

## تهیه و ارزیابی بایو نانوکامپوزیت بر پایه نشاسته سیب زمینی / نانو خاک رس / اسانس نعناع فلفلی

سارا مظفریان<sup>۱</sup>، صاحبعلی منافی<sup>۲\*</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران

۲- دانشیار گروه مهندسی مواد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۰۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۸/۲۰)

### چکیده

در این تحقیق فیلم‌های بایو نانوکامپوزیت حاوی نشاسته سیب‌زمینی به عنوان پایه فیلم، تقویت شده با اسانس نعناع فلفلی و درصد ثابتی از نانو خاک رس عامل دار شده با استفاده از روش کاستینگ تهیه شد. ترکیب شامل ۳ g نشاسته سیب‌زمینی و ۰.۴٪ وزنی مخلوط گلیسرول و سوربیتول به نسبت ۳ به ۱ به عنوان پلاستی‌سایزر به همراه ۳٪ وزنی نانو خاک رس و اسانس نعناع فلفلی با غلظت‌های ۳۰-۱۰٪ حجمی بود. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسانس نعناع فلفلی ویژگی‌های فیزیکی شامل میزان حلالیت در آب، میزان جذب آب و محتوای رطوبت به صورت معنی داری ( $p < 0.05$ ) کاهش یافتند. نفوذپذیری نسبت به بخار آب از ۳/۰۳ تا ۷/۳۱ ( $\times 10^{-6}$  g/m.s.Pa) به صورت معنی داری ( $p < 0.05$ ) افزایش و نفوذپذیری به اکسیژن از ۶/۱۰ تا ۴/۸۹ ( $\text{cc-mil}/(\text{m}^2 \text{ day})$ ) کاهش معنی داری ( $p < 0.05$ ) داشت. آزمون‌های مکانیکی بیانگر آن بود که با افزایش غلظت اسانس نعناع فلفلی استحکام کششی از ۱۰/۰۵ تا ۷/۱۱ (MPa) و مدول ینگ از ۵۰۰/۰۹ تا ۲۰۰/۷۷ (MPa) کاهش معنی داری داشت و درصد کشیدگی از ۱۵/۰ تا ۳۶/۰٪ افزایش یافت. همچنین باعث افزایش میزان جذب و کاهش میزان عبور نور به ویژه در بازه UV (۲۰۰-۴۰۰ nm) گردید. فیلم‌ها خاصیت ضد میکروبی خوبی علیه باکتری استافیلوکوکوس آرتوس ATCC 25923 از طریق روش فلاسک چرخان از خود نشان دادند. بنابراین افزودن اسانس نعناع فلفلی و نانو خاک رس به فیلم‌های نشاسته سیب‌زمینی منجر به بهبود ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی و میزان جذب و عبور نور در ناحیه فرابنفش گردید و این بایو نانوکامپوزیت‌ها توانایی بالایی جهت کاربرد در بسته‌بندی‌های ضد میکروب دارا می‌باشند.

**کلید واژگان:** فیلم های بایو نانوکامپوزیت، اسانس نعناع فلفلی، نشاسته سیب زمینی، نانو خاک رس، خواص ضد میکروبی

\* مسئول مکاتبات: ali\_manafi2005@yahoo.com

## ۱- مقدمه

کامپوست به خاک باز می‌گردند [۶،۷]. دو ویژگی خاص نانورس که نقش مهمی در تولید نانوکامپوزیت‌ها ایفا می‌کنند شامل، باز شدن لایه‌ها از همدیگر و پراکنده شدن آن‌ها در ماتریس پلیمری و اصلاح سطح آن‌ها جهت برهم‌کنش بهتر بین ماتریس پلیمری و نانوذرات می‌باشد. تولید آسان و دسترسی راحت‌تر و سازگاری بیشتر با پلیمرهای زیستی از دیگر دلایلی است که باعث افزایش توجه و استفاده از نانورس‌ها در تولید نانوکامپوزیت‌های بیوپلیمری شده است [۸]. باید توجه داشت کاربرد مواد نگهدارنده شیمیایی دارای عوارض جانبی زیادی است، بنابراین امروزه گرایش زیادی به استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی وجود دارد. با توجه به این که اسانس گیاه نعناع فلفلی به علت وجود ترکیباتی نظیر منتول در اسانس گیاه در غلظت‌های نسبتاً پایین روی رشد باکتری‌های مولد فساد مواد غذایی بسیار مؤثر است، لذا استفاده از این اسانس در بسته‌بندی مواد غذایی به عنوان یک ترکیب ضد میکروب طبیعی به جای مواد نگهدارنده مصنوعی یک امر مفید و مؤثر به نظر می‌رسد [۹،۱۰]. در این تحقیق، اسانس نعناع فلفلی با غلظت‌های مختلف به بایو نانوکامپوزیت نشاسته سیب‌زمینی و نانوخاک رس افزوده شده و اثرات آن بر خواص فیزیکی، مکانیکی، ممانعتی، میزان جذب و عبور UV و ویژگی ضد میکروبی اسانس بکار رفته در فیلم علیه باکتری گرم منفی اشرشیاکلی و باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آرتوس مورد بررسی قرار گرفته است.

## ۲- مواد و روش‌ها

نشاسته سیب‌زمینی (رطوبت ۱۲٪) و نانو خاک رس از شرکت سیگما و اسانس نعناع فلفلی از شرکت ارسطو تهیه شد. گلیسرول و سوربیتول مایع از لیانگ Traco (در ناحیه پتنگ مالزی)، توئین، نیتريت منیزیم و کلرید کلسیم اشباع از مرک آلمان خریداری گردید. محیط کشت تریپتون براث، نوترینت براث و نوترینت آگار به همراه سایر مواد شیمیایی مورد نیاز از گرید آزمایشگاهی تهیه شد.

در چند دهه اخیر تقاضا برای پلیمرهای دوستدار محیط‌زیست در حال رشد است و بسته‌بندی‌های بادوام و زیست تخریب‌پذیر<sup>۱</sup> در سرتاسر جهان در حال توسعه است [۱]. پلیمرهای زیستی، تجزیه‌پذیر هستند که در آن‌ها حداقل یکی از مراحل در فرآیند تجزیه آن‌ها با متابولیسمی به وسیله میکروارگانیسم‌های طبیعی صورت می‌گیرد و از مواد قابل بازیافت تشکیل شده‌اند [۲]. در گروه مواد تجدید شدنی بر پایه مواد پلیمری زیست تخریب‌پذیر، نشاسته یکی از قابل توجه‌ترین مواد می‌باشد و به خاطر قیمت پایین آن و قابلیت زیست تخریب‌پذیری یکی از مواد خاصی است که برای بسته‌بندی مواد غذایی استفاده می‌شود [۳]. نشاسته به علت داشتن ماهیت پلیمری قابلیت فیلم سازی خوبی دارد ولی به دلیل دارا بودن برخی معایب نمی‌تواند به تنهایی فیلم مطلوبی تولید کند. خاصیت آبدوستی شدید نشاسته و مقاومت ضعیف فیلم در برابر رطوبت و همچنین خواص مکانیکی ضعیف آن در مقایسه با پلیمرهای سنتزی، مهم‌ترین معایب فیلم نشاسته می‌باشند که باعث محدود شدن استفاده از این بیوپلیمر در زمینه‌های مختلف می‌شود [۴]. به همین دلیل، در سال‌های اخیر استفاده از سایر بیوپلیمرها یا فیبرهای زیست تخریب‌پذیر در ترکیب با نشاسته، مورد توجه قرار گرفته است و به فیلم‌های حاصل، فیلم‌های بایوکامپوزیت اطلاق می‌شود. همچنین فناوری نانو، و به طور خاص نانومواد، راه حل‌های امیدوارکننده‌ای را برای حل برخی از موانع کارایی پلاستیک‌های زیستی با هدف بسته‌بندی مواد غذایی ارائه نموده است. از جمله این نانوذرات می‌توان به نانوذرات رس اشاره کرد که رایج‌ترین نانوذرات کاربردی هستند و حدود ۷۰ درصد از حجم بازار را تشکیل می‌دهند [۵]. زمانی که پلیمرهای زیستی نظیر نشاسته با ذرات نانورس ترکیب می‌شوند، نانوکامپوزیت‌هایی حاصل خواهند شد که خاصیت جلوگیری از عبور بهتری نسبت به پلیمر خالص نشان می‌دهند و بعد از پایان عمر مفیدشان، با تبدیل شدن به

### 1. Biodegradable

متاکریلات (با نام تجاری Plexiglass) با ابعاد  $16 \times 16 \text{ cm}^2$  و ضخامت  $2 \text{ mm}$  ریخته شد و حدود  $24 \text{ h}$  در شرایط آزمایشگاه (دمای  $25^\circ \text{C}$  و رطوبت نسبی  $50 \pm 5\%$ ) نگه داشته و سپس به مدت  $24$  ساعت دیگر در آن خشک کرده و فیلم‌های تهیه شده در دسیکاتور حاوی نیترات منیزیم اشباع به منظور تعادل رطوبتی قرار داده شد. نمونه‌های کنترل فاقد اسانس نیز تهیه شده و در همان شرایط نگهداری شدند. همه فیلم‌ها از جمله شاهد در دو نسخه تهیه گردیدند.

### ۲-۳- ضخامت فیلم<sup>۲</sup>

ضخامت هر یک از فیلم‌ها با ریزسنج مدل insize با قدرت تفکیک  $0.02 \text{ mm}$  به طور تصادفی در  $5$  موقعیت تعیین و میانگین آن‌ها برای محاسبه استفاده گردید.

### ۲-۴- حلالیت در آب<sup>۳</sup>

حلالیت فیلم‌ها در آب با توجه به روش Maizura و Laohakunjit با برخی تغییرات مشخص شد [۱۱، ۱۲]. نخست تکه‌هایی از هر فیلم ( $2 \times 3 \text{ cm}$ ) به میزان  $400$  تا  $600 \text{ mg}$  توزین شد و در دسیکاتور حاوی کلرید کلسیم ( $\text{RH} \%$ ) به مدت  $24 \text{ h}$  نگهداری شد. مجدداً نمونه‌ها با ترازو با دقت  $0.001 \text{ g}$  توزین شد، سپس فیلم‌ها به مدت  $1 \text{ h}$  درون  $4$  بشر  $100 \text{ ml}$  که  $80 \text{ ml}$  آب دیونیزه در آن ریخته شده بود، نگهداری شد و با فویل آلومینیومی روی بشرها پوشیده شد و در این بین هر  $20 \text{ min}$  نمونه‌ها هم زده شد. کاغذ صافی برای ثابت شدن وزن در آون در دمای  $40^\circ \text{C}$  به مدت  $2 \text{ h}$  قرار گرفت و سپس کاغذ صافی توزین شد و آن را روی قیف گذاشته و محلول روی آن ریخته شد، سپس کاغذ صافی همراه با فیلم،  $24 \text{ h}$  درون آون  $40^\circ \text{C}$  نگهداری شد و سپس مجدداً توزین شد. نمونه‌ها در  $3$  بار تکرار اندازه‌گیری شدند و درصد حلالیت طبق معادله ۱ محاسبه شد.

$$100 \times (\text{وزن اولیه فیلم} / \text{وزن فیلم حل شده}) = \text{درصد حلالیت}$$

## ۲-۱- باکتری‌های مورد استفاده و روش

### نگهداری آن‌ها

باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق اشرشیاکلی ATCC 25922 و استافیلوکوکوس آرنوس ATCC 25923 بوده که از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال غرب کشور تهیه گردیدند. باکتری‌ها بطور جداگانه در محیط کشت شیب‌دار نوترینت آگار کشت داده شده و در دمای  $4^\circ \text{C}$  نگهداری شدند. به منظور حفظ قابلیت زیستی باکتری‌ها، هر بیست روز کشت مجدد آن‌ها انجام گردید.

## ۲-۲- روش تهیه فیلم‌های حاوی اسانس نعنای

### فلفلی

فیلم بایو نانوکامپوزیت حاوی نشاسته سیب‌زمینی به عنوان پایه فیلم، تقویت شده با نانو خاک رس و اسانس نعنای فلفلی همراه با پلاستی‌سایزر، توئین و آب مقطر به روش کاستینگ تهیه شد. در ابتدا به علت حلالیت پایین نانو خاک رس عامل دار شده در آب،  $24 \text{ h}$  قبل از تهیه محلول مورد نظر  $3\%$  (از کل ماده جامد خشک) نانو خاک رس را در  $100 \text{ ml}$  آب مقطر در یک ارلن حل کرده، سپس  $3 \text{ g}$  نشاسته سیب‌زمینی و  $40\%$  (وزنی-وزنی) پلاستی‌سایزر را به محلول از قبل تهیه شده اضافه کرده و یک مگنت داخل ظرف گذاشته و روی ظرف به وسیله فویل پوشانده شد و آن را روی هیتر با دور حداکثر قرار داده و بعد از اینکه دما به  $85^\circ \text{C}$  رسید به مدت  $45 \text{ min}$  در همین دما جهت کامل شدن فرآیند ژلاتینه شدن نشاسته، آن را نگه داشته و سپس آن را به دمای  $40^\circ \text{C}$  رسانده و در این دما به میزان  $10\%$  حجمی اسانس، توئین و در نهایت اسانس نعنای فلفلی با نسبت‌های (۱۰، ۲۰ و  $30\%$  حجمی) به محلول اضافه کرده و مجدداً به مدت  $45 \text{ min}$  محلول را در همین دما نگه داشته و سپس تا دمای حدود  $40^\circ \text{C}$  آن را خنک کرده و مقدار  $92 \text{ g}$  (این میزان بستگی به غلظت محلول تهیه شده داشته تا بتواند سطح یکنواختی بر روی پلیت ایجاد کند) از آن روی صفحاتی از جنس پلی متیل

2. Thickness

3. solubility in water

۲-۵- قابلیت جذب آب<sup>۴</sup> (WAC)

ظرفیت جذب آب با توجه به روش Kiatkamjornwong و همکارانش بررسی شد [۱۳]. نخست تکه‌هایی از هر فیلم (cm)  $2 \times 3$  به میزان mg ۴۰۰ تا ۶۰۰ توزین شد و در دسیکاتور حاوی کلرید کلسیم (به منظور صفر شدن رطوبت) به مدت ۲۴ h نگهداری شد. مجدداً نمونه‌ها با ترازو با دقت ۰/۰۰۱ g توزین شد، سپس فیلم‌ها به مدت ۱ h درون ۴ بشر ۱۰۰ ml که ۸۰ ml آب دیونیزه در آن ریخته شده بود، نگهداری شد و با فویل آلومینیومی روی بشرها پوشیده شد و در این بین هر ۲۰ min نمونه‌ها هم زده شد. کاغذ صافی برای ثابت شدن وزن در آن در دمای °C ۴۰ به مدت ۲ h قرار گرفت و سپس کاغذ صافی توزین شد و آن را روی قیف گذاشته و محلول روی آن ریخته شد، سپس به منظور جذب رطوبت سطحی فیلم، دستمال حوله‌ای روی فیلم‌ها گذاشته و فیلم‌ها به همراه کاغذ صافی مجدداً توزین شدند و از طریق معادله ۲ میزان جذب آب بدست آمد.

وزن اولیه فیلم/وزن آب جذب شده = WAC

۲-۶- محتوای رطوبت<sup>۵</sup>

اندازه‌گیری میزان رطوبت با توجه به روش Ammala و همکارانش مشخص شد [۱۴]. پس از رسیدن فیلم‌ها به تعادل رطوبتی، نخست تکه‌هایی از هر فیلم (cm)  $2 \times 3$  به میزان mg ۴۰۰ تا ۶۰۰ توزین شد و در دسیکاتور حاوی کلرید کلسیم (به منظور صفر شدن رطوبت) قرار گرفت، سپس در آن با دمای °C ۳۰ به مدت ۲۴ h تا رسیدن به وزن ثابت حرارت داده شد. از میزان کاهش وزن نمونه‌ها ( $M_2$ )، نسبت به نمونه اولیه ( $M_1$ )، درصد رطوبت تعیین شد.

۲-۷- نفوذپذیری به بخار آب<sup>۶</sup> (WVP)

اصلاح روش کاپ گراومتریکی بر اساس ASTM E96-05 [۱۵] و روش یانگ و همکارانش برای تعیین میزان نفوذپذیری در فیلم‌ها استفاده شد [۱۶]. در این آزمون کاپ‌ها با آب پر شد و شکاف هوا حدود ۱/۵ cm بین سطح فیلم و آب بود. فیلم‌ها به اندازه دهانه کاپ بریده و به کمک پارافیلیم بر روی کاپ نگه داشته شد. در ابتدا وزن اولیه کاپ‌ها با ترازو با دقت ۰/۰۰۱ اندازه‌گیری شد و سپس درون دسیکاتور حاوی سیلیکاژل (خشک‌کن) که در دمای °C ۱۷۰ به مدت ۱ h در آن فعال شده بود، برای تولید رطوبت نسبی ۰٪ قرار گرفت. پس از آن هر دو ساعت یک بار نمونه‌ها توزین شد تا ۵ نقطه این روند ادامه داشت. سپس از نمودار وزن بدست آمده در مقابل زمان برای تعیین WVTR استفاده شد. شیب قسمت خطی این نمودار نشان دهنده مقدار حالت پایدار از نفوذ بخار آب در میان فیلم در هر واحد زمان (g/h) بود. WVP فیلم توسط ضرب کردن WVTR در ضخامت متوسط فیلم و تقسیم آن بر فشار بخار آب در سطح فیلم طبق معادله ۴ محاسبه شد.

$$WVP = WVTR \times t/A \times P_{\text{sat. water at } 25^\circ\text{C}}$$

۲-۸- نفوذپذیری به اکسیژن<sup>۷</sup> (OP)

اندازه‌گیری‌های نفوذپذیری به اکسیژن بر روی فیلم‌ها توسط MoconOxtran 2/21 (Minneapolis, USA) مجهز به یک سنسور کالریمتریکی (Coulox®) و نرم افزار نفوذپذیری WinPerm™ انجام شد. اندازه‌گیری‌ها با استفاده از روش استاندارد ASTM D3985-05 مورد ارزیابی قرار گرفتند [۱۷]. فیلم‌ها درون پوشش فویل آلومینیوم با یک فضای باز  $5 \text{ cm}^2$  روی یک سل دیفیوژن قرار داده شدند. آزمون در دمای °C ۲۵، فشار اتمسفری و رطوبت نسبی ۵۰٪ انجام گرفت و ۲۱٪ گاز اکسیژن به عنوان تست گاز استفاده شد. اکسیژن منتقل شده از میان فیلم‌ها با استفاده از حمل‌کننده گاز ( $\text{N}_2/\text{H}_2$ ) به سنسورهای کالریمتریکی عبور داده شد. حمل‌کننده خارجی هر یک ساعت یکبار برای رسیدن به حالت پایدار انتقال اکسیژن،

4. Water absorption capacity
5. Moisture uptake
6. Water vapour permeability

## 7. Oxygen permeability

تهیه شد، سپس تک کلنی از هر باکتری برداشته و کشت خطی روی محیط کشت Nutrient agar انجام داده تا باکتری فعال شود، پس از کشت آن را داخل انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ h گذاشته تا باکتری رشد کند و سپس آن را در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری کرده و از باکتری فعال شده توسط لوپ استریل تک کلنی برداشته و داخل لوله آزمایش حاوی محیط کشت مایع Nutrient broth قرار داده و آن را در انکوباتور در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ h نگهداری کرده تا باکتری در محیط مایع رشد کند، بعد از این زمان محلول داخل لوله آزمایش می‌بایست کدر و غیر شفاف شده باشد، سپس سل حاوی محیط broth Nutrient که باکتری در آن رشد کرده را در دستگاه قرار داده و جذب آن گرفته شد. بعد از این مرحله، ۸ قطعه ( $2 \times 1/5 \text{ cm}$ ) از هر فیلم بریده و زیر نور UV استریل کرده و درون ۱۰۰ ml محیط کشت Tryptone soy broth (TSB) قرار داده، سپس  $0/4 \text{ g}$  توئین ۸۰٪ استریل شده و ۱ cc از اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس آرتوس رشد یافته در محیط Nutrient broth را به محیط اضافه کرده و آن را داخل انکوباتور شیکردار در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و  $150 \text{ rpm}$  قرار داده و هر دو ساعت یک بار توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب آن گرفته شد.

## ۲-۱۲- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها به جز در مورد خواص مکانیکی که در ۵ مرتبه تکرار شد در سایر اندازه‌گیری‌ها در ۳ مرتبه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. از آزمون‌های تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه و توکی (یا دانکن) برای ویژگی‌های فیزیکی، ممانعتی، مکانیکی و سایر پارامترهای مختلف در میان انواع مختلف فیلم در سطح معنی‌دار ۵٪ به کار برده شد. تجزیه و تحلیل با استفاده از GraphPad Prism نسخه ۶، انجام شد.

اندازه‌گیری شد. ضریب نفوذپذیری در  $\text{cc-mil}/(\text{m}^2 \text{ day})$  بر اساس نرخ انتقال اکسیژن در حالت ثابت با در نظر گرفتن ضخامت فیلم محاسبه شد.

## ۲-۹- جذب و عبور UV

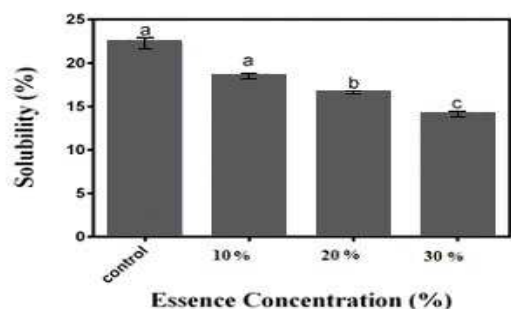
اندازه‌گیری میزان جذب و عبور UV با استفاده از روش محمدی نافچی و همکارانش تعیین شد [۱۸]. اشعه ماوراء بنفش مرئی برای هر دو طیف جذب و عبور برای فیلم‌های بایو نانوکامپوزیت (در ابعاد  $1 \times 5 \text{ cm}$ ) با استفاده از اسپکتوفتومتر مدل UV-Visible Unicam 8625 با به کارگیری هوا به عنوان شاهد از ۲۰۰ تا ۱۱۰۰ نانومتر ثبت شد.

## ۲-۱۰- خواص مکانیکی

از روش ASTM D882-10 با کمی تغییرات، جهت اندازه‌گیری ویژگی‌های مکانیکی تحت شرایط استاندارد استفاده شد [۱۹]. فیلم‌ها به طول ۱۰۰ mm و عرض ۲۰ mm بریده و به مدت ۴۸ h در دمای  $23^{\circ}\text{C}$  و رطوبت نسبی ۵۳٪ نگهداری شدند. دستگاه آنالیز بافت (TA.XT2, Stable MicroSystem, Surrey, UK) مجهز شده با نرم افزار Texture Exponent 32 به منظور اندازه‌گیری ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌ها بکار گرفته شد. فاصله اولیه بین دو فک و سرعت حرکت فک به ترتیب ۵۰ mm و  $1 \text{ mm/s}$  تعیین شد. افزایش طول تا نقطه شکست، مدول یانگ و مقاومت کششی، از تغییر شکل فیلم و نیروی داده شده ثبت شده توسط نرم افزار محاسبه شد. هر نمونه در ۵ بار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت.

## ۲-۱۱- خواص ضد میکروبی

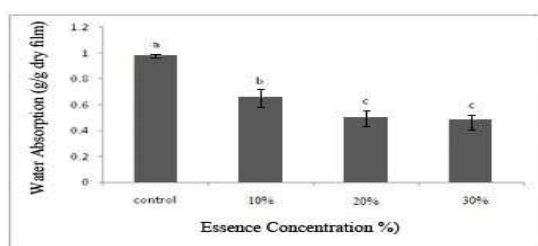
بررسی فعالیت ضد میکروبی بر روی فیلم‌ها با استفاده از روش جوکار و همکارانش انجام شد [۲۰]. در این روش از تست فلاسک برای تعیین فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها استفاده شد. باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس آرتوس از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال غرب کشور



**Fig 1** Effect of different percentage of mint essence on water solubility (%) of potato starch and nanoclay films. Values are means  $\pm$  SE (n = 5). Different letters are significantly different at ( $P < 0.05$ ).

### ۳-۳- بررسی میزان جذب آب

در شکل ۲، کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) WAC همزمان با افزایش غلظت اسانس نعناع فلفلی از ۰/۹۸ تا ۰/۴۶ (g/gdry film) قابل مشاهده است. جذب رطوبت به دلیل گروه‌های هیدروکسیل موجود در نشاسته می‌باشد که با آب پیوند برقرار می‌کنند. در این تحقیق با به کارگیری نانو خاک رس و افزودن اسانس در ماتریس پلیمر، گروه‌های هیدروکسیل قابل دسترس برای مولکول‌های آب کاهش پیدا می‌کنند، در نتیجه سبب کاهش خاصیت آبدوستی فیلم‌های نشاسته می‌شود و با نتایج صادق حسنی و زیا مطابقت داشته است [۲۳، ۲۴].



**Fig 2** Water absorption capacity of potato starch and nanoclay films and effects of mint essence on WAC of films in water. Values are means  $\pm$  SE (n = 5). Different letters are significantly different at ( $P < 0.05$ ).

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- بررسی ضخامت فیلم‌ها

فیلم‌های بایو نانوکامپوزیتی بدست آمده ضخامت کمی داشته و با اضافه کردن اسانس تغییر معنی‌داری نداشت. مطابق جدول ۱، ضخامت فیلم‌ها بین ۰/۱۴ تا ۰/۱۵ mm متغییر بوده و با افزایش غلظت اسانس، ضخامت فیلم‌ها افزایش یافت، البته این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبوده ( $p > 0.05$ ).

**Table 1** Thickness average of potato starch and nanoclay films incorporated with various concentration of mint essence

Mint essence (%)	Thickness (mm)
0	0.13 $\pm$ 0.01 a
10	0.14 $\pm$ 0.01 a
20	0.13 $\pm$ 0.02 a
30	0.15 $\pm$ 0.02 a

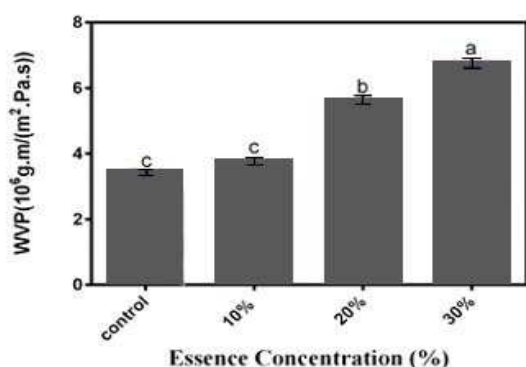
Values are mean (n = 5)  $\pm$  SD. Different letters in each represent significant difference at 5% level of probability among potato starch films.

### ۳-۲- بررسی میزان حلالیت در آب

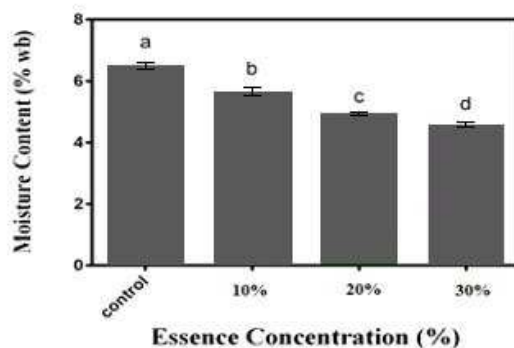
در این تحقیق، میزان حلالیت فیلم‌های تقویت شده با نانو خاک رس و افزایش غلظت اسانس نعناع فلفلی در نمودار ارائه شده است. شکل ۱، کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) حلالیت نسبت به فیلم شاهد را نشان می‌دهد و این نتیجه به علت آگریز بودن اسانس اضافه شده به فیلم‌ها بوده که با افزایش درصد اسانس میزان کاهش از ۲۳ تا ۱۴٪ کاملاً مشهود بوده است، از طرف دیگر افزودن نانو خاک رس به ماتریس فیلم به کاهش حلالیت در آب کمک کرده که آن را می‌توان به شکل‌گیری پیوندهای هیدروژنی قوی بین ماتریس نشاسته و نانوذرات رس نسبت داد. این نتیجه با نتایج محققین دیگر مطابقت داشته [۲۱، ۲۲، ۲۳] که با مقایسه با کار حاضر، اسانس نعناع فلفلی توانسته در کاهش میزان حلالیت فیلم‌ها در آب موثرتر باشد.

## ۳-۴- بررسی میزان رطوبت

طبق شکل ۳، با افزایش غلظت اسانس، میزان رطوبت به صورت معنی داری ( $p < 0.05$ ) از ۶/۵ تا ۴/۴٪ کاهش یافته است، که این کاهش به علت خاصیت آبگریز بودن اسانس نعناع فلفلی مورد استفاده می‌باشد و خواص مولکولی ترکیبات فنولیک بر روی محتوی رطوبت ماتریس فیلم‌ها تاثیر گذار بوده است. که این نتیجه با نتایج بدست آمده توسط محمدی مطابقت داشته و کاهش میزان رطوبت در فیلم‌های نشاسته را نشان داد [۲۱].



**Fig 4** Effect of different percentage of mint essence on water vapor permeability of potato starch and nanoclay films. Values are means  $\pm$  SE (n = 5). Different letters are significantly different at ( $P < 0.05$ ).



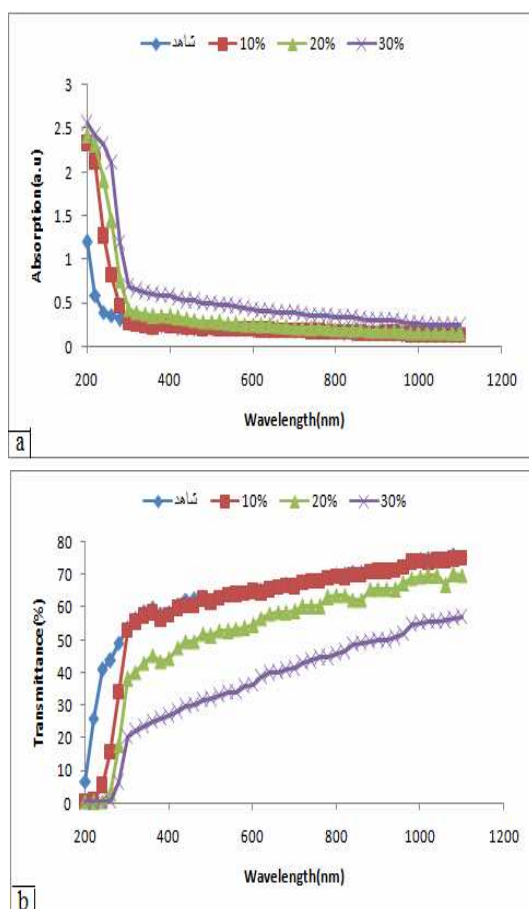
**Fig. 3** Effect of different percentage of mint essence on moisture content (%) of potato starch and nanoclay films. Values are means  $\pm$  SE (n = 5). Different letters are significantly different at ( $P < 0.05$ ).

## ۳-۶- بررسی میزان نفوذپذیری به اکسیژن

فیلم‌های نشاسته مانع خوبی در برابر نفوذ اکسیژن هستند و باعث افزایش ماندگاری مواد غذایی می‌شوند. نتایج در شکل ۵ نشان داد، با افزایش غلظت اسانس نعناع فلفلی و افزودن درصد ثابتی نانو خاک رس میزان نفوذپذیری به اکسیژن به صورت معنی داری ( $p < 0.05$ ) کاهش یافت. این کاهش نسبت به فیلم شاهد از ۶/۱۰ تا ۴/۸۹ cc-mil/(m<sup>2</sup> day) بوده است. کاهش در میزان نفوذپذیری به این معنی است که احتمالاً گازها مسیر ساطع طولانی‌تری را طی کرده‌اند [۳۰]. این نتیجه با نتایج سایر محققین مطابقت دارد [۳۱،۳۲].

## ۳-۵- بررسی میزان نفوذپذیری به بخار آب

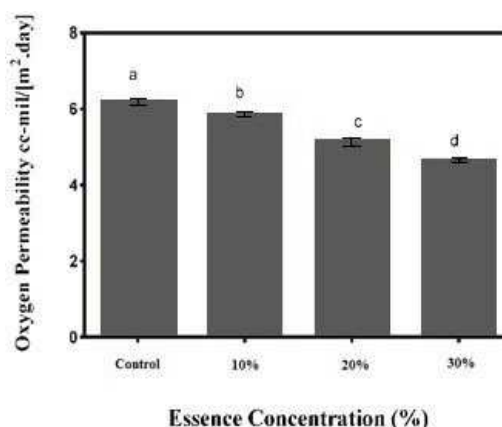
نفوذپذیری به بخار آب (WVP) فیلم‌ها دارای اثر زیادی بر روی عمر ماندگاری مواد غذایی دارد، که یک مقیاس برای اندازه‌گیری انتقال رطوبت از طریق مواد می‌باشد [۲۳]. بازدارندگی ضعیف نسبت به بخار آب از عیوب اساسی فیلم‌های نشاسته‌ای به علت ماهیت آبدوستی آن‌ها محسوب می‌شود و در نتیجه کاربرد آن‌ها در شرایط مختلف به ویژه در رطوبت‌های نسبی بالاتر را محدود می‌سازد [۲۵]. نتایج این آزمون مطابق شکل ۴ نشان داد، افزودن غلظت اسانس نعناع فلفلی از ۳۰-٪



**Fig. 6** UV-vis absorption (a) and transmission spectra (b) for potato starch bionanocomposite films of the films incorporated with different percentage of mint essence in the range of (200–1100 nm).

### ۳-۸- بررسی خواص مکانیکی

نتایج خواص مکانیکی بدست آمده از دستگاه بافت سنج در شکل ۷ نشان داده شده است. نتایج نشان داد، هنگامی که غلظت اسانس نعناع فلفلی در فیلم‌های بایو نانوکامپوزیت از ۰ تا ۳۰٪ افزایش می‌یابد، با توجه به شکل ۷-ا) مقاومت به کشش این فیلم‌ها به صورت معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) از ۱۰/۰۵ تا ۷/۱۱ (MPa) کاهش یافت. افزودن اسانس نعناع فلفلی باعث کاهش واکنش بین مولکولی در بین مولکول‌های نشاسته می‌شود و افزودن آن به ماتریس فیلم، چگالی را کاهش می‌دهد و باعث کاهش مقاومت کششی می‌شود. افزودن اسانس منجر به افزایش



**Fig 5** Effect of different percentage of mint essence on oxygen permeability cc-mil/[m<sup>2</sup>day] of potato starch and nanoclay films. Values are means  $\pm$  SE (n = 5). Different letters are significantly different at ( $P < 0.05$ ).

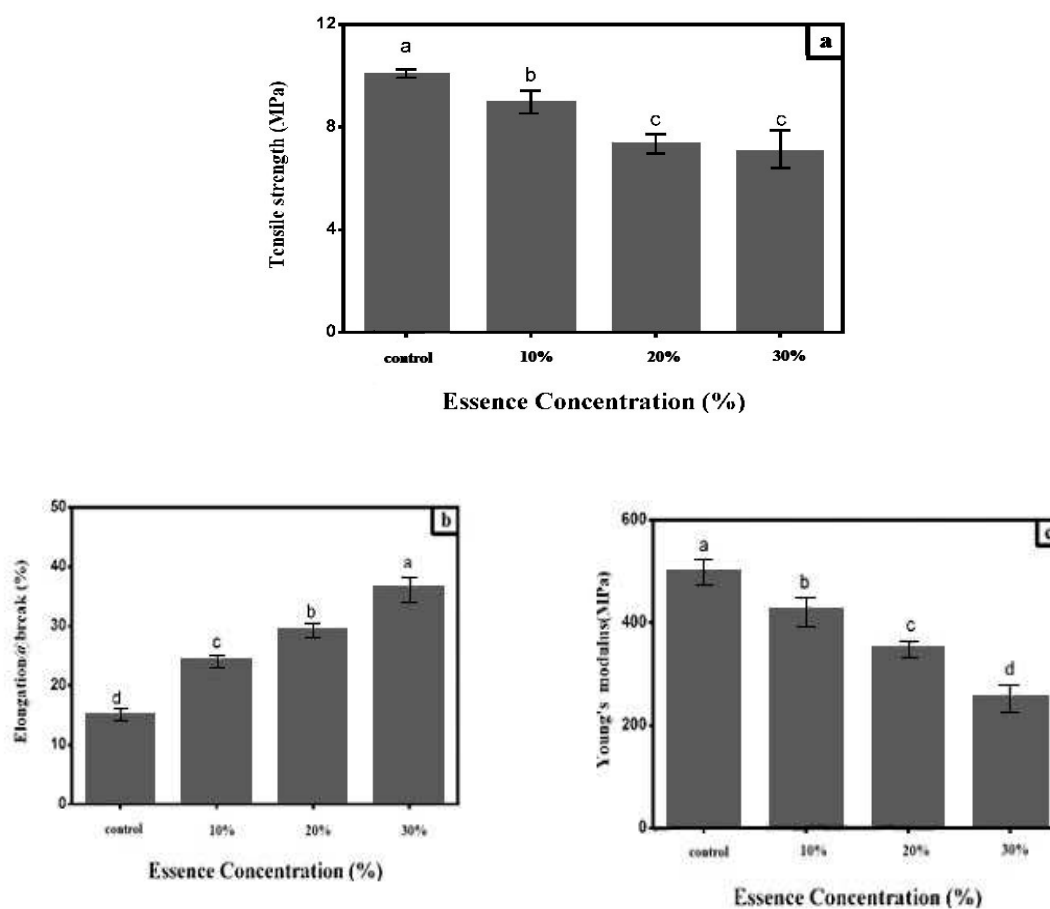
### ۳-۷- بررسی میزان جذب و عبور UV

مطابق شکل ۵، میزان جذب در بازه ۲۰۰–۱۱۰۰ nm مشخص شده است. با افزایش غلظت اسانس نعناع فلفلی در فیلم‌های نشاسته سیب‌زمینی میزان جذب بسیار افزایش یافت که این اثر، بیشتر در بازه UV (۲۰۰–۴۰۰ nm) مشاهده گردید که بیانگر موثر بودن اثر اسانس در میزان جذب UV می‌باشد و وجود مواد موثره (ترکیبات فنولی) در اسانس علت افزایش جذب می‌باشد و این افزایش با مقایسه فیلم شاهد و فیلم‌های حاوی اسانس کاملاً محسوس است. جذب نور بالای فیلم‌های بایو نانوکامپوزیت وقتی در مواد غذایی استفاده شوند، می‌تواند مانع بسیار خوبی برای جلوگیری از عبور نور و اکسیداسیون چربی باشد. شکل ۶ بیانگر درصد عبور نور در بازه UV می‌باشد و نشان می‌دهد افزایش درصد اسانس به خوبی توانسته میزان عبور را کاهش دهد.

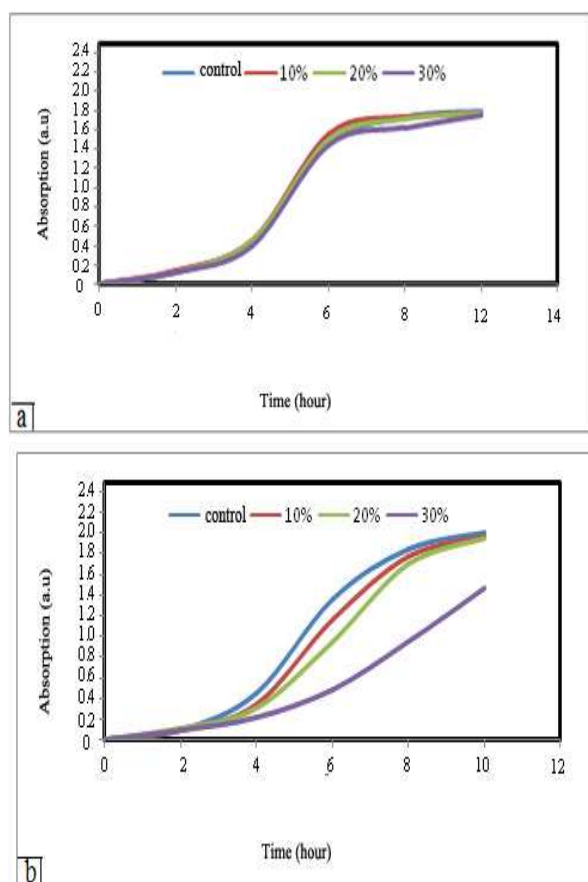


معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) مطابق شکل C-۷) از ۵۰۰/۰۹ تا ۲۰۰/۷۷ (MPa) کاهش یافت و در نتیجه سختی فیلم‌ها کم شد. اسانس در ماتریس فیلم باعث کاهش دانسیته می‌شود و حرکت شاخه‌های پلیمری و انعطاف‌پذیری فیلم‌ها را بهبود می‌بخشد. معمولاً مدول یانگ به صورت معنی‌دار با مقاومت به کشش رابطه مستقیم دارد. این نتایج با نتایج جوکی و پراناتو مطابقت دارد [۳۳،۳۴].

درصد طول فیلم در لحظه پاره شدن گردید. میزان درصد کشیدگی مطابق شکل b-۷) با افزایش غلظت اسانس به صورت معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) از ۱۵/۰ تا ۳۶/۰٪ افزایش یافت در نتیجه الاستیسیته فیلم‌ها افزایش پیدا کرد. دلیل این افزایش را کاهش واکنش بین مولکولی در ساختار فیلم و افزایش سیالیت پلیمر در نتیجه تداخل مولکول‌های اسانس با فیلم نشاسته می‌توان بیان کرد. میزان مدول یانگ (نسبت تنش به کرنش در ناحیه خطی) با افزایش غلظت اسانس نفع فلفلی در فیلم‌ها به صورت



**Fig 7** Tensile strength (a), elongation at break (b) and Young's modulus (c) of the potato starch based films incorporated with various mint essence concentrations. Values are means  $\pm$  SE (n = 5). Different letters are significantly different at (P < 0.05).



**Fig. 8** The growth curves result for *Escherichia coli* (a) and the growth curves for *Staphylococcus aureus* of the potato starch based films incorporated with various mint essence concentrations.

#### ۴- نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، اسانس نعناع فلفلی با غلظت‌های ۰-۳۰٪ (حجمی از کل ماده جامد) در بافت فیلم‌های بایو نانوکامپوزیتی نشاسته سیب‌زمینی/نانو خاک رس وارد شده و خواص عمومی و اختصاصی فیلم‌های خوراکی مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج نشان داد، اسانس نعناع فلفلی باعث کاهش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) میزان رطوبت، حلالیت و جذب آب فیلم‌های نشاسته سیب‌زمینی و همچنین موجب کاهش عبور و افزایش میزان جذب نور در ناحیه فرابنفش شد.

#### ۳-۹- بررسی خواص ضد میکروبی

با توجه به این که اسانس گیاه نعناع فلفلی به علت وجود ترکیباتی نظیر منتول در اسانس گیاه در غلظت‌های نسبتاً پایین روی رشد باکتری‌های مولد فساد مواد غذایی بسیار موثر است، لذا استفاده از این اسانس در مواد غذایی به عنوان یک ترکیب ضد میکروب طبیعی به جای مواد نگهدارنده مصنوعی یک امر مفید و مؤثر به نظر می‌رسد [۳۵]. در شکل ۸-ا، روند رشد باکتری اشرشیاکلی و در شکل ۸-ب، استافیلوکوکوس آرنوس در بازه زمانی ۱۲ ساعت در برابر فیلم‌های ضد میکروبی نشان داده شده است. همان‌گونه که از نتایج به خوبی پیداست، نشاسته سیب‌زمینی/نانو خاک رس/اسانس نعناع فلفلی باعث افزایش فاز تاخیر شده و تا حد زیادی فاز لگاریتمی را کاهش داده‌اند. به عبارتی ترکیبات موجود در اسانس نعناع فلفلی از طریق کاهش سرعت رشد و طولانی کردن فاز تاخیری میکروارگانیسم‌ها و یا غیر فعال کردن، سبب نابودی میکروارگانیسم‌ها می‌گردد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت اسانس سینتیک رشد میکروبی به طور قابل توجهی کاهش پیدا می‌کند. هر چه سینتیک رشد میکروبی بیشتر به سمت پایین کاهش پیدا کند حاکی از بازدارندگی بیشتر است زیرا فاز تاخیر افزایش و فاز لگاریتمی کاهش می‌یابد. با مقایسه دو نمودار مشخص شد، اسانس نعناع فلفلی به طور معنی‌داری در برابر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آرنوس مؤثرتر از باکتری گرم منفی اشرشیاکلی بوده. علت این پدیده تفاوت ساختار دیواره سلولی این دو نوع باکتری می‌باشد. همچنین، نتایج مشابهی به وسیله سایر محققین بدست آمده است [۳۶، ۳۷].

- [7] Sozer, N., & kokini, J. (2011), Nanotechnology and its applications in the food sector. Cell press, No.89 pp: 82-89.
- [8] Arvanitoyannis, I., Nakayama, A., Psomiadou, E., Kawasaki, N., and Yamamoto, N. (1996), Synthesis and degradability of a novel aliphatic polyester based on lactide and sorbitol. Polymer, No.37 pp: 651 –660.
- [9] Abdollahi, M., Rezaei, M., Farzi, Gh. (2012), A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. Journal of Food Engineering. 343-350.
- [10] Iscan, G. & Kirimer, N. & Kurkcouglu, M. & Husnu Canbaser, K. & Demirci, F. (2002), Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils. Journal of Agricultural food chemistry, 50: 3943-3946.
- [11] Maizura, M., Fazilah, A., Norziah, M., Karim, A. (2007), Antibacterial Activity and Mechanical Properties of Partially Hydrolyzed Sago Starch–Alginate Edible Film Containing Lemongrass Oil. J. Food Sci., 72 C324-C330.
- [12] Laohakunjit, N., Noomhorm, A. (2004), Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. Starch/Staerke, 56, 348-356.
- [13] Kiatkamjornwong, S., Chomsaksakul, W., & Sonsuk, M. (2000), Radiation modification of water absorption of cassava starch by acrylic acid/acrylamide. Radiation Physics and Chemistry, 59(4), 413–427.
- [14] Ammala, A., Hill, A. J., Meakin, P., Pas, S. J., Turney, T. W. (2002), Degradation studies of polyolefins incorporating transparent nanoparticulate zinc oxide uv stabilizers. Nanoparticle Research, Vol 4, 167-174.
- [15] ASTM, (2005), Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials E96/E96M-05. In Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia, PA.
- [16] Yu J., Yang J., Liu B., Ma X. (2009), Preparation and characterization of glycerol plasticized-pea starch/ZnO-carboxymethylcellulose sodium nanocomposites. Bioresource Technology 100, 2832-2841.
- [17] ASTM, (2005) "Standard test methods for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor d 3985 -05", Annual Book of ASTM Standards, Philadelphia, PA.
- [18] Mohammadi Nafchi, A., Moradpour, M., Saeidi, M., Alias, A. (2014), Effects of nanorod-rich ZnO on rheological, sorption

از طرفی افزایش غلظت اسانس نعناع فلفلی در ماتریس بیوپلیمر، میزان نفوذپذیری به بخار آب را افزایش و منجر به کاهش نفوذپذیری به اکسیژن شد و ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌ها را بهبود بخشید. اسانس به خوبی از خود خواص ضد میکروبی در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس آئوس و اشرشیاکلی نشان داد و در برابر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آئوس مؤثرتر از باکتری گرم منفی اشرشیاکلی بوده، علت این پدیده تفاوت ساختار دیواره سلولی این دو نوع باکتری است. همچنین در غلظت ۳۰٪، اسانس نعناع فلفلی بیشترین سطح بازدارندگی نسبت به باکتری استافیلوکوکوس آئوس را نشان داد. بنابراین اسانس نعناع فلفلی به همراه درصد ثابتی از نانوذرات خاک رس عامل‌دار شده می‌تواند به عنوان بسته‌بندی ضد میکروب در پوشش‌های خوراکی و بسته‌بندی محصولات غذایی و کشاورزی عمل کند.

## ۵- منابع

- [1] Salmieri, S., & Lacroix, M. (2006), Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone based films containing essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 10205–10214.
- [2] Nassiri, R., Mohammadi Nafchi, A. (2013), Antimicrobial and Barrier Properties of Bovine Gelatin Films Reinforced by Nano TiO<sub>2</sub>. Journal of Chemical Health Risks 3(3): 12-28.
- [3] Ghanbarzadeh, B., Almasi, H., & Entezami, A. A. (2010), Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11(4), 697–702.
- [4] Mali, S., Sakanaka, L. S., Yamashita, F., Grossmann, M. V. E. (2005), Water Sorption and Mechanical Properties of cassava Starch Films and their Relation to Plasticizing Effect. Carbohyd Polym., 60, 283-289.
- [5] Choudalakis, G., Gotsis, A.D. (2009), Permeability of polymer/clay nanocomposites: A review, European Polymer Journal No.45, pp. 967 –984.
- [6] Chaudhry, Q. Laurence Castle and Richard Watkins. (2010), Nanotechnologies in Food. Royal Society of Chemistry.

- [28] X. Xia, Z. Hu, M. Marquez. (2005), Physically bonded nanoparticle networks: a novel drug delivery system, *J. Control. Release*, 103 21-30.
- [29] Bajpai, S.K., Chand, N., Chaurasia, V. (2010), Investigation of water vapor permeability and antimicrobial property of zinc oxide nanoparticles-loaded chitosan-based edible film, *J. Appl. Polym. Sci.*, 115: 674-683.
- [30] Shen, X.L., Wu, J.M., Chen, Y., Zhao, G. (2010), Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids* 24, 285–290.
- [31] Araujo-Farro, P. C., Podadera, G., Sobral, P. J. A., & Menegalli, F. C. (2010), Development of films based on quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willdenow) starch. *Carbohydrate Polymers*, 81, 839–848.
- [32] Ghasemloua, M., Aliheidaric, N., Fahmid, R., Shojaee-Aliabadie, S., Keshavarzf, B., Marlene J. Crang., Khaksar, R. (2013), Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydrate Polymers* 98 1117–1126
- [33] Jouki, M., Mortazavi, A., Tabatabaei Yazdi, F., Koocheki, A. (2014), Characterization of antioxidant-antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydrate Polymers* 99 537–546.
- [34] Pranoto, Y., Rakshit, S.K., and Salokhe, V.M. (2005), Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT*, 38: 859-865.
- [35] Iscan, G. & Kirimer, N. & Kurkcoglu, M. & Husnu Canbaser, K. & Demirci, F. (2002), Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural food chemistry*, 50: 3943-3946.
- [36] Seydim, A.C., and Sarikus, G. (2006), Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with thyme, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39: 639-644.
- [37] Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2011). Antimicrobial activity of natural agents coated on starch-based films against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science*, 76, 531–537.
- isotherm, and physicochemical properties of bovine gelatin films. *LWT - Food Science and Technology*, 142e149.
- [19] ASTM, (2010), Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting D882–10, in: Annual book of ASTM standards, Philadelphia, PA.
- [20] Jokar, M., Russly, A. R., Nor Azowa, I., Luqman Chuah, A., Chin Ping, T. (2012), Melt Production and Antimicrobial Efficiency of Low-Density Polyethylene (LDPE)-Silver Nanocomposite Film. *Food Bioprocess Technol*, 5:719–728.
- [21] Mohammadi Nafchi, A., Alias, A. (2013), Mechanical, Barrier, Physicochemical, and Heat Seal Properties of Starch Films Filled with Nanoparticles. *Journal of Nano Research*, 90-100.
- [22] Voon, H., C., Bhat, R., Azhar, M., E., Liong, M., T. (2010), Effect of addition of Halloysite Nanoclay and  $\text{SiO}_2$  Nanoparticles on Barrier and Mechanical properties of Bovine Gelatin Films. *Food Bioprocess Technol*.
- [23] Sadegh-Hassani, F., Mohammadi Nafchi, A. (2014), Preparation and characterization of bionanocomposite films based on potato starch/halloysite nanoclay. *International Journal of Biological Macromolecules*. 67 458–462.
- [24] Zeppa, C., Gouanve, F., and Espuche, E., (2009), Effect of a plasticizer on the structure of biodegradable starch claynanocomposites: thermal, water sorption, and oxygen barrier properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 112, 2044-2056.
- [25] Vascones, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., Gerschenson, L. N. (2009), Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coating. *Food research. Int.* 42: 762-769.
- [26] Hosseini, S.M.H., Razavi, S.H., Mousavi, S.M.A. (2010), Studies on physical, mechanical, antibacterial and microstructural properties of chitosan edible films containing thyme and cinnamon essential oils. *EJFPP.*, Vol. 1 (2): 47-68
- [27] Muller, C., Laurindo, J., Yamashita, F. (2011), Effect of nanoclay incorporation method on mechanical and water vapor barrier properties of starch-based films. *Industrial Crops and Products*, 605-610.

## Preparation and characterization of bio-nanocomposite based on potato starch/nano-clay/mint essence

Mozaffarian, S.<sup>1</sup> Manafi, S.<sup>2\*</sup>

1. Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Islamic Azad University Shahrood Branch, Shahrood, Iran.

2. Department of Engineering, Islamic Azad University, Shahrood Branch, Shahrood, Iran

(Received: 2015/02/28 Accepted: 2015/11/11)

In this research casting method was used to prepare potato starch based bio-nanocomposite films with nanoclay and mint essence as the reinforcing materials. The composition included potato starch with 40% (w/w of total solid) of a mixture of the sorbitol/glycerol (weight ratio of 3 to 1 as plasticizer) with nanoclay (3% wt.) and mint essence with different concentrations (10-30% vol.). Results showed that by increasing the concentration of mint essence, Physical properties of films were improved. WVP increased ( $P < 0.05$ ) from 3.03 to 7.31 ( $\text{g/m.s.Pa} \times 10^{-6}$ ) and OP was decreased ( $P < 0.05$ ) from 6.10 to 4.89 cc-mil/( $\text{m}^2$  day). Results of mechanical properties showed that by increasing the concentration of mint essence, Tensile strength and modulus were decreased from 10.05 to 7.11 MPa and 500.09 to 200.77 MPa, and elongation at break increased from 15.0 to 36.0%. The films displayed an excellent antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was evaluated by the shake flask test. In summary, addition of mint essence and nanoclay improve the Physical and mechanical properties of the potato starch films and this bio-nanocomposites have high potential to be used for antimicrobial food packaging purposes.

**Keywords:** Bio-nanocomposite films, Mint essence, Potato starch, Nanoclay, Antimicrobial activity.

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: ali\_manafi2005@yahoo.com