

The Effect of Sodium Poly- γ -Glutamate Biopolymer Molecular Weight on Blood Coagulation Enhancement

Atefeh Naderi, Ali Bahrami*, Valiollah Babaeipour, and Mehdi Zeinoddini

Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran,
14665-137, Iran

Received: 7 October 2025, accepted: 25 May 2026

ABSTRACT

Hypothesis: Sodium poly- γ -glutamate salt (γ -PGA) is a polyanionic, biocompatible, and hydrophilic biopolymer produced by *Bacillus licheniformis*. Due to its high water absorption capacity and interaction with blood components, it has been considered as a biological hemostatic agent. In this study, the effect of fermentation time on the molecular weight characteristics of γ -PGA and its relationship with the hemostatic performance of dressings prepared based on this polymer was investigated.

Methods: γ -PGA was produced through submerged fermentation in a synthetic culture medium and purified by alcoholic precipitation and dialysis. Sampling was performed at intervals of 14, 24, 48 and 72 h. The extracted polymers were impregnated onto rayon/polyester fabric by the immersion method, and hemostatic dressings corresponding to each fermentation time were prepared.

Findings: Gel permeation chromatography (GPC) analysis showed that although the average molecular weight of γ -PGA did not change significantly during the time period studied, its molecular weight distribution was markedly affected by fermentation time. With increasing fermentation time from 14 to 72 h, the relative amount of polymer in the higher molecular weight range ($4-4.5 \times 10^6$ Da) increased, as inferred from the increased area under the corresponding peaks, while the contribution of lighter oligomers decreased. These changes in molecular weight distribution and polymer content were accompanied by improved hemostatic performance, such that the blood coagulation index (BCI) increased from 80.68% in the dressing containing γ -PGA extracted at 14 h to 88.48% in the 72-h dressing. Accordingly, the dressing containing γ -PGA extracted at a fermentation time of 72 h was selected as the optimal sample for hemostatic and cytocompatibility evaluations. These results indicate that simultaneous control of fermentation time and molecular weight distribution of γ -PGA is an effective approach for optimizing the hemostatic performance of dressings and provides a suitable basis for the development of bioactive dressings with improved efficiency.

Keywords:

coagulation,
sodium poly- γ -glutamate salt,
fermentation,
molecular weight,
hemostasis

(*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: a_bahrami@mut.ac.ir

Please cite this article using:

Naderi A., Bahrami A., Babaeipour V., and Zeinoddini M., The Effect of Sodium Poly- γ -Glutamate Biopolymer Molecular Weight on Blood Coagulation Enhancement, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (Persian)*, **38**, 353-365, 20026.

اثر وزن مولکولی زیست پلیمر سدیم پلی گاماگلوتامات بر بهبود انعقاد خون

عاطفه نادری، علی بهرامی*، ولی اله بابایی پور، مهدی زین الدینی

تهران، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، کد پستی ۱۴۵۸۸۹۶۹۴

دریافت: ۱۴۰۴/۷/۱۵، پذیرش: ۱۴۰۵/۳/۴

چکیده

فرضیه: نمک سدیم پلی گاماگلوتامات (γ -PGA) یک زیست پلیمر پلی آنیونی، زیست سازگار و آب دوست است که به وسیله سویه *Bacillus licheniformis* تولید می شود و به دلیل ظرفیت زیاد جذب آب و برهم کنش با اجزای خون، به عنوان عامل خون ایستی زیستی مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش، اثر زمان تخمیر بر ویژگی های وزن مولکولی γ -PGA و ارتباط آن با کارایی خون ایستان زخم پوش های تهیه شده بر پایه این زیست پلیمر بررسی شد.

روش ها: طی فرایند تخمیر غوطه وری در محیط کشت سنتزی γ -PGA تولید و با روش رسوب دهی الکلی و دیالیز خالص سازی شد. نمونه برداری از محیط تخمیر در فاصله های زمانی ۱۴، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ h انجام شد. زیست پلیمرهای استخراج شده با روش غوطه وری روی پارچه ریون پلی استر آغشته شده و زخم پوش های خون ایستان، متناظر با هر زمان تخمیر تهیه شدند.

یافته ها: نتایج سوانگاری ژل تراوشی (GPC) نشان داد، اگرچه میانگین وزن مولکولی γ -PGA در بازه زمانی بررسی شده تغییر قابل توجهی نداشت، اما توزیع وزن مولکولی آن به طور معناداری تحت تاثیر زمان تخمیر قرار گرفت. با افزایش زمان تخمیر از ۱۴ h تا ۷۲ h، مقدار نسبی زیست پلیمر در بازه وزن مولکولی بیشتر (محدوده $10^6 \times 4-4$) افزایش یافت که این موضوع از افزایش سطح زیر پیک های متناظر در سوانگارها استنباط شد؛ در حالی که سهم اولیگومرهای سبک تر کاهش یافت. این تغییرات در توزیع وزن مولکولی و مقدار زیست پلیمر با بهبود عملکرد خون ایستی زخم پوش همراه بود، به گونه ای که شاخص انعقاد خون (BCI) از ۸۰/۶۸٪ در زخم پوش دارای γ -PGA استخراج شده در ۱۴ h، به ۸۸/۴۸٪ در زخم پوش ۷۲ h افزایش یافت. براین اساس، زخم پوش دارای γ -PGA استخراج شده در زمان تخمیر ۷۲ h به عنوان نمونه بهینه برای ارزیابی های خون ایستی و یاخته سازگاری انتخاب شد. این نتایج نشان می دهد، کنترل هم زمان زمان تخمیر و توزیع وزن مولکولی γ -PGA رویکرد مؤثری برای بهینه سازی کارایی خون ایستی زخم پوش ها است و مبنای مناسبی برای توسعه زخم پوش های زیست فعال با کارایی بیشتر فراهم می کند.

واژه های کلیدی

انعقاد،

نمک سدیم پلی گاماگلوتامات،

تخمیر،

وزن مولکولی،

خون ایستی

* مسئول مکاتبات، پیام نگار:

a_bahrami@mut.ac.ir

مقدمه

خونریزی کنترل نشده یکی از علت‌های اصلی مرگ و میر ناشی از تروما و حوادث به‌شمار می‌رود و مدیریت سریع و مؤثر آن از اهمیت زیادی برخوردار است. در این راستا، استفاده از زخم‌پوش‌های خون‌ایستان (بندآورنده خون) به‌عنوان یکی از کارآمدترین روش‌ها مطرح است. این زخم‌پوش‌ها با سرعت بخشیدن فرایند انعقاد خون و کاهش زمان توقف خونریزی، نقش حیاتی در بهبود نتایج بالینی بیماران ایفا می‌کند. با توجه به شواهد، بهره‌گیری از عوامل خون‌ایستان نه تنها از نظر اثربخشی بیشتر است، بلکه از نظر هزینه نیز مقرون به‌صرفه است و می‌تواند به‌طور مؤثری از بروز پیامدهای بعدی جلوگیری کند [۱-۳]. طیف گسترده‌ای از زیست‌پلیمرهای طبیعی به‌منظور کاربردهای زیست‌پزشکی به‌طور جامع بررسی شده‌اند. توجه فزاینده به این زیست‌پلیمرها ناشی از ویژگی‌های برجسته‌ای همچون تجدیدپذیری، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری آن‌هاست. افزون بر این، وجود گروه‌های عاملی متنوع در واحدهای ساختاری آن‌ها، امکان طراحی و بهینه‌سازی عملکردهای زیستی متنوع را فراهم می‌آورد، که این موضوع نقش مهمی در توسعه مواد زیست‌پزشکی با عملکردهای هدفمند ایفا می‌کند [۴].

γ -PGA یک هوموپلی‌امید آنیونی طبیعی، غیرسمی، زیست‌تخریب‌پذیر و محلول در آب است که از واحدهای L یا D-گلوتامیک اسید تشکیل شده است. این ماده را می‌توان براساس اتصال گروه کربوکسیل به دو هم‌شکل (isomorph)، پلی- α -گلوتامیک اسید یا پلی- γ -گلوتامیک اسید دسته‌بندی کرد. وجود تعداد زیادی از گروه‌های کربوکسیل آزاد در ساختار γ -PGA موجب جذب و حفظ رطوبت زیاد می‌شود. تولید این زیست‌پلیمر از تخمیر میکروبی روشی اقتصادی با قابلیت توسعه زیاد است [۵-۱۱]. برخی باکتری‌های گرم مثبت قابلیت تولید γ -PGA را دارند که ویژگی‌های مولکولی آن بسته به گونه متفاوت است. گونه‌های *Bacillus* به‌دلیل بازده زیاد تولید، تنوع منابع غذایی قابل استفاده و شناخت دقیق فرایندهای متابولیکی، بیشترین توجه را به خود جلب کرده‌اند و به‌طور عمده با این گونه به‌عنوان محصول برون‌یاخته‌ای تولید می‌شوند [۹].

وزن مولکولی پارامتر تعیین‌کننده‌ای برای درشت‌مولکول‌هاست. وزن مولکولی این زیست‌پلیمر باکتریایی به عواملی مانند سویه باکتریایی، اجزای محیط کشت، شرایط کشت و مهم‌تر از آن به عملکرد آنزیم‌های ترشح‌شده به‌وسیله ریزاندامگان در اواخر فاز سکون رشد بستگی دارد. همچنین، برای آن‌ها گستره وسیعی از وزن‌های مولکولی از ۱۰ Da تا ۲۰۰۰ kDa گزارش شده است. گونه‌های *Bacillus*، γ -PGA را در محدوده ۱۰^۵ Da تا ۱۰^۷ Da تولید

می‌کنند، که می‌تواند با توجه به روش کاربرد متفاوت باشد [۱۶-۱۲]. همچنین، γ -PGA تولیدشده به‌وسیله *Bacillus* با وزن مولکولی زیاد، افزون بر نقش‌های زیست‌شیمیایی متنوع مانند القای پاسخ التهابی، مهاجرت و تکثیر یاخته‌ای در طراحی زخم‌پوش‌ها نیز کاربرد دارد. زخم‌پوش‌ها با هدف ایجاد محیطی مرطوب برای سرعت بخشیدن به روند ترمیم طراحی می‌شوند و γ -PGA به‌دلیل آب‌دوستی و ساختار شبکه‌ای خود، با جلوگیری از چسبندگی بافت و کاهش انقباض غشا، به‌عنوان مانع مؤثری در محل خونریزی عمل می‌کند [۴، ۵، ۱۶-۱۸].

زیست‌پلیمر γ -PGA به‌دلیل داشتن تعداد قابل توجهی گروه‌های کربوکسیل آزاد در ساختار خود، ماهیت پلی‌آنیونی دارد و نیز قابلیت جذب آب چندین برابر وزن خود دارد. آرایش سه‌بعدی γ -PGA در محلول‌های آبی، امکان به‌دام اندازی و نگه‌داری مؤثر مولکول‌های آب را فراهم می‌کند. به همین دلیل γ -PGA به‌عنوان جاذب مؤثر برای مدیریت سطح زیاد ترشحات زخم می‌تواند به‌کار گرفته شود. این زیست‌پلیمر با چسبندگی مطلوب به بافت‌های نرم و جذب سریع مایعات خون، باعث غلیظ‌شدن فاکتورهای انعقادی، کاهش خونریزی و در نهایت تسریع فرایند خون‌ایستی (انعقاد خون) می‌شود. در مجموع این خواص باعث می‌شود، γ -PGA به‌طور خودکار در پاسخ به شرایط فیزیولوژیکی عمل کرده و محیط مساعدی برای بهبود زخم و کنترل خونریزی را ایجاد کند [۲۳-۱۹، ۳].

در این مطالعه ابتدا γ -PGA در محیط کشت بهینه مطابق با مطالعات پیشین [۸، ۲۳] و با استفاده از سویه *Bacillus licheniformis* تولید شد و سپس با بهره‌گیری از روش‌های مختلف، مشخصه‌یابی شد. تمرکز اصلی پژوهش، بررسی اثر زمان تخمیر بر ویژگی‌های مولکولی γ -PGA و عملکرد خون‌ایستان آن بود، زیرا تاکنون نقش زمان تخمیر به‌عنوان متغیر کلیدی در تعیین ساختار مولکولی و کارایی بالینی این زیست‌پلیمر کمتر مورد توجه قرار گرفته است. بدین منظور نمونه‌برداری از مایع تخمیر در بازه‌های زمانی ۱۴، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ h انجام شد. نمونه‌های استخراج‌شده افزون‌بر استفاده در تهیه زخم‌پوش‌های خون‌ایستان، با سنجش GPC ارزیابی شدند، تا تغییرات میانگین وزن مولکولی و الگوی توزیع آن طی فرایند مشخص شود. زخم‌پوش‌ها بر پایه بستر پارچه ریون/پلی‌استر ساخته شدند و از نظر شاخص انعقاد خون (BCI) بررسی شدند. با وجود اینکه γ -PGA پیش‌تر به‌طور عمده به‌صورت زخم‌پوش‌های کامپوزیتی استفاده شده است، استفاده از آن به‌تنهایی برای تهیه زخم‌پوش خون‌ایستان تاکنون گزارش نشده است. در این مطالعه، با بررسی دقیق توزیع وزن مولکولی γ -PGA و تعیین زمان بهینه تخمیر، زخم‌پوشی با کارایی خون‌ایستی زیاد و شاخص انعقاد خون معادل زخم‌پوش‌های کامپوزیتی γ -PGA به‌دست

یاخته‌ای گرم‌خانه‌گذاری شد [۲۳].

برای مرحله تولید، ۵ mL از مایه تلقیح به ۴۵ mL از محیط کشت اصلی برای تولید γ -PGA دارای ترکیبات گلوتامیک اسید ۴۰ g/L، گلیسرول ۵۰ g/L، سیتریک اسید ۴۰ g/L، آمونیوم کلرید ۷ g/L، پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۵ g/L، منیزیم سولفات هپتاهیدرات ۰/۵ g/L، آهن (III) کلرید هگزا‌هیدرات ۰/۰۴ g/L، منگنز سولفات مونوهیدرات ۰/۱۵ g/L و کلسیم کلرید دی‌هیدرات ۰/۱۵ g/L منتقل شد. pH اولیه محیط روی ۷/۴ تنظیم شد و تخمیر در شرایط هوازی دمای ۳۷ °C و سرعت هم‌زدن بهینه ۲۰۰ rpm به مدت ۷۲ h انجام شد [۲۳]. نمونه برداری در زمان‌های مشخص انجام و نمونه‌ها برای استخراج و سنجش γ -PGA استفاده شد.

استخراج γ -PGA از محیط کشت تخمیر سویه

استفاده شده قادر به تولید خارج یاخته‌ای γ -PGA است، که برای استخراج زیست‌پلیمر ابتدا با افزودن هیدروکلریک اسید محیط کشت اسیدی شده و pH آن روی ۲ تنظیم شد. به دنبال آن با کاهش چسبندگی محتویات محیط کشت و از بین رفتن بار منفی یاخته‌ها، یاخته‌ها راحت‌تر به هم چسبیده و جداسازی آن‌ها ساده‌تر شد. سپس، با استفاده از دستگاه مرکزگریز (PIT Universal 320) یاخته‌ها و رسوب باکتری‌ها به خوبی جدا شدند، و محلول باقی‌مانده با سدیم هیدروکسید به pH ۷/۴ رسانده شد. پس از سرد شدن مایع رویی، حجم مشخصی از آن برداشته شد و با ۴ برابر اتانول سرد ۹۶٪ (حجمی/حجمی) استخراج زیست‌پلیمر انجام شد [۵۸، ۱۱، ۲۴]. با جداسازی محلول رویی آن، توده‌ای از محصول به دست آمد. در ادامه، به‌طور عمده برای نمک‌زدایی و حذف سایر ناخالصی‌ها محصول γ -PGA تحت فرایند دیالیز قرار گرفت. بدین منظور، از غشای دیالیز استفاده شد تا ناخالصی‌ها و مولکول‌های با وزن مولکولی کوچک از زیست‌پلیمر جدا شوند و محصولی با خلوص بیشتر حاصل شود. فرایند دیالیز به مدت ۴۸ h انجام شد و برای افزایش کارایی حذف ناخالصی‌ها، بافر دیالیز هر ۱۲ h یکبار عوض شد.

مشخصه یابی γ -PGA

پیوندهای شیمیایی و گروه‌های عاملی موجود در نمونه γ -PGA با طیف‌سنج زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) (NEXUS 670 Nicolet) بررسی شدند. طیف‌های حاصل، درصد عبور را در بازه عدد موجی $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ نشان می‌دهند. به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، γ -PGA خالص شده با دیالیز، برای حذف کامل رطوبت باقی‌مانده، به مدت ۴۸ h تحت فرایند خشک‌کن انجمادی قرار گرفت و سپس

آمد. افزون بر این، برخلاف مطالعات پیشین که اغلب شاخص انعقاد را در بازه‌های کوتاه‌مدت (۵ min یا ۱۰ min) سنجیده‌اند، در این پژوهش اثربخشی زخم‌پوش حتی در بازه طولانی‌تر (۳۰ min) نیز ارزیابی شد؛ که بیانگر پایداری و ماندگاری اثر خون‌ایستی است. این یافته‌ها نشان می‌دهد، سهم و مقدار بیشتر زیست‌پلیمرهای با وزن مولکولی بیشتر و کنترل شرایط تخمیر، در کنار ارزیابی پایدار شاخص انعقاد نقش کلیدی در افزایش خواص انعقادی و توسعه زخم‌پوش‌های زیست‌فعال ایفا می‌کند و به‌عنوان نوآوری اصلی این طرح تلقی می‌شود.

تجربی

مواد

سویه باکتریایی استفاده‌شده در کشت میکروبی، باکتری گرم مثبت *Bacillus licheniformis* ATCC a9945 بود، که از بانک میکروبی DSMZ تهیه شد. پارچه بی‌بافت ریون/پلی‌استر از شرکت یکتا‌بافت تهیه شد. هیدروکلریک اسید و اتانول از شرکت مجللی خریداری شدند. گلیسرول، سیتریک اسید، آمونیوم کلرید، پتاسیم هیدروژن فسفات، منیزیم سولفات هپتاهیدرات، آهن (III) کلرید هگزا‌هیدرات، منگنز سولفات مونوهیدرات، کلسیم کلرید دی‌هیدرات، کلسیم کلرید، سدیم هیدروکسید و ۲-پروپانول (ایزوپروپانول) از شرکت Merck (آلمان) تهیه شدند. گلوتامیک اسید و ۳-(۵،۴-دی‌متیل تیازول-۲-یل)-۲-۵-دی‌فنیل تترازولیوم برمید (MTT) از شرکت Sigma-Aldrich (آمریکا) خریداری شدند. محیط کشت Dulbecco's (fetal bovine serum, FBS) و سرم جنین گاوی (Eagle) با اصلاح شده با Eagle از شرکت Gibco تهیه شدند.

دستگاه‌ها و روش‌ها

فرایند تخمیر و تولید γ -PGA

تولید γ -PGA از راه تخمیر غوطه‌وری هوازی با استفاده از سویه *Bacillus licheniformis* انجام شد. ابتدا مایه تلقیح با تلقیح سویه در محیط کشت شامل گلوتامیک اسید ۳۰ g/L، گلیسرول ۴۰ g/L، سیتریک اسید ۱۲ g/L، آمونیوم کلرید ۷ g/L، پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۵ g/L، منیزیم سولفات هپتاهیدرات ۰/۵ g/L و آهن (III) کلرید هگزا‌هیدرات ۰/۰۴ g/L تهیه شد. pH محیط روی ۷/۴ تنظیم و پس از سترون‌سازی کشت به مدت ۱۶ h با شرایط دمایی ۳۷ °C و دور ۲۲۰ rpm در تکاننده گرم‌خانه (Incubator) (JAL Tajhiz- JTSL50) برای تکثیر

ساختاری و رفتار وزنی زیست پلیمر طی فرایند، افزون بر نمونه‌های اولیه و نهایی، نمونه‌های میانی (۲۴ و ۴۸ h) نیز بررسی شدند، تا سیر تحول توزیع وزن مولکولی و ویژگی‌های ساختاری در گذر زمان با دقت بیشتری تبیین شود. نمونه‌های استخراج شده افزون بر استفاده در تهیه زخم‌پوش‌های خون‌ایستان، برای تعیین وزن مولکولی نیز با سنجش GPC ارزیابی شدند. در ادامه، شاخص‌های مرتبط با انعقاد خون برای بررسی عملکرد زخم‌پوش‌ها بررسی شد.

آماده‌سازی زخم‌پوش γ -PGA

زخم‌پوش γ -PGA بر بستر پارچه ریون/پلی استر ساخته شد. بدین منظور، محلول γ -PGA با غلظت ثابت ۰/۹۵٪ (وزنی/حجمی) تهیه و حجم یکسان ۵ mL از محلول روی ۰/۵ g از الیاف ریون/پلی استر اعمال شد. با حل کردن γ -PGA در آب روی همزن مغناطیسی (Alpha D-500)، محلول تهیه شد. پس از آن پارچه ریون/پلی استر در محلول آماده شده غوطه‌ور شد. پس از تبخیر کامل آب و خشک شدن پارچه، پوشش یکنواختی از زیست پلیمر γ -PGA روی پارچه تشکیل شد.

بررسی شاخص انعقاد خون (BCI)

زخم‌پوش‌ها با ابعاد $1 \times 1 \text{ cm}^2$ برش زده شدند. $200 \mu\text{L}$ خون سیتراته به همراه $20 \mu\text{L}$ کلسیم کلرید ۰/۲ مولار به آرامی روی زخم‌پوش ریخته شد. نمونه‌ها به مدت ۵ min درون گرم‌خانه (Jal Incubator) با دمای 37°C قرار داده شد. پس از گرم‌خانه‌گذاری اولیه 10 mL آب یون‌زدوده بدون ایجاد اختلال در لخته خون اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۳۰ min دیگر گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از آن، نمونه‌ها به مدت ۱ min با سرعت ۱۰۰۰ rpm درون دستگاه مرکزگریز (NF-005-Nedaye Fan) قرار گرفتند و جذب هموگلوبین آزاد شده در طول موج 540 nm اندازه‌گیری شد. در نهایت، شاخص انعقاد خون (BCI) از معادله (۱) محاسبه شد [۲۵، ۲۶].

$$\text{BCI} = (A_w - A_s) / A_w \times 100 \quad (1)$$

در این معادله، A_w جذب $200 \mu\text{L}$ خون لخته نشده در 10 mL آب یون‌زدوده و A_s جذب خون نمونه است.

بررسی سمیت یاخته‌ای و یاخته‌سازی

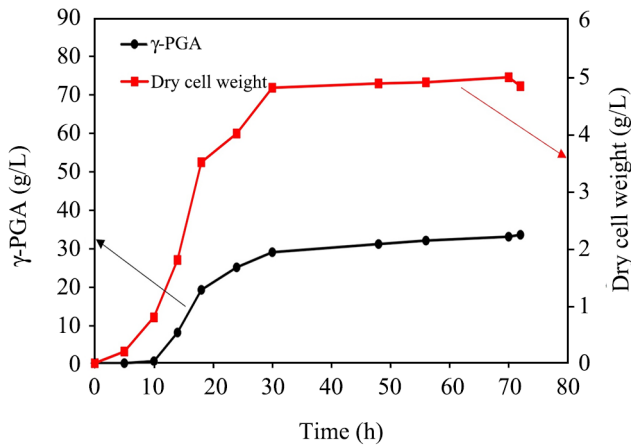
یاخته‌سازی زخم‌پوش‌ها با استفاده از آزمون MTT و یاخته‌های 929L (NCBI 161NCBI C)، بانک یاخته انستیتو پاستور ایران) ارزیابی شد. پیش از شروع این آزمون، یاخته‌ها پس از یخ‌زدایی و بازیابی، به

برای تهیه پودر یکنواخت آسیاب شد. برای ثبت طیف FTIR، قرص‌های KBr با مخلوط‌سازی یکنواخت ۲ mg از پودر γ -PGA با 200 mg KBr و فشرده‌سازی مخلوط به شکل قرص شفاف تهیه شد. در نهایت طیف زیرقرمز نمونه‌ها با دستگاه FTIR ثبت و تحلیل شد. همچنین به منظور بررسی ساختار شیمیایی نمونه زیست پلیمر، طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای ($^1\text{H-NMR}$) با طیف‌سنج Bruker Avance DRX500 در بسامد ۴۰۰-۱۰۰ MHz انجام شد. بدین منظور نمونه‌های خشک شده انجمادی γ -PGA در حلال دوتریم‌دار D_2O حل شده و محلول شفاف حاصل به لوله‌های استاندارد NMR منتقل شد؛ سپس، طیف نمونه با استفاده از دستگاه NMR در بسامد نام‌برده ثبت و تحلیل شد.

به منظور تعیین وزن مولکولی γ -PGA و بررسی تغییرات آن در طول زمان تخمیر، از سوانگاری ژل تراوشی (GPC) براساس زمان ماند، استفاده شد. سنجش GPC با استفاده از دستگاه Agilent 1100 مجهز به ستون‌های Agilent-PL aquagel-OH Mixed-H با ابعاد $7/5 \times 300 \text{ mm}$ که به صورت متوالی متصل شده بودند، انجام شد و آشکارسازی سیگنال‌ها با آشکارساز ضریب شکست (refractometer index, RI) انجام شد. شوینده (eluant) شامل محلول سدیم دی‌هیدروژن فسفات (NaH_2PO_4) با غلظت ۰/۰۱ مولار به همراه سدیم نیترات (NaNO_3) با غلظت ۰/۲ مولار و pH برابر ۷ بود. سرعت جریان فاز متحرک 1 mL/min و دمای ستون 35°C تنظیم شد. پیش از تزریق نمونه‌ها، دستگاه با استفاده از مجموعه‌ای از زیست پلیمرهای پولولان (Pullulan) درجه‌بندی و کالیبره شد و سپس نمونه‌ها پس از آماده‌سازی به دستگاه تزریق شدند. براساس داده‌های به دست آمده از سوانگاری، وزن مولکولی و تغییرات آن در نمونه‌های مختلف محاسبه و تحلیل شد. این سنجش‌ها به منظور ارزیابی و تأیید ترکیب زیست پلیمر تولید شده برای استفاده در مرحله بعدی و کاربرد آن در زخم‌پوش انجام شدند.

بررسی اثر زمان تخمیر بر وزن مولکولی γ -PGA و کاربرد آن در زخم‌پوش‌های خون‌ایستان

به منظور بررسی اثر زمان‌های مختلف تولید بر خواص γ -PGA و وزن مولکولی آن، نمونه برداری از محیط کشت در فاصله‌های زمانی ۱۴، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ h انجام شد. انتخاب این بازه‌های زمانی براساس الگوی رشد و نمودار تولید γ -PGA انجام شد؛ به گونه‌ای که از حدود مدت ۱۴ h پس از آغاز کشت، مقدار تولید زیست پلیمر شتاب می‌گیرد و در حدود مدت ۷۲ h فرایند تخمیر به مرحله پایدار رسیده و تولید متوقف می‌شود [۸]. به منظور دستیابی به ارزیابی جامع‌تر از تغییرات



شکل ۱- منحنی های رشد و تولید γ -PGA در بازه های زمانی ۱۴ h تا ۷۲ h: (●) مقدار تولید γ -PGA (محور چپ) و (■) وزن خشک یاخته (محور راست).

Fig. 1. Growth and γ -PGA production curves from 14 to 72 h: (●) γ -PGA production (left axis), and (■) dry cell weight (right axis).

تحلیل های آماری با نرم افزار GraphPad Prism 9 انجام شد و تفاوت بین گروه ها با استفاده از سنجش واریانس یک طرفه (ANOVA) ارزیابی شد. $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.0001$ و ns نشان دهنده عدم معنی دار بودن است.

نتایج و بحث

بررسی تولید γ -PGA

زیست پلیمر تولید شده به صورت برون یاخته ای و ترشحاتی است و از محیط کشت جداسازی می شود. مقدار تولید γ -PGA در هر بازه زمانی پس از استخراج زیست پلیمر از محیط کشت و اندازه گیری وزن خشک آن، به صورت گرم بر لیتر گزارش شد. نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار γ -PGA در بازه های زمانی ۱۴، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ h (شکل ۱) نشان داد که مقدار زیست پلیمر به طور پیوسته و قابل توجه افزایش یافته است؛ تولید از آغاز فرایند تخمیر هم زمان با رشد یاخته ای شروع شده و تا پایان فاز سکون ادامه می یابد. در مراحل اولیه، تولید γ -PGA به رشد یاخته ای وابسته بوده و سپس به صورت مستقل از رشد ادامه می یابد. سرعت تولید در مدت ۱۰ h نخست تخمیر کم است، اما پس از آن با سرعت بیشتری افزایش می یابد. از مدت ۱۴ h تا ۲۴ h کشت میکروبی غلظت محصول با شیب تندتری

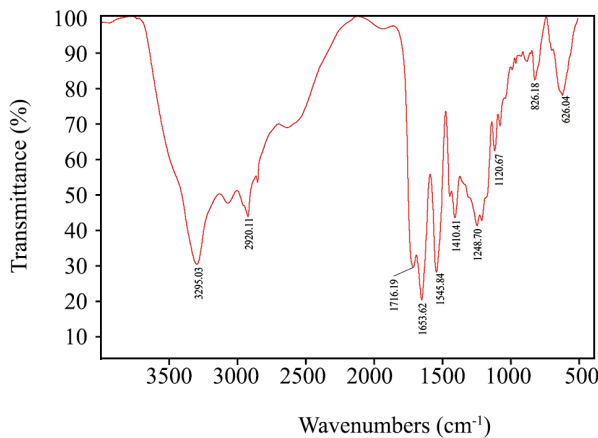
فلاسک دارای محیط کشت DMEM به همراه FBS ۱۰٪ (حجمی/حجمی) منتقل شده و در دمای 37°C ، رطوبت ۹۰٪ و غلظت کربن دی اکسید ۵٪ (حجمی/حجمی) گرم خانه گذاری شدند. ارزیابی سمیت یاخته ای به صورت غیرمستقیم و از روش عصاره گیری بر اساس استاندارد ISO 12-10993 انجام شد. در این روش، زخم پوش ها پس از سترون سازی با تابش فرابنفش (UV)، به قطعات 6 cm^2 برش داده شده و در ۱ mL محیط کشت در شرایط کربن دی اکسید ۵٪ (حجمی/حجمی) و دمای کشت 37°C گرم خانه گذاری شدند. بعد از مدت ۷۲ h عصاره خارج و به یاخته ها افزوده شد. این روش به دلیل جامد بودن زخم پوش ها و آغشته شدن زیست پلیمر γ -PGA روی الیاف ریون/پلی استر انتخاب شد که امکان بررسی آزادسازی واقعی زیست پلیمر و آثار احتمالی آن در شرایط شبیه سازی شده بدن را فراهم می کند.

بدین صورت که برای بررسی مقدار تکثیر یاخته ای و برای پایداری و چسبندگی مناسب، هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی با 1×10^4 cells/mL یاخته به همراه $100\ \mu\text{L}$ محیط کشت تلقیح شد و سپس به مدت ۲۴ h در دمای 37°C گرم خانه گذاری شد تا یاخته ها به کف ظرف کشت بچسبند و یک تک لایه کامل تشکیل شود. سپس، محیط کشت اضافی خارج شد و $90\ \mu\text{L}$ از عصاره زخم پوش به همراه $10\ \mu\text{L}$ FBS به هر چاهک کشت افزوده شد و یاخته ها به مدت ۲۴ h دیگر در مجاورت این عصاره ها گرم خانه گذاری شدند. پس از آن، محیط کشت خارج شد و $100\ \mu\text{L}$ محلول MTT با غلظت $0.5\ \text{mg/mL}$ به هر چاهک اضافه شد. پس از زمان ۴ h گرم خانه گذاری بلورهای فورمازان حاصل در ایزوپروپانول حل شدند و به مدت ۱۵ min روی دستگاه تکاننده (Stuart Scientific Orbital Shaker sol) قرار گرفتند. سپس، مقدار غلظت ماده حل شده در ایزوپروپانول با دستگاه ELISA reader, BioTek ELx808 ساخت آمریکا در طول موج $570\ \text{nm}$ اندازه گیری شد. مقدار تراکم نوری (OD) به طور مستقیم با تعداد یاخته های زنده و فعالیت متابولیکی متناسب است. بنابراین می توان از معادله (۲) چاهک دارای مقدار یاخته بیشتر را مشخص کرد و با نمونه کنترل منفی (محیط کشت DMEM شامل $10\ \mu\text{L}$ FBS) مقایسه کرد. گفتنی است، هر نمونه دارای پنج تکرار مستقل است [۲۷-۳۰].

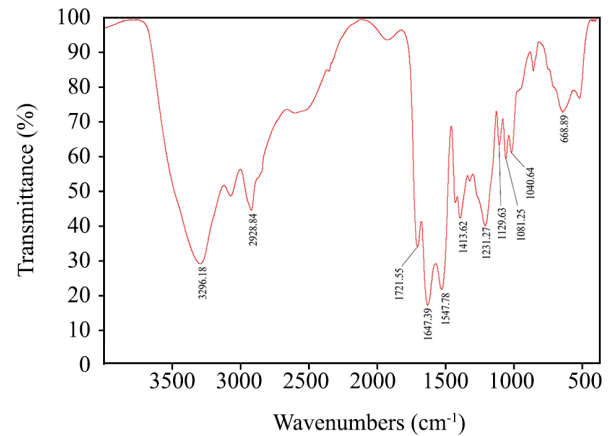
$$\text{viability \%} = (\text{mean OD of sample} / \text{mean OD of control}) \times 100 \quad (2)$$

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش ها حداقل در سه تکرار مستقل ($n=3$) انجام شد. داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) ارائه شده اند. تجزیه و



(a)



(b)

شکل ۲- طیف های (a) FT-IR نمونه استاندارد (b) γ -PGA تولیدی.

Fig. 2. FT-IR spectra (a) standard sample (b) produced γ -PGA.

تأیید می کند، بلکه ساختار ثانویه α -مارپیچ γ -PGA تولید شده را نیز به روشنی نشان می دهد.

طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته ($^1\text{H-NMR}$)

شکل ۳، طیف $^1\text{H-NMR}$ زیست پلیمر γ -PGA را به همراه نمونه استاندارد آن نشان می دهد. در این طیف، سه نوع هسته پروتون متمایز (α ، β و γ) مشاهده شد [۳۲، ۳۳]. جابه جایی شیمیایی مربوط به پروتون $\text{CH-}\alpha$ در ۴/۱۳ ppm، $\text{CH}_2\text{-}\beta$ در ۲/۰۴، ۲/۰۴ و ۱/۹۲ و $\text{CH}_2\text{-}\gamma$ در ۲/۳۴ ppm مشاهده شده اند. انطباق طیف زیست پلیمر با نمونه استاندارد، از مشاهده پیک های مشخص و بدون شیار یا وجود پیک های اضافی غیرمنتظره تأیید شد؛ به عبارت دیگر، پراکندگی غیرعادی پیک ها یا شیارهای جانبی که می توانست نشان دهنده آلودگی و ناخالصی باشد، مشاهده نشد که این همخوانی ساختاری، موفقیت آمیز بودن فرایند تولید زیست پلیمر γ PGA را تأیید می کند. همچنین اختلاف جزئی در جابه جایی شیمیایی می تواند به طور عمده ناشی از منبع تولید γ -PGA باشد، زیرا ریزاندامگان مختلف ممکن است، نسبت های کمی متفاوت از گروه های آمیدی و کربوکسیل را در زیست پلیمر تولید کنند. این برهم کنش های درون مولکولی هیدروژنی میان گروه های آمیدی و کربوکسیلات در زنجیر γ -PGA می تواند محیط شیمیایی پروتون ها را تغییر دهد و موجب جابه جایی اندک در طیف $^1\text{H-NMR}$ شود.

سنجش GPC و بررسی وزن مولکولی

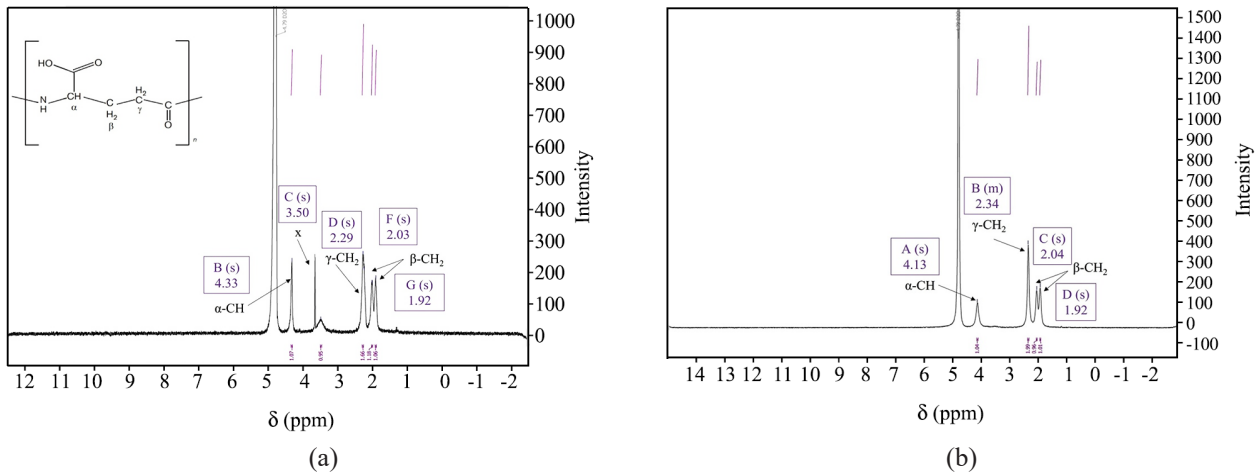
برای بررسی تغییرات وزن مولکولی γ -PGA طی فرایند تخمیر،

افزایش می یابد. این بازه نام برده بخش عمده ای از فاز رشد نمایی را شامل می شود. در نهایت، از ۸/۰۳ g/L در ۱۴ h به ۳۳/۵ g/L در ۷۲ h رسید و در روز سوم بازده تولید محصول به حداکثر می رسد.

طیف سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR)

شکل ۲ طیف FTIR زیست پلیمر γ -PGA به همراه نمونه استاندارد را نشان می دهد. در طیف γ -PGA، طیف جذب در 1721 cm^{-1} به ارتعاش گروه کربونیل (-COO) مربوط است. خمشی پیوند NH (آمید) در 1647 cm^{-1} ، ارتعاش کششی پیوند آمید ۲ در 1547 cm^{-1} مشاهده شد که نشان دهنده وجود پیوندهای آمیدی در ساختار پلی پتید است. ارتعاش کششی C=O در 1413 cm^{-1} و جذب های 1212 و 1081 cm^{-1} به ارتعاش کششی OH و CH مربوط هستند که هم پوشانی این ارتعاش های معمول در پلی پتیدها را نشان می دهد. همچنین ارتعاش CN در حدود 1120 cm^{-1} و NH در حدود 600 cm^{-1} ظاهر شدند.

مقایسه طیف γ -PGA با نمونه استاندارد نشان می دهد، موقعیت و شدت پیک ها کاملاً منطبق است، که حاکی از ساختار گروه های عاملی مشابه با نمونه استاندارد و خلوص زیاد زیست پلیمر تولید شده است. افزون بر این، بررسی موقعیت پیوندهای آمید ۱ و ۲ امکان تعیین ساختار ثانویه زیست پلیمر را فراهم می کند. در γ -PGA، پیوندهای آمید ۱ و ۲ در 1547 cm^{-1} و 1647 cm^{-1} قرار دارند، که مطابق با ساختار مارپیچ α پلی گلوتامات هاست. این در حالی است که ساختار صفحه ای β معمولاً پیوندهای آمید ۱ و ۲ را در محدوده 1525 و 1625 cm^{-1} نشان می دهند [۳۱]. بنابراین، تحلیل FTIR نه تنها وجود گروه های عملکردی زیست پلیمر را در مقایسه با نمونه استاندارد



شکل ۳- طیف های $^1\text{H-NMR}$ (a) نمونه استاندارد و (b) $\gamma\text{-PGA}$ تولیدی.

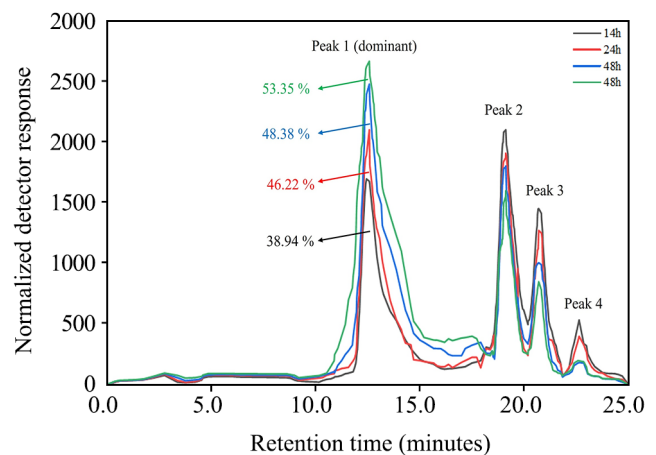
Fig. 3. $^1\text{H-NMR}$ spectra: (a) standard sample b) produced $\gamma\text{-PGA}$.

خروج و شماره هر پیک را نشان می دهد. تحلیل سهم نسبی زیر منحنی پیک غالب نشان داد، با توجه به حجم و مقدار تزریق یکسان، مقدار و سهم زیست پلیمر با وزن مولکولی زیاد ($4 \times 10^6 \text{ Da}$) از $38/94\%$ در ۱۴ h به ترتیب به $46/22\%$ در ۲۴ h و $48/38\%$ در ۴۸ h و در نهایت $53/35\%$ در ۷۲ h افزایش یافت (همان طور که شکل ۴ نشان می دهد). در مقابل، سهم مولکول های با وزن $> 2 \times 10^2 \text{ Da}$ کاهش تدریجی داشت. این روند نشان می دهد، با گذشت زمان، تعادل سامانه به سمت تجمع زیست پلیمرهای با وزن مولکولی $4 \times 10^6 \text{ Da}$ حرکت می کند. با وجود ثبات میانگین وزن مولکولی، تغییرات چشمگیری در الگوی توزیع وزن مولکولی طی فرایند تخمیر مشاهده شد. مطالعات پیشین نیز نشان داده اند، توزیع وزن مولکولی $\gamma\text{-PGA}$ در مراحل مختلف تخمیر تغییر می کند. با وجود این، چنین تغییراتی به صورت سامانمند و کمی ارزیابی نشده و سهم نسبی وزن مولکولی در طول زمان کمتر مورد توجه قرار گرفته است [۱۲، ۱۴]. این تحلیل کمی امکان بررسی دقیق توزیع وزن مولکولی $\gamma\text{-PGA}$ و ارتباط آن با زمان تخمیر و کارایی خون ایستی زیست پلیمر را فراهم می کند. همچنین نتایج می تواند در بهینه سازی فرایند تولید زخم پوش های خون ایستان با ویژگی های کنترل شده وزن مولکولی نقش مؤثری ایفا کند.

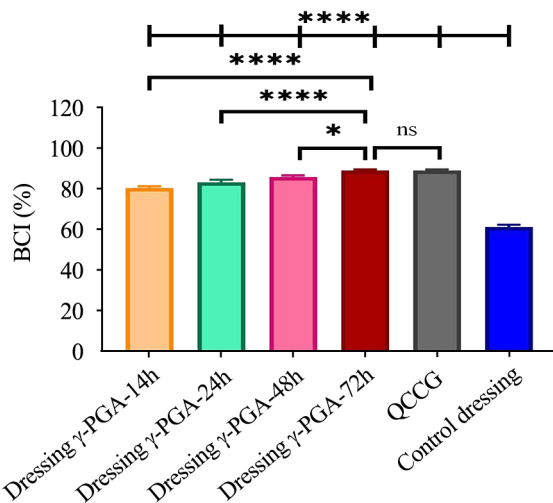
ارزیابی شاخص انعقاد و رابطه آن با وزن مولکولی و زمان تخمیر

هدف از این مطالعه، بررسی اثر زمان تخمیر بر ویژگی های مولکولی $\gamma\text{-PGA}$ و کارایی خون ایستان دارای این زیست پلیمر بود. بنابراین، زخم پوش های خون ایستان با $\gamma\text{-PGA}$ استخراج شده در بازه های زمانی

سنجش GPC انجام شد. نمونه ها شامل $\gamma\text{-PGA}$ استخراج شده از سویه *Bacillus licheniformis* در زمان های ۱۴، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ h بودند. سوانگاره های حاصل (شکل ۴) نشان دهنده چهار پیک اصلی در بازه های زمانی تقریبی ۱۶-۱۱، ۲۰-۱۸، ۲۱-۲۰ و ۲۳-۲۲ min بودند که بیانگر وجود چهار جمعیت وزنی متمایز در زیست پلیمر تولید شده هستند. شکل ۵ منحنی توزیع وزن مولکولی برای نمونه ۷۲ h را نشان می دهد. پیک غالب به زیست پلیمر با وزن مولکولی زیاد ($4 \times 10^6 \text{ Da}$) مربوط بود و در تمام نمونه ها میانگین وزن مولکولی نسبتاً ثابتی نشان داد، در حالی که سایر پیک ها نماینده جمعیت سبک تر زیست پلیمر بودند. جدول ۱ بازه های وزنی، زمان



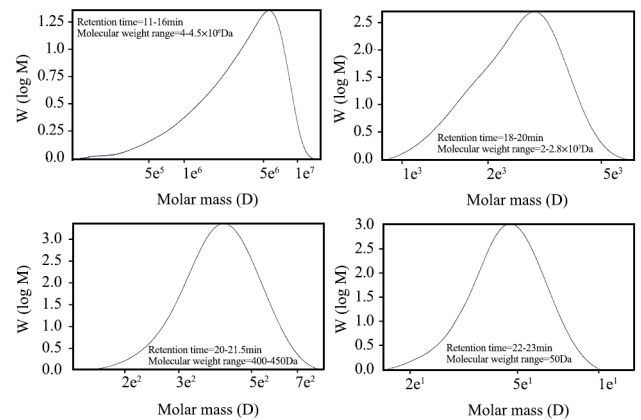
شکل ۴- طیف های GPC $\gamma\text{-PGA}$ تولید شده در زمان های مختلف تخمیر.
Fig. 4. GPC spectra of produced $\gamma\text{-PGA}$ at different fermentation times.



شکل ۶- شاخص انعقاد خون زخم پوش های خون ایستان در زمان های مختلف تخمیر γ -PGA تولیدی (میانگین \pm انحراف معیار، تکرار = ۳، $p^* < 0.05$ ، $p^{****} < 0.0001$).

Fig. 6. Blood coagulation index of hemostatic dressings at different fermentation times of produced γ -PGA (Mean \pm SD, n = 3, *p < 0.05, ****p < 0.0001).

بسیاری برخوردار است؛ زیرا خواص فیزیکی و زیستی محصول نهایی، از جمله گرانروی، زیست چسبندگی و قابلیت مهار خونریزی به طور مستقیم تحت تأثیر ساختار و وزن مولکولی زیست پلیمر قرار دارند [۱۲، ۱۴]. گرانروی به ماهیت و ساختار زیست پلیمر، برهم کنش های مولکولی آن و وزن مولکولی وابسته است و به عنوان یکی از ویژگی های کلیدی زیست پلیمرها، نقش مهمی در تعیین کاربردهای مناسب آن ها ایفا می کند. برای این زیست پلیمر تغییرات گرانروی در طول زمان تخمیر، روند افزایشی را تا ۷۲ h نشان می دهد. افزایش گرانروی در طول زمان می تواند به تجمع γ -PGA در اثر فرایند تخمیر و هم زدن مداوم در تکاننده گرم خانه نسبت داده شود. این شرایط موجب شکل گیری تجمع ها به واسطه برهم کنش ها و



شکل ۵- الگوی توزیع وزن مولکولی γ -PGA در ۷۲ h.

Fig. 5. Molecular weight distribution pattern of γ -PGA at 72 h.

مختلف تخمیر تهیه و شاخص انعقاد خون آن ها ارزیابی شد (شکل ۶). نتایج نشان داد، افزایش مدت زمان تخمیر با بهبود ویژگی های ساختاری زیست پلیمر همراه بوده و این موضوع به ارتقای کارایی خون ایستی زخم پوش ها منجر شده است. به طور مشخص، شاخص انعقاد خون از ۸۰/۶۸٪ در ۱۴ h تخمیر به ۸۸/۴۸٪ در نمونه با ۷۲ h تخمیر افزایش یافت که بیانگر اثربخشی بیشتر زیست پلیمرهای تولید شده در دوره های طولانی تر فرایند تخمیر در کنترل خونریزی است. شایان ذکر است، نمونه شاهد (کنترل منفی) شامل پارچه ایاف ریون/پلی استر بدون زیست پلیمر خون ایستان، شاخص انعقادی حدود ۶۰٪ را نشان داد که بیانگر نقش تعیین کننده γ -PGA در بهبود فرایند خون ایستی است و نمونه کنترل مثبت زخم پوش تجاری (QCCG) QuikClot Combat Gauze شامل پارچه ریون/پلی استر دارای کائولن دارای شاخص انعقادی در حدود ۸۹/۸٪ بود، که به عبارتی استفاده از نمونه کنترل مثبت کارایی قابل قبول زخم پوش γ -PGA را در مقایسه با نمونه های تجاری تأیید می کند.

با افزایش زمان تخمیر، محلولی با گرانروی بیشتر حاصل می شود، این ویژگی در کاربردهایی نظیر زخم پوش های زیستی از اهمیت

جدول ۱- بازه های وزن مولکولی γ -PGA براساس سنجش GPC.

Table 1. Molecular weight ranges of γ -PGA determined by GPC.

Peak No.	Retention time (min)	Molecular weight range (Da)	Assigned population
Peak 1 (dominant)	11-16	$4-4.5 \times 10^6$	High-molecular-weight polymer
Peak 2	18-20	$2-2.8 \times 10^3$	Medium-molecular-weight polymer
Peak 3	20-21.5	400-450	Oligomeric species
Peak 4	22-23	50	Monomeric species

جدول ۲- وزن زخم پوش های γ -PGA پیش و پس از آغشته سازی و مقدار جذب ماده خون ایستان.

Table 2. Weight of γ -PGA dressings before and after coating and their absorbed hemostatic content.

Row	Dressings	Weight of before coating (g)	Weight of after coating (g)	Absorbed amount (g)
1	Dressing- γ -PGA-14h	0.5048	0.5498	0.045
2	Dressing- γ -PGA-14h	0.5049	0.5501	0.0452
3	Dressing- γ -PGA-14h	0.5098	0.5552	0.0454
4	Dressing- γ -PGA-14h	0.5090	0.5548	0.0458

می کنند، خواص فیزیکی و شیمیایی و زیستی زیست پلیمر تابعی از زمان تخمیر است و نقش مستقیمی در کارایی نهایی زخم پوش و کنترل انعقاد خون ایفا می کند.

بررسی سمیت یاخته ای و یاخته سازگاری

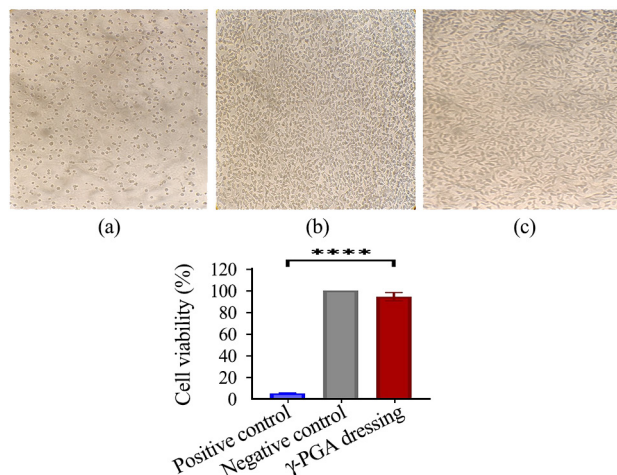
یاخته سازگاری به عنوان یکی از شاخص های اولیه در ارزیابی زیست سازگاری کلی مواد شناخته می شود و از الزام های اولیه برای کاربرد زخم پوش های خون ایستان است، که در این مطالعه با استفاده از آزمون غیرمستقیم MTT ارزیابی شد. در این آزمون، فعالیت متابولیکی یاخته ها بر اساس تبدیل پودر تترازولیوم زرد به بلورهای فورمازان نامحلول سنجیده می شود؛ به طوری که مقدار OD اندازه گیری شده با استفاده از دستگاه ELISA به طور مستقیم با تعداد یاخته های زنده متناسب است. با توجه به اینکه ماده فعال خون ایستان در تمام زخم پوش ها یکسان بوده و تمام نمونه های دارای γ -PGA با فرمول بندی پایه مشابه بودند، آزمون سمیت یاخته ای فقط روی نمونه زخم پوش γ -PGA با ۷۲ h تخمیر انجام شد، که بیشترین شاخص انعقاد خون را در میان سایر زخم پوش ها نشان داد (شکل ۶). از آنجا که ترکیبات پایه در سایر زخم پوش ها نیز یکسان است، می توان انتظار داشت، آن ها نیز رفتار زیستی مشابهی نشان می دهند. نتایج آزمون (شکل ۷) نشان داد، زنده مانگی یاخته با روش MTT در زخم پوش γ -PGA، ۹۵/۱۱٪ بوده و هیچ اثر سمیت یاخته ای روی یاخته های 929L مشاهده نشد. این نتایج حاکی از سازگاری یاخته ای عالی زخم پوش و ایمنی ترکیبات آزاد شده از آن است.

نتیجه گیری

هدف این پژوهش بررسی اثر زمان فرایند تخمیر بر ویژگی های مولکولی γ -PGA و ارتباط آن با عملکرد خون ایستان زخم پوش های

واکنش های بین مولکولی شده و در نتیجه به ایجاد زنجیرهای بلندتر γ -PGA منجر می شوند. در این بازه زمانی، زنجیرهای زیست پلیمر فرصت بیشتری برای رشد و تشکیل پیوندهای منظم پیدا می کنند. اما در مقابل میانگین تغییرات وزن مولکولی در برابر مدت زمان تخمیر تفاوت معنی داری نشان نداد [۱۲، ۱۴].

افزون بر این، وزن زخم پوش ها پیش از آغشته سازی و پس از خشک شدن کامل اندازه گیری شد (جدول ۲). نتایج نشان داد، اختلاف مقدار جذب زخم پوش ها ناچیز است که نمایانگر یکنواختی مناسب فرایند آغشته سازی و مقدار ماده خون ایستان اعمال شده است. از این رو، مقایسه کارایی خون ایستان زخم پوش ها بر اساس نمونه هایی با مقدار پوشش دهی تقریباً یکسان انجام شده و می توان نتیجه گرفت که تفاوت های مشاهده شده در شاخص های خون ایستان به طور عمده ناشی از ویژگی های مولکولی γ -PGA بوده است. این نتایج تأیید



شکل ۷- سنجش یاخته سازگاری زخم پوش γ -PGA (میانگین \pm انحراف معیار، تکرار = ۵، $p < 0.0001$).

Fig. 7. Cytocompatibility analysis of γ -PGA dressing (Mean \pm SD, n = 5, ****p < 00001).

زیست پلیمر در وزن مولکولی 10^6 Da - $4/5$ - 4 ، به دلیل دستیابی به بیشترین شاخص انعقاد به عنوان نمونه بهینه انتخاب شد. این موضوع در مقایسه مستقیم با زخم پوش شاهد مبتنی بر الیاف ریون/پلی استر (بدون γ -PGA) که شاخص انعقاد را فقط حدود ۶۰٪ نشان داد، کاملاً مشهود است. افزون بر این، کارایی زخم پوش γ -PGA در این مطالعه، با دستیابی به کارایی قابل قبول و نزدیک به زخم پوش تجاری QCCG (شاخص انعقاد ۸۹/۸٪)، قابلیت بالقوه این زیست پلیمر را در توسعه نسل جدیدی از زخم پوش های خون ایستان تأیید می کند. در مجموع نتایج این پژوهش نشان می دهد، کنترل زمان تخمیر می تواند به عنوان ابزار مؤثری برای هدایت توزیع وزن مولکولی γ -PGA و بهبود کارایی خون ایستی زخم پوش های مبتنی بر این زیست پلیمر استفاده شوند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می کنند، هیچ گونه تضاد منافی که بتواند بر نتایج پژوهش اثر بگذارد، وجود ندارد. منابع مالی این پژوهش توسط دانشگاه صنعتی مالک اشتر تهران تأمین شده است.

قدردانی

نویسندگان مقاله از شورای پژوهشی دانشگاه های صنعتی مالک اشتر (MUT) برای حمایت مالی از این پژوهش تشکر می کنند.

مراجع

- Hickman D.A., Pawlowski C.L., Sekhon U.D.D., Marks J., and Gupta A.S., Biomaterials and Advanced Technologies for Hemostatic Management of Bleeding, *Adv. Mater.*, **30**, 2018.
- Tong Z., Yang J., Lin L., Wang R., Cheng B., Chen Y., Tang L., Chen J., Ma X., In Situ Synthesis of Poly(γ -glutamic acid)/Alginate/AgNP Composite Microspheres with Antibacterial and Hemostatic Properties, *Carbohydr. Polym.*, **221**, 21-28, 2019.
- Wang Y., Wang P., Ji H., Ji G., Wang M., and Wang X., Analysis of Safety and Effectiveness of Sodium Alginate/Poly (γ -glutamic acid) Microspheres for Rapid Hemostasis, *ACS. Appl. BioMater.*, **4**, 6539-6548, 2021.
- Puppi D., Migone C., Morelli A., Bartoli C., Gazzarri M., Pasini D., and Chiellini F., Microstructured Chitosan/Poly(γ -glutamic acid) Polyelectrolyte Complex Hydrogels by Computer-Aided Wet-Spinning for Biomedical Three-Dimensional Scaffolds, *J. Bioact. Compat. Polym.*, **31**, 2016.
- Choi J.C., Uyama H., Lee C.H., and Sung M.H., Promotion Effects of Ultra-High Molecular Weight Poly- γ -Glutamic Acid on Wound Healing, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 941-945, 2015.
- Feng J., Shi Q., Zhou G., Wang L., Chen A., Xie X., Huang X., and Hu W., Improved Production of Poly(γ -glutamic acid) with Low Molecular Weight Under High Ferric Ion Concentration Stress in *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a, *Process. Biochem.*, **56**, 30-36, 2017.
- Halmschlag B., Steurer X., Putri S.P., Fukusaki E., and Blank L.M., Tailor-made Poly-Gamma-Glutamic Acid Production, *Metab. Eng.*, **55**, 239-248, 2019.
- Kouchesfahani M., Bahrami A., and Babaeipour V., Enhanced Production of Poly- γ -Glutamic Acid by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a Using simultaneous Pulse-Feedings of Citrate and Glutamate, *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2021.
- Lee J.M., Kim J.H., Kim K.W., Lee B.J., Kim D.G., Kim Y.O.,

تهیه شده بر پایه این زیست پلیمر بود. نتایج سنجش GPC نشان داد، اگرچه میانگین وزن مولکولی γ -PGA در بازه های زمانی مختلف تخمیر تغییر معناداری نداشت، اما توزیع وزن مولکولی آن به طور قابل توجهی تحت تأثیر زمان تخمیر قرار گرفت. به گونه ای که با افزایش زمان تخمیر از ۱۴ h تا ۷۲ h، سهم و مقدار جمعیت زیست پلیمر با وزن مولکولی زیاد (در محدوده 10^6 Da - $4/5$ - 4) افزایش یافت و هم زمان، سهم گونه های سبک تر شامل اولیگومرها (در بازه تقریبی 2000 Da تا 50 Da) کاهش یافت. این تغییرات در توزیع وزن مولکولی، که با افزایش گران روی محلول های زیست پلیمر نیز همراه بود، بیانگر بازآرایی تدریجی زنجیرهای γ -PGA و غلبه جمعیت های زیست پلیمر سنگین تر طی فرایند تخمیر است. نتایج FTIR و $^1\text{H-NMR}$ نیز تطابق گروه های عاملی، ساختاری و خلوص زیاد زیست پلیمر تولید شده را تأیید کردند.

ارزیابی کارایی خون ایستان نیز نشان داد، شاخص انعقاد خون زخم پوش ها با افزایش زمان تخمیر به صورت کمی بهبود یافته است؛ به طوری که این شاخص از حدود ۸۰/۶۸٪ در نمونه با ۱۴ h تخمیر به ۸۸/۴۸٪ در نمونه با ۷۲ h تخمیر افزایش یافت. یافته های این پژوهش نشان می دهد، زیست پلیمر γ -PGA، به ویژه با توجه به توزیع وزن مولکولی بهینه شده، نقش مؤثری در ارتقای عملکرد خون ایستان زخم پوش ایفا می کند. براین اساس، زخم پوش دارای γ -PGA استخراج شده در زمان تخمیر ۷۲ h با بیشترین مقدار

- Lee J.H., Kong I.S., Physicochemical Properties, Production, and Biological Functionality of Poly-Gamma-d-Glutamic Acid with Constant Molecular Weight from Halotolerant *Bacillus* sp, SJ-10, *Int. J. Biol. Macromol.*, **108**,598-607, 2018.
10. Shih I.L., Van Y.T., and Chang Y.N., Application of Statistical Experimental Methods to Optimize Production of Poly-(γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826, *Enzyme. Microb. Technol.*, **31**, 213-220, 2002.
 11. Zhang X., Li H., Guo Y., Ding S., Chen G., Liang Z., and Zheng W., An Integrated Strategy for Recovery and Purification of Poly- γ -Glutamic Acid from Fermentation Broth and Its Techno-Economic Analysis, *Sep. Purif. Technol.*, **278**, 2021.
 12. Azarhava H., Bajestani M.I., Jafari A., Vakilchah F., and Mousavi S.M., Production and Physicochemical Characterization of Bacterial Poly(γ -glutamic acid) to Investigate Its Performance on Enhanced Oil Recovery, *Int. J. Biol. Macromol.*, **147**,1204-1212, 2020.
 13. Bajaj I. and Singhal R., Poly(glutamic acid): An Emerging Biopolymer of Commercial Interest, *Bioresour. Technol.*, **102**, 5551-5561, 2011.
 14. de Cesaro A., da Silva S.B., da Silva V.Z., and Ayub M.A.Z., Physico-chemical and Rheological Characterization of Poly-Gamma-Glutamic Acid Produced by a New Strain of *Bacillus subtilis*, *Eur. Polym. J.*, **57**, 91-98, 2014.
 15. Elbanna K., Alsulami F.S., Neyaz L.A., and Abulreesh H.H., Poly(gamma glutamic acid): A Unique Microbial Biopolymer with Diverse Commercial Applicability, *Front. Microbiol.*, **15**, 1348411, 2024.
 16. Ijadi Bajestani M., Mousavi S.M., Mousavi S.B., Jafari A., Shojaosadati S.A., Purification of Extra Cellular Poly(gamma glutamic acid) as an Antibacterial Agent Using Anion Exchange Chromatography, *Int. J. Biol. Macromol.*, **113**,142-149, 2018.
 17. Huang M.H., and Yang M.C., Swelling and Biocompatibility of Sodium Alginate/Poly(γ -glutamic acid) Hydrogels, *Polym. Adv. Technol.*, **21**,561-567, 2010.
 18. Lin Y.H., Lin J.H., Peng S.F., Yeh C.L., Chen W.C., Chang T.L., Liu M.J., and Lai C.H., Multifunctional Gentamicin Supplementation of Poly(γ -glutamic acid)-Based Hydrogels for Wound Dressing Application, *J. Appl. Polym. Sci.*, **120**, 1057-1068, 2010.
 19. Liu B., Huang W., Yang G., An Y., Yin Y., Wang N., and Jiang B., Preparation of Gelatin/Poly(γ -glutamic acid) Hydrogels with Stimulated Response by Hot-Pressing Preassembly and Radiation Crosslinking, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, **116**, 111259, 2020.
 20. Liu W.C., Wang H.Y., Lee T.H., and Chung R.J., Gamma-Polyglutamate/Gelatin Composite Hydrogels Crosslinked by Proanthocyanidins for Wound Healing, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, **101**, 630-639, 2019.
 21. Xu T., Peng F., Zhang T., Chi B., Xu H., Mao C., and Feng S., Poly(gamma-glutamic acid), Coagulation? Anticoagulation?, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **27**,1599-1610, 2016.
 22. Yu G., Yang C., Dan N., Dan W., and Chen Y., Polyglutamic Acid Grafted Dopamine Modified Collagen-Poly(vinyl alcohol) Hydrogel for a Potential Wound Dressing, *Des. Monomers Polym.*, **24**, 293-304, 2021.
 23. Kouchesfahani M., Bahrami A., and Babaeipour V., Improving Poly(γ -glutamic acid) Production by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945 Strain under Citrate and Glutamate Pulsed Feedings and Biopolymer Characteristic Evaluation, *Polym. Bull.*, 2022.
 24. Wei X., Ji Z., and Chen S., Isolation of Halotolerant *Bacillus licheniformis* WX-02 and Regulatory Effects of Sodium Chloride on Yield and Molecular Sizes of Poly-Gamma-Glutamic Acid, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **160**,1332-1340, 2010.
 25. Barba B.J., Aranilla C., Rellve L., Cruz V., Vista J.R., and Abad L.V., Hemostatic Granules and Dressing Prepared from Formulations of Carboxymethyl Cellulose, kappa-Carrageenan and Polyethylene Oxide Crosslinked by Gamma Radiation, *Radiat. Phys. Chem.*, **144**, 2017.
 26. Lundin J.G., McGann C.L., Daniels G.C., Streifel B.C., and Wynne J.H., Hemostatic Kaolin-Polyurethane Foam Composites for Multifunctional Wound Dressing Applications, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, **79**,702-709, 2017.
 27. Bargavi P., Balakumar S., and Raghunandhakumar S., Multi-Functional Bandage-Bioactive Glass/Metal Oxides/Alginate Composites Based Regenerative Membrane Facilitating Re-Epithelialization in Diabetic Wounds with Sustained Drug Delivery and Anti-bactericidal Efficacy, *Int. J. Biol. Macromol.*, **262**, 130054, 2024.
 28. Feng Y., He Y., Lin X., Xie M., Liu M., and Lvov Y., Assembly of Clay Nanotubes on Cotton Fibers Mediated by Biopolymer for Robust and High-Performance Hemostatic Dressing, *Adv. Healthc. Mater.*, **12**, e2202265, 2023.
 29. Shakiba-Marani R., and Ehtesabi H., A flexible and Hemostatic Chitosan, Polyvinyl Alcohol, Carbon Dot Nanocomposite Sponge for Wound Dressing Application, *Int. J. Biol. Macromol.*, **224**,831-839, 2023.

30. Zhao H., Xu Y., Wang S., Li P., Wang T., Zhang F., Li J., Zhang Y., Ma J., and Zhang W., "Jianbing" Styling Multifunctional Electrospinning Composite Membranes for Wound Healing, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **10**, 943695, 2022.
31. Nguyen L.T., Le Tran H., Mai P.T., Duong V.B., Nguyen L-T.T., and Nguyen H.T., Poly(L-glutamic acid) via Catalytical Hydrogenation for the Fabrication of Carbon Nanotube Nanocomposites, *Mater. Res.*, **24**, 2021.
32. Cao M., Geng W., Zhang W., Sun J., Wang S., Feng J., Zheng P., Jiang A., Song C., Engineering of Recombinant *Escherichia coli* Cells co-Expressing Poly- γ -Glutamic Acid (γ -PGA) Synthetase and Glutamate Racemase for Differential Yielding of γ -PGA, *Microb. Biotechnol.*, **6**, 675-684, 2013.
33. Kouchesfahani M., Bahrami A., and Babaeipour V., Poly (γ -glutamic acid) Production Enhancement in Submerged Fermentation of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a Using Optimization of Operating Variables and Glutamate Feeding, *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, 2022.