مروری بر پروبیوتیک‌های نوترکیب

محمد ربانی خوراسگانی[1]، هاجرالسادات منصوری تهرانی[2]*

۱. گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان

۲. گروه زیست‌فناوری میکروبی دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین دانشگاه اصفهان

چکیده/پروبیوتیک‌ها، افزودنی‌های غذایی میکروبی هستند که از طریق بهبود تعادل میکروبی روده تاثیرات سودمندی بر میزبان دارند. مطالعاتی که در چند دهه اخیر صورت گرفته است اثبات کرده اند که استفاده از پروبیوتیک‌ها به حفظ سلامت و قدرت بدن، مبارزه با بیماری‌های روده‌ای و سایر بیماری‌ها کمک می‌کند. هرچند پروبیوتیک های متداول مورد استفاده گسترده هستند اما برای بهره گیری بهتر در صنایع غذایی و مصارف درمانی، نوترکیبی در پروبیوتیکها مورد توجه قرار گرفته است . دستکاری ژنتیکی در پروبیوتیک‌ها می‌تواند باعث بهبود تخمیر کربوهیدراتی، افزایش تولید متابولیت‌های خاص، تولید یا افزایش فعالیت آنزیم‌ها (نظیر آنزیم هاي پروتئولیتیک، آلفا آمیلاز، بتاگالاکتوزیدازو آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان) و یا افزایش ظرفیت تولید مواد سودمند از قبیل باکتریوسین، ویتامین‌ها و مواد ضدالتهابی شود. از طرف دیگر برخی باکتری‌های اسید لاکتیک این قابلیت را دارند که باسیستم بیانی بالا به کارخانه سلولی برای تولید پروتئین‌ها تبدیل شوند. در بررسی حاضر با مطالعه و جمع‌بندی مقالات در دسترس و مهم، به معرفی و کاربرد چندین پروبیوتیک نوترکیب پرداخته شده است.

با ایجاد پروبیوتیکهای نوترکیب، بهبود ویژگیهای پروبیوتیکها (چسبندگی به مخاط، مقاومت به اسید،...)، تهیه واکسن، انتقال دارو، کاهش آلرژی، تعدیل سیستم ایمنی و ایجاد مسیرهای متابولیکی کاراتر امکان پذیر می‌گردد.

واژگان کلیدی:پروبیوتیک‌ها؛ پروتئین‌های نوترکیب؛ مصارف درمانی؛ صنایع غذایی

مقدمه

فرآورده‌های پروبیوتیکی حاوی باکتری‌های مفیدی هستند که اثرات مفیدی در سلامتی مصرف کننده برجای می‌گذارند. اصطلاح پروبیوتیک[1] که ریشه لاتین-یونانی دارد، به معنی برای زندگی است و سازمان جهانی بهداشت، این اصطلاح را به میکروارگانیسم‌های زنده‌ای اطلاق می‌کند که در صورت مصرف به میزان لازم، اثرات سلامت‌زایی موثری برای میزبان خود دارند. برخی ترکیبات بطور طبیعی حاوی پروبیوتیکها هستند مانند شیر و کلستروم و لااقل بخشی از اثرات مهم آنها برای انسان ناشی از حضور باکتری‌های اسید لاکتیك است (۴-۱).

پروبیوتیک‌ها به دو صورت مصرف می‌شوند: به صورت مکمل‌های غذایی (به شکل پودر یا کپسول) و مواد غذایی غنی شده با پروبیوتیک‌ها. استفاده از پروبیوتیک‌ها نه فقط در انسان بلکه امروزه در مورد حیوانات به ویژه درغذای طیور صنعتی به فراوانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵).

هاجرالسادات منصوری تهرانی، کارشناس ارشد

کارشناس ارشد زیست‌فناوری میکروبی دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین دانشگاه اصفهان

پست الکترونیک: hajar_mansouri@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱ • تاریخ پذیرش:۹۲/۸/۲۷

1. Probiotic

در ابتدای قرن بیستم این طور تصور میشد که پروبیوتیک‌ها با بهبود توازن میکروبی روده‌ای و جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا و توکسین‌زا منافعی برای بدن میزبان داشته باشند. امروزه بررسی‌های کامل‌تر و ثبت شده‌ای در حال انجام است که تاثیرات ویژه پروبیوتیک‌ها را برکاهش علائم بیماری تورم مزمن روده[2]، پیشگیری و درمان اسهال ناشی از عوامل عفونی[3]، عفونتهای دستگاه ادراری - تناسلی[4]، بیماری‌های آتوپیک[5]، سندرم روده تحریک پذیر[6] و التهاب مزمن روده‌ای[7] تایید می‌کند (۵). دلایل اهمیت پروبیوتیک برای انسان بی‌خطر بودن و ویژگی‌های زیستی و فن‌آوری آن است. بی‌خطر بودن پروبیوتیک‌ها به خاطر این است که خاستگاه و مبداء اولیه آن‌ها از بدن انسان است، از دستگاه گوارش انسان سالم قابل جداسازی هستند، این میکروارگانیسم‌ها در تاریخچه خود مسبب بیماری نبوده‌اند و منتقل کننده ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک نیستند.

مهمترین ویژگی‌های زیستی آن‌ها عبارت است از؛ مقاومت به اسید و شیرابه معده، مقاومت به شیره صفرا، قابلیت چسبندگی (کلونیزه شدن) در دستگاه گوارش، تعدیل ایمنی سیستمیک و مخاطی میزبان، فعالیت آنتاگونیستی برعلیه بیماری‌زاها و خنثی سازی مواد جهش‌زا و مواد سرطان‌زا (۶).

مهمترین ویژگی‌های فن‌آوری پروبیوتیک‌ها عبارتند از؛ مقاومت در برابرفاژ، بقاء طی فرایند تولید محصول، قابلیت کشت در مقیاس بالا، عدم تاثیرمنفی روی مزه فرآورده وپایداری درمحصول (۷).

مصارف درمانی پروبیوتیک‌ها شامل؛ کنترل عفونت‌ها، برقراری توازن در سیستم ایمنی، کاهش حساسیت در برابر مواد حساسیت‌زا، کنترل عدم تحمل لاکتوز، کاهش سطح کلسترول سرم و پیشگیری از سرطان است. کنترل عفونت‌ها دربرگیرنده؛ اسهال (ناشی از باکتری، ویروس، مصرف آنتی بیوتیک)، بیماری های التهابی روده، عفونت دستگاه ادراری، سپسی پس از جراحی و پوسیدگی دندان می‌باشد(۸).

گردش مالی فرآورده‌های پروبیوتیک در کشور آمریکا در سال ۲۰۰۵ میلادی حدود ۷۶۴ میلیون دلار و برای سال ۲۰۱۰میلادی ۱,۱ میلیارد دلار تخمین زده شده است. با توجه به اینکه در کشورهای اروپایی و آسیایی مصرف فراورده‌های غذایی واجد پروبیوتیک بیشتر از آمریکا است، گردش مالی بیشتری دراین کشورها برآورد می‌شود(۹).

پروبیوتیک‌ها شامل دو دسته هستند: متداول (بدون تغییر ژنتیکی) و نوترکیب. هرچند پروبیوتیک‌های متداول مورد استفاده گسترده هستند اما برای بهره‌گیری بهتر، نوترکیبی در پروبیوتیک‌ها مورد توجه قرار گرفته است.

اهداف ایجاد پروبیوتیک‌های نوترکیب:

اهداف ایجاد پروبیوتیک های نوترکیب شامل؛ بهبود ویژگی‌های پروبیوتیک‌ها (چسبندگی به مخاط، مقاومت به اسید،...)، تهیه واکسن، انتقال دارو، کاهش حساسیت، تعدیل سیستم ایمنی و ایجاد مسیرهای متابولیکی کاراتر است (۷). دستکاری ژنتیکی در پروبیوتیک‌ها می‌تواند باعث بهبود تخمیر کربوهیدراتی، افزایش تولید متابولیت‌های خاص، تولید یا افزایش فعالیت آنزیم‌ها (پروتئولیتیک، آلفا آمیلاز، بتاگالاکتوزیداز) و یا افزایش ظرفیت تولید مواد سودمند از قبیل باکتریوسین، ویتامین‌ها، مواد ضدالتهابی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شود.

اولین هدف در زیست فن‌آوری یا مهندسی ژنتیک در پروکاریوت‌ها این است که تحمل تنش خارجی (شبیه دما و رطوبت) را افزایش دهند. میکروارگانیسم‌ها این کار را با جمع‌آوری محلول‌های سازگار بتائین و تره‌هالوز انجام می‌دهد. سیستم بتائین در لیستریا مونوسیتوژنز[8] وجود دارد که توسط یک ژن کد می‌شود و انتقال دهنده بتائین می‌باشد.

هدف دیگر این است که همسانه‌سازی پروبیوتیک‌ها در لوله گوارش بهبود یابد. با همسانه‌سازی ژن betl به داخل بیفیدوباکتریوم بروه[9] سویه کلون شده به محتویات روده شامل نمک‌های صفراوی و ... تحمل پیدا می‌کند(۱۰).

هدف دیگر از زیست فن‌آوری پروبیوتیک‌ها این است که سویه‌هایی به رقابت بیماری‌زایی افزایش یافته تولید کنیم. از آن‌جایی که عوامل بیماری‌زاها از الیگوساکاریدهای سطح سلول به عنوان گیرنده استفاده می‌کنند، زیست فن‌آوری با بیان ساختارهایی که نقش گیرنده را تقلید می‌کنند، موجب اتصال عوامل بیماری‌زا به این ساختارها شده و عوامل بیماری‌زا را برای

2. Chronic intestinal inflammatory diseases
3. Pathogen-induced diarrhea
4. Urogenital infections
5. Atopic diseases
6. Irritable bowel syndrome
7. Inflammatory Bowel Diseases
8. Listeria monocytogenes
9. Bifidobacterium breve

سلول میزبان بی‌ضرر می‌سازند.

مراحل ایجاد نوترکیبی در پروبیوتیک‌ها:

- استخراج ژن از موجود زنده مورد نظر
- تکثیر ژن با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[10]
- انتقال ژن به پلاسمید مطلوب توسط آنزیم های محدودالاثر
- انتقال پلاسمید به پروبیوتیک با روش ترانسفورماسیون
- جداسازی پروبیوتیک های ترانسفورم شده
- تایید تولید محصول نوترکیب توسط باکتری ترانسفورم شده
- تایید کارا بودن محصول نوترکیب
- تکثیر پروبیوتیک نوترکیب
- آماده سازی پروبیوتیک نوترکیب جهت نگهداری، عرضه و مصرف

در حال حاضر برخی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند باسیستم بیانی بالا به کارخانه سلولی برای تولید پروتئین‌ها تبدیل شوند. شناسایی و جداسازی پلاسمیدهای سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک امکان توسعه ناقل‌های همسانه‌سازی را فراهم ساخته است. این ناقل‌ها شامل نقطه آغاز همانندسازی، نشانگر برای مقاومت به آنتی‌بیوتیک، مکان‌های همسانه‌سازی متعدد و ناقل‌های متعدد شامل پروموتورهای القایی و دائمی هستند. سیستم NICIN [11] یکی از موفق‌ترین سیستم‌های بیانی به کار گرفته شده در باکتری‌های گرم مثبت مانند باکتری‌های اسید لاکتیک است که توسط باکتریوسین نایسین کنترل می‌گردد(۱۱). یک پروموتور القایی با گزیلوز در لاکتوکوکوس لاکتیس ncdo2118 [12] مورد استفاده قرار گرفته است(۱۲).

شاخص هایی که به منظور بی‌خطر بودن پروبیوتیک نوترکیب در نظر باید گرفت شامل موارد زیر است:

عدم مهاجرت از جایگاه مورد نظر به سایر قسمتهای بدن، عدم تکثیر و ماندگاری بیش ار حد متعارف در بدن، عدم تاثیر منفی بر فعالیتهای سیستم ایمنی، عدم آسیبزایی برای محیط زیست.

پروبیوتیکهایی که تا کنون برای انجام نوترکیبی بیشتر استفاده شده‌اند:

لاکتوکوس لاکتیس، لاکتوباسیلوس پاراکازئی[13] ، لاکتوباسیلوس کازئی[14] ، بیفیدوباکتریوم بروه، ساکارومیسس سروزیه[15] ، اشرشیا کلی[16].

لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان مدلی از باکتری‌های اسیدلاکتیک برای دستکاری ژنتیکی و تولید و انتقال پروتئین‌های متعدد مانند واکسن و دارو، به طور گسترده استفاده می‌شود زیرا ژنوم آن توالی‌یابی شده است، به آسانی دستکاری ژنتیکی می‌شود و برای این سویه خاص ابزارهای ژنتیکی بسیاری توسعه یافته است (۱۳).

معرفی پروبیوتیک‌های نوترکیب:

باکتری اسیدلاکتیک به عنوان ناقل پروتئین برای مخاط:

از باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان ناقل پروتئین‌هایی که می‌خواهیم به سطح مخاط برسند می‌توان استفاده کرد. پروتئین منتقل شده می‌تواند روی سیستم ایمنی تاثیر گذارد؛ یا اینکه به‌عنوان واکسن عمل کند و یا باعث افزایش تحمل‌پذیری نسبت به عوامل حساسیت‌زا شود. همچنین پروتئین‌هایی با عملکرد درمانی می‌توانند به این جایگاه‌ها منتقل شوند. هرچند انتقال پروتئین به محل مورد نظر آسان نیست و غلظت موردنظر و حضورش به مدت طولانی تا اثر مورد نظر را بگذارد، تضمین نمی‌شود. برای انتقال ازپروبیوتیک تغییریافته مثل لاکتوکوکوس تغییریافته استفاده می‌شود که تهاجمی نیست، کلونیزه نمی‌شود، بهطور کامل برای انسان بی‌خطر است و به‌طورگسترده درتولید و آماده‌سازی غذاها استفاده می‌شود (۱۴).

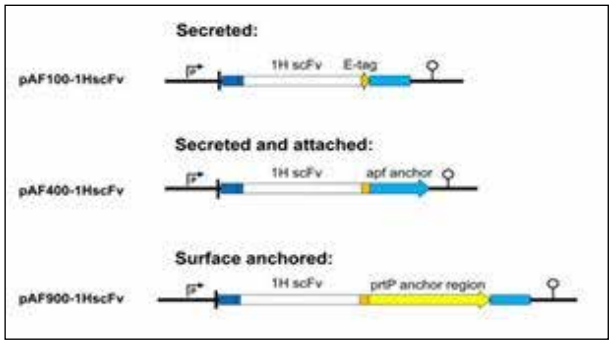
لاکتوکوکوس لاکتیس که به‌طور ژنتیکی دستکاری شده تا پروتئین مورد نظر را تولید کند، وقتی به دستگاه گوارش انتقال داده می‌شود، طی ۴ تا ۴۸ ساعت در آنجا ساکن می‌شود و در همین حین پروتئین با فعالیت زیستی مورد نظر را آزاد می‌کند. به عنوان نمونه برای درمان دیابت نوع یک از لاکتوکوکوس لاکتیس تولید کننده پروانسولین[17] و اینترلوکین۱۰ [18] در موش استفاده شده است که قادر است سلول‌های بتای پانکراس را به حالت اولیه برگرداند (۱۵). نمونه‌ای دیگر از این مورد انتقال پروتئین اینترلوکین۱۰ توسط باکتری اسید لاکتیک نوترکیب به افراد مبتلا به بیماری کرون[19] بوده است که اولین مورد استفاده از یک پروبیوتیک نوترکیب در انسان در فاز تحقیقاتی کلینیکی بوده است (۱۶).

10. PCR
11. Nisin controlled expression
12. Lactococcus lactis
13. Lactobacillus paracasei
14. Lactobacillus casei
15. Saccharomyces cerevisiae
16. Escherichia coli Nissle 1917
17. proinsulin
18. Interleukin 10
19. Crohn's disease

لاکتوباسیل مولد آنتی‌بادی ضد سم آنتراکس:

سیاه زخم یا آنتراکس بیماری باکتریایی ویژه گیاهخواران اهلی است که انسان برحسب تصادف به‌آن مبتلا می‌شود. عامل بیماری باسیلوس آنتراسیس[20] است که محیط‌های نامساعد ایجاد اسپور بسیار مقاوم می‌کند از این جهت این باکتری درحملات بیوتروریسم قابل استفاده است. انواع بیماریزای باسیل سیاه زخم دارای یک پوشش (کپسول) از جنس اسید گلوتامیک[21] و سه سم خارجی[22] به نامهای آنتی‌ژن محافظت کننده[23] ، عامل کشنده[24] و عامل ادم[25] می‌باشند. کپسول برای جلوگیری از بیگانه خواری توسط گویچه‌های سفید خون لازم است. عامل ادم باعث ایجاد ادم می‌شود و همچنین باعث اختلال در سیستم ایمنی میزبان می شود، عامل کشنده با راه‌کارهایی که هنوز ناشناخته است باعث مرگ می شود. این دو عامل بدون اتصال به آنتی‌ژن محافظت کننده کارائی خود را از دست می دهند. واکسن جذب سطحی آنتراکس تنها واکسنی است که از ایالات متحده تاییدیه گرفته است که به منظور کارایی این واکسن لازم است در طول ۱۲ تا ۱۸ ماه چندین بار تزریق شود، از این جهت هزینه بربوده و دارای عوارض جانبی می‌باشد که روش جایگزین مطلوب‌تری مورد توجه است.

راه حل درمانی کنونی برای عفونت آنتراکس[26] استفاده از آنتی‌بیوتیک است که به همراه واکسینه کردن موثرتر است. اما در صورت مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک روش درمانی جایگزینی مورد نیاز است. توانایی همسانه‌سازی و فائق آمدن بر شرایط لوله گوارشی دلیل استفاده از لاکتوباسیل‌ها در پیشگیری و درمان بیماری‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی است. بیان قسمت‌های مختلفی از آنتی‌بادی ضد سم پروتئینی باسیل آنتراسیس در لاکتوباسیل مطالعه شد و در بررسی‌های آزمایشگاهی قطعه ScFvs[27] آنتی بادی که در سیستم باکتریایی قابلیت بیان را دارد، با توجه با سادگی ساختار آن مورد توجه و استفاده قرار گرفت. قطعه ScFvs H1 که خاصیت ضد (خنثی کننده) قطعه آنتی‌ژن محافظت کننده سم آنتراکس را دارد از آنتی بادی منوکلونال 14B7 مشتق شده و با بازده بالایی تولید و با قطعه آنتی‌ژن محافظت کننده میل ترکیبی قابل توجهی دارد. با استفاده از چندین لاکتوباسیل نوترکیب، قطعه تک زنجیر آنتی بادی ScFvs H1 بر ضد قطعه آنتی‌ژن محافظت کننده سم آنتراکس بیان شد و قابلیت آن به عنوان ایمنیزایی غیرفعال در دستگاه گوارش مورد بررسی قرار گرفت. قطعه ScFvs H1 نه برابر از آنتی‌بادی منوکلونال اولیه کوتاهتر است وهم در بررسی‌های آزمایشگاهی و هم در موجود زنده تاثیر محافظت کنندگی دارد(شکل ۱).



شکل ۱: نحوه قرار گیری قطعه ScFvs H1.
ژن این قطعه را تحت پروموتور apf از کاست بیانی لاکتوباسیلوس کریسپاتوس M247 کد کردند و در سه حالت؛ ترشحی و متصل به غشا ویا هم ترشحی و هم متصل به غشا (وابسته C ترمینال انتخابی آن) بیان شد(۱۷).

توانایی پروتئین تولیدی توسط لاکتوباسیلوس ترانسفرم شده در خنثی سازی قطعه ScFvs سم آنتراکس، در کشت لایه سلولی J774 MΦ در حضور مقدار کشنده از فاکتور کشنده مورد بررسی قرار گرفت. با انجام آزمایش MTT assay[28] اثبات شد که سلول‌ها در مجاورت میزان کشنده سم آنتراکس و پروتئین ترشح شده از لاکتوباسیلوس پاراکازئی نوترکیب زنده می‌مانند. همچنین به منظور بررسی تاثیر پیشگیری کنندگی لاکتوباسیل نوترکیب در مدل حیوانی، از موش‌هایی استفاده شد که به آن‌ها قطعه عامل کشنده سم باسیل آنتراسیس را خورانده بودند.

پیش از این ثابت شده بود که مصرف خوراکی مقدار مشخص این سم باعث انباشتگی مایعات فراوان در روده و تورم در روده کوچک و بزرگ می‌شود. مصرف خوراکی لاکتوباسیلوس پاراکازئی pAF400 نوترکیب بیان کننده قطعه ScFvs H1 (به صورت متصل به دیواره باکتری)، چهار ساعت قبل از مصرف سم عامل کشنده باعث تورم کمتر نسبت به گروه شاهد شد (۱۷).

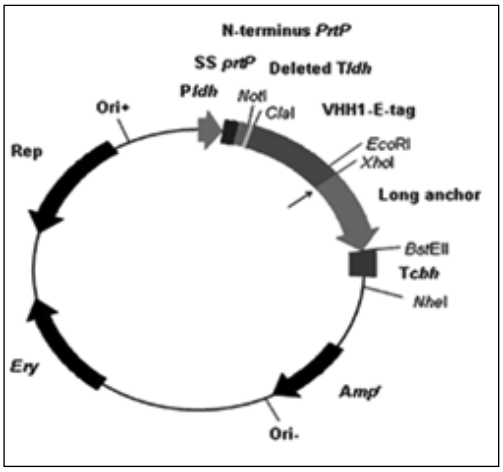
20. Bacillus anthracis
21. Poly-D-glutamic acid
22. Exotoxin
23. Protective antigen
24. Lethal factor
25. Edema factor
26. Anthrax Vaccine Adsorbed (AVA)
27. Single-chain variable fragment
28. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole), is reduced to purple formazan in living cells

لاکتوباسیل نوترکیب بیان کننده VHHs ضد روتاویروس[۲۹] :

روتاویروس شایع‌ترین عامل اسهال در کودکان کشورهای توسعه یافته است که سالانه مسبب مرگ حدود یک میلیون کودک زیر پنج سال در این کشورها می‌شود. از طرفی باعث صرف هزینه سالانه بیش از یک میلیارد دلار تنها در ایالات متحده می‌گردد. علاوه بر استفاده از واکسن برای کاهش شدت عفونت روده‌ای ناشی از روتاویروس ایجاد ایمنی غیرفعال نیز مدنظر قرار گرفته است. محافظت در برابر این بیماری منوط به وجود آنتی بادی برضد پوشش پروتئینی خارجی روتا ویروس (VP4,VP7) است. علیرغم تاثیر آنتی‌بادی‌های پلی‌کلنال، به دلیل هزینه بالای تولید این آنتی‌بادی‌ها کاربرد آن‌ها محدود است.

استفاده از مهندسی ژنتیک برای تولید قطعات آنتی‌بادی و استفاده از باکتری‌ها به عنوان ناقلین این فراورده‌ها به دستگاه گوارش، هزینه کمتری را درپی دارد. دمین‌های متغیر زنجیر سنگین آنتی‌بادی‌های لاما (VHHs)[۳۰] شامل ایمنوگلوبولین تک زنجیر است که کوچکترین مولکول تاکنون شناخته شده‌ای است که با آنتی‌ژن ترکیب می‌شود. VHHs چندین مزیت بر svFvs (قطعات متغیر تک زنجیر) دارد از جمله، کوچکتر بودن، مقاوم بودن در برابر حرارت و نیز از پلی‌پپتید تک رشته تشکیل شده که به همین دلیل در اشکال نوترکیب شده به آسانی با شکل فضایی صحیح بیان می‌شوند.

در این تحقیق کارایی لاکتوباسیل نوترکیب بیان کننده VHHs (از بدن شتر ایمن شده با روتا ویروس) به منظور پیشگیری از اسهال ناشی از روتاویروس در موش مورد بررسی قرار گرفته است. برای اینکه آنتی‌بادی در سطح باکتری بیان شود ژن VHH1-E-tag (دلیل استفاده از E-tag امکان شناسایی و خالص سازی در بقیه مراحل است) به توالی اتصالی (۲۴۴ اسیدآمینه انتهایی پروتئینازP از لاکتوباسیلوس کازئی) چسبانده شده و در ناقل بیانی لاکتوباسیلی pLP501 توسط آنزیم‌های محدودالاثر ClaI و XhoI وارد می‌شود. به منظور تولید نوع ترشحی قطعه VHHs، بعد از VHH1-E-tag کدون خاتمه TTA توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار داده می‌شود و سپس در پلاسمید pLP501 وارد می‌شود (شکل ۲).



شکل ۲: نقشه وکتور لاکتوباسیلوس برای بیان جسبیده به سطح پروتئین قسمت متغیر سنگین آنتی بادی لاما(VHH1).

برای تولید VHH1 ترشحی، کدون توقف TAA پس از توالی E-tag قرار داده می‌شود. Amp r ژن مقاومت به آمپي سیلین؛ Tldh deleted توالی باقی مانده پس از حذف توالی انتهایی ژن لاکتات دهیدروژناز از لاکتوباسیلوس کازئی؛ Ery ژن مقاومت به اریترومایسین؛ توالی طولانی اتصال دهنده به غشا از ژن پروتئیناز از لاکتوباسیلوس کازئی L. (۲۴ اسید آمینه)؛ N-terminus PrtP از Nترمینال ژن PrtP(۳۶ اسید آمینه)؛ Ori+ توالی آغاز همانندسازی اشریشیاکلی؛ Ori- توالی آغاز همانندسازی لاکتوباسیلوس‌ها؛ Pldh توالی پروموتور ژن لاکتات دهیدروژناز از لاکتوباسیلوس کازئی؛ Rep از ژن repA پلاسمید p353_2 ازلاکتوباسیلوس پنتوزیس؛ SS prtP توالی نشانگر از ژن PrtP (۳۳ اسید آمینه)؛ Tcbh توالی پایان دهنده نسخه برداری از ژن هیدرولاز اسید صفراوی از لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۸۰ (۱۸).

لاکتوباسیلوس پاراکازئی (که قبلا L. casei ATCC 393 pLZ15 نامیده می‌شد) تحت شرایط ترانسفرماسیون قرار می‌گیرد و هر دو توالی نوترکیب مورد نظر تحت پروموتور ساختمانی لاکتات دهیدروژناز (گرفته شده از لاکتوباسیلوس کازئی) قرار می‌گیرند. پروتئین نوترکیب از لاکتوباسیل ترشح کننده آن در مجاورت محیط کشت روتاویروس قرار گرفتند و پس از گذشت زمان تا ۸۰ درصد کاهش در ویروس‌های عفونت‌زا مشاهده شد.

به منظور بررسی در موجود زنده به موش‌های آزمایشگاهی یک روز قبل از خوراندن ویروس، لاکتوباسیل‌های نوترکیب به‌طور خوراکی یک‌بار در روز داده شد سپس در روز دوم روتاویروس به میزانی که حداقل در شرایط عادی در بیش از ۹۰ درصد موش‌ها اسهال ایجاد می‌کند، خورانده شد. در روز دوم و تا سه روز بعد ازآن هم، روزی یک بار لاکتوباسیل نوترکیب به طور خوراکی به موش‌ها داده شد. به یک گروه مشابه از موش‌ها لاکتوباسیل

29. Rotavirus
30. Variable domain of llama heavy-chain antibody

نوترکیبی که پروتئین غیر مربوطی را (برضد استرپتوکوکوس موتانس) را تولید می‌کرد و به گروه مشابه دیگری از موش‌ها لاکتوباسیلوس ترانسفورم نشده خورانده شد. موش‌ها هر روز از نظر علائم اسهال بررسی می‌شدند. پس از گذشت روز پنجم موش‌ها کشته شدند و قسمتی از روده کوچک آن‌ها به منظور ردیابی RNA [31] و کشت سلولی برداشته شد.

از هر گروه موش‌هایی در روزهای اول و سوم و هفتم وچهاردهم کشته شده و قسمت‌هایی از روده کوچک آن‌ها به منظور ارزیابی کلونیزه شدن لاکتوباسیل نوترکیب کشت داده شد. بدین طریق اثبات شد که لاکتوباسیل‌های نوترکیب پس از ۴۸ ساعت در ژوژنوم و ایلئوم کلونیزه می‌شود، از طرفی تفاوتی بین میزان لاکتوباسیل‌های نوترکیبی که در سطح خود بیان پروتئین داشتند، در شرایط حضور و عدم حضور روتاویروس مشاهده نشد. لاکتوباسیل‌های ترانسفورم شده پس از گذشت ۹۶ ساعت از مصرف در روده حیوان وجود نداشتند.

از طرفی از بین تمام موش‌هایی که به میزان عفونت‌زا روتاویروس خوردند، گروهی که از یک روز قبل لاکتوباسیلوس نوترکیب تولید کننده VHHs در سطح دیواره باکتری را مصرف کرده بودند به‌طور معنی‌داری کمتر مبتلا به اسهال شدند نسبت به گروه‌هایی که لاکتوباسیل نوترکیبی که پروتئین نامربوطی را کد می‌کرد خورده بودند و همچنین نسبت به گروهی که تنها روتاویروس خورده بودند. در مجموع گروهی که لاکتوباسیلوس نوترکیب تولید کننده VHHs را خورده بودند هم طول دوره اسهال وهم شدت ابتلا به اسهال در آن‌ها کمتر بود.

مصرف خوراکی باکتری لیوفیریزه نوترکیب تولید کننده VHHs هم تاثیر مشابه باکتری تازه را داشت. اما به طور تعجب‌برانگیزی بین اثر لاکتوباسیلوس ترانسفورم نشده و لاکتوباسیلوس نوترکیب ترشح کننده VHHs تفاوتی دیده نشد. پس از انجام ازمایش‌های Real-Time PCR بر روی قسمتی از روده موش‌ها در روز چهارم پس از خورانیدن روتاویروس این نتیجه حاصل شد که در موش‌هایی که لاکتوباسیلوس نوترکیب تولید کننده VHHs متصل به دیواره باکتری را مصرف کرده بودند کاهش روتاویروش بیشتر(۴۳ درصد) از گروه موش‌هایی بود که لاکتوباسیلوس نوترکیب تولید کننده پروتئین نامربوط را مصرف کرده بودند(در این گروه اخیر کاهش روتاویروس ۱۷ درصد بود).

با استفاده از میکروسکپ الکترونی روبشی[32] متصل شدن لاکتوباسیلوس نوترکیب تولید کننده VHHs متصل به دیواره با روتاویروس سالم مشاهده شد. البته در تحقیق دیگری ثابت شد که قطعه تک ظرفیتی VHH1 که توسط مخمر تولید شده است هم می‌تواند اسهال ناشی از روتاویروس را در موش‌ها کاهش دهد ولی باید میزان زیادی از این پروتئین را مصرف کرد تا تاثیر درمانی و پیشگیری مطلوبی از آن مشاهده شود. با اینکه ژن VHH1 تحت پروموتر قوی ساختاری بیان می‌شود تولید مقدار زیادی از آن امکان پذیر نیست. بیان پروتئین در سطح باکتری با توجه به اینکه یک ساختار بیولوژیکی زنده است باعث چند ظرفیتی بودن و کاراترشدن پروتئین در پاکسازی ویروس می‌شود. از طرف دیگر مصرف پروبیوتیک نوترکیب تولید کننده آنتی‌بادی نه تنها در هزینه استخراج و خالص‌سازی آنتی‌بادی‌ها صرفه جویی می‌کند بلکه هنگامی که آنتی‌بادی‌ها خورده می‌شوند در طی عبور از دستگاه گوارش خصوصا معده به میزان قابل توجهی آسیب پذیر می‌شوند ولی با مصرف خوراکی پروبیوتیک‌های نوترکیب به دلیل ماهیت ذاتیشان، پروبیوتیک‌ها در طول لوله گوارش پایدار مانده و نیز توانایی کلونیزه شدن در روده و تولید محصول خود را به میزان موثری دارند (۱۸).

لاکتوباسیل نوترکیب بیان کننده آنتی‌ژن سالمونلا اینتریتیدیس[33] :

سالمونلا عامل یکی از شایعترین مسمومیتهای غذایی می‌باشد. سالمونلا می‌تواند تخمدانهای پرنده را آلوده کند و قبل از تخم گذاردن پرنده، وارد تخم مرغ شود یا اینکه به هنگام تخم گذاردن پرنده به پوسته تخم مرغ نفوذ کند. ایجاد ایمنی در پیشگیری از آلودگی سالمونلا اینتریتیدیس موثر است. در این تحقیق به منظور پیشگیری از ابتلا به سالمونلا اینتریتیدیس، استفاده خوراکی ازلاکتوباسیلوس کازئی به‌عنوان حامل آنتی‌ژن مورد بررسی قرار گرفت. تاثیر لاکتوباسیل نوترکیب بیان کننده آنتی‌ژن سالمونلا اینتریتیدیس (FliC, SipC)، در مدل موش آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

همچنین با انجام مراحل دیگری از مهندسی ژنتیک می‌توان از این لاکتوباسیل به عنوان عامل کمکی[34] برای ترشح IL-1beta استفاده

31. Real-Time PCR
32. Scanning Electron Microscopy
33. Salmonella Enteritidis
34. Adjuvant

کرد که کارایی آن را افزایش می‌دهد. استفاده از این پروبیوتیک نوترکیب به عنوان راه‌حل جدیدی در پیشگیری ابتلای به سالمونلا اینتریتیدیس معرفی شده است (۱۹).

بیفیدوباکتری‌های تغییر یافته:

بهترین استاندارد در میکروبیولوژی برای فهمیدن عملکرد و محصول ژن، ایجاد جهش یافته‌های حذفی است. کارایی ترانسفورماسیون در بیفیدوباکترها به‌طور معمول کمتر از حداقل مورد نیاز برای استفاده ازپلاسمیدهای حذف کننده ژن است. ممکن است با به کاربردن روش‌هایی که دیواره سلولی را سست می‌کنند بتوان انجام ترانسفورماسیون را در یکسری باکتری‌های گرم مثبت کاراتر کرد، این روش‌ها شامل استفاده از لیزوزیم[۳۵]، موتانولیزین [۳۶]، آنتی‌بیوتیک‌هایی که مانع از سنتز دیواره می‌شوند، استات لیتیم[۳۷] یا دیتیوتریتول[۳۸] است. تنها استثنا بیفیدوباکتریوم بروه UCC2003 است که ترانسفورماسیون با کارایی مناسب در آن روی می‌دهد. علاوه بر نیاز به ایجاد ترانسفورماسیون به ابزارهایی برای ایجاد جهش‌های تصادفی و هدف‌دار در بیفیدوباکترها نیاز داریم. با اینکه استفاده از نشانگرهای انتخابی آنتی‌بیوتیک در بررسی‌های خواص پروبیوتیکی بیفیدوباکتری‌ها منطقی است، کاربرد آن‌ها در بیان پروتئین‌های نوترکیب به چند دلیل مشکل است؛ نه تنها استفاده از آنتی‌بیوتیک در مقیاس صنعتی کاربردی نیست و نیازمند هزینه بالایی است بلکه خواص آنتی‌بیوتیک هم در طی مراحل تولید ثابت نمی‌ماند.

همچنین به دلیل اینکه ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک ممکن است به طور افقی به باکتری‌های فلور یا بیماری‌زا منتقل شود، استفاده از این ژن‌ها ممکن است مشکل‌آفرین باشد. با استفاده ازنشانگر غیرآنتی‌بیوتیکی مانند لوانسوکراز[۳۹]:

sucrose + (2,6-beta-D-fructosyl)n = glucose + (2,6-beta-D-fructosyl)n+1

و گلوکزآمین سنتتاز در بیفیدوباکترها می‌توان بر این محدودیت فائق آمد. بدین ترتیب می‌توان با استفاده از بیفدوباکتریوم نوترکیب، پروتئین‌های درمانی، آنتی‌ژن‌های واکسن و پروتئین‌هایی که بهبود دهنده خواص پروبیوتیک‌ها هستند را در جایگاه‌های مربوطه تولید نمود. بیفیدوباکترها دسته‌ای از پروبیوتیک‌ها هستند که اثرات مفیدی بر سلامتی انسان دارند. روش‌های مولکولی کاربردی به منظور مطالعه روی فیزیولوژی و صفات ژنتیک که باعث این اثرات مفید شده است، وجود ندارند (۲۰).

لاکتوکوکوس لاکتیس بیان کننده آنتی‌ژن پنوموکوک[۴۰] :

اگرچه بیشترین کاربرد ایمنی زایی باکتری‌های اسید لاکتیک در برابر عوامل بیماری‌زای دستگاه گوارش است، ولی در تعدادی از مطالعات از باکتری اسید لاکتیک نوترکیب در پیشگیری و درمان ذات‌الریه استفاده شده است. پروبیوتیک قادر به تحریک ایمنی دستگاه تنفسی و افزایش مقاومت به عفونت‌ها در میزبان می‌شود. با استفاده از ابزار مولکولی وبیان آنتی‌ژن‌های عوامل بیماریزای تنفسی در باکتری‌های اسید لاکتیک کارایی آن‌ها در ایمنی‌زایی افزایش پیدا می‌کند.

تا کنون چند باکتری اسید لاکتیک نوترکیب به طور موفقیت‌آمیز بر علیه عفونت‌های تنفسی به کار گرفته شده‌اند. دو پلی‌ساکارید کپسولی و چند پروتئین پنوموکوک در لاکتوکوکوس لاکتیس بیان شده است که کارایی آن هم به عنوان عامل کمکی و هم به عنوان ناقل واکسن در مدل حیوان آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. تولید IgA اختصاصی بر ضد پنوموکوک در مسیر راه‌های تنفسی در طی عفونت‌زایی بسیار اهمیت دارد زیرا مانع از کلونیزه شدن باکتری عامل عفونت در مخاط وعدم ورود به گردش سیستمیک بدن می‌شود. تولید آنتی‌بادی IgG اختصاصی ضد پنوموکوک در گردش سیستمیک بدن باعث چسباندن باکتری عفونت‌زا به یکدیگر شده و مانع از رسیدن آن‌ها به راه‌های هوایی و تحریک بلع آن‌ها توسط ماکروفاژها می‌شود.

تجویز پروبیوتیک نوترکیب از طریق بینی در موش باعث تحریک پاسخ ایمنی هم در راه‌های هوایی وهم به طور سیستمیک شد. قبل از این که بتوان از این واکسن زنده در انسان استفاده نمود نکته مهم این است که بتوان ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را که به عنوان انتخابگر عمل می‌کند، از آن حذف کرد. استفاده از واکسن‌های غیرفعال در حال حاضر یک راه حل جایگزین است ولی ایمنیزایی واکسن زنده در مقایسه با واکسن غیرفعال شده بیشتر است. به نظر میرسد در آینده نزدیک با فائق آمدن بر این عارضه جانبی، بتوان از پروبیوتیک‌های نوترکیب در کنترل عفونت

35. Lysozyme
36. Mutanolysin
37. Lithium acetate
38. Dithiothreitol
39. Levansucrase
40. Streptococcus pneumoniae

پنوموکوکی انسان بهره برد (۲۱).

ساکارومیسس سروزیه نوترکیب بیان کننده سیتوکروم P450 73A1 گیاهی:

استفاده از ساکارومیسس سروزیه (مخمر) نوترکیب، بیان کننده سیتوکروم P450 73A1 گیاهی به عنوان یک داروی زنده، در تحقیقی مورد بررسی قرار گرفته است. این پروبیوتیک نوترکیب می‌تواند قابلیت درمانی (سم‌زدایی در دستگاه گوارش) داشته باشد. از میان پروبیوتیک‌ها، یوکاریوت‌ها تحمل‌پذیری بیشتری به شیره معده و پانکراس دارند.

برای انجام این بررسی از یک مدل دست‌ساز شبیه دستگاه گوارش انسان بهره برده شده است. این مدل شرایط بدن را مهیا کرده و جایگزین مناسبی به جای مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی است و یک مرحله قبل از آزمایشات بالینی قابل استفاده است. سیتوکروم p450 خانواده بزرگی از ایزوآنزیم‌ها است که نقش مهمی در سیستم سم‌زدایی بدن دارند، همچنین نقش مهمی در متابولیسم استروئیدها و ویتامین‌های محلول در چربی و اسیدهای چرب دارند. سیتوکروم P450 73A1 توانایی تبدیل سینامیک اسید به کوماریک اسید را دارد. مخمر نوترکیب بیان کننده این پروتئین به طور موثری این تبدیل را در دستگاه شبیه‌ساز انجام داده و پیشنهاد می‌شود که از این پروبیوتیک نوترکیب به عنوان یک داروی زنده در پیشگیری از سرطان و بیمای‌های چند عاملی دیگر استفاده شود (۲۲).

لاکتوکوکوس لاکتیس جهش یافته:

پروبیوتیک نوترکیب دیگر لاکتوکوکوس لاکتیس است که با استفاده از نیتروزوگوانیدین[41] جهش تصادفی در آن ایجاد شده است. انتخاب جهش یافته‌ای که در آنزیم آلفا استولاکتات دکربوکسیلاز نقص داشته و فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز آن کم باشد باعث تولید مقدار بالایی از آلفا استولاکتات در شرایط بی هوازی حاصل شده است و در نهایت دی‌استیل بیشتر تولید می‌شود که باعث بهبود کیفیت و مزه پنیر می‌شود (۲۳).

زمینه دیگر کاربرد باکتری‌های اسیدلاکتیک نوترکیب در مهندسی متابولیک است. از این جمله ایجاد مسیرهای متابولیک دست‌کاری شده با استفاده از این قبیل باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان آغازگر بهبود یافته مواد غذایی تخمیری و یا به‌عنوان تولید کننده آنزیم‌های نوترکیب مسیرهای بیولوژیکی در تولید صنعتی موادشیمیایی است (۲۴). لاکتوکوکوس لاکتیس واجد ژن groESL : نمونه بعدی لاکتوکوکوس لاکتیس است که ژن وارد شده به آن groESL از لاکتوباسیلوس پاراکازئی سوش **NFBC338** است. نتایج بیان بیش ازحد چپرون پروتئین شوک حرارتی GroES و GroEL، افزایش مقاومت به حرارت و افزایش تحمل در برابر نمک و حلال بوده است. ثمره کاربرد این پروبیوتیک نوترکیب تحمل بیشتر تنش‌های دستگاه گوارش (مصرف درمانی) وماندگاری بیشتر طی فرایند تولید محصول (کاربرد در صنایع غذایی) است (۲۵).

لاکتوباسیلوس پاراکازئی واجد ژن gtf :

لاکتوباسیلوس پاراکازئی سوش NFBC338 که ژن وارد شده gtf گلیکوزیل ترانسفراز (مسئول تبدیل قند به بتا گلوکان) از پدیوکوکوس پاروالوس[42] است. نتایج حاصل از آن تولید بتا گلوکان در سطح باکتری (به عنوان محافظ باکتری) وچسبنده شدن باکتری (اتصال قوی تر به سلولها ومحیط اطراف خود) است. تحمل استرس بیشتر (کاربرد در صنعت) واتصال محکمتر به مخاط دستگاه گوارش (مصارف درمانی) از ویژگی‌های این پروبیوتیک نوترکیب است (۲۶).

لاکتوکوکوس لاکتیس واجد ژن قطعه C سم تتانوس توام با اینترلوکین:

لاکتوکوکوس لاکتیس که ژن های وارد شده قطعه C سم تتانوس (TTFC) از کلستردیوم تتانی[43] توام با اینترلوکین۲ و یا اینترلوکین ۶ موشی است. نتایج حاصل از این نوترکیبی افزایش سطح آنتی بادیهای مخاطی و سرمی (IgA و IgG) و ترشح اینترلوکین است. کارایی این محصول در پیشگیری و درمان برعلیه بیماری کزاز در موش آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (۲۷).

لاکتوباسیلوس برویس[44] مولد گاما آمینو بوتیریك اسید:

به تازگی همسانه سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز در باکتری لاکتوباسیلوس برویس به منظور تولید گاما آمینوبتیریك اسید گزارش شده است (۲۸).

پروبیوتیک‌های نوترکیب کاهش دهنده حساسیت:

غذاهای حساسیت‌زا علائمی مانند اسهال و آسم ایجاد می‌کنند. با اینکه پروبیوتیک‌های متداول علائم حساسیت را کاهش می‌دهند،

41. Nitrosoguanidine .
42. Pediococcus parvalus
43. Clostridium tetani
44. Lactobacillus brevis

استفاده از پروبیوتیک‌های نوترکیب قادر به تحریک سیستم ایمنی در جایگاه، نویدبخش امکان پیشگیری و درمان حساسیت را می‌دهد. اشرشیا کولی (EcN) Nissle 1917 باکتری بی‌خطری است که برای انتقال پروتئین به جایگاه روده انتخاب مناسبی است (کلونیزه شدن عالی). ژن وارد شده derp1 (در پاسخ به آلرژن خاک و حشره mite) از بدن موش دچار حساسیت شده است. مصرف از راه بینی در مدل حیوان آزمایشگاهی (موش) باعث تحریک پاسخ IgG2a خاص حساسیت‌زا، ممانعت از ساخت IgE خاص، کاهش شدید ترشح IL-5 و ممانعت از افزایش نوتروفیل و ائوزینوفیل در راه‌های هوایی شد. کاربرد این پروبیوتیک نوترکیب کاهش دهنده حساسیت (مصارف درمانی) می‌تواند باشد (۷).

نتیجه‌گیری:

پروبیوتیک‌های نوترکیب علاوه بر دارا بودن مزایای پروبیوتیک‌های معمول، از محاسن زیر برخوردارند:

داشتن نقشه ژنتیکی، قابلیت انجام روش‌های مولکولی، پایداری بیشتر در دستگاه گوارش.

برتری پروبیوتیک‌های نوترکیب بر فرآورده‌های نوترکیب شامل موارد زیر است:

کاراتر بودن پروتئین متصل به باکتری در پاکسازی ویروس به دلیل اینکه باکتری یک ساختار زیستی زنده است، صرفه‌جویی در هزینه استخراج و خالص‌سازی آنتی‌بادی‌ها هنگام مصرف پروبیوتیک نوترکیب تولید کننده آنتی‌بادی، پایداری بیشتر پروبیوتیک‌های نوترکیب به دلیل ماهیت ذاتیشان در طول لوله گوارش نسبت به مصرف خوراکی پروتئین به تنهایی و توانایی کلونیزه شدن در روده توسط پروبیوتیک‌ها و تولید محصول نوترکیب به میزان موثر.

کاربردهای پروبیوتیک‌های نوترکیب، در صنایع غذایی شامل بهبود مزه فرآورده خوراکی و پایدار سازی میکروارگانیسم تولید کننده فرآورده است و در پزشکی شامل تولید واکسن، انتقال دارو و کاهش حساسیت است.

چالش‌های استفاده از پروبیوتیک‌های نوترکیب (با فرض اینکه محصول نوترکیب مورد نظر با کیفیت و کارایی مطلوب بیان خوبی در میزبان مورد نظر داشته باشد) شامل موارد زیر است: مشکلات کار با موجود زنده (حساسیت‌های آن به تغییرات دما، pH، اکسیژن)، استفاده از نشانگرهای انتخابی آنتی‌بیوتیک (نیاز به هزینه بالا به خاطر مصرف آنتی‌بیوتیک در مقیاس صنعتی، از دست رفتن کارایی آنتی‌بیوتیک در طی زمان تولید محصول، امکان انتقال افقی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک به باکتری های فلور و عامل بیماری‌زا)، کلونیزه نشدن پروبیوتیک نوترکیب در جایگاه مورد نظر و امکان اثرات مخرب برای محیط زیست.

پیشنهادهایی که ارائه می‌شود شامل این موارد است:

انجام کار بالینی روی داوطلبین، انجام کارهای مقایسه‌ای: بین پروبیوتیک نوترکیب و پروبیوتیک کلاسیک؛ بین پروبیوتیک نوترکیب و محصول به تنهایی، سنجش پایداری و موثربودن پروبیوتیک نوترکیب در فرآورده ی غذایی و سنجش تاثیر نوترکیبی بر سایر صفات پروبیوتیک.

منـابع/ References

1. Mokhber Dezfuli M, Rezazadeh F, Rabbani M, Zahraae Salehi T, Seifi H. Efficacy of dried colostrum powders in the prevention of diarreia in neonatal Holestein calves. Comparative Clinical Pathology 2007; 16(2)127-130.
2. Panahi Y, Falahi G, Falahpour M, et al. Bovine Colostrum in the Management of Nonorganic Failure to Thrive: A Randomized Clinical Trial. JPGN 2010; 50(5): 551–554.
3. Morshedi A, Rabbani M, Zahrai salehi T, Rezazadeh F, Taghipoor Bazargani T. Evaluation of antibodies levels against Escherichia coli, rotavirus and coronavirus in the colostrum of non-vaccinated cows in southern Tehran, Iran. International Journal of Veterinary Research 2010; 4(4): 217-219.
4. Rabbani M, Rzazadeh F, Zahraei Salehi T, Zahraei Salehi T, MokhberDezfouli M, Makanani M. Evaluation of antibodies levels against Shigella in colostrum of non-vaccinated cows in suburbs of Tehran ,IRAN. 9th Malaysian congress and exhibition on allergy and Immunology : s.n., 2007.
5. Fuller R. Probiotics in human medicine. Gut 1991; 32(4): 439-442.
6. 6. Kullen MJ, Klaenhammer TR. Genetic modification of intestinal lactobacilli and bifidobacteria. Current issues in molecular biology 2000; 2(2): 41-50.
7. Silva I. Recombinant Technology and Probiotics. International Journal of Engineering and Technology 2011; 3(4): 288-293.
8. Friedrich MJ. A bit of culture for children: probiotics may improve health and fight disease. The journal of the American Medical Association 2000; 284(11): 1365-1366.
9. Vanderhoof JA, Young R. Probiotics in the United States. Clinical infectious diseases 2008; 46 Suppl 2: S67-72
10. Sheehan VM, Sleator RD, Hill C, Fitzgerald GF. Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain Bifidobacterium breve UCC2003. Microbiology 2007;153(10): 3563-3571.
11. Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in Lactococcus lactis. Applied microbiology and biotechnology 2005; 68(6): 705-717.
12. Miyoshi A, Jamet E, Commissaire J, Renault P, Langella P, Azevedo V. A xylose-inducible expression system for Lactococcus lactis. FEMS microbiology letters 2004; 239(2): 205-212.
13. Villatoro-Hernandez J, Montes-de-Oca-Luna R, Kuipers OP. Targeting diseases with genetically engineered Lactococcus lactis and its course towards medical translation. Expert opinion on biological therapy 2011; 11(3): 261-267.
14. Van Huynegem K, Loos M, Steidler L. Immunomodulation by genetically engineered lactic acid bacteria. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library 2009; 14: 4825-4835.
15. Takiishi T, Korf H, Van Belle TL, et al. Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified Lactococcus lactis in mice. The Journal of clinical investigation 2012; 122(5): 1717-1725.
16. Braat H, Rottiers P, Hommes DW, et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. Clinical gastroenterology and hepatology 2006; 4(6): 754-759.
17. Andersen KK, Marcotte H, Álvarez B, Boyaka PN, Hammarström L. In situ gastrointestinal protection against anthrax edema toxin by single-chain antibody fragment producing lactobacilli. BMC Biotechnol 2011; 11: 126.
18. Pant N, Hultberg A, Zhao Y, et al. Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea. The journal of Infectious Diseases 2006; 194(11):1580-1588.

منـابع/ References

19. Kajikawa A. Protection against Salmonella via immunization with recombinant lactic acid bacteria. Japanese journal of clinical medicine 2012; 70(8):1293-1297.
20. Sun Z, Baur A, Zhurina D, Yuan J, Riedel CU. Accessing the inaccessible: molecular tools for bifidobacteria. Applied and environmental microbiology 2012; 78(15): 5035-5042.
21. Medina M, Vintiñi E, Villena J, Raya R, Alvarez S. Lactococcus lactis as an adjuvant and delivery vehicle of antigens against pneumococcal respiratory infections. Bioengineered bugs 2010; 1(5): 313-325.
22. Blanquet S, Marol-Bonnin S, Beyssac E, Pompon D, Renaud M, Alric M. The 'biodrug' concept: an innovative approach to therapy. Trends in biotechnology 2001; 19(10): 393-400
23. Monnet C, Aymes F, Corrieu G. Diacetyl and alpha-acetolactate overproduction by Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis mutants that are deficient in alpha-acetolactate decarboxylase and have a low lactate dehydrogenase activity. Applied and environmental microbiology 2000; 66(12): 5518-20.
24. Berlec A, Strukelj B. Novel applications of recombinant lactic acid bacteria in therapy and in metabolic engineering. Recent Pat Biotechnol 2009; 3(2): 77-87.
25. Desmond C, Fitzgerald GF, Stanton C, Ross RP. Improved stress tolerance of GroESL-overproducing Lactococcus lactis and probiotic Lactobacillus paracasei NFBC 338. Applied and environmental microbiology 2004; 70(10): 5929-5936.
26. Stack HM, Kearney N, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Association of beta-glucan endogenous production with increased stress tolerance of intestinal Lactobacilli. Applied and environmental microbiology 2010; 76(2): 500–507.
27. Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, et al . Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of Lactococcus lactis coexpressing antigen and cytokine. Infection and immunity 1998; 66(7): 3183-3189.
28. Kheiri yegane azar B, Esmaeili A, Rabbani M. Cloning of glutamate decarboxylase and production of γ-aminobutyric acid from Lactobacillus brevis. Research in Pharmaceutical Sciences 2012; 7(5): S421.