

ای نام تو بہترین سرآغاز

بی نام تو نامہ کی کنم باز

**Development of probiotic Lactobacillales
from laboratory to the market: working in
conjunction with BRCs**

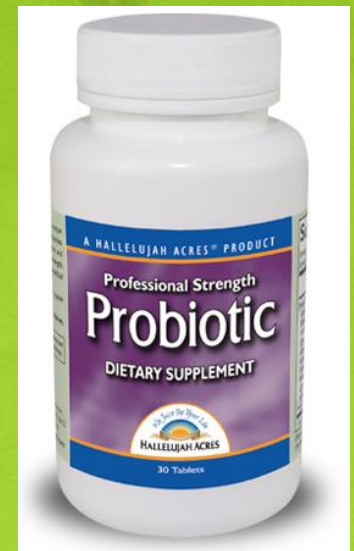
M. R. SOUDI

MSOUDI@ALZAHRA.AC.IR



Health Benefits of Probiotics

- **DIARRHOEA CAUSED BY CERTAIN PATHOGENIC BACTERIA AND VIRUSES**
- ***HELICOBACTER PYLORI* INFECTION AND COMPLICATIONS**
- **INFLAMMATORY DISEASES AND BOWEL SYNDROMES**
- **CANCER**
- **CONSTIPATION**
- **MUCOSAL IMMUNITY**
- **ALLERGY**
- **CARDIOVASCULAR DISEASE**
- **UROGENITAL TRACT DISORDERS**
- **BACTERIAL VAGINOSIS**
- **YEAST VAGINITIS**
- **URINARY TRACT INFECTIONS**
- **USE OF PROBIOTICS IN OTHERWISE HEALTHY PEOPLE**



LAB Marketing

- Industrial Uses of Lactic acid Bacteria
 - Fermented dairy products
 - Cereal Processing
 - Sour Dough
 - Fermented vegetables
 - Fermented Meat
 - Health Products(Live LAB as Probiotics)



Some of LAB Probiotics Contributions to Fermented Food

- FLAVOR
- AROMA
- TEXTURE
- NUTRITIONAL ENHANCEMENT
 - **Superior Preservation**
- **Natural ANTIBACTERIALS**
- **Natural ANTIFUNGALS**



LAB fermented food Market without LABs

- Pickles as an example:
Unprocessed or Defective?
- Steam sterilized
- +Additive antimicrobials
- Highly salted acidic non fermented products





Thus,

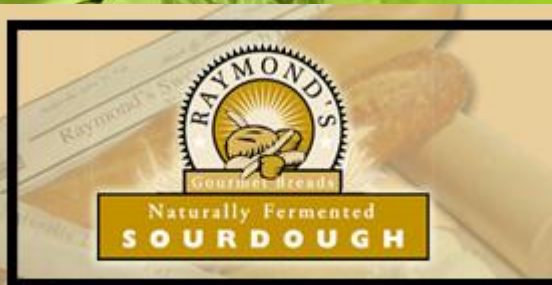
our LAB fermented food
industries suffer from poor
access to powerful strains

COLLECTION OF LACTOBACILALES

A key of the success!



- ***Lactobacillus sanfranciscensis*** (formerly *L. sanfrancisco*) is a species of lactic acid bacteria that helps give sourdough bread its characteristic taste. It is named after San Francisco, whose sourdough was found to contain the variety, though it not exclusive to the area.^[1]
- Sourdough starters are leavened by a mixture of yeast and lactobacilli in a ratio of about 1:100. The yeast is most commonly *Candida milleri*. This yeast cannot metabolize the maltose found in the dough, while the *Lactobacillus* needs maltose.^[2] They therefore act without conflict for substrate, with the *Lactobacillus* utilizing maltose and the yeast utilizing the other sugars, including the glucose produced by the *Lactobacillus*.



Raymond's Story

Where Are Our Native LABs?!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

- **Day to day loss of opportunities**



- Rural population has changed his life style
- A decrease in population from half to less than 10%
- (6.5 M)



Biosystematics of LACTOBACILALES

A key of the success!

- PHYLUM *FIRMICUTES*
- CLASS *BACILLI*
- ORDER *LACTOBACILLALES*
 - Family *Lactobacillaceae*
 - genera: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, and *Pediococcus*
 - Family "*Leuconostocaceae*"
 - genera: *Leuconostoc*, *Oenococcus*, and *Weissella*.
 - Family *Streptococcaceae*
 - *Streptococcus* and *Lactococcus* and *Lactovum*
 - Family "*Enterococcaceae*" . . .
 -

A urgent need to BRC

- Laboratory --- Pilot ----- Industry -----Market
- **BRC:**
- ---research assistant----- credit provider



So, why we need to share with BRC,

- To decline research expenses**
- To gain access to more strains**
- To take bio-systematic adv. & comm.**
- To save the time of strain evaluation**





مرکز ملی ذخائر ژنتیکی و زیستی ایران
بانک میکروارگانیسم ها



ضرورت ها و اهداف راه اندازی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران



مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران بنابر نیازهای زیربنایی کشور در حوزه علوم زیستی و زیست فناوری و بر اساس مطالعات انجام پذیرفته و بررسی کارکردهای گوناگون این گونه مراکز (Biological Resource Centers) در سطح جهانی و داخل کشور راه اندازی گردید.

الف: اهداف

- ❖ ارائه انواع نمونه های زیستی به مراکز و موسسات مختلف
- ❖ ارائه خدمات تخصصی شناسایی و نگهداری میکروارگانیسم ها
- ❖ تحقیقات پایه و کاربردی در حوزه ذخائر ژنتیکی و زیستی (بهینه سازی روش ها و افزایش بهره وری در زمان استفاده از مواد بیولوژیک)
- ❖ راه اندازی و مدیریت شبکه مجازی از اطلاعات نمونه های زیستی موجود در کشور جهت بهره برداری مراکز تحقیقاتی



ب: ضرورت ها و چالش ها

۱- نمونه های زیستی

عدم دسترسی و شناسایی ناقص نمونه های زیستی بومی کشور، عدم امکان احیاء و ارزیابی نمونه های جمع آوری شده، عدم نگهداری ایمن و وجود بانک زیستی درون سازمانی

۲- خدمات

عدم وجود مرکزی با شرایط استاندارد جهت انجام متمرکز فرآیند نگهداری و شناسایی، عدم امکان نگهداری نسخه های پشتیبان از نمونه ها به علت نداشتن فضا، تجهیزات و یا شرایط نگهداری، عدم حفظ مالکیت معنوی و مادی نمونه های زیستی ارسال شده به خارج از کشور

۳- تحقیقات پایه و کاربردی:

مراکزی که تحت عنوان زیست بانک فعالیت دارند در زمینه شناسایی، جمع آوری، تعیین هویت و غیره می بایست از الگوی استاندارد روشها و پروتکلها، و نیز آخرین دستاوردهای علمی در این حوزه بهره مند گردند تا در هر کدام از این مراحل نمونه های زیستی فاقد ارزش نگردد.

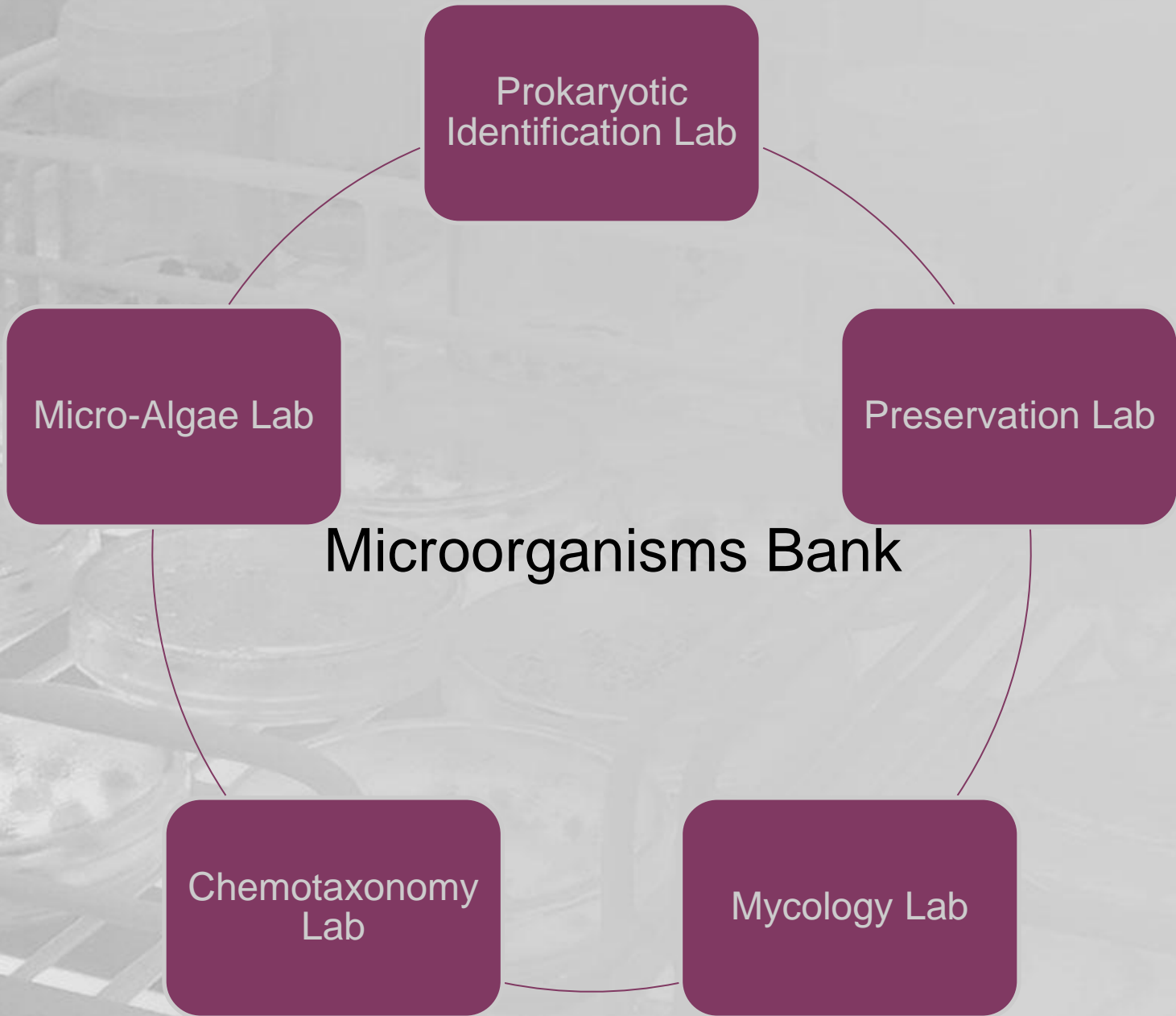




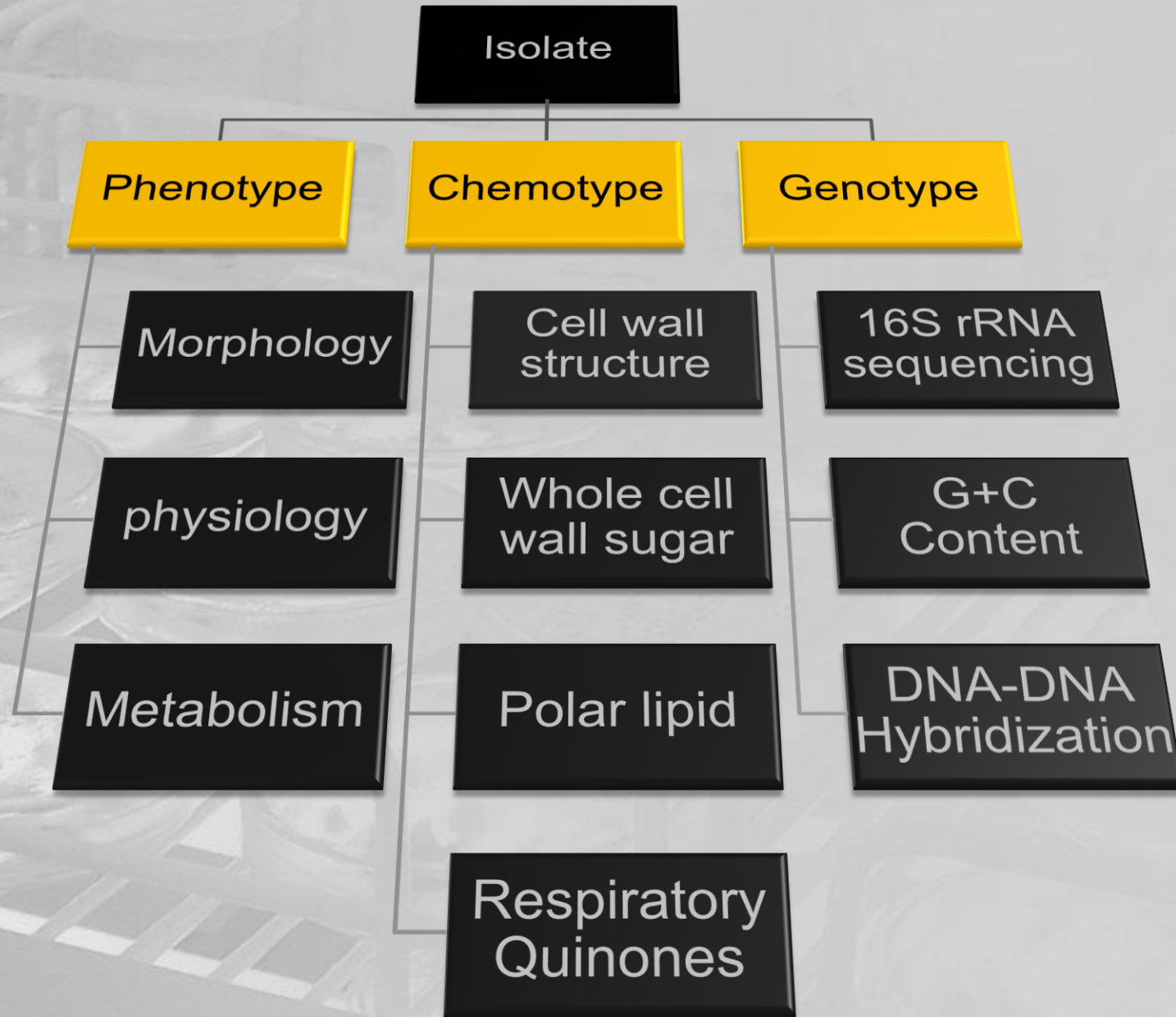
بانک میکروارگانیسم ها
ضرورت امروز
پشتوانه فردا

تنوع میکربی، واقعیت پنہان

Group	Described	Estimated (range)	Accuracy
Plants	270,000	300,000 - 500,000	good
Chordates	45,000	50,000 – 55,000	good
Arthropods	1,065,000	2,375,000 -100 million	moderate
Nematodes	25,000	100,000 - 1,000,000	poor
Fungi	75,000	200,000 – 10 million	moderate
Bacteria	~5,000	50,000 – 3 million (??)	very poor



Polyphasic Identification Process



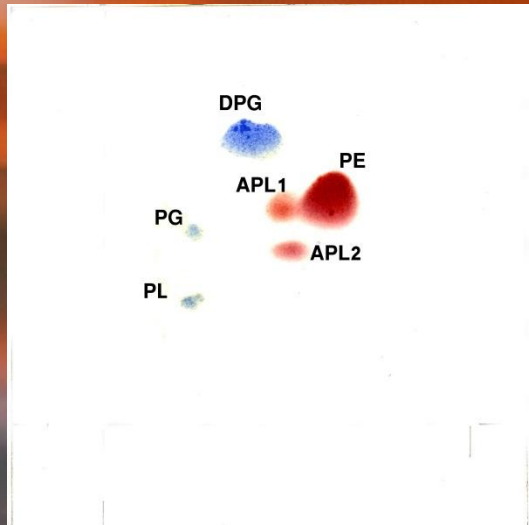
شناسایی پلی فازیک پروکاریوتها

❖ انجام بیش از ۸۰ درصد فرآیند شناسایی پلی فازیک در داخل کشور

❖ خود کفایی کامل در زمینه شناسایی فنوتیپیک پروکاریوت ها (صفات بیوشیمایی و فیزیولوژیک) طبق استانداردهای جهانی مصوب کمیته های بین المللی شناسایی

❖ انجام ۸۰ درصد شناسایی مولکولی میکروارگانیسم ها (16S&23S rRNA, 18S rRNA و MLSA) (هیبریداسیون DNA در دست راه اندازی)

دستاوردهای ویژه و متمایز بانک در حوزه شناسایی میکروارگانیسم ها



❖ پذیرش بانک مرکز در کمیته بین المللی شناسایی میکروارگانیسم ها

❖ انجام آنالیز لپیدهای قطبی برای اولین بار در کشور و خاورمیانه

❖ انجام آنالیز درصد گوانین سیتوزین برای اولین بار در کشور، خاورمیانه و به عنوان یکی از ۷ بانک جهان

❖ انجام آنالیز کینونهای تنفسی در مخمرها و باکتری های گرم منفی برای اولین بار در ایران، خاورمیانه و ششمین بانک جهان

❖ کاهش ۶۰-۷۰ درصدی هزینه های شناسایی



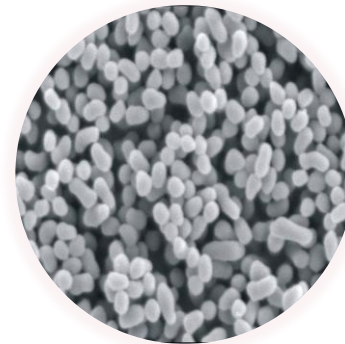
همکاری های بین بانکی، دستاورد بزرگ مرکز



Complete genome
sequence of
Oceanimonas sp.
GK1 as a PHB
producer



IBRC
Genome
projects:
the first in
IRAN



Draft genome
sequence of
Nesterenkonia sp.
Strain F. as a
Amylase Producer



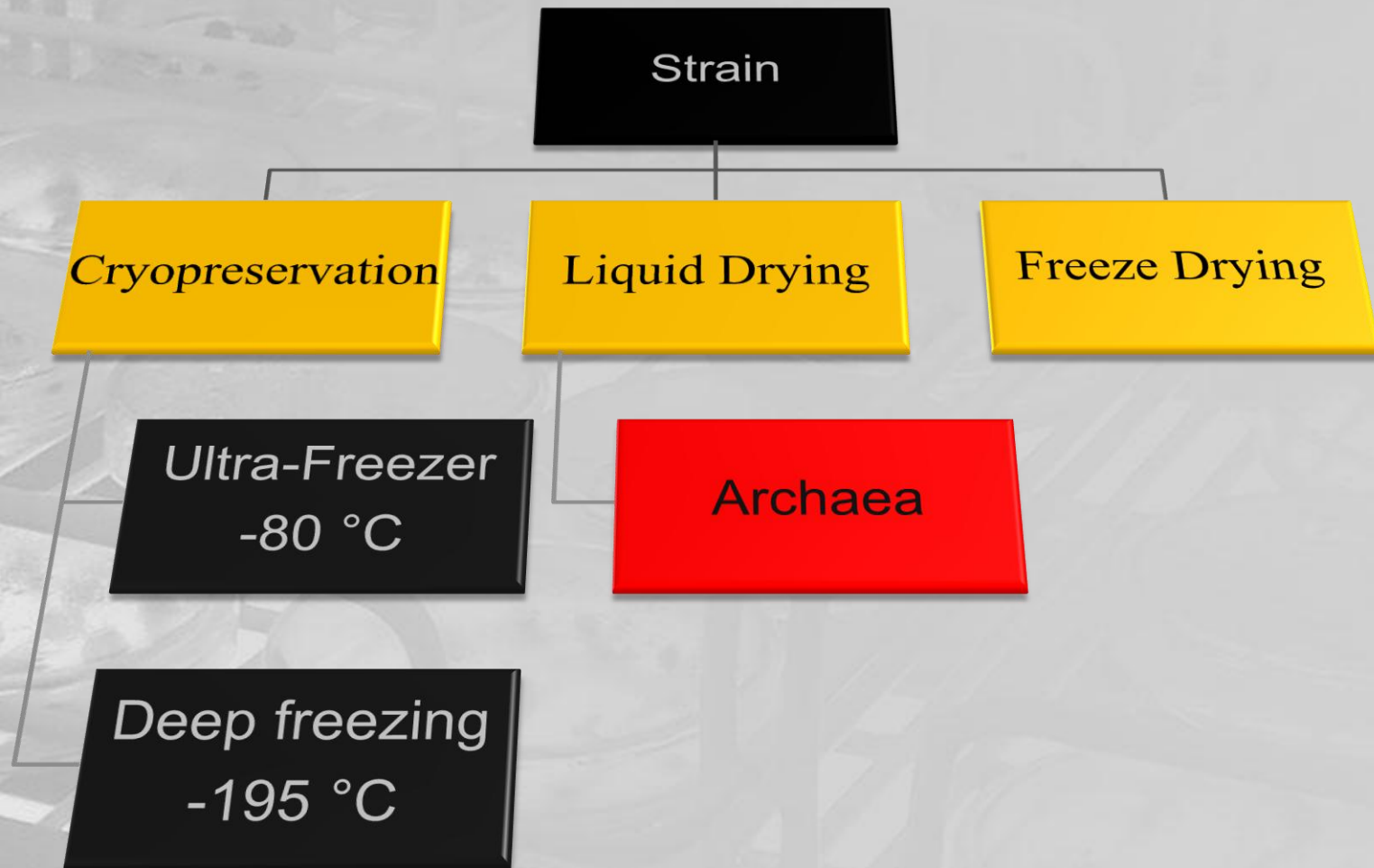
دستاورد مهم پروژه ژنوم

آنزیم PHB سنتاز متعلق به باکتری *Oceanimonas sp. Gk1* از نوع سنتاز کلاس یک می باشد که از نقطه نظر بیوتکنولوژی اهمیت ذیل را دارد

- این آنزیم پلی مر PHB با زنجیره کوتاه تولید می کند که می تواند در صنایع بسته بندی و داروسازی به عنوان حامل دارو کاربرد داشته باشد
- محصول این آنزیم در واقع پلاستیک قابل تجزیه می باشد



Long-term preservation Process



نگهداری میکروارگانیسم ها

• نگهداری میکروارگانیسم ها به روشهای مختلف :

❖ نگهداری در اولترافریزر -۸۰

❖ نگهداری در تانک ازت -۱۹۵

❖ نگهداری به روش خشک کردن در خلأ



کاتالوگ سویه ها

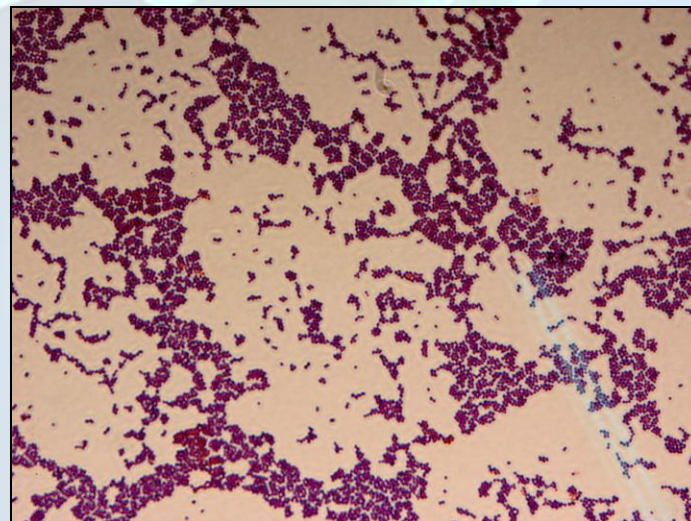
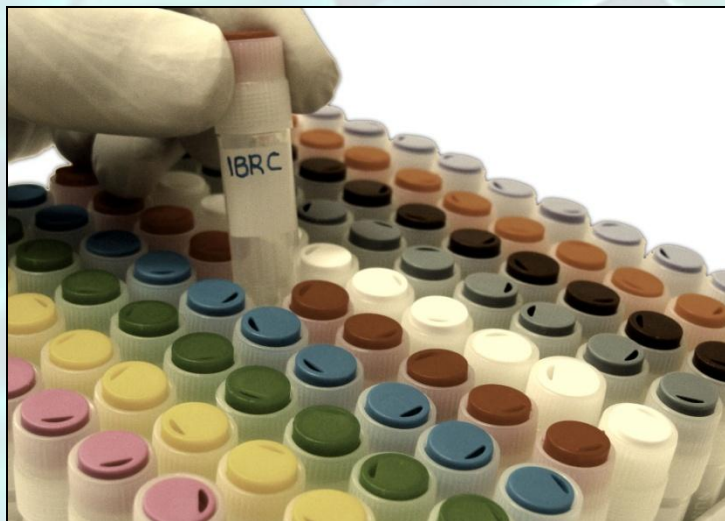
- کاتالوگ رسمی بانک شامل ۱۴۶ سویه با شناسنامه کامل
- ارائه اولین بار کاتالوگ سویه های بومی کشور
- ارائه اولین بار کاتالوگ سویه های دارای ارزش بیوتکنولوژیک
- ارائه کاتالوگ سویه های ارزشمند در فرآیند کنترل کیفی محصولات صنایع غذایی، آب - فاضلاب، بهداشتی-آرایشی و تشخیص بیماریهای عفونی (آنتی بیوگرام)



دستاورد ویژه و متمایز بانک در حوزه نگهداری

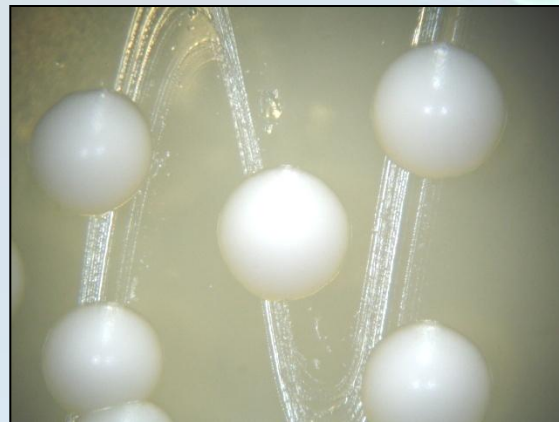
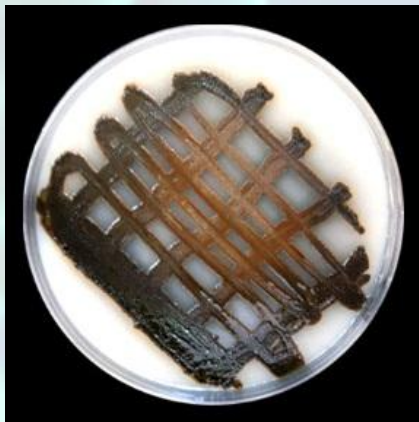
❖ نگهداری پروکاریوت‌های آرکیایی در بانک میکروارگانیسم‌ها به روش L-Drying که بانک را جزء معدود کلکسیون‌های نگهدارنده آرکی‌ها در سطح جهان معرفی نموده است.

❖ نگهداری و صدور گواهی‌نامه نگهداری (Accession Code) برای سویه‌های بومی و ارسال شده از کشورهای چین، ژاپن و اسپانیا، مالزی، چین با پیشوند IBRC-M ارائه شده در ژورنال‌های بین‌المللی



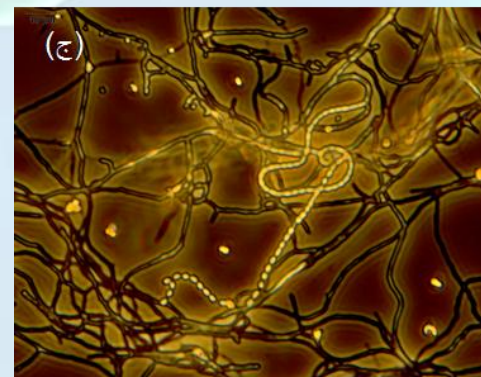
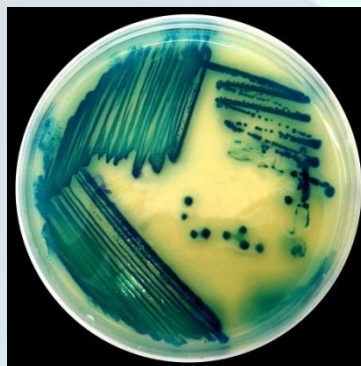
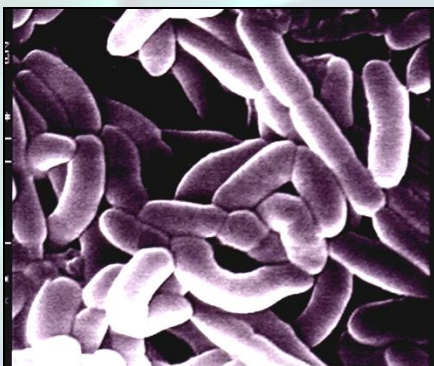
سویه های بومی کشور

NO	Organism type	Scientific Name	IBRC Number	Journal
1	Archaea	<i>Halovenus aranensis</i>	10015	IJSEM
2	Archaea	<i>Haloarchaeobius iranensis</i>	10013	IJSEM
3	Archaea	<i>Halopenitus persicus</i>	10041	IJSEM
4	Bacteria	<i>Salinibacter iranicus</i>	10423	IJSEM
5	Bacteria	<i>Bacillus iranensis</i>	10446	IJSEM
6	Bacteria	<i>Alteribacillus bidgolensis</i>	10614	IJSEM
7	Bacteria	<i>Saliterribacillus persicus</i>	10629	IJSEM
8	Bacteria	<i>Ornithibacillus halophilus</i>	10683	IJSEM



سویه های بومی کشور (ادامه)

NO	Organism type	Scientific Name	IBRC Number	Journal
۹	Bacteria	<i>Salinicoccus iranensis</i>	IBRC-M 10198	IJSEM
۱۰	Bacteria	<i>Salinivibrio proteolyticus</i>	IBRC-M 10218	IJSEM
۱۱	Bacteria	<i>Piscibacillus halophilus</i>	IBRC-M 10220	IJSEM
۱۲	Bacteria	<i>Halobacillus karajensis</i>	IBRC-M 10221	IJSEM
۱۳	Bacteria	<i>Salinibacter luteus</i>	IBRC-M 10423	IJSEM
۱۴	Bacteria	<i>Alteribacillus persepolensi</i>	IBRC-M 10436	IJSEM
۱۵	Bacteria	<i>Lentibacillus persicus</i>	IBRC-M 10440	IJSEM



سویه های ارزشمند از دیدگاه بیوتکنولوژی

No.	Scientific Name	IBRC No.	حوزه صنعت و کاربری بیوتکنولوژیک
1	<i>Salinicoccus iranensis</i>	10198	محیط زیست: پاکسازی زیستی فلزات سمی - تلوریت
2	<i>Nesterenkonia</i>	10224	محیط زیست: پاکسازی زیستی فلزات سمی - کرومات
3	<i>Halomonas elongata</i>	10214	محیط زیست: پاکسازی زیستی فلزات سمی - تلوریت، سلنیت، سلنات، کرومات
4	<i>Salinivibrio proteolyticus</i>	10218	صنایع تولید کننده مواد شوینده: تولید پروتئاز با ارزش صنعتی مقاوم به حلال
5	<i>Alcanivorax dieseloii</i>	10429	محیط زیست و صنعت نفت: باکتری نفت خوار، تجزیه کننده ترکیبات آلکان زنجیره بلند
6	<i>Alcanivorax dieseloii</i>	10428	محیط زیست و صنعت نفت: باکتری نفت خوار، تجزیه کننده ترکیبات آلکان زنجیره بلند



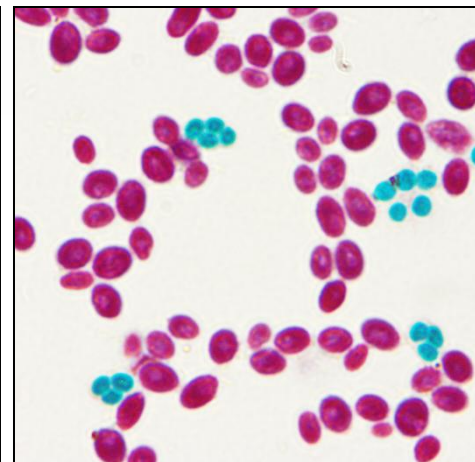
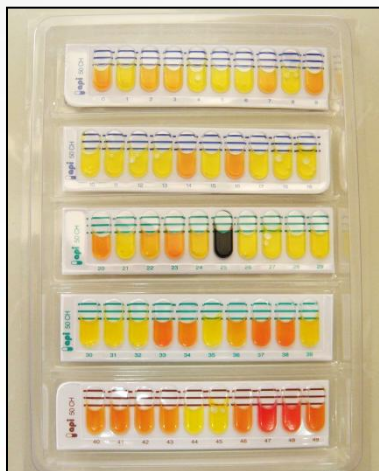
سویه های ارزشمند از دیدگاه بیوتکنولوژی

No.	Scientific Name	IBRC No.	حوزه صنعت و کاربری بیوتکنولوژیک
7	<i>Oceanimonas</i> sp.	10197	محیط زیست و صنعت تولید پلاستیک: تولید کننده PHB به عنوان پلاستیک زیستی
8	<i>Halomonas</i> sp.	10200	محیط زیست و صنعت نساجی: رنگبری آلاینده های رنگی آزو
9	<i>Halomonas</i> sp.	10199	محیط زیست و صنعت نساجی: رنگبری آلاینده های رنگی آزو
10	<i>Halomonas</i> sp.	10219	محیط زیست و صنعت نساجی: رنگبری آلاینده های رنگی آزو
11	<i>Nesterenkonia</i> sp.	10223	صنعت فرآوری نشاسته و تولید گلوکز: تولید آنزیم آمیلاز با قابلیت صنعتی، مقاوم به حلال
12	<i>Kocuria</i> sp.	10207	صنایع تولید مواد آرایشی، بهداشتی و غذایی: تولید کننده پیگمان کارتنوئیدی
13	<i>Streptomyces</i> sp.	10618	صنعت کشاورزی: تولید فیتوتوکسین

خدمات شناسایی بانک

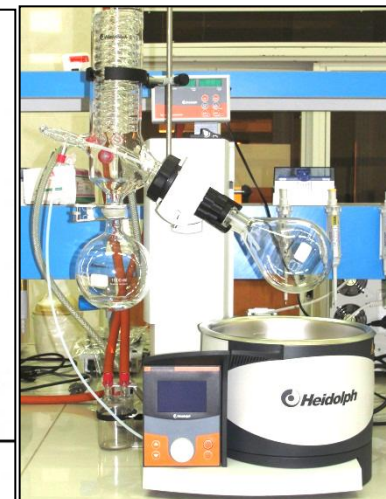
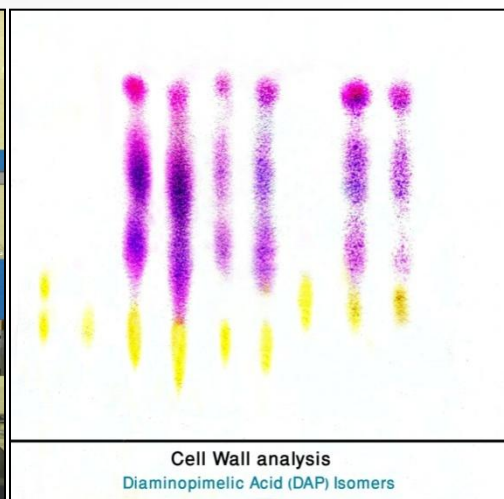
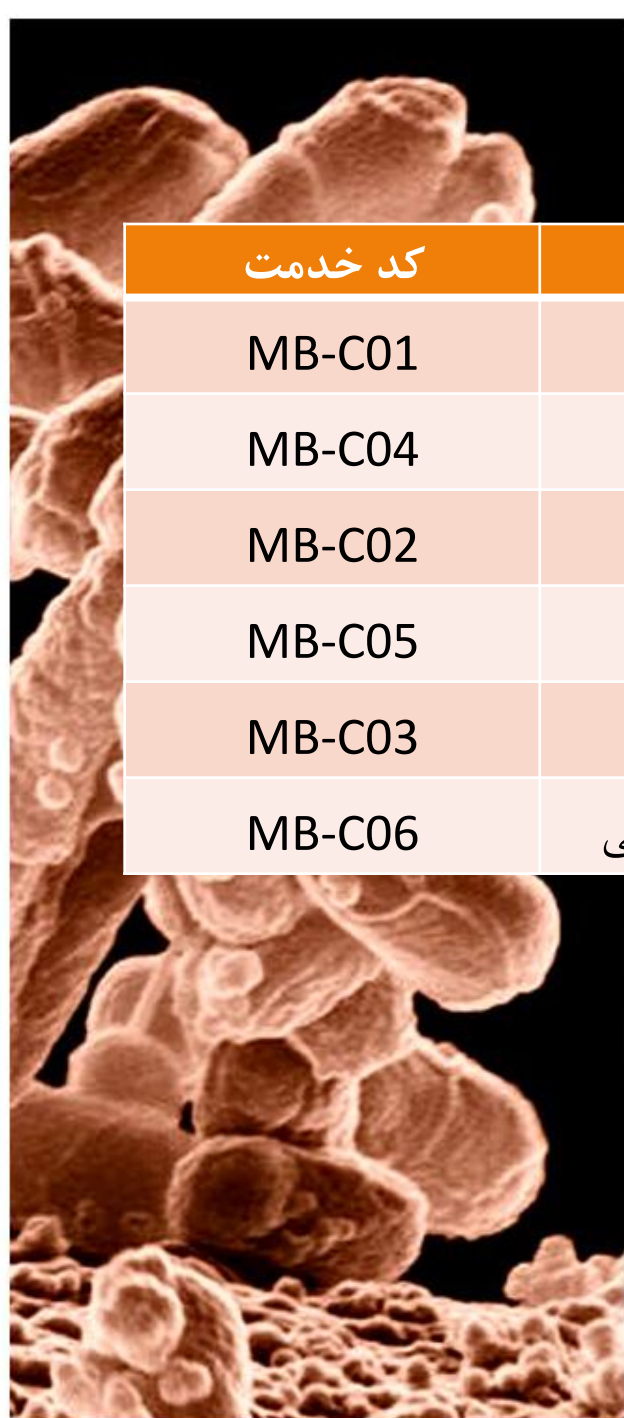
الف) شناسایی فنوتیپیک پروکاریوت ها

کد خدمت	نام خدمت	ردیف
MB-I01	خالص سازی سویه	۱
MB-I02	شناسایی اولیه	۲
MB-I03	شناسایی کامل فنوتیپیک باکتری ها	۳
MB-I04	شناسایی کامل فنوتیپیک اکتینومايست ها	۴
MB-I05	شناسایی کامل فنوتیپیک آرکی ها و اکستريموفیل ها	۵



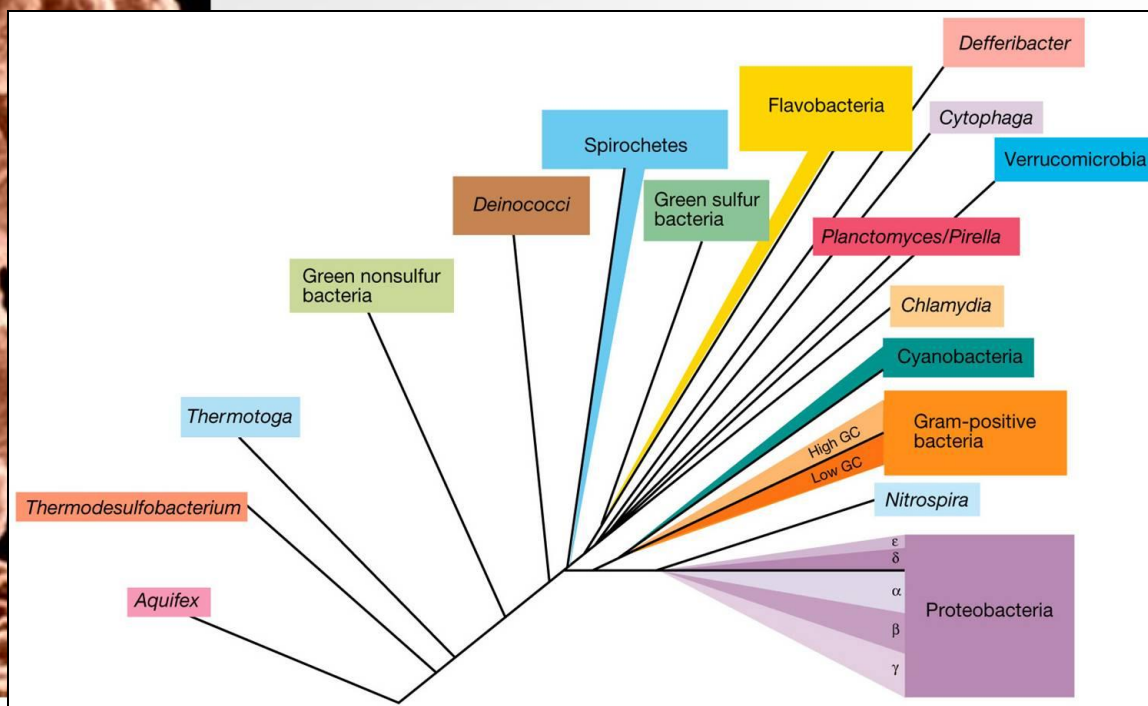
ب) شناسایی کموتاکسونومی

کد خدمت	نام خدمت	ردیف
MB-C01	آنالیز دی آمینو پایملیک اسید	۱
MB-C04	آماده سازی دیواره سلولی خالص شده	۲
MB-C02	آنالیز قند دیواره	۳
MB-C05	تولید بیوماس برای هرگونه آنالیز	۴
MB-C03	تعیین ساختار پپتیدوگلیکان	۵
MB-C06	آنالیز کینون های تنفسی در مخمرها و باکتری های گرم منفی	۶



ب) شناسایی مولکولی

ردیف	نام خدمت	کد خدمت
۱	مطالعه بیوانفورماتیک میکربی	MB-M02
۲	شناسایی پروکاریوتها بر اساس تعیین توالی DNA	MB-M01
۳	شناسایی مخمرها و کپک ها بر اساس تعیین توالی DNA	MB-F05
۴	آنالیز درصد گوانین سیتوزین	MB-M03



خدمات نگهداری بانک

کد خدمت	نوع خدمت	ردیف
MB-P01	احیاء آمپولهای لیوفیلیزه و تهیه کشت فعال از آن	۱
MB-P02	ارائه میکروارگانیسم به صورت لیوفیلیزه	۲
MB-P03	ارائه میکروارگانیسم به صورت کشت فعال	۳
MB-P06	تهیه آمپول لیوفیلیزه از سویه های ارسالی	۴
MB-P07	لیوفیلیزاسیون (خشک کردن) انواع مواد بیولوژیک	۵
MB-P08	تهیه هاگ های خشک یا سوسپانسیون شده از سویه های خارج از مجموعه	۶
MB-P04	نگهداری بلند مدت میکروارگانیسم های هتروترف (Safe Deposit)	۷
MB-P05	نگهداری بلند مدت میکروارگانیسم های با نیازهای ویژه (اکستریموفیل ها، اتوتروف ها ...) (Safe Deposit)	۸



بانک میکروارگانیزم‌ها

بانک میکروارگانیزم‌ها



معرفی مشاوران بانک

- مدیر بانک میکروارگانیسم ها

دکتر محمدعلی آموزگار

- مشاوران بانک میکروارگانیسم ها

جناب آقای دکتر صعودی: عضو محترم هیئت علمی دانشگاه الزهرا (س)

جناب آقای دکتر یخچالی: عضو محترم هیئت علمی مرکز تحقیقات ژنتیکی و فناوری زیستی

جناب آقای دکتر اولیاء: عضو محترم هیئت علمی دانشگاه شاهد

جناب آقای دکتر حامدی: عضو محترم هیئت علمی دانشگاه تهران

جناب آقای دکتر اخوان: عضو محترم هیئت علمی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات

جناب آقای دکتر لطیفی: عضو محترم هیئت علمی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی بقیه اله (عج)



Nestlé

Good Food, Good Life

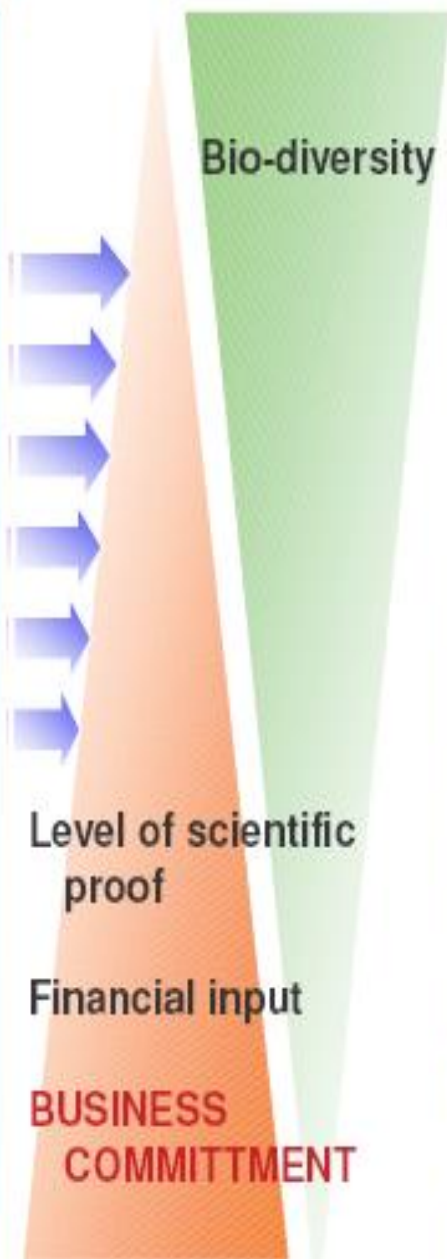
Probiotics are defined living micro-organisms, which reach in sufficient concentration in active form the gastro-intestinal tract and thereby exert positive health beneficial effects.

BgVV, 2000

- Safety
- Efficacy
- Stability

Probiotic effects are strain specific and can not be extrapolated to other strains, even of the same species.

Business Needs



Phase 1 Isolation, purification, identification, basic physiological characterization

Isolation of MOs from different habitats and ecological niches (e.g. fermented products, oral cavity, intestines, mammary glands). Focus on LAB, bifs, yeasts.

Phase 2 *In vitro* screening - properties potentially linked to probiotic efficacy

Gastric and bile salt resistance, interaction with intestinal cell lines, growth, antipathogenic effects, immunological profile, etc...

Evaluation of technological properties

Growth, yield, process and storage stability (A_w , O₂, temperature, etc...)

Safety evaluation of candidate strains (case-by-case)

AB resistance profile, transferable AB resistance genes, potential virulence factors, deconjugation of bile salts, adherence to fibrinogen and fibronectin, mucin degradation, hemolysis, (genome sequencing of selected strains), etc...

Phase 3 Pre-clinical studies Evaluation of safety and efficacy

Experimental setup depending on benefit that shall be demonstrated.

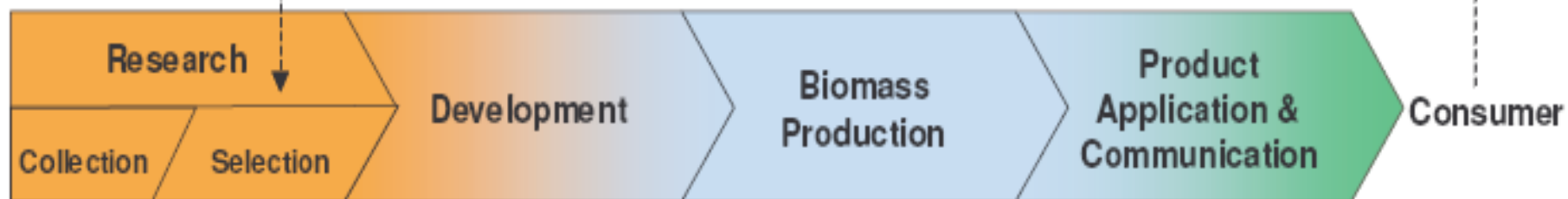
Phase 4 Clinical studies Evaluation of safety and efficacy

Primary objective: "Proof of principle" : investigation of efficacy under well controlled conditions (target population, ethiology of the disease, etc..) typically using a high daily dose.

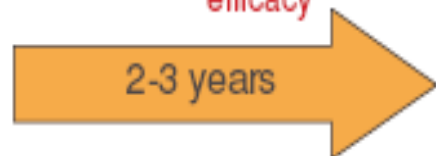
Phase 5 Studies supporting the launch of specific products

Consideration of the product form (matrix), target population / market, technological requirements, costs, local regulatory constraints (e.g. with respect to claims), marketing positions.

Consumer insights, definition of benefits



- Collection of strains
- Mgmt of culture collection
- Identification, characterisation
- Strain screening:
 - safety
 - efficacy
 - stability
- Testing of selected strains:
 - efficacy (*in vivo*)
 - mechanisms of action
 - safety
- Documentation of safety and efficacy

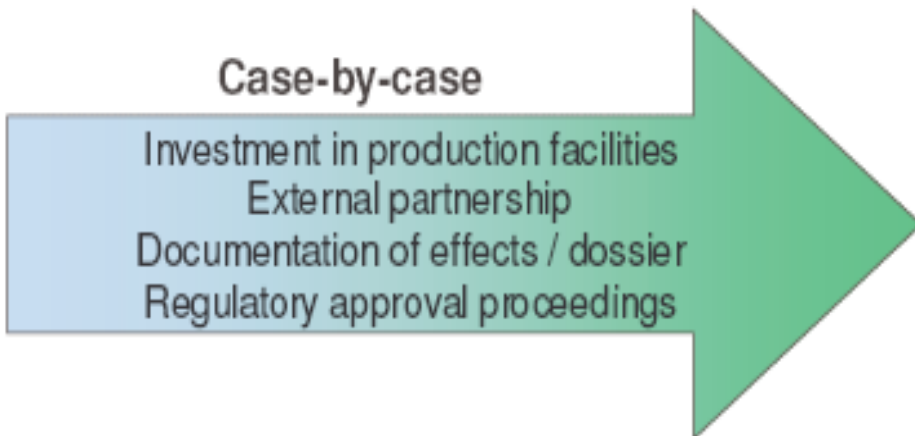


- Selection of optimum growth media
- Process development for biomass production, downstream processing, conditioning
- Optimisation of protective agents and processing conditions
- Development of "delivery systems" (e.g., encapsulation)



- Preparation of growth media
- Production of starter cultures
- Fermentation
- Filtration
- Mixing
- Encapsulation, delivery systems
- Inactivation
- Drying

- Product formulation
- Packaging functionality
- Supply Chain, distribution
- Consumer benefit communication



با تشکر از توجه شما

