بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های نوین

گروه زیست فناوری

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست فناوری گرایش میکروبی

همسانه‌سازي ژن گلوتامات دکربوکسیلاز باکتري اسید لاکتیک و ساخت وکتور بیاني آن

استاد راهنما:

دکترابوالقاسم اسماعیلی

استاد مشاور:

دکتر محمد ربانی

پژوهشگر:

بهجت خیری یگانه آذر

دی ماه ۱۳۹۱

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری‌های نوین

گروه زیست فناوری

پایان‌نامه ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست فناوری گرایش میکروبی خانم بهجت خیری یگانه آذر

تحت عنوان

همسانه‌سازي ژن گلوتامات دکربوکسیلاز باکتري اسید لاکتیک و ساخت وکتور بیاني آن

در تاریخ ۹۱/۱۰/۲۶ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه ..... به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر ابوالقاسم اسماعیلی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۲- استاد مشاور پایان نامه دکتر محمد ربانی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۳- استاد داور داخل گروه دکتر حسن محبت کار با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

۴- استاد داور خارج از گروه دکتر کامران قائدی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

امضای مدیر گروه

سپاس و ستایش خداوند جان و خرد را که علمش در غایت کمال است و فعلش در نهایت نظام

او که دریای بی کران الطافش پهنای افق زندگی ام را به زیبایی رنگین نموده و دامنه آن تا بی نهایت امتداد یافته است.

مراتب سپاس و تشکر فراوان خود را جهت راهنمایی های دلسوزانه استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر ابوالقاسم اسماعیلی ابراز می دارم. همچنین از زحمات جناب آقای دکتر محمد ربانی که به عنوان استاد مشاور، مزاحمت های گاه و بیگاه من را با گشاده رویی و صبر و حوصله پاسخگو بودند، صمیمانه ارج می نهم. از جناب آقای دکتر حمید امامی و همچنین جناب آقای دکتر رحمان امامزاده، آقای دکتر اصغر طاهری، آقای دکتر مومن بیک، جناب آقای دکتر قزل باش که از محضرشان دانش آموختم، صمیمانه سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر حسن محبت کار و جناب آقای دکتر کامران قائدی که زحمت داوری این پایان نامه را به عهده گرفتند، نهایت تشکر را دارم.

از سرکار خانم مهندس احمدی مسئول HPLC، که همفکری با ایشان در راستای مطالعاتم بسیار کارگشا بودند، تشکر می کنم.

از استاد بزرگوارم سرکار خانم دکتر زهرا محمدی نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

از دوست و هم اتاقی عزیزم سرکار خانم سمیه بنی آدم که در سختی های این دوران تکیه گاهم بودند و جاودانه ترین لحظات را در کنار ایشان تجربه کردم، صمیمانه سپاسگزارم.

از دوستان عزیزم سرکار خانم الهه بنده علی، پروین حبیبی، ندا غلامیان، شیوا شهبازی، مریم غلامی و دیگر همکلاسی هایم تشکر می کنم.

از خداوند متعال برای تمامی این عزیزان موفقیت روز افزون همراه با بهروزی و طول عمر خواهانم.

بهجت خیری یگانه آذر

دی ماه ۱۳۹۱

از خواهران عزیز و مهربانم نصیبه و اکرم تشکر می کنم ، همیشه همراهان روزهای تلخ و شیرینم که در سایه همدلی و همراهی شان ارتقا می یابم .
صبوری شان توانم می دهد و مهرشان شکوفایم می کند و آنچه از آن ها آموختم نه همین بود . . .

از جناب آقای مهندس مجتبی ملکی به خاطر راهنمایی هایشان و همدردی هایشان تشکر می کنم همچنین از جناب آقای مهندس فرخ مددیار صمیمانه سپاسگزارم .

ازمحدثه نازنینم ، همصحبت شبهای تنهایم ، امید روزهای زندگیم به خاطر وجود مهربانش بی نهایت سپاسگزارم .

تقدیم به

«پدر بزرگوار و مادر مهربانم»

آنان که راستی قامتم در شکستگی قامتشان تجلی یافت.

آنان که وجودم برایشان همه رنج بود و جودشان برایم همه مهر و محبت.

آنان که نگاهشان، گرمی کلامشان و روشنی رویشان سرمایه های جاودان زندگی من است.

پدر مهربانم، ای مفهوم زیبای عشق، ای راز نهفته در پس هر واژه، ای تبلور محبت پاک در دریای بیکران دل، ای تجلی نور معنویت در عالم هستی، ای صفای خانه دل، ای آشنای روزهای بی کسی، ای طنین سکوت تنهایی، ای شیرینی لحظات تلخ زندگی، ای پشت و پناه من، چگونه وصف تو گویم که تمام واژه های عالم هستی از توصیف مقامت عاجز است.

و ای مهربان مادرم، چگونه توصیفت کنم مادر، تو بهشت جاودانی منی مادر، تو سرچشمه ی مهر بیکرانی مادر، تو خورشید بلند آسمانی مادر، تو آرامش جان منی مادر، تو همدرد روزهای تنهایی منی مادر، تو شریک غصه های منی مادر

در برابر وجود گرامی شان زانوی ادب بر زمین می نهم و با دلی مملو از عشق، محبت و خضوع بر دستانشان بوسه می زنم و سخن به این جمله بسنده می کنم:

با تو، با تو همیشه دریایم پدر و بی تو و بی تو دریای بی ساحلم مادر، مادر

ای یامان گونده چاتان هر زمان امداده آنا ! ای حیاتیم بویو دونیاده یئتن داده، آتا!

یاتارام هر گئجه من فیکر و خیالینله سنیزین گوره رم گول اوزیویزه هر گئجه رویاده سنیزین

سنیزی گوردوم اوزومی غصه ده ن آزاد ائله دیم مسکنین دائم اولاجنت اعلاده سنیزین

چکیده

گاما آمینوبوتیریک اسید(گابا) یک اسیدآمینه غیر پروتئینی است که به عنوان یک نوروترانسمیتر مهاری در بافت مغز پستانداران عمل می‌کند. گابا چندین عملکرد فیزیولوژیکی مشتمل بر انتقال دهنده عصبی، اثرات کاهندگی فشار خون و مدری دارا می‌باشد. اگر گابا خوراکی در مقادیر مناسب به مغز برسد، گابا به عنوان یک آرامبخش اثر می‌کند. گابا به عنوان یک نوروترانسمیتر پالس‌های عصبی را بلوکه می‌کند و انتقال عصبی را کاهش داده و می‌تواند اضطراب و افسردگی را تحت تاثیر قرار دهد. در انسان، گابا به وسیله ۲ ایزوفرم از آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز وابسته به پیریدوکسال فسفات تولید می‌شود. بعضی از باکتری‌ها مثل سویه‌های لاکتوباسیلوس، قادر به تولید گابا هستند. دراین تحقیق، تولید گابا توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از ماست، مطالعه شد. بررسی‌های فیلوژنتیک مبتنی بر توالی 16srDNA و مطالعات بیوشیمیایی نشان داد که آن‌ها متعلق به جنس لاکتوباسیلوس برویس هستند. این سوش‌ها در محیط کشت MRS حاوی ۱٪ اسید گلوتامیک در ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و سپس تولید گابا با روش HPLC بررسی شد. قطعه DNA حاوی ژن GAD از NCBI بدست آمد. برای همسانه‌سازی ژن GAD از این سویه‌ها، PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده با اولیگو۶ انجام شد. محصول PCR از ژل استخراج شد و در وکتور PGEM-T توسط لیگاز T_4، الحاق شد و به داخل باکتری ای‌کولای XL1Blue ترانس‌فورم شد. سپس کلنی‌های سفید انتخاب شده و پس از استخراج پلاسمید و برش با آنزیم‌های محدود کننده، ژن GAD به یک وکتور PET الحاق شد و در باکتری ای‌کولای BL21 ترانس‌فورم شد. ژن GAD در باکتری‌های ای‌کولای بیان شد و بیان آن با SDS-PAGE بررسی شد. نتایج این مطالعات نشان داد که این سویه‌ها را می‌توان در صنعت برای تولید گابا به کار برد. در نهایت چنین سویه‌هایی می‌توانند سرعت تولید غذاهای تخمیری آرامبخش را افزایش دهند.

کلمات کلیدی: گابا، گلوتامات دکربوکسیلاز، لاکتوباسیلوس، همسانه سازی، HPLC

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱باکتری های اسید لاکتیک(LAB)..... ۱

۱-۲پروبیوتیک ها ۴

۱-۲-۱ معیارهای انتخاب پروبیوتیک ها ۴

۱-۲-۲ مکانیسم اثر پروبیوتیک ها ۵

۱-۳ متابولیسم قند ۶

۱-۳-۱ باکتری های جور تخمیر ۶

۱-۳-۲ باکتری های ناجور تخمیر..... ۶

۱-۴روش های جداسازی باکتری های اسید لاکتیک تولید کننده گابا ۷

۱-۵ لاکتوباسیلوس برویس ۹

۱-۵-۱ رده بندی..... ۹

۱-۵-۲ اهمیت لاکتوباسیلوس برویس..... ۱۰

۱-۵-۳ ساختار ژنوم..... ۱۱

۱-۵-۴ ساختار سلولی و متابولیسم..... ۱۱

۱-۵-۵ اکولوژی ۱۲

۱-۵-۶ پاتولوژی ۱۲

۱-۵-۷ کاربرد در زیست فناوری ۱۲

۱-۶گابا..... ۱۳

۱-۶-۱ تاریخچه ۱۵

۱-۶-۲ ساختار اسید آمینه گابا..... ۱۶

۱-۶-۳ اثرات فیزیولوژیکی گابا ۱۷

۱-۶-۴ اهمیت گابا ۱۷

۱-۶-۵ مسیر تولید گابا..... ۱۷

۱-۶-۶ نیاز برای تولید گابا توسط ریز سازواره ها..... ۱۹

۱-۶-۷ متابولیسم گابا ۲۰

عنوان **صفحه**

۱-۷ گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD) ۲۱
۱-۷-۱ ویژگی های آنزیمی GAD در باکتری های اسید لاکتیک ۲۱
۱-۷-۲ همسانه سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز ۲۲
۱-۸ اورتوفتالدهید ۲۳
۱-۹ اهداف این پژوهش ۲۶

فصل دوم : مواد و روشها

۲-۱ مواد ۲۷
۲-۱-۱ریزسازواره ها ۲۷
۲-۱-۲ مواد شیمیایی ۲۷
۲-۱-۳ آنتی بیوتیک ها ۲۹
۲-۱-۴ آغازگرها ۲۹
۲-۱-۵ پلاسمیدها ۲۹
۲-۱-۶ کیت های آزمایشگاهی ۳۲
۲-۱-۷ آنزیم ها ۳۲
۲-۱-۸ سایر آنزیم ها ۳۲
۲-۱-۸ مارکرها ۳۲
۲-۱-۹ محلول ها ۳۳
۲-۱-۱۰ محیط های کشت ۳۵
۲-۱-۱۱ دستگاه ها ۳۸
۲-۱-۱۱ نرم افزارها و پایگاه های مورد استفاده ۳۹
۲-۲ روش ها ۳۹
۲-۲-۱ روش استریل کردن ۳۹
۲-۲-۲ شناسایی باکتری لاکتوباسیلوس برویس ۴۰
۲-۲ -۳ شناسایی لاکتوباسیلوس ها به روش های بیوشیمیایی ۴۰
۲-۲-۴ شناسایی باکتری ها به روش PCR در حد سوش ۴۱
۲-۲-۶ استخراج DNA ژنومی لاکتوباسیلوس برویس ۴۳

عنوان **صفحه**

۲-۲-۷ الکتروفورز DNA ژنومی بر روی ژل آگارز ۴۴
۲-۲-۸ انجام PCR وتکثیر ژن گلوتامات دکربوکسیلاز ۴۵
۲-۲-۷ استخراج قطعات DNA به دست آمده از PCR از روی ژل ۵۰
۲-۲-۸ همسانه سازی قطعات DNA مورد نظر در باکتری اشریشیا کلای..... ۵۱
۲-۲-۸-۵ کلنی PCR با آغازگرهای اختصاصی به منظور تائید حضور ژن در سلول های تراریخت ۵۷
۲-۲-۹ همسانه سازی قطعه ژنی در وکتور بیانی PET ۵۹
۲-۲-۱۰ کلنی PCR ژن گلوتامات دکربوکسیلاز وکتور بیانی ۶۳
۲-۲-۱۱ بررسی بیان روتئین..... ۶۳

فصل سوم : نتایج

۳-۱ نتایج رنگ آمیزی گرم ۶۵
۳-۲ نتایج آزمون بیوشیمیایی ۶۶
۳-۳ نتایج 16srRNA PCR..... ۶۷
۳-۴ نتایج حاصل از TLC ۶۹
۳-۵ استخراج DNA ژنومی لاکتوباسیلوس برویس با استفاده از ۳ روش ۷۰
۳-۶ تکثیر ژن گلوتامات دکربوکسیلاز توسط PCR ۷۱
۳-۷ همسانه سازی ژن GAD در وکتورPJET1.2/Blunt ۷۲
۳-۷-۱ تائید حضور ژن GAD در وکتور PJET1.2/Blunt..... ۷۲
۳-۷-۲ تائید از طریق توالی یابی..... ۷۳
۳-۸ نتایج حاصل از وبگاه NEBCutter ۷۸
۳-۹ نتایج حاصل از همسانه سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز ۷۹
۳-۱۰ نتایج حاصل از ورود ژن به وکتور pGEM-T..... ۷۹
۳-۱۱ نتایج حاصل از کلنی PCR ژن گلوتامات دکربوکسیلاز وکتور بیانی ۸۰
۳-۱۲ نتایج حاصل از بیان پروتئین GAD ۸۰
۳-۱۳ نتایج حاصل از سرور Cell-Ploc..... ۸۲

عنوان **صفحه**

۳-۱۴ نتایج حاصل از پیش بینی ساختار ثانویه پروتئین گلوتامات دکربوکسیلاز ۸۳
۳-۱۵ نتایج حاصل از HPLC.....۸۵
فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری
پیشنهادات.....۹۸
پیوست ها.....۹۹
منابع و ماخذ ۱۰۲

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ باکتری لاکتوباسیلوس برویس ۱۰
شکل۱-۲ نمای شماتیک از گیرنده های گابا ۱۴
شکل ۱-۲ ساختار اسید آمینه گابا ۱۶
شکل۱-۳ شانت گابا. GABA-T ۱۸
شکل ۱-۴ مسیر متابولیسم گابا ۲۰
شکل ۱-۵ ساختار اورتوفتالدهید ۲۴
شکل ۱-۶ شیمی مشتق گابا ۲۵
شکل ۲-۱ ساختار شماتیک وکتور pJET1.2/Blunt ۳۰
شکل ۲-۲ ساختار شماتیکی وکتور PET-28a(+) ۳۱
شکل ۲-۳: تصویر شماتیک از PCR ۴۸
شکل۲-۴ نقشه ژنتیکی وکتورومحل برش آنزیم های محدود کننده ۵۴
شکل ۲- ۵ توالی پرایمرهای وکتور pJET1.2 ..... ۵۵
شکل ۲-۶اجزای مورد نیاز برای Blunting Reaction ۵۵
شکل ۲-۷ اجزای مورد نیاز برای واکنش اتصال ۵۶
شکل ۲-۸ مواد مورد نیاز برای واکنش الحاق دروکتور PGEM-T ۶۰
شکل ۲-۹ نقشه ژنتیکی وکتور PGEM-T ۶۱
شکل ۳-۱تصویر میکروسکوپی لاکتوباسیلوس برویس ۶۵
شکل ۳-۲ نتایج حاصل از ژل آگارز برای PCR 16srRNA. ۶۷
شکل ۳-۳بخشی از نتایج بلست توالی 16 srRNA ۶۸
شکل۳-۴: نتایج حاصل از TLC ۶۹
شکل۳-۵ : نتایج حاصل از ژل اگارز برای DNA استخراجی توسط ۳ روش ۷۰
شکل ۳-۶ : محصول PCR از DNA ژنومی ۸۵۷. ..... ۷۱
شکل ۳-۷ نتایج حاصل از ورود ژن به وکتور T ۷۲
شکل ۳-۸ توالی پروتئینی ژن GAD ۷۳
شکل ۳-۹ تشابهات ژن GAD با بقیه سویه های لاکتوباسیلوس ۷۴

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱۰بخشی از نتایج حاصل از BLASTX برای ژن GAD ۷۵
شکل ۳-۱۱ نتایج حاصل از همردیفی ۴ توالی گلوتامات دکربوکسیلاز ۷۶
شکل ۳-۱۲ رسم درخت فیلوژنی برای گلوتامات دکربوکسیلازها ۷۷
شکل ۳-۱۳ نتایج حاصل از برش توالی GAD ۷۸
شکل ۳-۱۴ کلنی های رشد یافته پس از انتقال ژن به وکتورPGEM-T ۷۹
شکل ۳-۱۵ نتایج حاصل از ورود ژن به وکتور pGEM-T ۷۹
شکل ۳-۱۶ نتایج حاصل از ورود ژن GAD به وکتور بیانی ۸۰
شکل ۳-۱۷ نتایج مربوط به وکتور بیانی..... ۸۱
شکل ۳-۱۸ نتایج حاصل از SDS-PAGE..... ۸۱
شکل ۳-۱۹ نتایج حاصل از پیش بینی محل قرار گیری پروتئین..... ۸۲
شکل ۳-۲۰ نتایج پیش بینی ساختار ثانویه توسطPSIPRED..... ۸۴
شکل ۳-۲۱ منحنی استاندارد اسیدآمینه گابا..... ۸۵
شکل ۳-۲۲ پیک مربوط به استاندارد گابا ۸۶
شکل ۳-۲۳ نتایج HPLC محیط کشت MRS بدون کشت باکتری ۸۷
شکل ۳-۲۴ نتایج HPLC ۹۶ ساعته سویه ۸۵۶..... ۸۸
شکل ۳-۲۵ نتایج HPLC ۱۴۴ ساعته سویه ۸۵۶..... ۸۹
شکل ۳-۲۶ نتایج HPLC سویه ۸۵۶..... ۹۰
شکل ۳-۲۷ نتایج HPLC ۹۶ ساعته سویه۸۵۷ ..... ۹۱
شکل ۳-۲۸ نتایج HPLC ۱۴۴ ساعته سویه ۸۵۷ ..... ۹۲
شکل ۳-۲۹ نتایج HPLC سویه ۸۵۷ ..... ۹۲
شکل ۳-۳۰ نمودار ستونی مقایسه تولید گابا توسط ۲ سویه ۸۵۶ و ۸۵۷..... ۹۳
شکل ۴-۱ ساختار گاباپنتین..... ۹۵

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱ سویه های تولید کننده گابا ۸
جدول ۲-۱ مواد شیمیایی مورد استفاده و شرکت سازنده ۲۸
جدول ۲-۲ مواد و میزان مورد نیاز برای محیط کشت LB ۳۵
جدول ۲-۳ مواد و مقدار مورد نیاز برای محیط های کشت قند ۳۶
جدول ۲-۴ دستگاه های مورد استفاده ۳۸
جدول۲-۴ مقادیر مورد نیاز برای انجام PCR ۴۹
جدول۲-۵ شرایط دمایی انجام PCR ۵۰
جدول ۲-۶ شرایط دمایی انجام 16srRNA PCR ۵۰
جدول ۲- ۷ اجزای موجود در کیت ۵۴
جدول ۲-۸ شرایط دمایی PCR برای پرایمر های جدید ۵۹
جدول۲-۹ مقادیر مورد نیاز برای واکنش هضم آنزیمی ۶۲
جدول ۲-۱۰ مقادیر مورد نیاز برای واکنش اتصال ۶۲
جدول ۳-۱ نتایج آزمون بیوشیمیایی ۶۶
جدول ۳-۲ مقادیر غلظت و جذب برای لاکتوباسیلوس برویس شماره ۸۵۶ و ۸۵۷ ..... ۷۰
جدول ۳-۳ فاصله تکاملی گلوتامات دکربوکسیلاز ۷۷

مخففها

مخفف	عبارات
ATP	Adenosin Three Phosphate
BME	2- Mercaptoethanol
CoA	Coenzyme A
DNA	Deoxy Ribo Nucleic Acid
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide
FAO	Food and agriculture organization
GABA	Gama Amino Butyric Acid
GABA-T	Gaba α-oxoglutarate Transe amynase
GAD	Glutamate Decarboxylase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LAB	Lactic Acid Bacteria
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotid
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotid Phosphate
OPA	Ortho-Phthaladehyde
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribo Nucleic Acid
SSAD	Succinic Semi Aldehyde Dehydrogenase
TAE	Tris Acetic acid EDTA
TE	Tris-EDTA
TLC	Thin Layer Chromatography
WHO	World health organization

فصل اول

مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱ باکتری‌های اسید لاکتیک(LAB)[1]

باکتری‌های اسید لاکتیک طیف گسترده ای از باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند، اما از بین آنها لاکتوباسیلوس‌ها مورد توجه خاص قرار دارند. در ابتدا گونه‌های لاکتوباسیلوس از کفیر جداسازی شدند و در سال ۱۸۸۱ توسط محقق روسی به نام کرن[2] نامگذاری شدند. مورو[3] محقق استرالیایی، در سال ۱۹۵۵برای اولین بار باکتری غیر هوازی اختیاری میله‌ای شکلی را از مدفوع نوزادان تغذیه شده با شیر مادر جدا نمود و آن را باسیلوس اسیدوفیلوس نامگذاری کرد، که نام عمومی برای لاکتوباسیلوس‌های روده‌ای به شمار می‌رود. باکتری‌های اسید لاکتیک گروه مهمی از باکتری‌های گرم مثبت هستند که به طور وسیعی در محیط پراکنده شده‌اند و در غذاهای تخمیری، سبزیجات، روده انسان و حیوانات یافت می شود. باکتری‌های اسید لاکتیک جزو فلور دستگاه گوارش (روده) و دستگاه تناسلی (واژن) انسان بوده ویکی از اجزا تشکیل دهنده مهم میکروفلور طبیعی بدن انسان و حیوان به شمار می‌رود(Khunajakr A. W. N. 2008). پراکندگی این باکتری‌ها به برخی عوامل محیطی نظیر دسترسی به اکسیژن، مقدار مواد اولیه مورد نیاز، وجود برخی ترشحات و فعالیت‌های باکتریایی یاد کرد. این دسته از باکتری‌ها

[1] Lactic acid bacteria
[2] Kern
[3] Moro

بندرت با عفونت‌های دستگاه گوارش یا سایر دستگاه‌های بدن در ارتباط هستند و سویه‌هایی که از نظر اکولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند، در دسته باکتری‌های بی‌خطر [1] قرار دارند؛ همچنین گزارش شده است که باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی حذف فلزات سنگین (Halttunen 2008)، سیانوتوکسین ها[2] (Nybom 2007) و مایکوتوکسین‌ها (El-Nezami 1998) را از محلول‌های آبی در محیط آزمایشگاهی دارند. باکتری-های اسید لاکتیک متعلق به شاخه کلستریدیوم از باکتری‌های گرم مثبت، بی هوازی تا هوازی اختیاری و کوکو باسیل یا میله‌ای هستند که گلوکز را تخمیر کرده و لاکتات را به عنوان فراورده‌ی نهایی تخمیر تولید می‌کنند. کاتالاز منفی و اکسیداز منفی بوده و هاگ (اسپور) تولید نمی‌کنند. افزودن سویه‌های خاصی از باکتری‌های اسید لاکتیک به مواد غذایی، به عنوان یک عامل تحریک‌کننده دستگاه ایمنی عمل می‌کند که در شرایط سرکوب ایمنی مانند ابتلا به سرطان می‌تواند باعث تقویت دستگاه ایمنی شود. یکسری مکانیسم‌هایی برای توجیه اثرات پیشگیری کننده و درمانی آن ها در بیماری‌های انسان پیشنهاد شده است که از آن جمله می‌توان به تولید ترکیبات مهارکننده باکتری‌ها، تعدیل pH روده، تقویت دستگاه ایمنی، انسداد جایگاه‌های اتصال باکتری‌ها و رقابت برای جذب مواد غذایی اشاره نمود. فعالیت ضد باکتریایی، به دلیل تولید اسیدهای آلی شامل اسیدلاکتیک، اسید استیک، اسیدهای چرب و همچنین دی استیل و هیدروژن پراکسید است(Rattanachaikunsopon P. 2010). باکتریوسین‌های تولیدی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، کوچک هستند وبه صورت ریبوزومی سنتز می‌شوند، پپتیدی یا پروتئینی هستند که دارای اثرات باکتری‌کشی علیه باکتری‌های گرم مثبت، با سویه‌های در ارتباط نزدیک، هستند، در صورتی که برای سلول‌های تولید کننده‌شان بی ضرر هستند و قادرند به گیرنده‌های اختصاصی سطح سلول متصل شوند. باکتریوسین‌ها گروه هتروژن از آنتاگونیست‌های باکتریایی هستند که تفاوت آن‌ها در وزن مولکولی، خصوصیات بیوشیمیایی و ... می‌باشد. هم باکتری‌های گرم مثبت و هم باکتری‌های گرم منفی باکتریوسین تولید می‌کنند. باکتریوسین‌های تولیدی توسط گرم مثبت‌ها، پپتیدهای کوچک۳-۶ کیلودالتونی هستند. اغلب آن‌ها باعث افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی می‌شود و فعالیت ضد باکتریایی باکتریوسین‌های تولیدی توسط گرم مثبت‌ها بیش تر از گرم منفی‌ها است که این به دلیل تمایل افزایش یافته کاربرد باکتری‌های اسید لاکتیک درنگهداری مواد غذایی می‌باشد.چهار نوع باکتریوسین تولید شده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک امروزه شناسایی شده اند. یکی از مهمترین آن‌ها که توسط لاکتوباسیلوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس تولید می‌شود و علیه باکتری‌های گرم مثبت مثل لیستریا موثر بوده(Priyanka Singh 2009; Singh 2009) و همچنین

[1] Generally Regarded as Safe (Gras)
[2] Cyanotoxin

باعث مهار اسپورزایی باسیلوس‌ها و کلستریدیوم‌ها می‌شود، نیسین می‌باشد، که جایگاه اولیه اثر آن غشای سلولی می‌باشد(L.DeVuyst 2007) همچنین در برخی سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک فعالیت ضد قارچی هم دیده شده است (Hwanhlem 2010), (Herich 2002).

بنابراین، انواع مختلفی از LAB که توانایی تولید گابا را دارند به عنوان یک هدف خوب برای صنعت غذاسازی به حساب می‌آیند. به خصوص غذاهای تخمیری، زیرا سویه‌های منفرد ویژگی‌های تخمیری متعددی مانند توانایی تولید اسید، طعم و مزه مختلف را دارد(Jeng 2007). این ویژگی‌ها، عوامل مهمی در کاربرد LAB به عنوان شروع‌کننده‌ها در تولید غذاهای تخمیری هستند (Jeng 2007). تاریخچه کاربرد باکتری‌های اسید لاکتیک در تولید غذاهای تخمیری بسیار طولانی است و تلاش‌های زیادی انجام شده است تا نقش این باکتری‌ها در این فرایند آشکار شود. بدون شک مهمترین کاربرد باکتری‌های اسید لاکتیک، کاربرد آن‌ها به عنوان آغازگر در تولید محصولات شیری تخمیری است. به ویژه استرپتوکوکوس ترموفیلوس[1]، لاکتوکوکوس لاکتیس[2]، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس[3]، لاکتوباسیلوس دلبروکی[4] که زیر گونه بولگاریکوس می‌باشند.

در فرایند تخمیر شیر، سیستم پروتئولیتیک LAB، نقش کلیدی دارد زیرا این سیستم باکتری‌ها را قادر می‌سازد تا در شیر رشد کنند و بنابراین یک تخمیر موفقیت آمیز صورت می‌گیرد.

باکتری‌های اسید لاکتیک ریزسازواره‌های حساسی هستند که به یک منبع خارجی از اسیدهای آمینه، پپتیدها نیاز دارند که از طریق پروتئولیز کازئین، فراوان‌ترین پروتئین در شیر و منبع اصلی اسیدهای آمینه، فراهم می‌شود. به‌طور کلی استفاده از کازئین توسط LAB توسط یک پروتئیناز پوشش سلولی[5] آغاز می‌شود که پروتئین را به اولیگوپپتید تجزیه می‌کند و سپس در نهایت از طریق سیستم‌های انتقالی اختصاصی پپتید برای تجزیه بیشتر برای پپتیدهای کوتاه‌تر و اسیدهای آمینه به داخل سلول برده می‌شوند(Macedo 2001) . اگرچه بسیاری از سویه - هایی که دارای CEP هستند، اما چندین نوع از این سویه‌ها یعنی LAB غیر شروع کننده، فاقد آن هستند و این نوع از باکتری‌های اسید لاکتیک برای تولید پپتیدها و اسید آمینه‌ها متکی به LAB های شروع کننده[6] هستند (Rattanachaikunsopon 2010).

[1] S. thermophilus
[2] L. lactis
[3] L. helveticas
[4] L. delbrueckii
[5] Cell Envelope(CEP)
[6] Starter