



مقاله علمی-پژوهشی

بهینه‌یابی تولید نانوذله کیتوزان-اسیدکافنیک حاوی اسانس آویشن شیرازی و نایسین و بررسی اثر نانوذله بهینه بر کیفیت پنیر

سفید ایرانی

سید محمد حسینی^۱، حمید توکلی پور^{۱*}، محسن مختاریان^۲، محمد آرمین^۳

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

۳- گروه کشاورزی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۵/۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۴

کلمات کلیدی:

آویشن شیرازی؛

بهینه‌یابی؛

پنیر سفید ایرانی؛

رگرسیون گام به گام؛

نانوذله کیتوزان-اسیدکافنیک

DOI: 10.22034/FSCT.21.148.1.

مسئول مکاتبات: *

h.tavakolipour@gmail.com

این مطالعه با هدف بهینه‌یابی فرمولاسیون نانوذله کیتوزان-کافنیک اسید حاوی اسانس آویشن شیرازی (ZEO) و نایسین انجام شد. متغیرهای مستقل (غلظت نانوذله کیتوزان-اسیدکافنیک، آویشن شیرازی و نایسین) بر اساس بالاترین پتانسیل زتا و کارایی درون‌پوشانی، در کنار کمترین اندازه ذرات و مقادیر $IC_{50}(DPPH)$ (بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH) بهینه شدند. فرمولاسیون نانوذله بهینه مطابق نتایج طرح آزمایشی باکس-بنکن و مدل سطح پاسخ گام به گام عبارت است از: غلظت کیتوزان: ۰/۴ گرم؛ غلظت اسانس آویشن شیرازی: ۱۵۷/۱ ppm و نایسین: ۱۰/۱ ppm. اندازه ذرات، پتانسیل زتا، $IC_{50}(DPPH)$ و راندمان کپسولاسیون نانوذله کیتوزان حاوی ZEO و نایسین به ترتیب 411.39 ± 1.11 نانومتر، 1.10 ± 0.32 mV، 0.06 ± 0.09 mg.mL⁻¹ و 71.06 ± 82.69 ٪ بود. افزودن ZEO و نایسین (آزاد یا محصور شده در نانوذله کیتوزان) به فرمولاسیون پنیر سفید ایرانی، کیفیت میکروبی و فیزیکوشیمیایی پنیر را بهبود بخشید. فعالیت ضد میکروبی نانوذله کیتوزان حاوی ZEO و نایسین در مقایسه با فرم آزاد آن بیش تر بود. جمعیت کلی فرم پنی‌های تیمار شده با نیترات سدیم و نانوذله کیتوزان حاوی ZEO-نایسین طی ۶۰ روز نگهداری در محدوده قابل قبول بود. در طول مدت نگهداری، بیشترین تغییرات رنگ و بافت (سختی) نمونه پنیر مربوط به نمونه شاهد و کمترین تغییر مربوط به نمونه‌های تیمار شده با نیترات سدیم و نانوذله کیتوزان-ZEO-نایسین بود ($p < 0.05$). همچنین کیفیت حسی نمونه حاوی ZEO و نایسین برای ارزیابی حسی قابل قبول بود. نمونه حاوی نانوذله کیتوزان در مدت ۶۰ روز نگهداری نمره حسی قابل قبولی (بالای ۳) دریافت کرد. به طور کلی، نانوذله کیتوزان-ZEO-نایسین در افزایش ماندگاری پنیر سفید ایرانی جایگزین مناسبی برای نگهدارنده شیمیایی نیترات سدیم بود.

۱- مقدمه

پنیر یک محصول لبنی مغذی است که منبع ارزشمندی از پروتئین، ویتامین‌ها و مواد معدنی (به ویژه کلسیم و فسفر) است. با این حال، پنیرها به دلیل محتوای بالای رطوبت، پروتئین و چربی مستعد فساد میکروبی و شیمیایی هستند [۱]. افزودن مواد نگهدارنده از دیرباز یکی از ساده‌ترین روش‌های افزایش زمان ماندگاری پنیر بوده است. مواد ضد میکروبی متعددی همچون نیاسین، ناتامایسین، لیزوزیم، هیدروژن پراکسید، نیترات سدیم و پتاسیم و سوربات‌ها از مرسوم‌ترین نگهدارنده‌های پنیر هستند. با این حال، استفاده از ضد میکروبی‌های مصنوعی به عنوان نگهدارنده مواد غذایی به دلیل سمیت آن، به تدریج توسط مقررات ایمنی مواد غذایی محدود و مصرف بیش از حد توصیه شده، مضر تشخیص داده شده است [۲]. در میان نگهدارنده‌های مرسوم در صنعت لبنیات، نیاسین یک باکتریوسین کاتیونی با اثرات ضد میکروبی روی گروه‌های مختلف باکتری‌های گرم مثبت است که معمولاً به عنوان GRAS^۱ شناخته می‌شود [۳]. با این حال مطالعات انجام شده روی جوندگان، اثرات ژنوتوکسیک مصرف نیاسین و ناتامایسین را در غلظت‌های بالاتر از حد توصیه شده را نشان داده‌اند [۴]. بنابراین به دلیل نگرانی فزاینده مصرف‌کنندگان در مورد نگهدارنده‌های مصنوعی، جستجو برای افزودنی‌های ضد میکروبی جایگزین در حال افزایش است. از سوی دیگر از آنجایی که نیاسین ترکیب ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت است، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی دیگر در کنار نیاسین می‌تواند اثربخشی آن‌ها را تقویت سازد.

استفاده از اسانس‌ها به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در صنایع غذایی یکی از موضوعات مورد علاقه پژوهشگران علوم و صنایع غذایی در سال‌های اخیر بوده است. ترکیبات فنلی عمده‌تاً مسئول فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها هستند. در اسانس آویشن شیرازی، کارواکرول و تیمول فراوان‌ترین ترکیبات زیست فعال را تشکیل می‌دهند [۵، ۶]. اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم

مانند باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، ویروس‌ها و قارچ‌ها در پژوهش‌های پیشین گزارش شده است [۵-۷]. ترکیبات موثره نیاسین و اسانس‌ها می‌توانند با مواد غذایی واکنش داده یا تحت تأثیر شرایط محیط اثربخشی خود را از دست بدهند. همچنین اسانس‌ها عموماً ترکیباتی با بوی تند هستند که می‌توانند پذیرش حسی محصول را تحت تأثیر قرار دهند. برای غلبه بر این محدودیت‌ها، درون‌پوشانی مواد زیست‌فعال راه‌کار مناسبی است. نانوذله‌ها شبکه‌هایی هستند که ترکیبات زیست فعال را به دام می‌اندازند تا کارایی آن‌ها را در غلظت‌های پایین افزایش داده، پایداری و رهاسازی آن‌ها را بهبود بخشند [۸]. کیتوزان یک پلی ساکارید کاتیونی ضد میکروبی، سازگار با محیط زیست و نسبتاً ارزان است که به دلیل پتانسیل ضد میکروبی آن (به ویژه در برابر کلیفرم) و سودوموناس‌ها) می‌تواند ماندگاری پنیر را افزایش دهد. علاوه بر این، کیتوزان بر رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک در محصولات لبنی تأثیری ندارد. همچنین کیتوزان به دلیل ظرفیت قابل توجه تشکیل فیلم/پوشش می‌تواند به عنوان حاملی برای ترکیبات زیست فعال عمل کند [۹]. تغییرات شیمیایی در ساختار کیتوزان می‌تواند کاربری آن را بهبود بخشد. این کار می‌تواند از طریق گروه‌های واکنش‌پذیر آن (آمینو و هیدروکسیل) انجام شود. در میان ترکیبات مورد استفاده برای اصلاح ساختار کیتوزان، اسیدهای آلی مانند سینامیک اسید، گالیک اسید، کافئیک اسید، p-کوماریک و برخی از مشتقات آن‌ها گزینه‌های مناسبی هستند. زیرا علاوه بر فراوانی در طبیعت، شامل فعالیت‌های بیولوژیکی متعددی می‌شوند. این اسیدهای آلی می‌توانند میل ترکیبی کیتوزان را با مواد چربی‌دوست، مانند اسانس‌های روغنی را افزایش دهند و در نتیجه موادی با خواص ضد اکسایشی، ضد باکتریایی و ضد قارچی بهتری ایجاد کنند [۱۰، ۱۱].

برای رسیدن به بهترین ریزره کیتوزان-اسیدکافئیک حاوی اسانس آویشن شیرازی-نیاسین بهینه‌سازی غلظت ترکیبات

مجللی (تهران، ایران) و (Darmstadt, Merck, آلمان) و Sigma Chemicals (Sigma-Aldrich Chemical Co St. Louis, آمریکا) تهیه شد.

۲-۲- استخراج اسانس آویشن شیرازی *Zataria multiflora* (ZEO)

اسانس گیاه آویشن شیرازی به کمک کلونجر در مدت زمان ۳ ساعت استخراج شد. مهم‌ترین ترکیبات این اسانس شامل تیمول (۶۷۱٪)، کارواکرول (۱۸۳٪)، پاراسیمین (۸۵٪) و گاماترپنین (۸۳٪) بودند که توسط GC-MS (Perkin Elmer (PE) Auto System XL, USA) تشخیص داده شد. اسانس به کمک Na_2SO_4 آبگیری و در محیط تاریک و خنک نگهداری شد [۱۳].

۲-۳- آماده‌سازی نایسین

محلول استوک نایسین با انحلال ۱ گرم نایسین (Sigma-Aldrich, USA) در ۱۰۰ mL محلول اسید کلریدریک (۶۱٪ $\text{pH} = ۰.۰۲ \text{ N}$) به دست آمد (۱.۰^4 IU.g^{-1}). این محلول با فیلتر $۰.۴۵ \mu\text{m}$ فیلتر شد. غلظت‌های کم‌تر با افزودن آب مقطر تهیه شد [۱۰].

۲-۴- تهیه نانوزل کیتوزان-اسیدکافئیک

کافئیک اسید (CA) با تشکیل پیوندهای آمیدی از طریق EDC و HOBt به کیتوزان متصل شد. در ابتدا ۰/۵ کیتوزان در ۵۰ محلول اسید استیک ۲ درصد (v/v) با HOBt (۱/۶ گرم، $۷/۸۳ \text{ mmol}$) تحت هم زدن مغناطیسی (۵۰۰ دور در دقیقه، $۲۵ \pm ۵^\circ\text{C}$) حل شد. محلول EDC (۱/۵۱ گرم، $۷/۸۳ \text{ mmol}$) و اسید کافئیک (۱/۴۱ گرم، $۷/۸۳ \text{ mmol}$) در ۲ mL اتانول حل شد. این محلول به آرامی با سمپلر و تحت هم زدن مغناطیسی با دور ۲۵۰ rpm به محلول کیتوزان افزوده و هم زدن برای ۲۴ ساعت ادامه یافت. محلول تحت فراصوت (vCLEAN1 – L3 Ultrasonic Cleaner، تهران، ایران) با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز، به مدت ۵ دقیقه و در دمای اتاق قرار گرفت. pH محلول با استفاده از هیدروکسید سدیم ۱ مولار به منظور رسوب نانوزل روی ۹/۰-۸/۵ تنظیم شد. این ترکیب در

ضروری به نظر می‌رسد. روش سطح پاسخ^۲ (RSM) یک مدل چند بعدی غیر خطی برای درک رابطه غیر خطی بین متغیرهای مختلف است [۱۲]. بررسی پیشینه پژوهش نشان داد که تاکنون مطالعه‌ای در مورد درون‌پوشانی همزمان اسانس آویشن شیرازی و نایسین در نانوزل کیتوزان-اسیدکافئیک مشاهده نشده است. بنابراین، در مطالعه حاضر، نسبت نانوزل کیتوزان-اسید کافئیک، اسانس آویشن شیرازی (ZEO) و نایسین به منظور رسیدن به ذره‌ای با حداقل اندازه ذرات، بالاترین راندمان درون‌پوشانی، مهار رادیکال‌های آزاد و پتانسیل زتا بهینه شدند. در فاز دوم نیز اثر ترکیب بهینه اسانس آویشن شیرازی و نایسین به شکل آزاد و درون‌پوشانی شده بر خواص فیزیکوشیمیایی، حسی و میکروبی پنیر سفید ایرانی طی نگهداری در یخچال مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش

۲-۱- مواد

حدود ۵ کیلوگرم از اندام هوایی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) از شهرستان جهرم (استان فارس، ایران) در شهریور ۱۴۰۱ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در سایه ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) تا رطوبت ۱۰ درصد خشک شدند. نمونه خشک شده آسیاب شد (KRUPS GVX231 Expert Burr Grinder, Distrito Federal, Mexico)، از یک الک ۴۰ عبور داده شد و در یک بطری تیره نگهداری شد.

کیتوزان با جرم مولی کم (CS) (درجه‌استیلاسیون ۷۵-۸۵٪ و $190000-50000 \text{ Da}$)، کافئیک اسید (CA: ۹۸٪)، ۱-اتیل-۳-دی‌متیل‌آمینوپروپیل‌کربودی‌ایمید^۳ (EDC: ۹۷٪) به عنوان عامل پیوند دهنده^۴ و محیط کشت میکروبی از شرکت Merck آلمان تهیه شد. ۱-هیدروکسی بنزوتیرازول^۵ (HOBt: ۹۸٪) از شرکت Fluka (Bush SG، سوئیس) تهیه شد. استارت پنیر نیز شامل *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* و *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* بود و از شرکت Danisco Deutschland (GmbH Alemanha، آلمان) تهیه شد. دیگر مواد شیمیایی نیز با درجه آزمایشگاهی و از شرکت دکتر

5-1- hydroxy benzotriazole
6-Thymol (46.11); Carvacrol (18.32 %), p-Cymene (9.85 %) and γ -Terpinene (8.33 %)

2-Response surface method
3-1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
4-Coupling agent

دور rpm ۶۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سائتریفیوژ شد. نانوذله رسوب‌شده با آب مقطر و اتانول شسته شد تا و ناخالصی‌ها حذف شود. نانوذله در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت با خشک‌کن انجمادی (ساخته شده دانشگاه شیراز، ایران) خشک شد [۱۱].

۵-۲- درون‌پوشانی اسانس آویشن شیرازی و نایسین در ساختار نانوذله کیتوزان-اسیدکافئیک

اسانس آویشن شیرازی و نایسین به طور همزمان توسط نانوذله CS-CA محصور شدند. غلظت‌های مختلف نانوذله CS-CA (۰/۱، ۰/۲۵ و ۰/۴ گرم) در ۱۰ میلی‌لیتر محلول اسیدی (۰/۱-۳/۵ pH) تحت هم‌زدن مغناطیسی در دمای اتاق حل شد. غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی (۲۵۰، ۵۰ ppm) و در اتانول (۱:۱w/v) تهیه شد. محلول اسانس با محلول نانوذله CS-CA ترکیب شد. غلظت‌های مختلف نایسین (۲، ۷ و ۱۲ ppm) نیز قطره قطره به محلول حاصل اضافه شد. مخلوط‌های حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق در حمام فراصوت (vCLEAN1 – L3 Ultrasonic Cleaner، تهران، ایران) با فرکانس ۴۰ کیلوهرتز قرار گرفت. برای رسوب نانوذله کیتوزان-حاوی ZEO و نایسین، pH بین ۹-۸/۵ تنظیم و مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C نگهداری شد. در ترکیب دو فاز شده حاصل، مایع رویی دور ریخته شد و نانوذله‌های کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی و نایسین (TCZN) به کمک خشک‌کن انجمادی خشک شدند [۱۱]. طرح آزمایشی باکس-بنکن^۷ برای بررسی تأثیر متغیرهای مستقل (غلظت نانوذله کیتوزان، اسانس آویشن شیرازی و نایسین) بر متغیرهای وابسته (کارایی درون‌پوشانی، توانایی جذب رادیکال

آزاد DPPH، اندازه ذره و پتانسیل زتا) اعمال شد. طرح آزمایشی شامل ۱۵ اجرا بود (جدول ۱). متغیرهای مستقل برای دستیابی به بالاترین کارایی درون‌پوشانی و پتانسیل زتا، همچنین کم‌ترین میزان آنتی‌اکسیدان برای مهار رادیکال آزاد DPPH و اندازه ذره و بهینه شدن داده‌های تجربی در یک مدل رگرسیون گام به گام برای جلوگیری از مشکل چند خطی برازش داده شدند. چند خطی زمانی رخ می‌دهد که دو یا چند متغیر مستقل در یک معادله رگرسیون چندگانه همبستگی داشته باشند و باعث افزایش خطای ضرایب استاندارد شوند [۱۴].

۶-۲- خصوصیات نانوذله

۱-۶-۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی (ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH^۸) به روش اسپکتروفتومتری (Shimadzu 2501 UV spectrophotometer، توکیو، ژاپن) محاسبه شد. مقدار IC₅₀ (% غلظت بازدارندگی) با تجزیه و تحلیل رگرسیون خطی مقادیر RSC محاسبه شد [۱۵].

۲-۶-۲- کارایی درون‌پوشانی^۹ نانوذله‌های کیتوزان

کارایی درون‌پوشانی برای نایسین (EE_{Nisin}) و اسانس آویشن شیرازی (EE_{ZEO}) به ترتیب با آزمایش انتشار آگار بر اساس *Listeria innocua* (ATCC 33090) به عنوان میکروارگانیسم شاخص [۱۶] و آنالیز وزن‌سنجی^{۱۰} [۱۷] محاسبه شد.

۳-۶-۲- اندازه ذرات و پتانسیل زتا

اندازه ذرات و پتانسیل زتا نانوذله بهینه با کمک پراکندگی نور پویا^{۱۱} (DLS instrument, SZ-100 HORIBA، ژاپن) اندازه‌گیری شد.

Table 1. Box-Behnken experimental design with process variables and experimental results of various chitosan nanogels containing Shirazi thyme and nisin

Runs	ZEO ppm	Nisin ppm	Chitosan (g)	Particle Size (nm)	Zeta Potential (mV)	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	EE _{ZEO} (%)	EE _{Nisin} (%)
1	50	7	0.1	389	30.20	1.38	66.62	61.84
2	50	2	0.25	392	31.40	1.18	80.98	58.33
3	50	12	0.25	374	34.50	1.17	84.96	65.82
4	50	7	0.4	385	37.20	1.14	87.90	68.81

10-Gravimetric analysis
11-Dynamic light scattering

7- Box-Behnken
8- 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
9-Encapsulation efficiency

5	150	2	0.1	468	25.00	0.95	71.06	59.16
6	150	12	0.1	421	28.10	1.09	69.11	63.20
7	150	7	0.25	415	30.10	0.81	83.18	68.16
8	150	2	0.4	438	27.80	0.77	88.03	67.12
9	150	12	0.4	422	29.16	0.78	86.49	76.23
10	250	7	0.1	481	25.60	0.87	68.11	68.11
11	250	2	0.25	487	27.16	0.71	77.05	61.28
12	250	12	0.25	461	27.80	0.74	74.34	72.42
13	250	7	0.4	471	32.20	0.71	82.81	73.11
14	150	7	0.25	423	30.40	0.76	81.60	67.12
15	150	7	0.25	413	31.03	0.78	82.21	69.29

EE_{nisin}: encapsulation efficiency of nisin; EE_{ZEO}: encapsulation efficiency of *Zataria multiflora*

مدت ۸ ساعت در آب نمک (۲۰w/w) در دمای اتاق (°C)

۲۵±۵) قرار داده شدند. پس از این مدت از آب نمک خارج، قطعات پنیر با ابعاد مشخص (۵ × ۵ × ۱۰ cm) در ظرف استریل حاوی ۸٪ وزنی آب نمک و ماده نگهدارنده قرار داده شد. نمونه‌های پنیر بسته‌بندی شد و در دمای ۴ °C به مدت ۶۰ روز نگهداری شدند.

۲-۹-۲- ویژگی‌های پنیر

۲-۹-۱- ویژگی‌های میکروبی پنیر

تعداد کل مزوفیل زنده (TMC)^{۱۲}، میزان کپک و مخمر^{۱۳} (YMC) و کلیفرم‌ها مطابق روش‌های مطرح شده در استاندارد اندازه‌گیری شدند [۲۱-۲۳]. تمام نتایج میکروبیولوژیکی بر حسب واحد لگاریتم تشکیل کلنی در هر گرم (log₁₀ CFU/g) بیان شد.

۲-۹-۲- محتوای بازهای ازته فرار (TVB-N)

محتوای TVB-N نمونه‌ها بر اساس تکنیک تقطیر با بخار و توسط دستگاه کلدال نوع (PECO, Kjeltex PDU-500)، شیراز، ایران) تعیین شد. این شاخص بر حسب میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم نمونه (mg N/100g⁻¹) نمونه گزارش شد [۲۴].

۲-۹-۳- بافت پنیر

سختی پنیرها با کمک تحلیل‌گر بافت (Brookfield Engineering Laboratories Inc. Middleboro, MA, USA) انجام شد [۲۵].

۲-۹-۴- ویژگی‌های حسی پنیر

۳۰ ارزیاب حسی نیمه آموزش (۱۷ زن و ۱۳ مرد) دیده از

۲-۷- بهینه‌سازی و اعتبارسنجی مدل

برای یافتن متغیرهای مستقل معنادار از روش تحلیل واریانس (ANOVA) استفاده شد. کفایت مدل از نظر آزمون عدم برازش، ضریب تعیین (R^2)، ضریب تعیین تعدیل‌شده ($R^2(\text{adj})$)، ضریب تعیین پیش‌بینی‌شده ($R^2(\text{pred})$)، خطای استاندارد (S) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. یک مدل مناسب را می‌توان بر اساس اصول زیر معرفی کرد: (الف) مقدار بالای ضریب تعیین (مدل ضعیف: $R^2 < 0.50$ ؛ مدل متوسط: $0.50 < R^2 < 0.70$ ؛ مدل خوب: $0.70 < R^2 < 0.90$ و مدل عالی: $R^2 > 0.90$)؛ (ب) خطای استاندارد (S) پایین و (ج) تفاوت کوچک بین $R^2(\text{adj})$ و $R^2(\text{pred})$ [۱۸]. تمامی مراحل در نرم افزار Minitab (نسخه ۲۰، Minitab Inc، آمریکا) انجام شد.

۲-۸- تهیه پنیر

پنیر سفید ایرانی با استفاده از شیر گاو پاستوریزه (۲/۵ درصد چربی) و بر اساس کشت اولیه ۰/۵ w/v و ۲ mL مایه پنیر میکروبی تولید شد [۱۹]. تیمارهای آزمایشی به شرح زیر بودند: T_{CO}: پنیرهای تولید شده بدون افزودن مواد نگهدارنده. T_{CZN} - پنیرهای تولید شده با افزودن نانوزل کیتوزان بهینه (۰/۴ گرم) حاوی ZEO و نایسین (۱۵۷/۱ ppm اسانس آویشن شیرازی و ۱۰/۱ نایسین). T_{FZN}: پنیرهای تولید شده با افزودن ۱۵۷/۱ ppm اسانس آویشن شیرازی و ۱۰/۱ نایسینو T_S: پنیرهای تولید شده با افزودن نترات سدیم (۳۵ پی پی ام؛ بر اساس INSO-11832) [۲۰]. پنیرهای تهیه شده به

دانشجویان و کارکنان بخش علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار (سن بین ۲۴ تا ۵۱ سال) برای بررسی ویژگی‌های حسی محصول انتخاب شدند. ارزیاب‌ها بر اساس ویژگی‌های زیر انتخاب شدند: مصرف‌کننده پنی‌رسفید ایرانی، عدم استعمال دخانیات، در دسترس بودن و علاقه به شرکت در آزمون. برای تأیید ویژگی‌های حسی از مقیاس هدونیک پنج نقطه‌ای (۵ عالی و ۱ بسیار بد) استفاده شد. مصرف‌کنندگان بافت و ظاهر، رنگ، طعم و بوی محصول را مورد ارزیابی قرار دادند. طعم، نرمی و بو/عطر را ارزیابی کردند [۲۶]. پذیرش کلی نمونه‌ها نیز بر اساس میانگین وزنی امتیاز سایر ویژگی‌های مورد بررسی (ضرایب برای طعم، بو، بافت و رنگ به ترتیب ۴، ۳، ۲ و ۱ در نظر گرفته شد) برآورد شد [۲۷].

۱۰-۲- آنالیز آماری

کلیه آزمایش‌های انجام شده روی پنیر سفید ایرانی در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین و انحراف از استاندارد ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) ثبت شد. تجزیه و تحلیل آماری بر اساس آنالیز واریانس مدل خطی عمومی (GLM) انجام شد. تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌ها با آزمون توکی ($p < 0.05$) بررسی شد. محاسبات آماری در نرم‌افزار مینی‌تب (ورژن ۱۸، State College، آمریکا) انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۱-۳- اندازه ذره و پتانسیل زتا

اندازه ذرات و پتانسیل زتا نانوذله‌های حاوی اسانس آویشن شیرازی و در جدول ۱ مشخص است. همان‌طور که مشخص است اندازه ذرات نانوذله حاوی اسانس آویشن شیرازی و نایسین بین ۳۷۴ (اجرای ۳: اسانس آویشن شیرازی: ۱۵۰ ppm؛ نایسین: ۱۲ ppm و نانوذله کیتوزان: ۰/۲۵ g) تا ۴۸۷ (اجرای ۱۱: اسانس آویشن شیرازی: ۲۵۰ ppm؛ نایسین: ۲ ppm و نانوذله کیتوزان: ۰/۲۵ g) نانومتر متغیر بود. این داده‌ها با نتایج گزارش شده برای نانوذله کیتوزان-اسید دی هیدرو-کافئیک حاوی اسانس *Matricaria recutita* (331.5 ± 81.3 نانومتر) قابل مقایسه است [۱۱]. بررسی عوامل مؤثر بر اندازه ذرات نشان داد (جدول ۲)، غلظت نایسین و اسانس آویشن شیرازی به طور معنی‌داری بر اندازه ذره نانوذله‌های زیست فعال مورد مطالعه،

اثر دارد. با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی اندازه ذرات بزرگ‌تر می‌شود، در حالی که افزایش سطح غلظت نایسین موجب کاهش اندازه ذره است. احتمالاً افزایش میانگین اندازه ذرات نانوذله به دلیل افزایش غلظت اسانس به دلیل بازآرایی ساختار نانوذله و تشکیل یک ناحیه آبگریز برای تعامل بیش‌تر با اسانس است [۱۱، ۲۸]. معادله رگرسیونی برآورد اندازه ذرات توانست حدود ۹۰ درصد تغییرات اندازه ذره نانوذله طراحی شده را پیش‌بینی کند.

پتانسیل زتا مربوط به نانوذله‌های مختلف نیز بین ۲۵ mV (اجرای ۵: اسانس آویشن شیرازی: ۱۵۰ ppm؛ نایسین: ۲ و نانوذله کیتوزان: ۰/۱) تا ۳۷.۲ (اجرای ۴: اسانس آویشن شیرازی: ۵۰ ppm؛ نایسین: ۷ ppm و نانوذله کیتوزان: ۰/۴) متغیر بود (جدول ۱). پتانسیل زتا با پایداری فیزیکی-شیمیایی و رفتار مواد در محیط‌هایی با بار الکتریکی مرتبط است. مقادیر پتانسیل زتا بیشتر از ۳۰ mV (در یک ماژول) به دلیل نیروهای مدول دافعه ای که مانع تجمع ذرات آنها می‌شود، پایداری هستند [۴، ۱۰]. نانوذله کیتوزان آویشن شیرازی-نایسین دارای بار مثبت بود که به وجود گروه‌های آمینه آزاد در سطح نانوذله مربوط است. نتیجه با نتایج به دست آمده برای نانوذله کیتوزان-اسید دی هیدروکافئیک حاوی اسانس *Matricaria arecutita* (+ ۳۵/۲۰ mV) قابل مقایسه بود [۱۱]. مدل رگرسیونی برآورد پتانسیل زتا نشان داد که غلظت اسانس آویشن شیرازی؛ نایسین، کیتوزان و اثرات درجه دوم آویشن و نایسین به طور معنی‌داری بر پیش‌بینی این شاخص مؤثر بودند. بیش‌ترین اثر بخشی مثبت مربوط به غلظت کیتوزان بود (ضریب ۲/۱۷۹). کیتوزان در محیط دارای بار مثبت است و طبیعی است با افزایش غلظت کیتوزان شاهد افزایش پتانسیل زتا باشیم [۱۰]. اما اثر غلظت آویشن و مربع غلظت نایسین به طور معنی‌داری باعث کاهش پتانسیل زتا شده است که می‌تواند به دلیل کاهش بار مثبت در محیط باشد [۱۱]. معادله درجه دوم طراحی شده برای پیش‌بینی این شاخص قدرت متوسطی در پیش‌بینی پتانسیل زتا داشت.

۲-۳- شاخص بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوذله‌های کیتوزان-کافئیک اسید حاوی

(عملکرد عالی) را برآورد کند.

۳-۳- کارایی درون پوشانی

کارایی درون پوشانی اسانس آویشن برای ذرات نانوزل زیست فعال طراحی شده بین ۶۴/۶۲ درصد (اجرای ۱: اسانس آویشن شیرازی: ۵۰ ppm؛ نایسین: ۷ ppm و نانوزل کیتوزان: ۱۰/۱۰) تا ۸۷/۰۳ (اجرای ۸: اسانس آویشن شیرازی: ۱۵۰ ppm؛ نایسین: ۲ ppm و نانوزل کیتوزان: ۰/۴ g) متغیر بود (جدول ۱). این نتایج با آنچه برای نانوزل کیتوزان-سینامیک اسید حاوی *Syzygium aromaticum* ($89/0 \pm 4/0$ %)، کیتوزان-سینامیک اسید حاوی *Cinnamomum ssp.* ($74/0 \pm 3/0$ %) [۱۰] و کیتوزان-دی هیدروکافئیک اسید حاوی اسانس *Matricaria recutita* (۶۱/۲۳ درصد) قابل مقایسه بود [۱۱]. تفاوت بین نتایج پژوهش های مختلف به نوع و غلظت متفاوت مواد اولیه، روش و شرایط درون پوشانی وابسته است.

اسانس آویشن شیرازی و نایسین بر اساس IC_{50} در جدول ۱ مشخص شده است. مقدار این شاخص بین ۰/۷۱ mg/mL (اجرای ۱۱ و ۱۳: اسانس آویشن شیرازی: ۲۵۰ ppm؛ نایسین: ۲ ppm یا ۷ و نانوزل کیتوزان: ۰/۴ g یا ۰/۲۵) تا ۱/۳۸ (اجرای ۱: اسانس آویشن شیرازی: ۵۰ ppm؛ نایسین: ۷ ppm و نانوزل کیتوزان: ۰/۱ g) بود. بررسی اثر متغیرهای مستقل بر شاخص فعالیت آنتی اکسیدانی نتایج نشان داد با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی و کیتوزان، مقدار IC_{50} کاهش می یابد و به این ترتیب فعالیت آنتی اکسیدانی نانوزل افزایش می یابد. فعالیت آنتی اکسیدانی این نانوزل ها می تواند ناشی از منوترپن ها و ترکیبات فنلی اسانس آویشن شیرازی است. همچنین کافئیک اسید موجود در نانوزل می تواند فعالیت آنتی اکسیدانی داشته باشد، بنابراین با افزایش غلظت نانوزل کیتوزان میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نیز افزایش یافت [۲۹-۳۱]. مدل رگرسیون گام به گام تعریف شده برای پیش بینی شاخص فعالیت آنتی اکسیدانی، توانست بیش از ۹۰ درصد تغییرات این شاخص

Table 2. Stepwise response surface regression: analysis of variance, coded coefficient, model equations and Models summary for evaluation of quality properties of various chitosan nanogels containing Shirazi thyme and nisin

Parameter	Model (p-value)	Lack of fit	Coded coefficient (p-value)	Model summary			
				S	R ²	R ² (adj)	R ² (pred)
Particle size	0.000	0.190 ⁿ _s	Constant: 429.33 (0.000) Z: 45.00 (0.002) N: -13.38 (0.004)	10.63	92.86 %	91.67 %	89.96%
	Equation		Particle size= 380.56+0.45Z-2.675N Constant: 29.93 (0.000) Z: -2.567 (0.001) N: 1.029 (0.072) C: 2.179 (0.002) Z ² : 1.814 (0.037) N ² : -1.963 (0.027)				
Zeta potentiate	0.00	0.083 ⁿ _s	N: 1.029 (0.072) C: 2.179 (0.002) Z ² : 1.814 (0.037) N ² : -1.963 (0.027)	1.428	87.44 %	80.46 %	61.15%
	Equation		Zeta potential (Mv) = 28.94 - 0.0801 Z + 1.305 N + 14.53 C + 0.000181 Z ² - 0.0785 N ² Constant: 0.7937 (0.000) Z: -0.2317 (0.000) C: -0.111 (0.05) Z ² : 0.1489 (0.000) C ² : 0.0930 (0.001)				
IC ₅₀	0.000	0.183 ^{ns}	C: -0.111 (0.05) Z ² : 0.1489 (0.000) C ² : 0.0930 (0.001)	0.040	97.51 %	96.52 %	94.33%
	Equation		IC ₅₀ = 9197 - 0.006783 Z - 2.808 C + 0.000015 Z ² + 4.135 C ² Constant: 81.118 (0.000) Z: -2.267 (0.008) C: 8.792 (0.000) Z ² : -2.626 (0.025) C ² : -3.290 (0.008) ZC: -1.645 (0.114)				
EE _{ZEO}	0.000	0.134 ^{ns}	C: 8.792 (0.000) Z ² : -2.626 (0.025) C ² : -3.290 (0.008) ZC: -1.645 (0.114)	1.88	95.85 %	93.54 %	82.61%
	Equation		EE _{ZEO} = 51.71 + 0.0835 Z + 148.2 C - 0.000263 Z ² - 146.2 C ² - 0.1097 ZC Constant: 68.05 (0.000) Z: 2.52 (0.003) N: 3.97 (0.000)				
EE _{Nisin}	0.000	0.244 ^{ns}	Z: 2.52 (0.003) N: 3.97 (0.000)	1.87	90.65 %	86.91 %	76.58%

C: 4.125 (0.000)

N²: -5.44 (0.022)

Equation

EE_{Nisin} = 46.70 + 0.02524 Z + 2.260 N + 27.50 C - 0.1047 N²EE_{Nisin}: encapsulation efficiency of nisin; EE_{ZEO}: encapsulation efficiency of *Zataria multiflora*Stepwise Selection of Terms: α to enter = 0.15, α to remove = 0.15S: the standard deviation of the distance between the data values and the fitted values; R²: coefficient of determination; R²(adj): adjusted coefficient of determination; R²(pred): predicted coefficient of determination

۹۳/۳ - ۸۰/۵ [۳۲]، در پلی الکترولیت پکتین-کیتوزان حدود

۶۵/۹ [۳۳] و در نانوذرات کیتوزان حدود ۶۷/۳۲ [۳۴]٪

گزارش شد. بررسی نتایج مربوط به متغیر مدل‌سازی این شاخص نیز نشان داد، غلظت کیتوزان، آویشن و نایسین به طور معنی‌داری بر کارایی درون‌پوشانی نایسین اثر مستقیم دارند. معادله رگرسیونی طراحی شده قادر بود بیش از ۷۶ درصد از تغییرات درصد کارایی درون‌پوشانی نایسین را به کمک متغیرهای مستقل برآورد سازد که حاکی از عملکرد متوسط-خوب مدل است.

۴-۳- بهینه‌سازی و تأیید مدل

متغیرهای مستقل به صورت عددی بهینه شدند و نتایج نشان داد که در غلظت ۰/۴ g نانوذله، ۱۵۷/۱ ppm اسانس آویشن شیرازی و ۱۰/۱ ppm نایسین بهترین نانوذله زیست فعال تشکیل می‌شود (جدول ۳). بررسی ویژگی‌های نانوذله بهینه حاوی اسانس آویشن و نایسین نشان داد که بر اساس آزمون t تک نمونه‌ای، تفاوت معنی‌داری بین مقادیر پیش‌بینی شده و تجربی وجود ندارد و تغییرات بین مقادیر ویژگی‌های مورد بررسی کمتر از ۱۰٪ بود. بنابراین، مناسب بودن رگرسیون‌های گام به گام در برآورد پاسخ‌ها قابل تأیید است.

در میان متغیرهای مستقل مورد بررسی غلظت اسانس آویشن شیرازی و نانوذله کیتوزان (اثر ساده و مربع آن) به طور معنی‌داری بر میزان کارایی درون‌پوشانی اسانس آویشن شیرازی مؤثر بوده است. افزایش غلظت کیتوزان به طور معنی‌داری باعث افزایش کارایی درون‌پوشانی اسانس آویشن شیرازی می‌شود در حالی که با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی شانس درون‌پوشانی کامل اسانس کاهش می‌یابد (جدول ۲). با کاهش غلظت ماده هسته یا افزایش غلظت ماده دیواره، از میزان ترکیبات زیست فعال درون‌پوشانی نشده کاسته می‌شود و کارایی درون‌پوشانی افزایش می‌یابد [۸]. مدل رگرسیون گام به گام طراحی شده برای برآورد این شاخص، عملکرد خوبی را نشان داد.

کارایی درون‌پوشانی نایسین توسط نانوذله‌های کیتوزان-کافئیک اسید نیز بین ۵۸/۳۱ درصد (اجرای ۲: اسانس آویشن شیرازی: ۵۰ ppm؛ نایسین: ۲ ppm و نانوذله کیتوزان: ۰/۲۵٪) تا ۷۶/۳۹ (اجرای ۹: اسانس آویشن شیرازی: ۱۵۰ ppm؛ نایسین: ۱۲ و نانوذله کیتوزان: ۰/۴٪) بود (جدول ۱). میزان کارایی درون‌پوشانی شده نایسین در نانوکریستال سلولز باکتریایی بین

Table 3. The t-test conducted to compare the predicted and actual experimental response values and optimized condition for preparation chitosan nanogels containing Shirazi thyme and nisin

Response	Goal	Fitted value	SE Fit	experimental value	% Variation	Mean difference	Significance Two-tailed (p-value)
PS	Minimum	424.27	3.60	411.39 ±18.11	-0.68	12.88	-1.23 (0.343) ^{Ns}
ZP	Maximum	31.82	0.81	32.90±1.10	+3.28	1.08	1.70 (0.231) ^{Ns}
IC ₅₀	Minimum	0.76	0.02	0.79±0.06	+3.79	0.03	0.87 (0.478) ^{Ns}
EE _{Nisin}	Maximum	73.81	0.93	71.06±2.66	-3.87	2.75	-1.79 (0.215) ^{Ns}
EE _{ZEO}	Maximum	87.33	1.06	82.69±3.12	-5.61	4.64	-2.58 (0.123) ^{Ns}
Multiple Response Prediction (optimized condition)							
Chitosan nanogel		ZEO		Nisin		Composite Desirability	
0.4 g		157.1 ppm		10.1 ppm		0.69	

Ns: not significant difference (P > 0.05); *: Significant difference (P < 0.05)

PS: Particle size (nm); ZP: Zeta potential (mV); EE_{Nisin}: encapsulation efficiency of nisin (%); EE_{ZEO}: encapsulation efficiency of *Zataria multiflora* (%)Stepwise Selection of Terms: α to enter = 0.15, α to remove = 0.15

۴-۵-۳- ویژگی‌های میکروبی

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، سطح کپک و مخمر

۴-۵-۳- تأثیر نانوذله کیتوزان حاوی اسانس شیرازی و

نایسین بر ویژگی‌های پنیر سفید ایرانی

قبل قبول کلیفرم برای پنیروالیه پنی و پنی رسیده به ترتیب Log CFU/g ۳ و ۱ بود [۳۵]. بنابراین، تنها نمونه‌های TCZN و T_s در پایان نگهداری در بازه‌ی استاندارد قرار داشتند. به این ترتیب، نانوزل کیتوزان حاوی آویشن شیرازی و نایسین می‌تواند جایگزین مناسبی برای نگهدارنده‌های شیمیایی مانند نیترات سدیم باشد.

مطابق جدول ۴ میزان باکتری‌های مزوفیل کل طی ۳۰ روز نگهداری تغییر معنی داری نشان نداد. با این حال، روند افزایشی TMC در نمونه‌های TCO و T_{FZN} مشاهده شد، در حالی که در دو نمونه دیگر، سطح TMC طی ۳۰ روز نگهداری کاهش یافت. در روز ۶۰ نگهداری، سطح TMC در همه نمونه‌ها روند افزایشی را نشان داد، اما این افزایش در نمونه شاهد بیش از دو برابر نمونه TCZN بود. ترکیبات زیست فعال چربی دوست (مانند کارواکرو و تیمول) اسانس‌ها نفوذپذیری دیواره سلول را تغییر می‌دهند و باعث از بین رفتن یون‌ها و اجزای سیتوپلاسمی می‌شوند و بر سنتز ATP تأثیر می‌گذارند [۵].

۲-۵-۳- شاخص بازهای ازته فرار (TVB-N)

همان‌طور که در جدول ۴ مشخص است، شاخص بازهای ازته فرار در روز نخست نگهداری حدود 0.25 mg N/100 g بود که با گذشت زمان در تمام نمونه‌ها به طور معنی داری افزایش یافت. در روز ۶۰ نگهداری میزان این شاخص در نمونه‌ی شاهد به طور معنی داری بیش‌تر از سایر نمونه‌ها بود. مقایسه بین سه پنی تیمار شده نیز نشان داد که میزان شاخص TVB-N در دو نمونه T_s و TCZN به طور معنی داری کم‌تر از نمونه‌ی T_{FZN} است ($p < 0.05$). بازهای ازته فرار ترکیبی از تری‌متیل آمین^{۱۴} (TMA)، دی‌متیل آمین^{۱۵} (DMA)، آمونیاک و سایر ترکیبات ازته فرار هستند. دی‌متیل آمین به طور کلی توسط آنزیم‌های درون‌زا و تری‌متیل آمین توسط آنزیم‌های باکتریایی تولید می‌شود. بنابراین، نتایج محتوای TVB-N پ با بار میکروبی محصول رابطه دارد. از آنجایی که در مقیاس صنعتی، اندازه‌گیری بار میکروبی زمان‌بر است، مقدار TVB-N می‌تواند شاخصی برای برآورد سریع کیفیت میکروبی

(YMC) نمونه‌های پنی در روز اول نگهداری Log CFU/g $2.79 - 2.70$ بود. طبق استاندارد INSO-2406 ، حد آستانه سطح YMC برای پنی اولیه مقدار کم‌تر از 3 Log CFU/g است [۳۵]. بنابراین میزان YMC همه نمونه‌ها در حد قابل قبول بود. مقایسه نمونه‌های مختلف پنی نشان داد که سطح کپک و مخمر در نمونه‌های TCZN (2.29 Log CFU/g) و T_s (2.34 Log CFU/g) به طور معنی دار کم‌تر از نمونه شاهد ($2.70 \text{ Log CFU.g}^{-1}$) بود ($p < 0.05$). همچنین تفاوت بین T_{FZN} با سایر نمونه‌های تیمار شده و با نمونه شاهد سطح ۵ درصد معنی دار نبود ($p > 0.05$). در روز ۶۰ نگهداری، اگرچه سطح YMC نمونه‌ها کمتر از روز اول ذخیره سازی بود، اما به طور معنی داری بیشتر از روز ۳۰ ام نگهداری بود. در پایان زمان نگهداری تفاوت بین نمونه‌های تیمار شده و نمونه شاهد معنی داری بود ($p < 0.05$). در پنی سفید ایرانی رسیده در آب نمک، حد قابل قبول برای میزان سطح کپک و مخمر 2 Log CFU/g است [۳۵]. با توجه به این استاندارد، در روز ۳۰ ام نگهداری، همه نمونه‌ها در محدوده استاندارد قرار دارند، اما در روز ۶۰ نگهداری، تنها نمونه TCZN در محدوده قابل قبول قرار داشت. تیمول و کارواکرو جزء اصلی اسانس آویشن شیرازی هستند. این ترکیبات در برابر مخمرهایی مانند *ساکاروهایسس سروزیه* و قارچ‌های رشته‌ای مانند *آسپرژیلوس* فعالیت بازدارنده نشان می‌دهند [۳۶، ۵]. اگرچه مطالعات نشان داده است که نایسین روی قارچ‌های رشته‌ای، مخمرها و باکتری‌های گرم منفی کم اثر یا حتی بی‌اثر است. با این حال، اثر سینرژیک میکروبی نایسین و اسانس‌های گیاهی در مطالعات قبلی گزارش شده است [۳۷، ۳۸]. اثر ضد میکروبی بالاتر نمونه کپسوله شده (TCZN) در مقایسه با نمونه آزاد (T_{FZN}) نیز می‌تواند به اثر محافظتی فرآیند درون‌پوشانی روی ترکیبات زیست‌فعال و همچنین اثر ضد میکروبی کیتوزان و کافئیک اسید مربوط باشد [۸].

کلیفرم‌ها: در طول دوره نگهداری، سطح کلیفرم تمامی نمونه‌ها روند کاهشی را نشان داد ($p < 0.05$). پس از ۶۰ روز نگهداری، کلیفرمی در نمونه TCZN و T_s شناسایی نشد. حد

فرآورده‌های پروتئینی باشد [۱۸]. اثر اسانس-نایسین (به شکل آزاد و درون‌پوشانی) و نیترات سدیم به خواص ضد میکروبی آن‌ها مرتبط است (بخش ۱-۵-۳).

۳.۵.۳ سختی بافت

میزان سختی نمونه‌های پنیر طی ۶۰ روز نگهداری نیز در جدول ۴ نشان داده شده است. در روز اول نگهداری سختی پنیرها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. در طی ۶۰ روز نگهداری از سختی نمونه‌ها به طور معنی‌داری کاسته شد. با این حال، تغییرات بافت نمونه‌های تیمار شده در مقایسه با تیمار شاهد، بیش‌تر بود. در روز ۶۰ نگهداری، میزان سختی نمونه‌های پنیر T_{CZN} و T_s به طور معنی‌داری بیش‌تر از دو نمونه دیگر بود. تغییرات بافتی کم‌تر در نمونه‌های پنیر تیمار شده احتمالاً ناشی از بار میکروبی کم‌تر این نمونه‌ها بود. میکروارگانیسم‌ها با تخریب بافت پروتئینی پنیر موجب نرمی پنیر می‌شوند. Esparvarini و همکاران (۲۰۲۲) نیز پوشش‌های خوراکی حاوی اسانس زیره را در کنترل تغییرات بافتی پنیر مؤثر دانستند [۳۹].

۴-۵-۳ مؤلفه‌های رنگی پنیر

در روز نخست نگهداری تفاوت معنی‌داری بین شاخص‌های رنگی (L^* ، a^* و b^*) نمونه‌ها دیده نشد (جدول ۴). بعد از ۳۰ روز نگهداری به طور معنی‌داری از روشنایی نمونه‌ها کاسته شد که این تغییر در نمونه شاهد بیش‌تر بود ($p < 0.05$).

شاخص a^* در تمام نمونه‌ها افزایش یافت. این افزایش در نمونه شاهد و T_s معنی‌دار بود ($p < 0.05$). شاخص b^* نیز افزایش معنی‌داری را نشان داد (به جز در T_{CZN}). در روز ۶۰ نگهداری شاخص L^* نمونه شاهد نسبت به روز ۳۰ افزایش داشت، در سایر نمونه‌ها روند این تغییر کاهش بود ($p < 0.05$). بیش‌ترین میزان شاخص L^* در روز پیلانی نگهداری در نمونه‌های T_s و T_{CZN} بود. کم‌ترین میزان این شاخص نیز در نمونه T_{FZN} بود. شاخص a^* و b^* تمام نمونه‌ها نسبت به روز ۳۰ افزایش داشت. این افزایش در نمونه شاهد معنی‌دار بود.

از آن‌جایی که مولفه‌های رنگی می‌توانند روی یکدیگر اثر داشته باشند، برآورد شاخص تغییرات رنگی نسبت به نمونه‌ی شاهد می‌تواند مقایسه بهتری بین تیمارها و زمان‌های مختلف ارائه کند. بررسی شاخص ΔE نشان داد اگرچه در روز نخست نگهداری اختلاف معنی‌داری بین رنگ نمونه شاهد با سایر نمونه‌ها وجود داشت، اما این اختلاف کم‌تر از ۳ بود و با چشم قابل مشاهده نبود. این اختلاف رنگ می‌تواند ناشی از رنگ مواد افزودنی باشد. با گذشت زمان، شاخص ΔE در تمام نمونه‌ها افزایش معنی‌داری را نشان داد. بیش‌ترین تغییرات رنگی مربوط به نمونه شاهد و کم‌ترین آن مربوط به T_s و T_{CZN} بود. تغییرات رنگی بیش‌تر در نمونه‌ی شاهد را می‌توان ناشی از اکسایش، فعالیت آنزیم‌ها و میکروارگانیسم‌ها دانست [۳۹].

Table 4 Effect of the combination of nisin and Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) essential oil on physicochemical and microbial properties of Iranian white cheese during 60 days of cold storage.

Storage time (days)	Treatment			
	T_{Co}	T_{FZN}	T_{CZN}	T_s
<i>Yeasts and molds count (Log CFU/g)</i>				
0	2.70±0.05 ^A	2.58±0.02 ^{AB}	2.29±0.05 ^{BCD}	2.34±0.12 ^{BCD}
30	1.80±0.04 ^{FG}	1.69±0.09 ^{GH}	1.32±0.28 ^I	1.46±0.15 ^{HI}
60	2.47±0.01 ^{ABC}	2.17±0.10 ^{CDE}	1.84±0.06 ^{EFG}	2.04±0.04 ^{DEF}
<i>Coliforms (Log CFU/g)</i>				
0	3.14±0.03 ^A	3.01±0.04 ^A	2.81±0.05 ^B	2.63±0.06 ^{BC}
30	2.66±0.03 ^{BC}	2.59±0.04 ^C	2.07±0.10 ^E	2.40±0.05 ^D
60	2.35±0.10 ^D	2.12±0.10 ^E	0.00 ^F	0.00 ^F
<i>Total viable mesophilic counts (Log CFU/g)</i>				
0	1.84±0.06 ^{CDE}	1.76±0.09 ^{DEF}	1.60±0.12 ^{EF}	1.59±0.26 ^{EF}
30	2.10±0.07 ^{CD}	1.86±0.03 ^{CDE}	1.32±0.25 ^F	1.46±0.15 ^{EF}
60	4.25±0.07 ^A	2.79±0.10 ^B	2.10±0.17 ^{CD}	2.26±0.24 ^C
<i>TVB-N (mg N/100g)</i>				
0	0.25±0.03 ^F	0.26±0.01 ^F	0.25±0.01 ^F	0.26±0.01 ^F
30	0.68±0.02 ^D	0.59±0.03 ^E	0.53±0.03 ^E	0.53±0.01 ^E
60	1.08±0.02 ^A	0.90±0.02 ^B	0.83±0.04 ^C	0.81±0.03 ^C

Hardness (N)				
0	6.56±0.46 ^A	6.50±0.35 ^A	6.54±0.28 ^A	6.49±0.32 ^A
30	2.72±0.19 ^C	3.29±0.19 ^B	3.80±0.22 ^B	3.82±0.14 ^B
60	1.27±0.10 ^D	1.52±0.09 ^D	2.79±0.06 ^C	2.62±0.13 ^C
L*				
0	81.96±0.51 ^A	82.03±0.45 ^A	82.30±0.32 ^A	81.80±0.58 ^A
30	70.46±0.22 ^F	78.64±1.05 ^{BC}	79.59±0.08 ^B	79.59±0.08 ^B
60	76.46±0.32 ^D	72.09±0.36 ^E	78.05±0.61 ^C	78.70±0.10 ^{BC}
a*				
0	5.94±0.21 ^F	6.47±0.46 ^{EF}	6.78±0.26 ^{DEF}	6.09±0.16 ^F
30	7.51±0.02 ^{BCD}	7.25.11 ^{BCDE}	7.40±0.27 ^{BCD}	7.05±0.27 ^{CDE}
60	8.85±0.31 ^A	8.04±0.47 ^{AB}	7.86±0.11 ^{BC}	7.42±0.42 ^{BCD}
b*				
0	11.84±0.43 ^F	12.32±0.98 ^F	12.94±0.55 ^{EF}	11.86±0.21 ^F
30	15.43±0.29 ^{BC}	14.67±0.10 ^{BCD}	13.91±0.20 ^{DE}	13.90±0.20 ^{DE}
60	17.80±0.10 ^A	15.77±0.49 ^B	14.33±0.27 ^{CD}	14.40±0.30 ^{CD}
ΔE				
0	0.00±0.00 ^I	1.40±0.09 ^{GH}	1.76±0.20 ^G	0.64±0.52 ^{HI}
30	11.57±0.29 ^A	4.15±0.62 ^D	3.09±0.07 ^{EF}	2.92±0.29 ^F
60	8.20±0.35 ^C	10.28±0.41 ^B	4.59±0.30 ^D	3.97±0.33 ^{DE}

*Each value represents the mean ± SD of triplicate experiments

Different capital letter for each factor indicated significant differences between various times or treatments ($P < 0.05$).

T_{CO}: Cheeses produced without the addition of preservative; T_{CZN}: Cheeses produced with the addition of optimal chitosan nanogel containing ZEO and nisin (based on 0.4 g chitosan, 157.1 ppm ZEO and nisin at 10.1 ppm); T_{FZN}: Cheeses produced with the addition of 157.1 ppm ZEO and nisin at 10.1 ppm and T_S: Cheeses produced with the addition of sodium nitrate (35 ppm; based on INSO-11832)

۵-۳- ویژگی‌های حسی پنیر سفید ایرانی

نبود. اما امتیاز رنگ نمونه شاهد به طور معنی‌داری کمتر از دو

نمونه T_S و T_{CZN} بود. در روز پایانی نگهداری تفاوت معنی‌داری بین امتیاز رنگ در نمونه‌های مختلف دیده نشد. تفاوت رنگ نمونه‌های مختلف در روز ۳۰ و ۶۰ نگهداری نیز با یکدیگر معنی‌دار نبود. این نتایج نیز با آنچه در مورد تغییرات رنگی پنیر عنوان شد هم‌خوانی دارد. پذیرش کلی نمونه‌ها در روز نخست نگهداری بالاتر از ۴/۶ بود و تمام نمونه‌ها کیفیت عالی داشتند. در روز ۳۰ نگهداری امتیاز نمونه T_{CZN} تفاوت معنی‌داری با روز صفر این نمونه نداشت. مقایسه نمونه‌های مختلف در روز ۳۰ نشان داد که امتیاز دو نمونه T_S و T_{CZN} بالاتر از خوب (بزرگتر از ۴) بود و تفاوت این دو نمونه با نمونه شاهد و T_{FZN} در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. در روز پیلانی نگهداری به طور معنی‌داری از امتیاز پذیرش کلی همه نمونه‌ها کاسته شد. در پایان زمان نگهداری تنها نمونه T_{CZN} توانست امتیاز بالای ۳ بگیرد. تفاوت این نمونه با سایر نمونه‌ها نیز در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. کم‌ترین امتیاز نیز مربوط به نمونه شاهد (۱/۶۱) بود. در مجموع می‌توان گفت نانوژل کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی و نایسین می‌تواند جایگزین مناسبی برای نگهدارنده شیمیایی سدیم نترات باشد و اثر منفی بر ویژگی‌های حسی پنیر سفید ایرانی ندارد.

در روز نخست نگهداری هیچ تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های مختلف دیده نشد (شکل ۱). در روز ۳۰ نگهداری طعم و بوی نمونه‌های T_S و T_{CZN} نسبت به روز نخست تفاوت معنی‌داری نداشت. اما از امتیاز نمونه‌های T_{FCN} و نمونه شاهد به طور معنی‌داری کاسته شد. تا روز ۳۰ نگهداری امتیاز طعم و بو برای تمام نمونه‌ها بالاتر از ۳ بود. امتیاز طعم در روز پیلانی نگهداری در تمام نمونه‌ها به طور معنی‌داری کمتر از روز ۳۰ بود. پژوهش‌های پیشین نشان داده است که بوی اسانس‌های گیاهی از جمله مریم گلی، آویشن، رزماری، گریپ‌فروت، پرتقال و لیمو تأثیر منفی بر طعم و بوی پنیر ندارد [۲]. در روز ۳۰ نگهداری امتیاز بافت نمونه‌های تیمار شده تفاوت معنی‌داری با یکدیگر و با روز نخست نداشت. تنها امتیاز نمونه شاهد در این روز به طور معنی‌داری کمتر از روز نخست بود. در روز ۶۰ نگهداری می‌توان گفت تقریباً هیچ کدام از نمونه‌ها امتیاز قابل قبولی را برای بافت کسب نکرده‌اند. این نتایج با آنچه پیش‌تر در مورد بافت پنیر (سختی) گزارش شد هم‌راستا بود. در روز ۳۰ نگهداری تفاوت رنگ در نمونه‌های T_{CZN} و T_S تفاوتی با روز نخست نگهداری نداشت. در این روز تفاوت بین رنگ نمونه‌های تیمار شده نیز در سطح ۵ درصد معنی‌دار

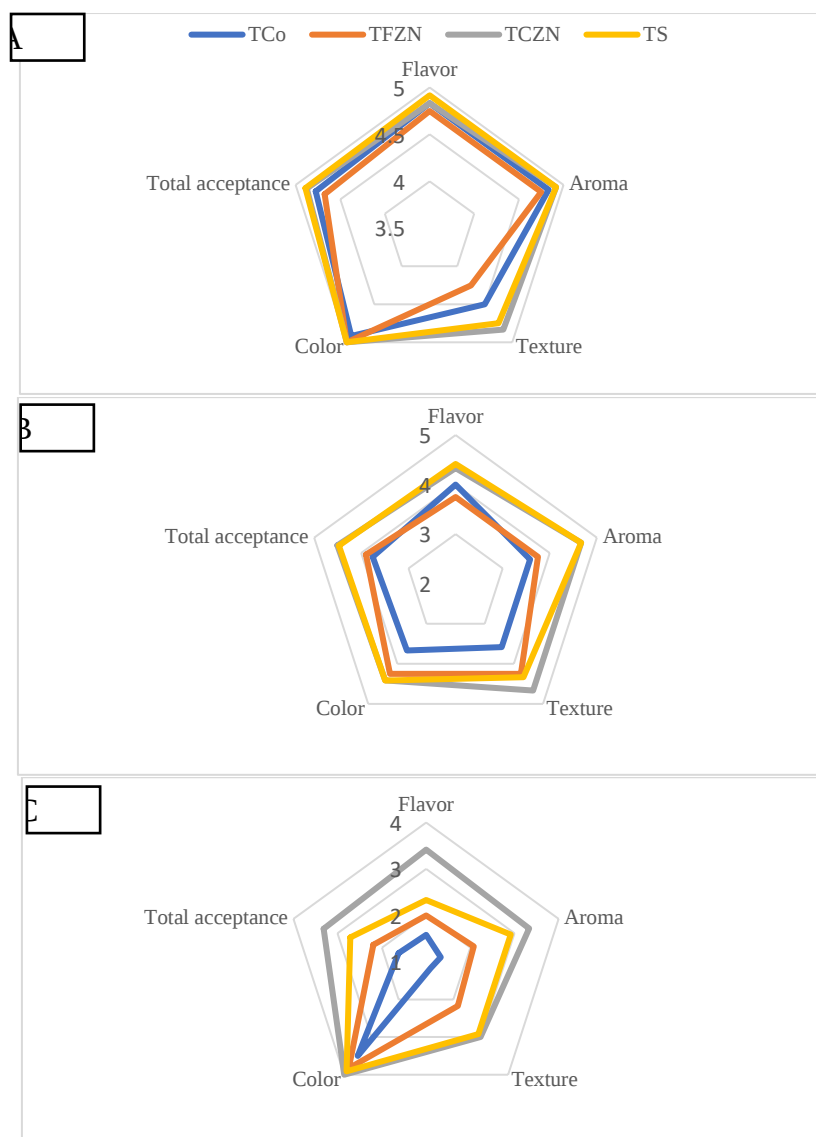


Fig 1. Effect of the combination of nisin and Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) essential oil on the sensory properties of Iranian white cheese on A) 1st day; B) 30th day and C) 60th day of cold storage;

T_{Co}: Cheeses produced without the addition of preservative; T_{CZN}: Cheeses produced with the addition of optimal chitosan nanogel containing ZEO and nisin (based on 0.4 g chitosan, 157.1 ppm ZEO and nisin at 10.1 ppm); T_{FZN}: Cheeses produced with the addition of 157.1 ppm ZEO and nisin at 10.1 ppm and T_S: Cheeses produced with the addition of sodium nitrate (35 ppm; based on INSO-11832)

اسانس آویشن شیرازی و نایسین در مقدار بهینه شده به حالت

نانوذله و آزاد توانست رشد میکروبی در پنیر را کنترل کند. همچنین روند تغییرات بافت و رنگ در پنیر را نیز کاهش دهد. افزودن اسانس آویشن-شیرازی-نایسین تأثیر منفی بر کیفیت حسی پنیر سفید ایرانی نداشت و اثر نانوذله در افزایش ماندگاری پنیر سفید با نیترات سدیم قابل رقابت بود. به نظر می‌رسد درون‌پوشانی همزمان اسانس‌های گیاهی و باکتریوسین‌ها در نانوذله کیتوزان-کافئیک اسید بتواند یک جایگزین طبیعی برای نگهدارنده‌های شیمیایی باشد.

۴- نتیجه‌گیری

طرح آزمایشی باکس-بنکن مدل سطح پاسخ گام به گام توانست به طور مناسبی غلظت نانوذله کیتوزان، اسانس آویشن شیرازی و نایسین را بهینه‌سازی کند. نانوذله بهینه شامل ۰/۴ گرم نانوذله کیتوزان، ۱۵۷/۱ ppm اسانس آویشن شیرازی و ۱۰/۱ ppm نایسین بود. این نانوذله اندازه ذره‌ای حدود ۴۱۱/۳۹ نانومتر، پتانسیل زتا ۳۲/۹۰ mV، قدرت مهار رادیکال آزاد بر اساس شاخص IC₅₀ حدود ۰/۷۹ mg/mL، کارایی درون‌پوشانی نایسین ۷۱/۰۶ درصد و کارایی درون‌پوشانی اسانس آویشن شیرازی ۸۲/۶۹ درصد را نشان داد. استفاده از

۵- منابع

- [1] Resa, C.P.O., R.J. Jagus, and L.N. Gerschenson, (2014), Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces. *Food Control*, 35(1): p. 101-108.
- [2] de Campos, A.C.L.P., et al., (2022), Antimicrobial effect of *Origanum vulgare* (L.) essential oil as an alternative for conventional additives in the Minas cheese manufacture. *LWT*, 157: p. 113063.
- [3] Özel, B., Ö. Şimşek, M. Akçelik, and P.E. Saris, (2018), Innovative approaches to nisin production. *Applied microbiology and biotechnology*, 102: p. 6299-6307.
- [4] González-Solís, J.L., J.C. Martínez-Espinosa, L.A. Torres-González, A. Aguilar-Lemarroy, L.F. Jave-Suárez, and P. Palomares-Anda, (2014), Cervical cancer detection based on serum sample Raman spectroscopy. *Lasers in medical science*, 29: p. 979-985.
- [5] Youseftabar-Miri, N., N. Sedaghat, and S. Khoshnoudi-Nia, (2021), Effect of active edible coating on quality properties of green-raisin and ranking the samples using fuzzy approach. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15: p. 46-58.
- [6] Raeisi, M., H. Tajik, J. Aliakbarlu, S.H. Mirhosseini, and S.M.H. Hosseini, (2015), Effect of carboxymethyl cellulose-based coatings incorporated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and grape seed extract on the shelf life of rainbow trout fillets. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2): p. 898-904.
- [7] Saffari Samani, E., H. Jooyandeh, and B. Alizadeh Behbahani, (2023), The impact of Zedo gum based edible coating containing *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the quality enhancement and shelf life improvement of fresh buffalo meat. *Journal of Food Measurement and Characterization*: p. 1-13.
- [8] Sharif, N., S. Khoshnoudi-Nia, and S.M. Jafari, (2020), Nano/microencapsulation of anthocyanins; a systematic review and meta-analysis. *Food Research International*, 132: p. 109077.
- [9] Iqbal, M.W., et al., (2021), Chitosan-based materials as edible coating of cheese: A review. *Starch-Stärke*, 73(11-12): p. 2100088.
- [10] de Carvalho, S.Y.B., et al., (2021), Encapsulation of essential oils using cinnamic acid grafted chitosan nanogel: Preparation, characterization and antifungal activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166: p. 902-912.
- [11] Torres, K.G., R.R. Almeida, S.Y. de Carvalho, J.F. Haddad, A.A. Leita, and L.G.d.L. Guimaraes, (2020), Synthesis and characterization of dihydrocaffeic acid grafted chitosan nanogel for nanoencapsulation of *Matricaria recutita* essential oil. *Materials Today Communications*, 24: p. 101252.
- [12] Li, B.-x., W.-c. Wang, X.-p. Zhang, D.-x. Zhang, W. Mu, and F. Liu, (2017), Integrating uniform design and response surface methodology to optimize thiacloprid suspension. *Scientific Reports*, 7(1): p. 46018.
- [13] Mokhtarian, M., A. Kalbasi-Ashtari, and H.-W. Xiao, (2022), Effects of solar drying operation equipped with a finned and double-pass heat collector on energy utilization, essential oil extraction and bio-active compounds of peppermint (*Mentha Piperita* L.). *Drying Technology*, 40(5): p. 897-923.
- [14] Daoud, J.I. *Multicollinearity and regression analysis*. in *Journal of Physics: Conference Series*. 2017. IOP Publishing.
- [15] Koleva, I.I., T.A. Van Beek, J.P. Linssen, A.d. Groot, and L.N. Evstatieva, (2002), Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 13(1): p. 8-17.
- [16] Wolf, C. and W. Gibbons, (1996), Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *Journal of applied bacteriology*, 80(4): p. 453-457.
- [17] Damasceno, E.T.S., et al., (2018), *Lippia origanoides* Kunth. essential oil loaded in nanogel based on the chitosan and *p*-coumaric acid: Encapsulation efficiency and antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 125: p. 85-94.
- [18] Moosavi-Nasab, M. and S. Khoshnoudi-Nia, (2021), Combining knowledge-and data-driven fuzzy approach to evaluate shelf-life of various seafood products. *Food Quality and Safety*, 5: p. fyab022.
- [19] Ehsani, A., M. Hashemi, S.S. Naghibi, S. Mohammadi, and S. Khalili Sadaghiani, (2016), Properties of *Bunium persicum* essential oil and its application in Iranian white cheese against *Listeria monocytogenes*

- and Escherichia coli O157: H7. *Journal of food safety*, 36(4): p. 563-570.
- [20] INSO, (2016) *Cheddar cheese: Specifications and test methods*, Iranian National Standardization Organization: Tehran: Iran. p. 6.
- [21] ISO, (2013) *Microbiology of the food chain- Horizontal method for the enumeration of microorganisms-Part 1: Colony count at 30° C by the pour plate technique.*, International Organization for Standardization
- [22] ISO, (2008) *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2 : Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95* International Organization for Standardization: London: London, UK.
- [23] ISO, (2006) *Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms – Most probable number technique.*, International Organization for Standardization Geneva, Switzerland. p. 1-11.
- [24] Lynch, J.M., et al., (2002), Determination of the total nitrogen content of hard, semihard, and processed cheese by the Kjeldahl method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 85(2): p. 445-455.
- [25] Bourne, M., *Food texture and viscosity: concept and measurement*. 2002: Elsevier.
- [26] Cunha, C.R., A.I. Dias, and W.H. Viotto, (2010), Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat. *Food Research International*, 43(3): p. 723-729.
- [27] Frøst, M.B., H. Heymann, W.L. Bredie, G.B. Dijksterhuis, and M. Martens, (2005), Sensory measurement of dynamic flavour intensity in ice cream with different fat levels and flavourings. *Food Quality and Preference*, 16(4): p. 305-314.
- [28] López-Meneses, A., et al., (2018), Schinus molle L. essential oil-loaded chitosan nanoparticles: Preparation, characterization, antifungal and anti-aflatoxigenic properties. *LWT*, 96: p. 597-603.
- [29] Bazargani-Gilani, B., J. Aliakbarlu, and H. Tajik, (2015), Effect of pomegranate juice dipping and chitosan coating enriched with Zataria multiflora Boiss essential oil on the shelf-life of chicken meat during refrigerated storage. *Innovative food science & emerging technologies*, 29: p. 280-287.
- [30] Damasceno, E.T., R.R. Almeida, S.Y. de Carvalho, S.S. Vieira, V. Mano, and L.G.d.L. Guimarães, (2020), Nano-encapsulation of lippia origanoides kunth. Essential oil by chitosan-caffeic acid nanogel. *Química Nova*, 43: p. 16-23.
- [31] Zhavah, S., et al., (2015), Encapsulation of Cuminum cyminum essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against Aspergillus flavus. *Industrial Crops and Products*, 69: p. 251-256.
- [32] Gedarawatte, S.T., J.T. Ravensdale, H. Al-Salami, G.A. Dykes, and R. Coorey, (2021), Antimicrobial efficacy of nisin-loaded bacterial cellulose nanocrystals against selected meat spoilage lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 251: p. 117096.
- [33] Wang, H., B. Yang, and H. Sun, (2017), Pectin-Chitosan polyelectrolyte complex nanoparticles for encapsulation and controlled release of nisin. *Am. J. Polym. Sci. Technol*, 3(5): p. 82.
- [34] Lee, E.H., I. Khan, and D.-H. Oh, (2018), Evaluation of the efficacy of nisin-loaded chitosan nanoparticles against foodborne pathogens in orange juice. *Journal of food science and technology*, 55: p. 1127-1133.
- [35] INSO, (2017) *Microbiology of milk and milk products –Specifications and test methods*, Iranian National Standardization Organization (INSO): Tehran, Iran.
- [36] Hashemi, M., A.M. Dastjerdi, S.H. Mirdehghan, A. Shakerardekani, and J.B. Golding, (2021), Incorporation of Zataria multiflora Boiss essential oil into gum Arabic edible coating to maintain the quality properties of fresh in-hull pistachio (Pistacia vera L.). *Food Packaging and Shelf life*, 30: p. 100724.
- [37] Abdollahzadeh, E., M. Rezaei, and H. Hosseini, (2014), Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control Listeria monocytogenes inoculated in minced fish meat. *Food control*, 35(1): p. 177-183.
- [38] Mavalizadeh, A., A. Fazlara, M. PourMahdi, and N. Bavarsad, (2022), The effect of separate and combined treatments of nisin, Rosmarinus officinalis essential oil (nanoemulsion and free form) and chitosan coating on the shelf life of refrigerated chicken fillets. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(6): p. 4497-4513.
- [39] Esparvarini, Z., B. Bazargani-Gilani, M. Pajohi-Alamoti, and A. Nourian, (2022), Gelatin-starch composite coating containing cucumber peel extract and cumin essential oil: Shelf life improvement of a cheese model. *Food Science & Nutrition*, 10(3): p. 964-978.



Scientific Research

Optimizing the preparation of chitosan-caffeic acid nanogel containing Shirazi thyme essential oil and nisin and investigating the effect of optimized nanogel on the quality of Iranian white cheese.

Seyed Mohammad Hosseini¹, Hamid Tavakolipour^{*1}, Mohsen Mokhtarian², Mohammad Armin³

1- Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

2- Department of Food Science and Technology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

3- Department of Agronomy, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received: 2023/7/26 Accepted: 2024/2/3 Keywords: Stepwise-response surface model; Optimization; Co-encapsulation; Chitosan-caffeic acid nanogel; Iranian white cheese; Shirazi thyme DOI: 10.22034/FSCT.21.148.1. *Corresponding Author E-Mail: h.tavakolipour@gmail.com	This study aimed to optimize the formulation of chitosan-caffeic acid nanogel containing Shirazi thyme (<i>Zataria multiflora</i>) essential oil (ZEO) and nisin. The independent variables (the concentration of chitosan nanogel, Shirazi-thyme, and nisin) were optimized based on the highest zeta potential and encapsulation efficiency, besides the lowest particle size and IC_{50}(DPPH) values. The results of The Box-Behnken experimental design and Stepwise-response surface model showed the optimal nanogel formulation was as follows: chitosan concentration= 0.4 g; ZEO= 157.1 ppm and nisin= 10.1 ppm. The particle size, zeta-potential, antioxidant activity, and encapsulation efficiency of the optimal chitosan-ZEO-nisin nanogel were 411.39 ± 18.11 nm, 32.90 ± 1.10 mV, 0.79 ± 0.06 mg.mL⁻¹, 71.06-82.69% respectively. Moreover, the addition of optimized nanogel to the Iranian white cheese formulation showed that the treated cheese samples with ZEO and nisin (free or encapsulated in chitosan nanogel) improved the microbial quality of chess. The antimicrobial activity of the ZEO and nisin encapsulated in chitosan-caffeic acid nanogel was higher than a free form of ZEO-nisin. The Coliforms population of cheeses treated with sodium nitrate and chitosan nanogel containing ZEO-nisin was acceptable during 60 days of storage. During the storage period, the most changes in the color and texture (hardness) of the cheese samples were related to the control sample, and the least change was obtained for samples treated with sodium-nitrate and chitosan nanogel ($P < 0.05$). Also, the sensory quality of the sample containing ZEO and nisin was acceptable for the sensory evaluator. The sample containing chitosan nanogel received an acceptable sensory score (>3) during 60 days of storage. In general, the potential of the nanogel in increasing the shelf-life of Iranian white cheese was comparable with sodium nitrate.