

سنتز و ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی پلیمر پتیدی بر پایه پلی اتیلن ایمین پرشاخه به عنوان

پلیمر بیومیمتیک

سمیرا میرزائی^۱، هاله الوندی^۲، علی حسین رضایان^{۳*}، یاسمین بیده^۴، غلامحسین ریاضی^۵، مهدی ضرابی^۶

چکیده

مقدمه: بیومیمتیک (زیست تقلید) به معنی تقلید از مدل‌ها، سیستم‌ها و عناصر طبیعت با هدف حل مشکلات پیچیده انسان است. این علم منجر به ایجاد فناوری‌های جدید با الهام از راه‌حل‌های زیستی در اندازه‌های ماکرو و نانو شده است. هر ساله هزاران نفر به دلیل بیماری‌های ناشی از مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک جان خود را از دست می‌دهند. از این رو استفاده از پتیدی‌های ضد میکروبی اهمیت ویژه‌ای یافته است. در این پروژه از پلیمر پلی اتیلن ایمین پرشاخه با وزن مولکولی پایین به عنوان پلیمر زیست تقلیدی از پتیدی‌های ضد باکتریایی استفاده شده است. **روش‌ها:** به منظور افزایش خاصیت ضد باکتریایی از آمینواسید والین و لیزین برای اصلاح سطح پلیمر پلی اتیلن ایمین پرشاخه استفاده شد. برای اثبات اتصال آمینواسیدها به پلیمر از 1H -NMR و FTIR استفاده شد. فعالیت ضدباکتریایی پلیمر اصلاحی با دو روش تست MIC و بررسی هاله‌ی عدم رشد روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس و باکتری‌های گرم منفی اشرشیا کلای و سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد. **نتیجه و بحث:** غلظت بهینه پلیمر پلی اتیلن ایمین پرشاخه ۸ میکرولیتر و نسبت آمینواسید والین:لیزین، ۶:۱ بود. پلیمر پلی اتیلن ایمین اصلاح شده با آمینواسیدهای والین و لیزین به صورت وابسته به غلظت، رشد باکتری‌ها را مهار کرد ($p < 0.05$). ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این پلیمر رشد باکتری‌ها را بیش از ۷۰ درصد مهار کرد. هم‌چنین قطر هاله‌ی عدم رشد این پلیمر در باکتری‌های مورد بررسی بین ۱۵-۲۰ میلی‌متر بود. فعالیت ضدباکتریایی این پلیمر با آنتی‌بیوتیک سفپیم قابل مقایسه بود. به نظر می‌رسد این پلیمر می‌تواند به عنوان پلیمری ضدباکتریایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بیوتیک سفپیم، پلی اتیلن ایمین لیزین، خاصیت ضد میکروبی، والین.

۱. کارشناسی ارشد، بخش نانوبیوتکنولوژی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. دانشجوی دکتری، بخش نانوبیوتکنولوژی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. استاد، بخش نانوبیوتکنولوژی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- * نویسنده مسئول: ahrezayan@ut.ac.ir
۴. استادیار، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
۵. استاد، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران، ایران
۶. استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

بیومیمتیک (Biomimetic) یا زیست تقلید از دو واژه Bio به معنای زیست و طبیعت و Mimetic به معنای تقلید کردن تشکیل شده است. این علم توسط فیزیکدانی به نام اتو اسمیت در دهه ۱۹۵۰، حین مطالعه بر روی اعصاب ماهی مرکب ابداع شد و واژه زیست تقلید در سال ۱۹۷۴ به لغت‌نامه راه یافت. در واقع بیومیمتیک به معنی تقلید از مدل‌ها، سیستم‌ها و عناصر طبیعت به منظور طراحی و ساخت سیستم‌های مدرن برای رفع مشکلات پیچیده انسان است. این علم منجر به ایجاد فناوری‌های جدید با الهام از راه‌حل‌های زیستی در اندازه‌های ماکرو و نانو شده است (Bhushan, 2009; Paar & Petutschnigg, 2016; Vincent *et al.*, 2006). پپتیدهای ضد میکروبی از جمله ترکیباتی هستند که در هر دو گروه پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند (Zasloff, 2019). تاکنون حدود ۲۹۰۰ نوع پپتید ضد میکروبی شناخته شده است؛ این پپتیدها بر اساس نوع آمینواسید و ساختار سوم به چند گروه تقسیم می‌شوند (Taniguchi *et al.*, 2019; Zasloff, 2002). پپتیدهای آنیونی (۷۲۰-۸۳۰ دالتون) که غنی از آمینواسیدهای گلوتامیک‌اسید و آسپارتیک‌اسید هستند، بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت اثر دارند (Steinraesser *et al.*, 2012). پپتیدهای آبگریز کاتیونیک با ماریچ آلفا، شامل ۳۰۰ پپتید کوتاه هستند و فعالیت ضد میکروبی این خانواده به‌طور پیوسته با افزایش نظم ساختاری افزایش می‌یابد (Bechinger, 1997). بر اساس ساختار دوم، پپتیدهای ضد میکروبی در چهار دسته α -helical، β -sheet، α/β و none α/β تقسیم‌بندی می‌شوند (Forde & Devocelle, 2015). ویژگی مشترک اکثریت پپتیدهای ضد میکروبی، طبیعت کاتیونی آن‌ها است که با حضور آمینواسیدهایی با بار مثبت (لیزین، آرژینین و هیستیدین) در ساختار آن‌ها در ارتباط است. بار مثبت کلی این پپتیدها بین ۱+ تا ۷+ برآورد می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند رابطه مستقیمی بین طبیعت کاتیونی این پپتیدها و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها وجود دارد. اهمیت اساسی این ویژگی در برهمکنش الکترواستاتیک بین گروه‌هایی با بار مثبت پپتید با سطح منفی غشاهای باکتریایی نمود پیدا می‌کند (Jiang *et al.*, 2008; Ringstad *et al.*, 2006). مطالعات بسیاری برای شناسایی مکانیسم عمل پپتیدهای ضد میکروبی انجام شده است. این پپتیدها از طریق برهمکنش با گیرنده واسطه یا بدون گیرنده واسطه، غشا سلولی را هدف قرار داده و جذب آن می‌شوند (Melo & Castanho, 2012). مکانیسم دیگر اثر آن‌ها، هدف قرار دادن دیواره سلولی یا اجزای داخلی سلولی است (Brogden *et al.*, 2003).

با این حال، پپتیدهای ضد میکروبی محدودیت‌هایی نیز دارند؛ دسترس‌پذیری آن سخت و عمر آن‌ها کوتاه است، نسبت به پروتازها حساس و تجزیه‌پذیر هستند، قیمت تولید بالایی دارند و پتاسیل سمیت و همولیز سلول را دارند (Shen *et al.*, 2018). بنابراین دانشمندان به دنبال طراحی و تولید نوع جدیدی از پلیمرها با الگوگیری از پپتیدهای ضد میکروبی هستند که محدودیت‌های آن‌ها را نداشته باشند. Lam و همکاران فعالیت ضد میکروبی پلیمر (آمیدو آمین) پرشاخه‌ی اصلاح شده با مونومرهای لیزین و والین را مورد بررسی قرار دادند. این آمینواسیدها با ایجاد گروه‌های آبگریز و بارهای مثبت سبب افزایش فعالیت ضدباکتریایی می‌شوند. این ترکیب سنتزی با هدف قرار دادن غشای باکتری‌ها، سبب نشت سیتوپلاسم و مرگ آن‌ها می‌شوند (Lam *et al.*, 2016). در مطالعه‌ی دیگر، فعالیت ضدباکتریایی الیگومرهای کاتیونی فنیلن اتیلن مورد بررسی قرار گرفت. پلیمرهای مبتنی بر پلی فنیلن اتیلن که با تقلید ساختار کاتیونی و هیدروفوبی پپتیدهای ضد میکروبی سنتز شدند، خواص ضد میکروبی مناسبی نشان دادند (Lam *et al.*, 2016).

یکی دیگر از پلیمرهای مناسب برای این هدف، پلی اتیلن ایمین است که پلیمری سنتزی و زیست‌سازگار بوده و از طریق پلیمریزاسیون آزریدین ساخته می‌شود. این پلیمر جزء پلیمرهای کاتیونی است که قابلیت اتصال لیگاند را نیز دارد. این پلیمر در انواع مختلف خطی، شاخه‌دار و دندریمری ساخته می‌شود. فرم خطی پلی اتیلن ایمین فقط از گروه‌های آمیدی اول و دوم ولی فرم شاخه‌دار آن از گروه آمیدی اول، دوم و سوم تشکیل شده است. فرم خطی در دمای اتاق به صورت جامد و نقطه ذوب آن ۷۳ تا ۷۵ درجه سانتی‌گراد است. فرم شاخه‌دار نیز صرف نظر از وزن مولکولی در دمای اتاق مایع است و در آب گرم، کلروفورم، اتانول و متانول حل می‌شود (Beyth *et al.*, 2010; Yemul & Imae, 2008). هدف از این مطالعه تهیه‌ی ساختاری ضدباکتریایی با تقلید از پپتیدهای ضد میکروبی است. بدین منظور پلیمر پلی اتیلن ایمین شاخه‌دار با وزن مولکولی ۶۰۰-۸۰۰ دالتون با آمینواسیدهای لیزین و والین عامل‌دار شد. همان‌طور که ذکر شد پپتیدهای ضد میکروبی گروه‌های آگریز با بار مثبت دارند؛ در این ساختار نیز والین سبب ایجاد گروه‌های آگریز و لیزین سبب ایجاد بار مثبت می‌شود. پس از بررسی ویژگی‌های ساختاری، فعالیت ضدباکتریایی این پلیمر عامل‌دار شده به عنوان یک پلیمر ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت.

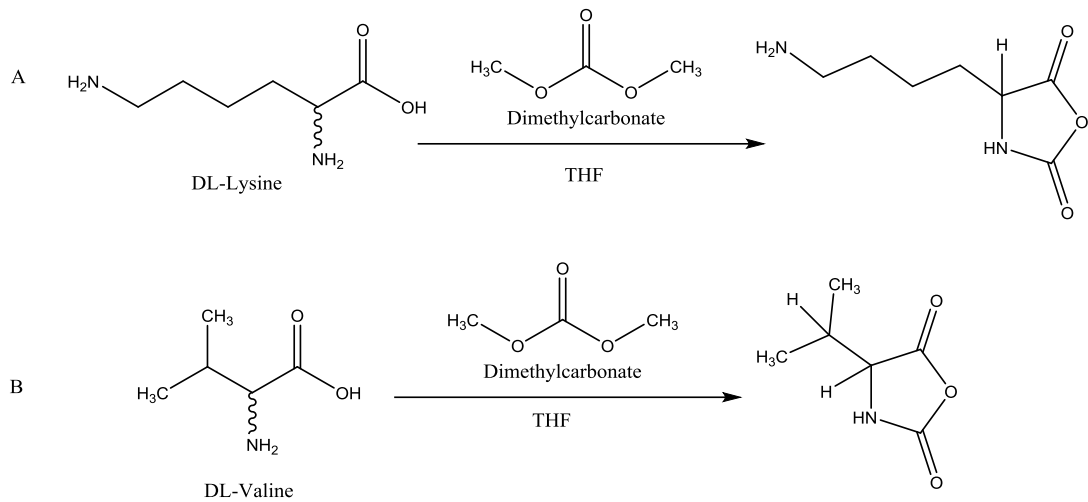
مواد و روش‌ها

۱. آگیری حلال‌ها

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند. پلیمر پلی اتیلن ایمین پرشاخه با وزن مولکولی پایین (۶۰۰-۸۰۰ دالتون) مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش‌های این پژوهش حساس به رطوبت و هوا می‌باشند، به همین دلیل قبل از انجام آزمایش حلال‌ها کاملاً خشک شدند. خالص‌سازی حلال تتراهیدروفوران (THF) و پنتان با سدیم فلزی و تحت سیستم رفلکس انجام شد. خالص‌سازی حلال دی متیل فورمامید (DMF) در حضور کلسیم هیدرید تحت استیرر انجام شد.

۲. فعال کردن آمینواسیدهای والین و لیزین با دی متیل کربنات

آمینواسیدهای لیزین (۱/۲۴ گرم) و والین (۱/۲۴ گرم) به صورت جداگانه در ۲۵ میلی‌لیتر حلال تتراهیدروفوران حل شدند، سپس ۱۶۴ میکرولیتر دی متیل کربنات اضافه شد و در حضور گاز نیتروژن در حمام روغن ۵۵ درجه سانتی‌گراد هم‌زده شد (شکل ۱). پس از ۳۰ دقیقه و سرد شدن محلول در دمای اتاق، ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال پنتان به آن اضافه شد. پس از سانتریفیوژ، رسوب حاصل، با پنتان شستشو داده شد (این مرحله ۲ بار انجام شد) و در نهایت رسوب جمع‌آوری و به مدت ۲۴ ساعت در آون خلا گذاشته شد. به منظور بهینه‌سازی مقدار آمینواسیدها و پلیمر، در ابتدا مقدار ثابتی از پلیمر با مقدارهای مناسب از آمینواسید لیزین و والین سنتز شد. در مرحله‌ی بعد رقت‌های مختلف پلیمر به همراه آمینواسیدهای بهینه شده به منظور سنتز استفاده شد و پس از مشخصه‌یابی، فعالیت ضدباکتریایی مورد بررسی قرار گرفت (Lam *et al.*, 2016).

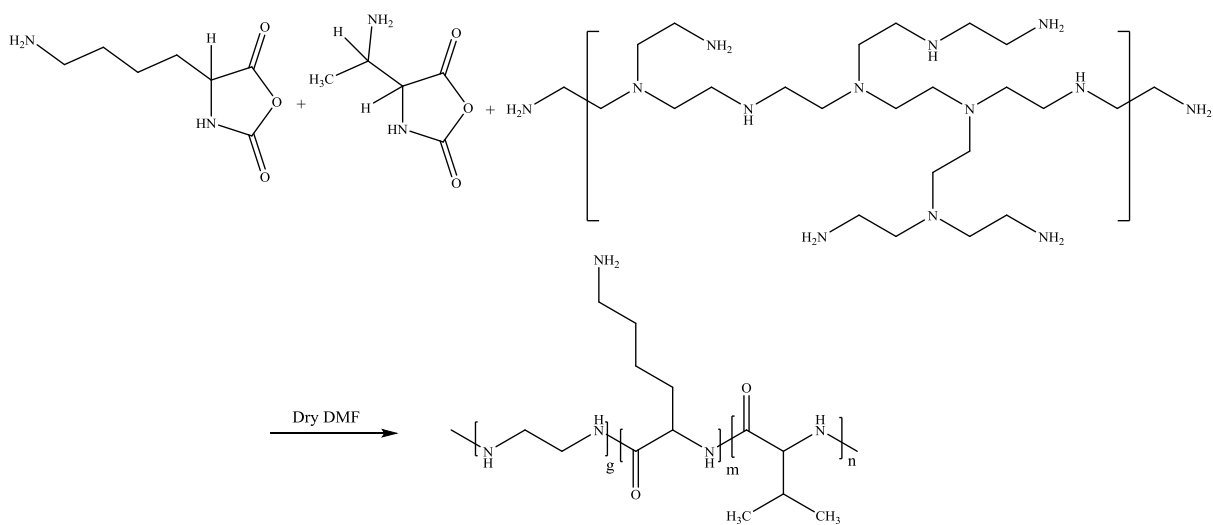


شکل ۱- فعال کردن آمینواسید لیزین (A) و والین (B) با استفاده از دی متیل کربنات.

Figure 1. Activation of the amino acids lysine (A) and valine (B) using dimethyl carbonate.

۳. اصلاح سطح پلیمر پلی اتیلن ایمین پرشاخه با آمینواسیدهای لیزین و والین

به منظور بررسی نسبت بهینه‌ی آمینواسیدها و پلیمر آزمایش‌های اولیه انجام شد؛ مقادیر بهینه پلیمر پلی اتیلن ایمین ۸ میکرولیتر، آمینواسید لیزین ۱۰/۵ میلی‌گرم و آمینواسید والین ۶۴/۵ میلی‌گرم بود. آمینواسیدها و پلیمر به صورت جداگانه در حلال دی متیل فرمامید حل شدند و پلیمر حل شده به محلول آمینواسیدها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت تحت گاز نیتروژن همزده شدند، بعد از ۲۴ ساعت بوتانول اضافه شد و یک ساعت همزده شد. پس از سرد شدن محلول، حلال دی اتیل اتر افزوده شد و سانتریفیوژ انجام شد. در نهایت رسوب به مدت ۲۴ ساعت تحت آون خلا خشک شد و به منظور اثبات از $^1\text{H-NMR}$ و FTIR استفاده شد (Lam *et al.*, 2016). شکل ۲ اصلاح سطح پلی اتیلن ایمین با استفاده از آمینواسیدهای لیزین و والین را نشان می‌دهد.



شکل ۲- اصلاح سطح پلی اتیلن ایمین با استفاده از آمینواسیدهای لیزین و والین.

Figure 2. Surface modification of polyethylenimine using the amino acids lysine and valine.

۳. مشخصه یابی

به منظور بررسی ساختار پلیمر سنتز شده آنالیز رزونانس مغناطیسی هسته ($^1\text{H-NMR}$) با استفاده از Varian - INOVA 500MHz انجام شد. همچنین طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (ATR-FTIR) با استفاده از Bruker - Tensor 27 انجام شد. پتانسیل زتا پلیمر نیز مورد بررسی قرار گرفت (Horiba- SZ-100z Zeta potential analyzer).

۴. ارزیابی های زیستی

۴-۱- بررسی فعالیت ضدباکتریایی با روش انتشار در آگار

باکتری های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) و *Bacillus subtilis* (ATCC 168) و باکتری های گرم منفی (*Escherichia coli* (ATCC 35218) و *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، محلول ۰/۵ مک فارلند از هر باکتری تهیه شد. سپس با استفاده از پنچ استریل چاهک هایی با قطر ۶ میلی متر در محیط کشت جامد در پتری دیش ایجاد شد. در هر چاهک ۴۰ میکرولیتر پلیمر اصلاح شده در غلظت های مختلف ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر ریخته شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت حساسیت باکتری ها نسبت به پلیمر اصلاح شده از طریق اندازه گیری هاله ی عدم رشد در اطراف هر چاهک مشخص گردید. در این آزمایش کنترل مثبت کشت باکتری روی محیط کشت مولر هینتون آگار و کنترل منفی تنها حاوی محیط کشت بود (Shirvany et al., 2021).

۴-۲- روش تعیین حداقل غلظت مهاري (Minimum inhibitory concentration, MIC)

آزمایش MIC در غلظت های ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶، ۰/۷۸، ۰/۳۹، ۰/۱۹، ۰/۰۹ میلی گرم بر میلی لیتر از پلیمر اصلاح شده برای چهار باکتری گرم مثبت و منفی، انجام شد. غلظت های مورد بررسی براساس مطالعات پیشین انتخاب شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده از هر باکتری درون چاهک های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث درون هر یک از ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از پلیمر اصلاح شده در غلظت مشخص اضافه شد. کنترل مثبت حاوی سوسپانسیون باکتری و محیط کشت مولر هینتون براث و کنترل منفی تنها حاوی محیط کشت بود. پس از ۲۴ ساعت جذب نمونه ها با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (Shirvany et al., 2021). از رابطه زیر میانگین درصد مهاري محاسبه شد.

$$\left[\frac{A_{600 \text{ pozitiv control}} - A_{600 \text{ sample}}}{A_{600 \text{ pozitiv control}}} \right] \times 100$$

۴-۳- تست همولیز روی سلول های خونی

آزمایش همولیز به منظور بررسی فعالیت همولیتیکی نمونه سنتزی بر روی گلبول های قرمز خون انسان انجام شد. برای تعیین درصد همولیز در ابتدا غلظت ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر از نمونه سنتزی در ۱ میلی لیتر بافر فسفات سالین حل شد. نمونه های خون انسانی در لوله های حاوی هپارین ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در ۲۰ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. سپس نمونه های خونی سه بار توسط بافر فسفات سالین شسته شدند. سوسپانسیون حاصل با نسبت ۱:۲۰ توسط بافر رقیق شد، و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های مختلف نمونه و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون

رقیق شده‌ی سلول خونی در میکروتیوب ریخته شد. در کنترل مثبت ۱۰۰ درصد سلول‌ها توسط تریتون X-100 همولیز شد و کنترل منفی فقط خون رقیق شده با بافر بود. نمونه‌های حاصل به مدت ۱ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و جذب محلول رویی آن‌ها در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد، درصد همولیز هر نمونه توسط فرمول زیر محاسبه شد (Barman *et al.*, 2019; Engler *et al.*, 2013).

$$[(A_{450 \text{ sample}} - A_{450 \text{ negativ control}}) / (A_{450 \text{ pozitiv control}} - A_{450 \text{ negativ control}})] \times 100$$

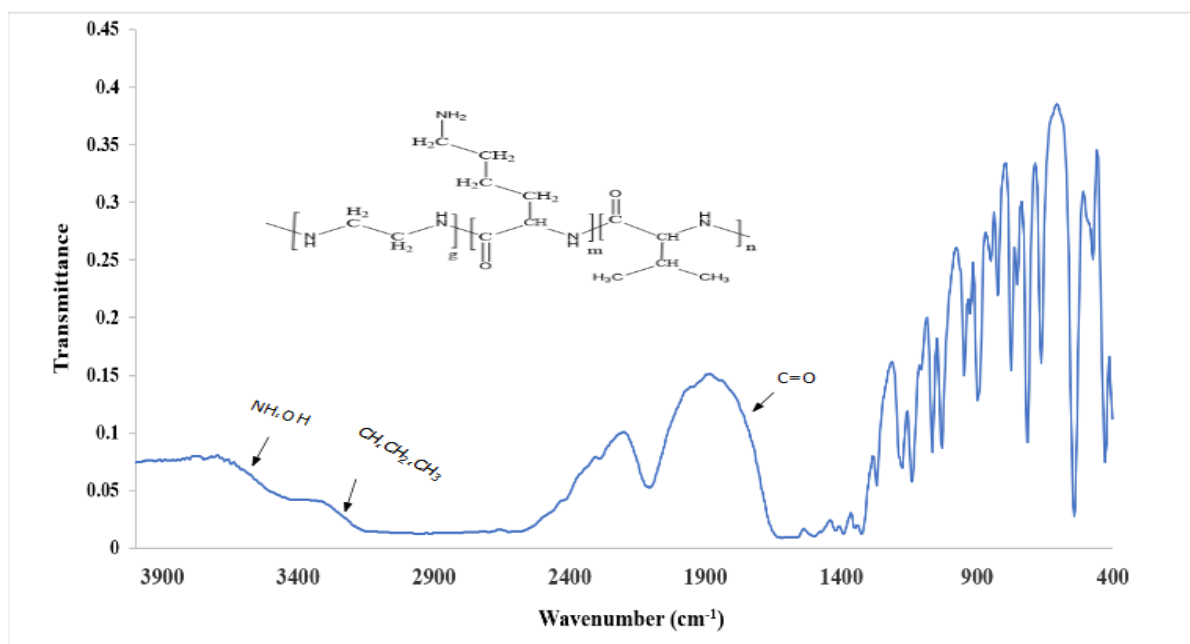
یافته‌ها و بحث

۱. بهینه‌سازی مقدار آمینواسیدها برای اصلاح سطح پلیمر

بررسی‌های اولیه نشان داد در حالتی که مقدار آمینواسید والین بیشتر از لیزین باشد، فعالیت ضدباکتریایی بیشتر خواهد بود؛ نسبت بهینه‌ی آمینواسیدهای والین:لیزین، ۱:۶ است. هم‌چنین مقدار بهینه پلیمر پلی اتیلن ایمین ۸ میکرولیتر است. مطالعات نشان می‌دهند پلی اتیلن ایمین با وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰ دالتون برای سلول‌های انسانی سمیت ندارد. پلیمر مورد استفاده در این پژوهش وزن مولکولی ۶۰۰-۸۰۰ دالتون داشت که قابلیت نفوذ به سلول‌ها را نیز دارد (Neu *et al.*, 2005).

۲. نتایج FTIR مربوط به پلیمر پلی اتیلن ایمین اصلاح شده با آمینواسید والین و لیزین

شکل ۳ منحنی FTIR پلیمر پلی اتیلن ایمین اصلاح شده با آمینواسیدهای والین و لیزین را نمایش می‌دهد. پیک در بازه‌ی ۱۶۰۰ تا ۱۸۰۰ cm^{-1} مربوط به گروه‌های کربونیل (C=O) است که به آمینواسید والین مربوط است (Janus *et al.*, 2020; Striegler *et al.*, 2015). پیک ۲۹۰۰ تا ۳۱۰۰ cm^{-1} مربوط به گروه‌های آلکان (CH₃, CH₂, CH) است (Ghiyasi *et al.*, 2018; Pillai *et al.*, 2017). پیک در ناحیه‌ی ۲۹۴۵ cm^{-1} ناشی از ارتعاش کشش C-H در آمینواسید لیزین است (Lahrouch *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2020). پیک پهن ۳۲۰۰ تا ۳۵۰۰ cm^{-1} مربوط به گروه‌های OH و NH است (Pillai *et al.*, 2019). این نتایج نشان می‌دهند آمینواسیدهای والین و لیزین به پلیمر پلی اتیلن ایمین متصل شدند.



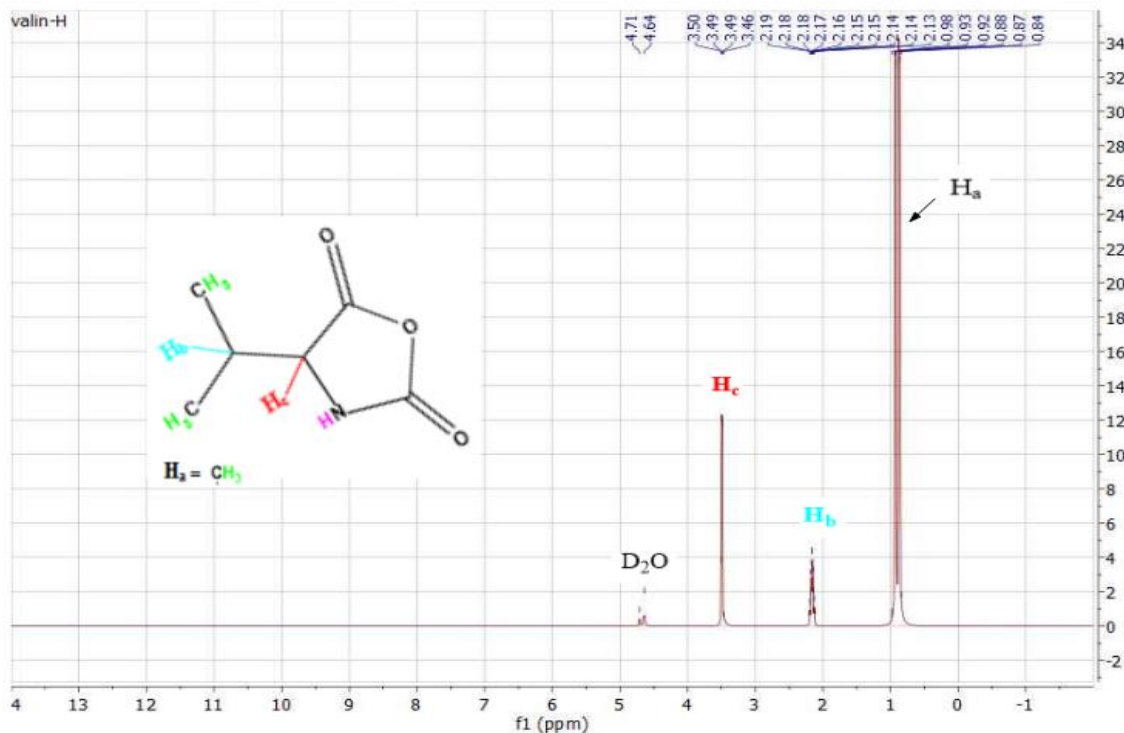
شکل ۳- طیف FTIR پلیمر پلی اتیلن ایمین اصلاح شده با آمینواسیدهای والین و لیزین.

Figure 3. FTIR spectrum of polyethylenimine polymer modified with the amino acids valine and lysine.

۳. آنالیز $^1\text{H-NMR}$

۳-۱- طیف $^1\text{H-NMR}$ مربوط به آمینواسید والین فعال شده با دی متیل کربنات

شکل ۴ طیف $^1\text{H-NMR}$ والین فعال شده با دی متیل کربنات را نشان می‌دهد. پیک بازه $\delta = 0/84 - 0/9$ مربوط به هیدروژن گروه CH_2 است. (Ha)، پیک $\delta = 2/13 - 2/19$ مربوط به هیدروژن CH خطی است. (Hb)، پیک $\delta = 3/46 - 3/50$ مربوط به هیدروژن CH حلقوی و پیک $\delta = 4/5 - 5$ مربوط به حلال D_2O است. به صورت کلی هیدروژن گروه‌های NH ، OH و HS در صورتی که حلال D_2O باشد، از پیک NMR حذف می‌شود (Lam *et al.*, 2016). داده‌های طیفی آنالیز $^1\text{H-NMR}$ نشان می‌دهند، آمینواسید والین با دی متیل کربنات فعال شده است.

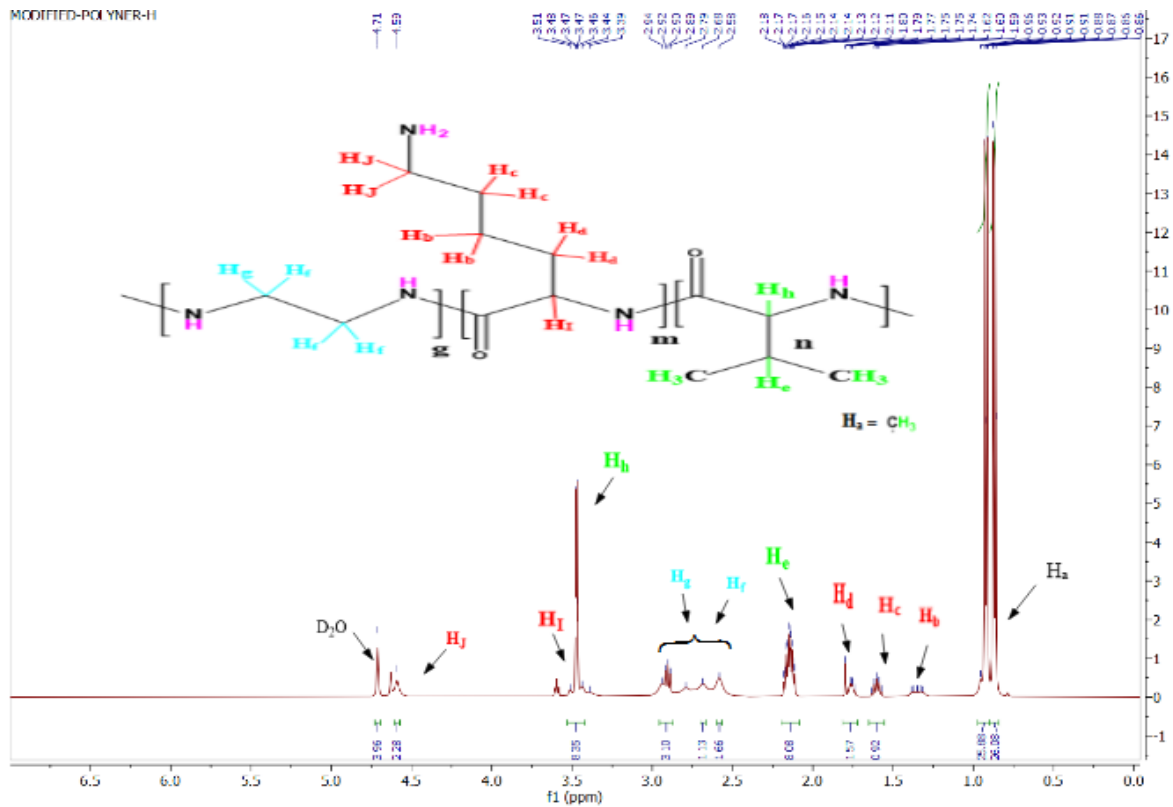


شکل ۴- طیف $^1\text{H-NMR}$ والین فعال شده با دی متیل کربنات.

Figure 4. $^1\text{H-NMR}$ spectrum valine activated with dimethyl carbonate.

۳-۲- طیف $^1\text{H-NMR}$ مربوط به آمینواسید لیزین فعال شده با دی متیل کربنات

شکل ۵ طیف $^1\text{H-NMR}$ لیزین فعال شده با دی متیل کربنات را نشان می‌دهد. پیک $\delta = 1/35 - 1/26$ مربوط به گروه هیدروژن CH_2 است (Hc)، پیک $\delta = 1/53 - 1/65$ مربوط به هیدروژن گروه CH_2 است (Hb, Ha)، پیک $\delta = 1/80 - 1/91$ مربوط به گروه هیدروژن CH است (He)، پیک $\delta = 3/27 - 3/33$ مربوط به هیدروژن گروه CH است و پیک $\delta = 4/5 - 5$ مربوط به حلال D_2O است. همان‌طور که ذکر شد، پیک مربوط به هیدروژن گروه NH به دلیل وجود حلال D_2O مشاهده نمی‌شود (Lam *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2012). نتایج نشان می‌دهند، فعال‌سازی آمینواسیدها و سنتز به درستی انجام شده است.

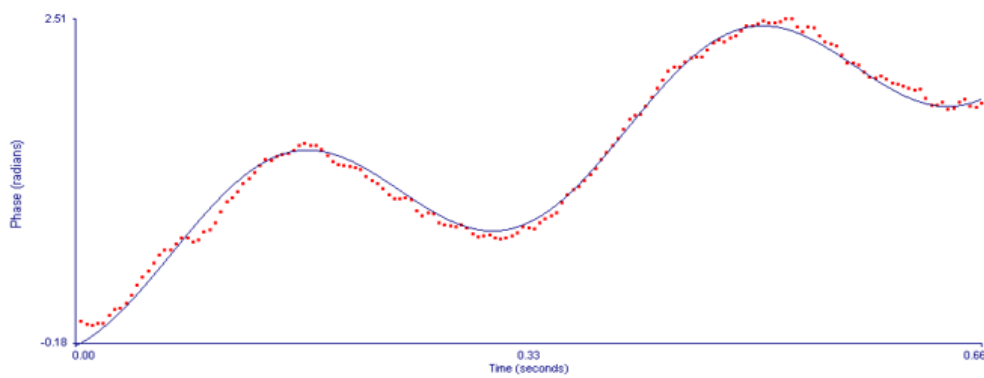


شکل ۶- طیف $^1\text{H-NMR}$ پلی اتیلن ایمین اصلاح شده با آمینواسید والین و لیزین.

Figure 6. $^1\text{H-NMR}$ spectrum polyethylenimine polymer modified with the amino acids valine and lysine.

۴. پتانسیل زتا برای پلیمر پلی اتیلن ایمین اصلاح شده

به منظور اندازه گیری بار سطحی پلیمر از پتانسیل زتا استفاده شد (شکل ۷). نقاط قرمز رنگ در این نمودار پتانسیل زتای اندازه گیری شده و خط آبی، نمودار رسم شده توسط دستگاه است. پلیمر پلی اتیلن ایمین پتانسیل زتای مثبت دارد و مقدار این پتانسیل با توجه به غلظت و وزن مولکولی پلیمر و هم چنین pH محیط متغیر است (Barick *et al.*, 2015). مطالعات نشان می دهد، ترکیبات سنتزی حاوی بار مثبت، فعالیت ضدباکتریایی بهتری دارند (Freire *et al.*, 2011). پتانسیل زتای این پلیمر اصلاح شده $+5/56$ میلی ولت است. حضور آمینواسید لیزین در ساختار پلیمر پلی اتیلن ایمین با پتانسیل زتای مثبت در ارتباط است. ترکیبات با پتانسیل زتای مثبت به طور معنی داری برهمکنش بهتری با غشا سلولی دارند و سبب تخریب شدید سلول ها می شوند. هم چنین ورود نانوذرات با پتانسیل زتای مثبت به سلول ها تسهیل شده است. بررسی ها نشان می دهند مقدار پتانسیل زتای بهینه در پپتیدهای ضد میکروبی در محدوده $+1$ تا $+7$ میلی ولت است. زمانی که پتانسیل زتا در این محدوده باشد، پپتید ضد میکروبی می تواند به خوبی روی غشا سلولی باکتری اثر گذارد و در عین حال به سلول های انسان آسیبی نمی رساند و سبب همولیز نخواهد شد. نتایج به دست آمده از آزمایش های ما نیز با این یافته ها مطابقت دارد (Findlay *et al.*, 2010; Ong *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2015).



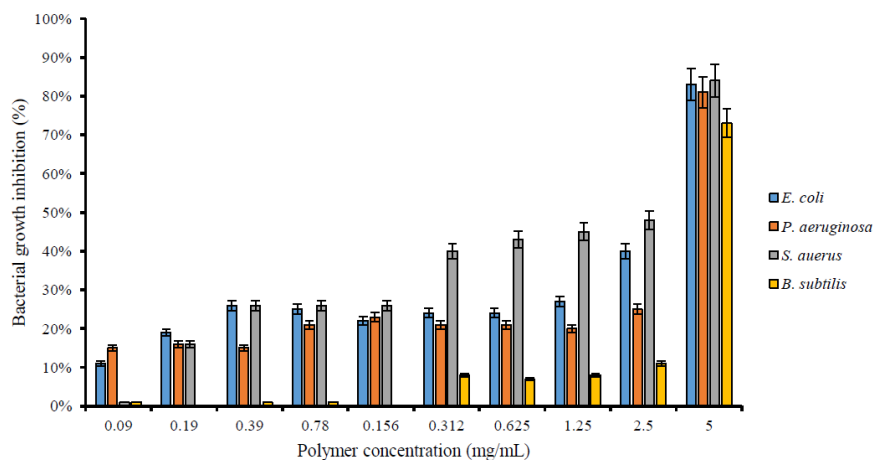
شکل ۷- نمودار پتانسیل زتا پلیمر اصلاح شده با آمینواسیدهای والین و لیزین.

Figure 7. Zeta potential diagram of polyethylenimine polymer modified with the amino acids valine and lysine.

۵. ارزیابی‌های زیستی

۵-۱- تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC)

مطالعات نشان می‌دهد پلیمر پلی اتیلن ایمین خطی و شاخه‌دار فعالیت ضدباکتریایی دارند (Shvero, 2012; Gibney *et al.*, 2010). اما آگریزی و حضور گروه‌های آلکیل بلند در فرم شاخه‌دار این پلیمر سبب می‌شود تعامل آن با غشای باکتری و فعالیت ضدباکتریایی آن کمتر باشد (Gibney *et al.*, 2012)؛ اصلاح پلیمر می‌تواند این فعالیت را بهبود بخشد. طبق انتظار با کاهش غلظت پلیمر پلی اتیلن ایمین اصلاح شده در چاهک‌ها، درصد مهاری رشد باکتری‌ها کم شده است (شکل ۸). غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پلی اتیلن ایمین اصلاح شده با آمینواسید والین و لیزین، رشد باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* را بیش از ۸۰ درصد مهار کرد. اثر مهاری این پلیمر روی این ۳ سویه باکتریایی، تفاوت معنی‌داری ندارد. با کاهش غلظت پلیمر سنتزی درصد مهار رشد باکتری‌ها کاهش یافت؛ به طوری که در غلظت ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رشد باکتری‌ها کمتر از ۳۰ درصد است.



شکل ۸- نمودار درصد مهار رشد باکتری‌ها در حضور غلظت‌های مختلف پلیمر.

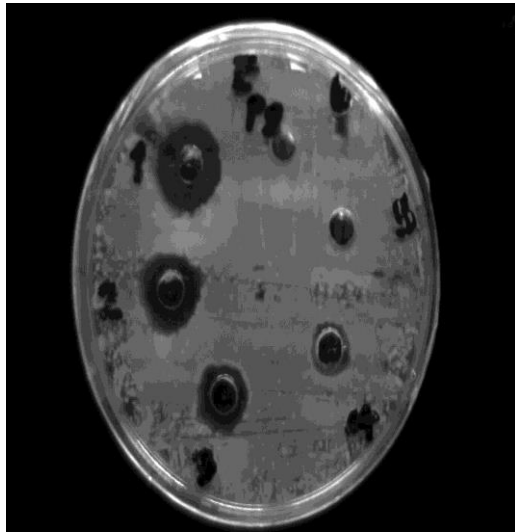
Figure 8. Graph of bacterial growth inhibition of bacteria in different polymer concentrations.

۵-۲- هاله‌ی عدم رشد پلیمر اصلاح شده روی باکتری‌ها

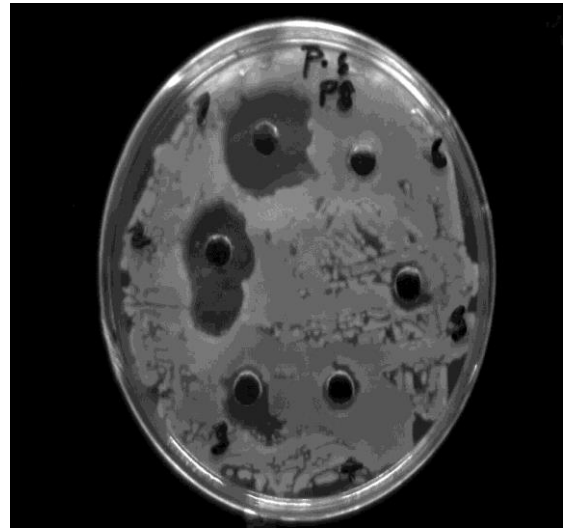
همان‌طور که از نتایج قابل مشاهده هست، پلیمر پلی‌اتیلن ایمین اصلاح شده، رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را مهار می‌کند (شکل ۹)؛ این اثر مهار با افزایش غلظت افزایش یافت. قطر هاله‌ی عدم رشد در باکتری‌های *P. B. subtilis* و *aeruginosa* در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به حدود ۲۰ میلی‌متر رسید و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اما در باکتری *E. coli* قطر هاله‌ی عدم رشد در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۱۵ میلی‌متر رسید و اثر مهار پلیمر به طور معنی‌داری در *E. coli* کمتر از ۳ باکتری دیگر بود ($p < 0.05$). به‌طور کلی باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیشتری نسبت به پلیمرهای ضدباکتریایی دارند و دیواره متخلخل باکتری‌های گرم مثبت اجازه نفوذ مولکول‌های کوچک را می‌دهد (Tegos et al., 2006). مطالعات نشان می‌دهند پلیمرهای حاوی لیزین می‌توانند به عنوان ترکیباتی ضدباکتریایی مورد استفاده قرار گیرند. این پلیمرها سازماندهی غشای خارجی باکتری را بهم ریخته و سبب تخریب لیپوپلی‌ساکارید آن می‌شوند. اثرات ضدباکتریایی لیزین روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مشاهده شده است. هم‌چنین لیزین از تشکیل بیوفیلم توسط باکتری *S. aureus* نیز جلوگیری می‌کند (Alkekhia & Shukla, 2019). فعالیت ضدباکتریایی این پلیمر با آنتی‌بیوتیک سفپیم (Cefepime) نیز در غلظت ۵ میلی‌گرم مقایسه شد (شکل ۱۰). این آنتی‌بیوتیک جزء سفالسپورین‌ها است و سبب مهار سنتز دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌شود. در همه‌ی باکتری‌ها قطر هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط سفپیم از پلیمر به‌طور معنی‌داری بیشتر بود ($p < 0.05$). بیشترین قطر هاله‌ی عدم رشد برای آنتی‌بیوتیک ۲۳ میلی‌متر و برای پلیمر اصلاحی ۲۰ میلی‌متر در باکتری *B. subtilis* بود.

۵-۳- نتایج همولیز سلول خونی

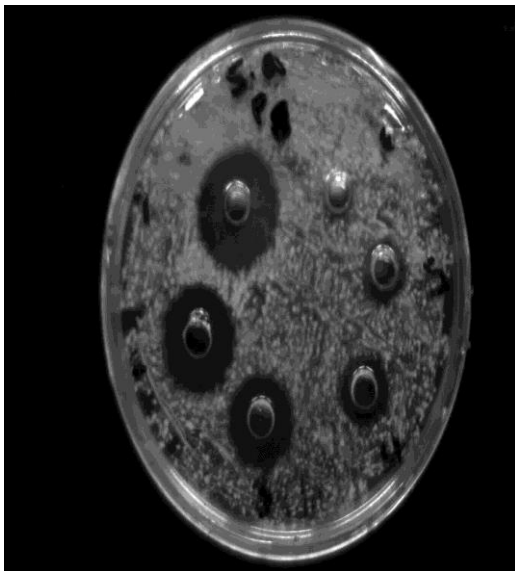
همان‌طور که ذکر شد، یکی از محدودیت‌های استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی احتمال سمیت و همولیز سلول‌های خونی است. آزمایش همولیز به منظور بررسی فعالیت همولیتیکی نمونه سنتزی بر روی گلبول‌های قرمز خون انسان انجام شد (Henkelman et al., 2009; Shen et al., 2018). درصد همولیز برای هر ۵ رقت در شکل ۱۱ آورده شده است. با افزایش غلظت پلیمر درصد همولیز سلول‌ها افزایش یافت، به طوری که در بیشترین غلظت (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) درصد همولیز سلول خونی ۲۱ درصد بود. همان‌طور که آنالیز پتانسیل زتا نشان داد، پلیمر اصلاح شده دارای بار مثبت است. به نظر می‌رسد برهمکنش این پلیمر با غشا سلول‌های خونی سبب آسیب غشا، تغییر ساختار آن و در نهایت همولیز می‌شود (Chi et al., 2018). زمانی که همولیز ایجاد شده توسط پلیمر کمتر از ۱۰ درصد باشد، پلیمر غیرسمی محسوب می‌شود (Fischer et al., 2003). بنابراین غلظت ۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پلیمر پلی‌اتیلن ایمین اصلاح شده با آمینواسیدهای والین و لیزین مناسب‌ترین غلظت برای استفاده است.



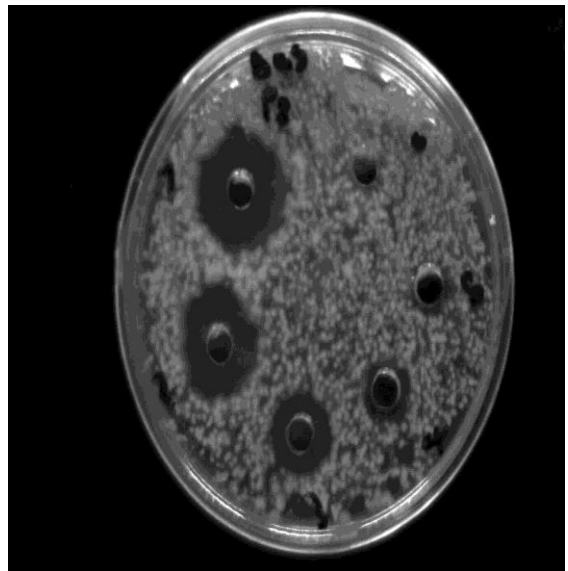
E. coli



P. aeruginosa



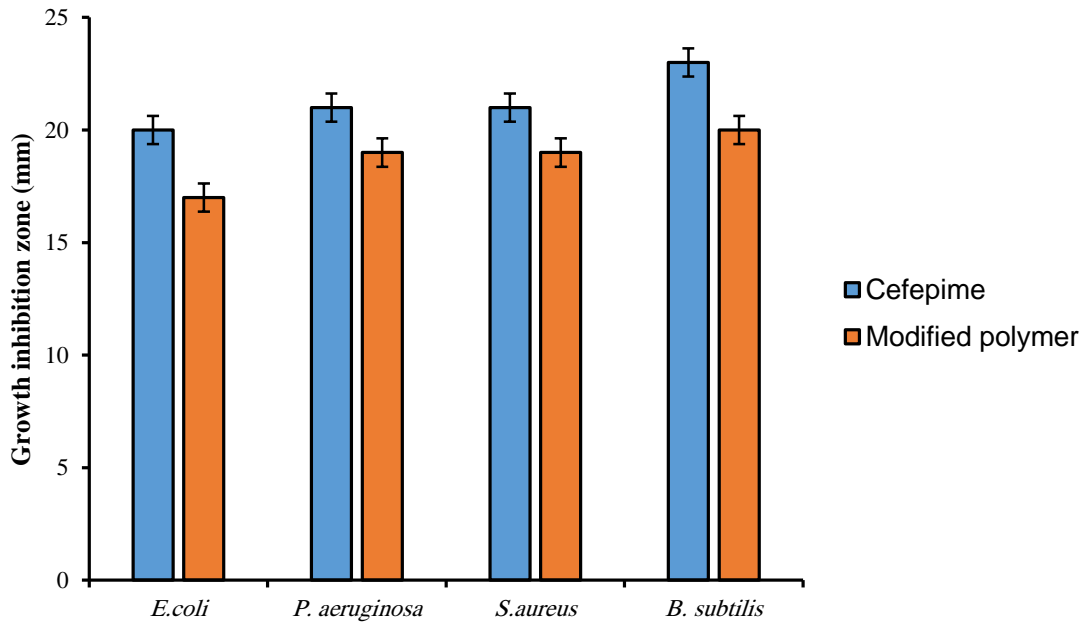
S. aureus



B. subtilis

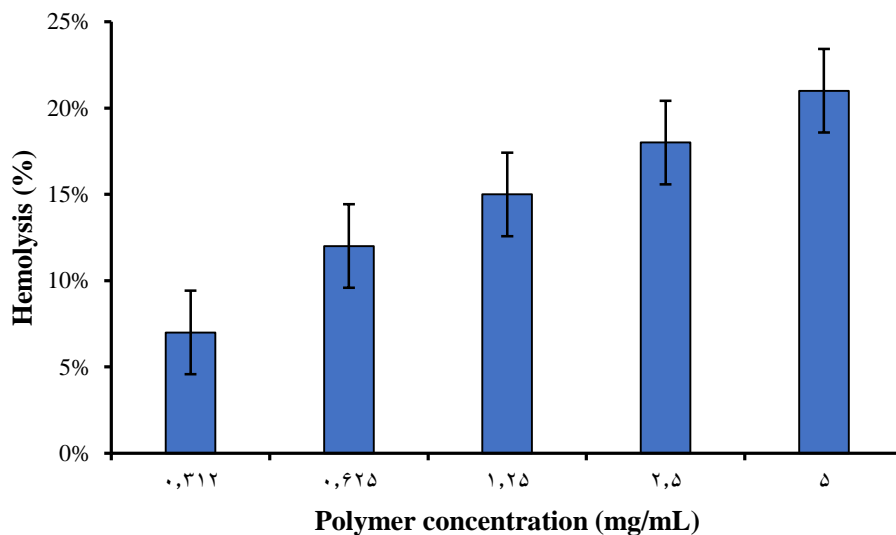
شکل ۹- هاله‌ی عدم رشد پلیمر پلی اتیلن ایمین اصلاح شده با آمینواسیدهای والین و لیزین بر روی باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف.

Figure 9. Growth inhibition zone of polyethylenimine polymer modified with valine and lysine amino acids on bacteria.



شکل ۱۰- مقایسه قطر هاله‌ی عدم رشد پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین اصلاح شده در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با آمینواسیدهای والین و لیزین و آنتی‌بیوتیک سفپیم روی باکتری‌ها.

Figure 10. Comparison of the growth inhibition zone of modified polyethylenimine polymer with the amino acids valine and lysine (5 mg/ml) and the antibiotic cefepime on bacteria.



شکل ۱۱- نمودار درصد همولیز سلول‌های خون تیمار شده با پلیمر پلی‌اتیلن‌ایمین اصلاح شده با آمینواسیدهای والین و لیزین.

Figure 11. Diagram of the hemolysis of blood cells treated with modified polyethylenimine polymer with the amino acids valine and lysine.

نتیجه گیری

در این مطالعه پلیمر پلی اتیلن ایمین توسط آمینواسیدهای والین و لیزین اصلاح سطح شد. شرایط بهینه برای اصلاح پلیمر مقدار والین ۶ برابر لیزین و ۸ میکرولیتر پلیمر انتخاب شد. برای اثبات اصلاح سطح از آنالیز ¹HNMR و FTIR استفاده شد. به منظور ارزیابی بار سطحی پلیمر پلی اتیلن ایمین اصلاح شده، پتانسیل زتا بررسی شد. پتانسیل زتا این پلیمر ۵/۵۶+ میلی ولت است که سبب نفوذ بهتر به غشای باکتری می شود. پلیمر پلی اتیلن ایمین اصلاح شده با آمینواسیدهای والین و لیزین فعالیت ضدباکتریایی وابسته به غلظت دارند و ۵ میلی گرم بر میلی لیتر این پلیمر رشد باکتری های *E. coli* و *P. aeruginosa* و *S. aureus* را بیش از ۸۰ درصد مهار کرد. هم چنین قطر هاله عدم رشد در باکتری های *B. subtilis*، *P. aeruginosa* و *S. aureus* به حدود ۲۰ میلی متر رسید. نتایج نشان می دهد فعالیت ضدباکتریایی پلی اتیلن ایمین اصلاح شده با آمینواسیدهای والین و لیزین با آنتی بیوتیک سفپیم قابل مقایسه است. پلیمر اصلاح شده در غلظت ۰/۳۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر غیرسمی است. این پلیمر می تواند به عنوان پلیمری ضد باکتریایی مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از تمام همکاران محترم دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران که ما را در این پژوهش یاری نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

تعارض منافع

در انجام مطالعه بین نویسندگان تعارضی در منافع وجود ندارد.

References

- Alkekha, D., & Shukla, A. (2019). Influence of poly-L-lysine molecular weight on antibacterial efficacy in polymer multilayer films. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(6), 1324-1339.
- Barick, P., Saha, B. P., Mitra, R., & Joshi, S. V. (2015). Effect of concentration and molecular weight of polyethylenimine on zeta potential, isoelectric point of nanocrystalline silicon carbide in aqueous and ethanol medium. *Ceramics International*, 41(3), 4289-4293.
- Barman, S., Konai, M. M., Samaddar, S & Haldar, J. (2019). Amino acid conjugated polymers: antibacterial agents effective against drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with no detectable resistance. *ACS applied materials & interfaces*, 11(37), 33559-33572.
- Bechinger, B. (1997). Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *The Journal of membrane biology*, 156(3), 197-211.
- Beyth, N., Yudovin-Farber, I., Perez-Davidi, M., Domb, A. J., & Weiss, E. I. (2010). Polyethyleneimine nanoparticles incorporated into resin composite cause cell death and trigger biofilm stress in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51), 22038-22043.
- Bhushan, B. (2009). Biomimetics: lessons from nature—an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 367(1893), 1445-1486.
- Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray Jr, P. B., & Tack, B. F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International journal of antimicrobial agents*, 22(5), 465-478.

- Chi, Z., Lin, H., Li, W., Zhang, X., & Zhang, Q. (2018). In vitro assessment of the toxicity of small silver nanoparticles and silver ions to the red blood cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, (32) 32380-32373
- Engler, A. C., Tan, J. P., Ong, Z. Y., Coady, D. J., Ng, V. W., Yang, Y. Y., & Hedrick, J. L. (2013). Antimicrobial polycarbonates: investigating the impact of balancing charge and hydrophobicity using a same-centered polymer approach. *Biomacromolecules*, 14(12), 4331-4339.
- Findlay, B., Zhanel, G. G., & Schweizer, F. (2010). Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(10), 404-9.4058.
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., & Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24(7), 1121-1131.
- Forde, E., & Devocelle, M. (2010). Pro-moieties of antimicrobial peptide prodrugs. *Molecules*, 20(1), 1210-1227.
- Freire, J. M., Domingues, M. M., Matos, J., Melo, M. N., Veiga, A. S., Santos, N. C., & Castanho, M. A. (2011). Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. *European biophysics journal*, 40(4), 481-487.
- Ghiyasi, S., Sari, M. G., Shabaniyan, M., Hajibeygi, M., Zarrintaj, P., Rallini, M., Torre, L., Puglia, D., Vahabi, H., & Jouyandeh, M. (2018). Hyperbranched poly (ethyleneimine) physically attached to silica nanoparticles to facilitate curing of epoxy nanocomposite coatings. *Progress in Organic Coatings*, 120, 100-109.
- Gibney, K. A., Sovadinova, I., Lopez, A. I., Urban, M., Ridgway, Z., Caputo, G. A., & Kuroda, K. (2012). Poly (ethylene imine) s as antimicrobial agents with selective activity. *Macromolecular bioscience*, 12(9), 1279-1289.
- Henkelman, S., Rakhorst, G., Blanton, J., & van Oeveren, W. (2009). Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials. *Materials Science and Engineering: C*, 29(5), 1650-1654.
- Janus, E., Ossowicz, P., Kleboko, J., Nowak, A., Duchnik, W., Kucharski, Ł., & Klimowicz, A. (2020). Enhancement of ibuprofen solubility and skin permeation by conjugation with L-valine alkyl esters. *RSC Advances*, 10(13), 7570-7584.
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 90(3), 369-383.
- Lahrouch, F., Sofronov, O., Creff, G., Rossberg, A., Hennig, C., Den Auwer, C., & Di Giorgio, C. (2017). Polyethyleneimine methylphosphonate: towards the design of a new class of macromolecular actinide chelating agents in the case of human exposition. *Dalton Transactions*, 46(40), 13869-13877.
- Lam, S. J., O'Brien-Simpson, N. M., Pantarat, N., Sulistio, A., Wong, E. H., Chen, Y.-Y., Lenzo, J. C., Holden, J. A., Blencowe, A., & Reynolds, E. C. (2011). Combating multidrug-resistant Gram-negative bacteria with structurally nanoengineered antimicrobial peptide polymers. *Nature microbiology*, 1(11), 1-11.
- Melo, M. N., & Castanho, M. A. (2012). The mechanism of action of antimicrobial peptides: lipid vesicles vs. bacteria. *Frontiers in immunology*, 3, 236.
- Neu, M., Fischer, D., & Kissel, T. (2005). Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly (ethylene imine) and its derivatives. *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, 7(8), 992-1009.
- Ong, Z. Y., Wiradharma, N., & Yang, Y. Y. (2014). Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. *Advanced drug delivery reviews*, 78, 28-45.
- Paar, M. J., & Petutschnigg, A. (2016). Biomimetic inspired, natural ventilated façade—A conceptual study. *Journal of Facade Design and Engineering*, 4(3-4), 131-142.
- Pillai, P., Saw, R. K., Singh, R., Padmanabhan, E., & Mandal, A. (2019). Effect of synthesized lysine-grafted silica nanoparticle on surfactant stabilized O/W emulsion stability: Application in enhanced oil recovery. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 171, 106511.

- Ringstad, L., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2006). Effect of peptide length on the interaction between consensus peptides and DOPC/DOPA bilayers. *Langmuir*, 22(11), 5042-5050.
- Ryu, K., Lee, M. K., Park, J., & Kim, T.-i. (2018). pH-Responsive Charge-Conversional Poly (ethylene imine)–Poly (l-lysine)–Poly (l-glutamic acid) with Self-Assembly and Endosome Buffering Ability for Gene Delivery Systems. *ACS Applied Bio Materials*, 1(5), 1496-1504.
- Shao, X. R., Wei, X. Q., Song, X., Hao, L. Y., Cai, X. X., Zhang, Z. R., Peng, Q., & Lin, Y. F. (2015). Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell proliferation*, 48(4), 465-474.
- Shen, W., He, P., Xiao, C., & Chen, X. (2020). From Antimicrobial Peptides to Antimicrobial Poly (α -amino acid)s. *Advanced healthcare materials*, 7(20), 1800354.
- Shirvany, A., Rezayan, A. H., Alvandi, H., Barshan Tashnizi, M., & Sabahi, H. (2021). Preparation and Evaluation of a Niosomal Drug Delivery System Containing Cefazolin and Study of Its Antibacterial Activity [Original]. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 15(6), 638-657. <https://doi.org/10.30699/ijmm.15.6.638>
- Shvero, D. K., Davidi, M. P., Weiss, E. I., Sreter, N., & Beyth, N. (2020). Antibacterial effect of polyethyleneimine nanoparticles incorporated in provisional cements against *Streptococcus mutans*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 94(2), 367-371.
- Steinstraesser, L., Hirsch, T., Schulte, M., Kueckelhaus, M., Jacobsen, F., Mersch, E. A., Stricker, I., Afacan, N., Jenssen, H., & Hancock, R. E. (2012). Innate defense regulator peptide 1018 in wound healing and wound infection.
- Striegler, C., Franke, M., Müller, M., Boye, S., Oertel, U., Janke, A., Schellkopf, L., Voit, B., & Appelhans, D. (2015). Amino acid modified hyperbranched poly (ethylene imine) with disaccharide decoration as anionic core–shell architecture: Influence of the pH and molecular architecture on solution behaviour. *Polymer*, 80, 188-204.
- Sun, Y.-x., He, J.-h., Huang, J.-w., Sheng, Y., Xu, D., Bradley, M., & Zhang, R. (2020). Electrochemical recognition of tryptophan enantiomers based on the self-assembly of polyethyleneimine and chiral peptides. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 865, 114130.
- Taniguchi, M., Noda, Y., Aida, R., Saito, K., Ochiai, A., Saitoh, E., & Tanaka, T. (2019). Cationic peptides from enzymatic hydrolysates of soybean proteins exhibit LPS-neutralizing and angiogenic activities. *Journal of bioscience and bioengineering*, 127(2), 176-182.
- Tegos, G. P., Anbe, M., Yang, C., Demidova, T. N., Satti, M., Mroz, P., Janjua, S., Gad, F., & Hamblin, M. R. (2006). Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin (e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(4), 1402-1410.
- Vincent, J. F., Bogatyreva, O. A., Bogatyrev, N. R., Bowyer, A., & Pahl, A.-K. (2006). Biomimetics: its practice and theory. *Journal of the Royal Society Interface*, 3(9), 471-482.
- Wang, Y.-Q., Su, J., Wu, F., Lu, P., Yuan, L.-F., Yuan, W.-E., Sheng, J., & Jin, T. (2012). Biscarbamate cross-linked polyethylenimine derivative with low molecular weight, low cytotoxicity, and high efficiency for gene delivery. *International journal of nanomedicine*, 7, 693.
- Yemul, O., & Imae, T. (2008). Synthesis and characterization of poly (ethyleneimine) dendrimers. *Colloid and Polymer Science*, 286(6), 747-752.
- Zaslhoff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *nature*, 415(6870), 389-395.
- Zaslhoff, M. (2019). Antimicrobial peptides of multicellular organisms: my perspective. *Antimicrobial Peptides*, 3-6.

Design, synthesis and evaluation of antibacterial activity of peptide polymer based on branched PEI as a biomimetic polymer

S. Mirzaei¹, H. Alvandi², A. H. Rezayan³, Y. Bideh⁴, Gh. Hossein Riazi³⁵, M. Zarabi⁶

Received: 2022.3.1

Accepted: 2022.6.25

Abstract

Introduction: Biomimetic means imitating models, systems, and elements of nature to solve complex human problems. This field of science has led to the creation of new technologies inspired by biological solutions in macro and nano sizes. Thousands of people die every year due to diseases caused by antibiotic resistance. Therefore, the use of antimicrobial peptides has become particularly important. **Methods:** in this study, branched polyethyleneimine polymer has been used as a biomimetic polymer of antibacterial peptides. In order to increase the antibacterial properties, the amino acids valine and lysine were used to modify the surface of branched polyethyleneimine. ¹H-NMR and FTIR were used to prove the binding of amino acids to the polymer. Antibacterial activity of the modified polymer by two methods of MIC test and growth inhibition zone on gram-positive bacteria *S. aureus* and *B. subtilis* and gram-negative bacteria *E. coli* and *P. aeruginosa* were examined. **Results and discussion:** Under optimal conditions, the concentration of branched polyethyleneimine polymer was 8 µl, and the amino acid valine to lysine ratio was 1: 6. Polyethyleneimine polymer modified with the amino acids valine and lysine inhibited bacterial growth concentration-dependent (p <0.05). 5 mg/ml of this polymer inhibits more than 70% of bacteria growth. The diameter of the inhibition zone of this polymer in examined bacteria reached about 15-20 mm. The antibacterial activity of this polymer was comparable to the antibiotic cefepime. It seems that this polymer can be used as an antibacterial polymer.

Keywords: *Antimicrobial property, Cefepime antibiotic, Polyethyleneimine lysine, Valine.*

1. Masters, Division of Nanobiotechnology, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

2. PhD Student, Division of Nanobiotechnology, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

3. Professor, Division of Nanobiotechnology, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran (*Corresponding Author Email: ahrezayan@ut.ac.ir)

4. Assistant Professor, Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

2 Professor, The Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran

2 Assistant Professor, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran