GENETIC STUDIES ON A PROBIOTIC YEAST STRAIN *SACCHAROMYCES BOULARDII*

By

RASHA GOMMA SAID SALIM
B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2001

THESIS
Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

MASTER OF SCIENCE

In

Agricultural Sciences
(Genetics)

Department of Genetics
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2009
GENETIC STUDIES ON A PROBIOTIC YEAST STRAIN SACCHAROMYCES BOULARDII

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Genetics)

By

RASHA GOMMA SAID SALIM
B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2001

Approval Committee

Dr. OMER EL-GABALY ALI EBRAHIM……………………………………
Researcher Professor of Genetics, NRC, Giza

Dr. REDA E. A. MOGHAIEB………………………………………………
Assistant Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Dr. AHMED NAGIB EL-SAYED SHARAF ……………………………
Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Date: / /
SUPERVISION SHEET

GENETIC STUDIES ON A PROBIOTIC YEAST STRAIN SACCHAROMYCES BOULARDII

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Genetics)

By

RASHA GOMMA SAID SALIM
B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2001

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. AHMED NAGIB EL-SAYED SHARF
Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Dr. SAMIR MOHAMMED MOSTAFA
Assistant Professor of Genetics, Fac. Agric., Cairo University

Dr. NIVIEN ABD EL-RAHMAN ABOSEREH
Researcher Professor of Genetics, NRC, Giza
**Name of Candidate:** Rasha Gomma Said Salim  
**Degree:** M.Sc.

**Title of Thesis:** Genetic studies on a probiotic yeast strain *saccharomyces boulardii*

**Supervisors:**  
Dr. Ahmed Nagib El-Sayed  
Dr. Samir Mohammed Mostafa  
Dr. Nivien Abd El- Rahman Abosereh

**Department:** Genetics  
**Approval:**  
/ / 

### ABSTRACT

The present investigation aims to study the impact of some genetic treatments (using mutation by EMS and protoplast fusion) on the probiotic activities of *Saccharomyces boulardii* yeast strain. As well as *S. boulardii* whole cells were transformed using yeast recombinant plasmid (pRSH-Ins) and enzymatic amplification of genetic material using PCR technique. Most experiments of this investigation were conducted in microbial genetics laboratory National Research Center. While some experiments were carried out in the microbial genetic laboratory, Genetics Department, Faculty of Agriculture, Cairo University, Giza, Egypt. The present study was conducted during 2004-2009.

*Saccharomyces boulardii* was used to examine the changes in different points; the ability to tolerate bile salts, bioaccumulation of zinc, selenium, antimicrobial activity and the productivity of vitamin B6, and some important character such as insulin production; following EMS as chemical mutagenic agent, protoplast fusion and transformation as a genetic engineering method. Induction of mutation in *S. boulardii* was carried out by (1.17 g/ml) to take 0.250, 0.500, and 1000 µl ml⁻¹ results revealed that the survival percentages was decreased by increasing the doses of the amount of EMS where as the survival percentage was 7.9% at exposure dose 1000 µl /ml⁻¹. eight mutants were isolated as auxotrophes and their nutritional requirements were determined. *S. boulardii* and their resulted mutants were tested for 5% bile salts tolerance, and selection of high zinc yeast The results showed that mutants S.b M7 tolerated 5% bile salt and mutants S.b M6 is a highly zinc yeast. S.b M8 highly selenium bioaccumulation, S.b M7 is a highly antimicrobial activity biotherapeutic yeast *S.boulardii* strains by interspecific protoplasts fusion(3.54%). Protein banding patterns SDS PAGE from w.t and their mutant show specific band of the different EMS treatment and fusant may be referring to the occurred chane of different character of the *S.boulardii*. Genetic construction of new strains using yeast recombinant plasmid (pRSH-Ins) and enzymatic amplification of genetic material using PCR technique was used in the present work to detect the human pro-insulin gene corresponding sequence in the newly *S. boulardii* cells. Four successive amplifications were obtained using the primer set (P1). When the amplified products were run on 1% agarose gel electrophoresis at ~264bp.

**Key words:** Mutation, EMS, *S.boulardii*, protoplast fusion, protein fingerprinting, Bile salt, Zinc, Selenium, Antimicrobial activity, Vitamin B6, Transformation, Proinsulin gene.
DEDICATION

I dedicate this work to Prof. Dr. Ahmed Nagib El-Sayed Sharaf, Prof. Dr. Nivien Abdelrahman Abosereh, Dr. Samir Mohammed Mostafa, Dr. Hassan Abdel-Latif Mohammed, Dr. Abd El-Hadi Abd Allah Abd El-Hadi, my mother the most kind person on the earth, my father for all the support they lovely offered along the period of my post graduation, whom my heart felt thanks; to my husband Mahdy and my sons Mohamed and Mahmoud for their patience, my friends, and to everyone want that world to be a better place to live.
ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest thanks, gratitude and deep appreciation to Dr. Ahmed Nagib El-Sayed Saraf, Professor of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University. For supervision, continued assistance, guidance through the course of study. Sincere thanks to Dr. Samir Mohamed Mostafa, Associate Professor of Genetics of Faculty of Agriculture, Cairo University for sharing in supervision. Sincere thanks, deepest gratitude and appreciation to Dr. Nivien Abdelrahman Abosereh, Researcher Professor of Genetics, Microbial Genetic Department, National Research Center. Deep thanks to Dr. Hassan Abdel-Latif Mohamed, Assistant Researcher Professor of Genetics, Microbial Genetic Department, National Research Center for suggesting the problem, continued assistance and their guidance through the course of study and revision the manuscript of this thesis. Dr. Abd El-Hadi Abd Allah Abd El-Hadi lecturer of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University, continuous support for practical parts of this research work and helping during writing the thesis.

Grateful appreciation is also extended to all staff members of Genetics Department, Faculty of Agriculture, Cairo University. All staff members of Microbial Genetics Department, National Research Center. Special deep appreciation is given to my father, my late mother, my Husband, my brothers, sisters and my sons.
دراسات وراثية على خميرة البروبيوتيك Saccharomyces boulardii

 رسالة ماجستير
في العلوم الزراعية (وراثة)

 مقدمة من

 رشا جمعة سعيد سالم
بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية). كلية الزراعة - جامعة القاهرة، 2001

 لجنة الإشراف

 دكتور/ أحمد نجيب السيد شرف
أستاذ الوراثة - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

 دكتور/ سمير محمد مصطفى
أستاذ مساعد الوراثة - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

 دكتورة/ نيفين عبد الرحمن أبو سريع
أستاذ باحث الوراثة - المركز القومي للبحوث
دراسات وراثية على خميرة البروبيوتيك

Saccharomyces boulardii

رسالة ماجستير
في العلوم الزراعية
(وراثة)

مقدمة من
رشا جمعة سعيد سالم
بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنيولوجيا حيوية). كلية الزراعة - جامعة القاهرة، 2001

لجنة الحكم

دكتور/ عمر الجبالي علي إبراهيم
استاذ بحث الوراثة - المركز القومي للبحوث

دكتور/ رضا علواني عبد الحليم
استاذ مساعد الوراثة - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

دكتور/ أحمد نجيب السيد شرف
استاذ الوراثة - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

التاريخ /
دراسة وراثية على خميرة البروبيوتيك

Saccharomyces boulardii

رسالة مقدمة من

رشا جمعة سعيد سالم
بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية)، كلية الزراعة - جامعة القاهرة، 1999

للحصول على درجة

الماجستير

في

العلوم الزراعية

(وراثة)

قسم وراثة
كلية الزراعة
جامعة القاهرة
مصادر

2009
الدرجة: الماجستير

عنوان الرسالة: دراسات وراثية على حمض البروبوميكل 

المشرفين: دكتور: أحمد نجيب السيد شرف
دكتور: سمير مصطفى محمد
دكتورة: نيفين عبد الرحمن أبو سربع

تاريخ منح الدرجة: / /

قسم الوراثة:

المستخلص العربي


يمكن الحصول على سلاسلة عالية انتاج من فيتامين B6 (4.3%) من املاح الصفار، السلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاح الصفار، سلفونات 87% من املاحظات الدالة: الطفرات، الآثاب فيتامين B6، السلفonsoات، س.بولارد، النقل الخلوي، الأنسولين، النقل، الوراثي، النقل، البلازمي، فيتامين B6، النقل، الوراثي، الأنسولين.
استمارة معلومات الرسائل التي تمت مناقضتها

الكلية / المعهد : الزراعة

القسم : الوراثة

1 - الدرجة العلمية : ماجستير

2 - بيانات الرسالة :

عنوان الرسالة باللغة العربية :

"دراسات وراثية على خصيرة البروبيوتيك

Saccharomyces Boulardii"

عنوان الرسالة باللغة الأجنبية:

"Genetic Studies on a Probiotic Yeast Strain Saccharomyces Boulardii"

التخصص الدقيق : الوراثة

تاريخ المناقشة : 2009/7/2

3 - بيانات الطالب :

الاسم : رشا جمعة سعيد سالم

الجنسية : مصرية

النوع : أنثى

العنوان: قرية غمزة الصغرى - مركز الصف - محافظة حلوان

رقم الهاتف: 0118748452

البريد الإلكتروني: Rasha_Gomma@yahoo.com

الجهة العمل: المركز القومي للبحوث

4 - المشرفون على الرسالة :

الاسم

1. أ.د أحمد نجيب السيد شرف

القسم : الوراثة

الجامعة : القاهرة

الكلية : الزراعة

2. د. سمير محمد مصطفى

القسم : الوراثة

الجامعة : القاهرة

الكلية : الزراعة

3. أنفين عبد الرحمن أبو سريع

القسم : الزراعة

الكلية : الوراثة

الجامعة : المركز القومي للبحوث

الكلية : الميكروبية
الكلمات الدالة: الطفرات، الأتيال ميثان سلفونات، S. boulardii، الدمج الخلوي، النشاط الميكروبي، فيتامين B6، النقل الوراثي، جين الأنسولين.

استخدمت خميرة S. boulardii لدراسة العديد من النقاط مثل تحمل التركيزات العالية من املاح الصفراء، صفة التقام الميكروبي وإنتاج فيتامين B6، إنتاج الأنسولين. باستخدام الأتيال ميثان S.b M7 5% من املاح الصفراء S.b M7 0.5 ميكروليلتر/ملم تحملت الطفرة سلفونات 200، 500، 1000 ميكروليلتر/مل. أعطت على معدل من الزنك العضوي، S.b M6 أعلى معدل من السليوم العضوي S.b M8 على نشاط ميكروبي، باستخدام الدمج الخلوي (3.45%) وجدنا سلاسة عالية الإنتاج من فيتامين PRSH-Ins B6 (1.84 جم/لمجم) واجرى النقل الوراثي باستخدام البلازميد المحتوي على جين PCR بالآنسولين و باستخدام الإثبات النتائج وجود الجين عند 264 نَفَقَبًا.
(Key Words: Mutation, EMS, *S. boulardii*, protoplast fusion, Bile salt, Antimicrobial activity, Vitamin B6, Transformation, Proinsulin gene.

*Saccharomyces boulardii* was used to study the changes in different points; the ability to tolerate bile salts, antimicrobial activity, the productivity of vitamin B6, and insulin production; Induction of mutation by EMS was carried out by 0.250, 0.500, and 1000 µl ml⁻¹ results revealed that mutants *S. b. M7* tolerated 5% bile salt and *S. b. M6* is a highly zinc, *S. b. M8* highly selenium yeast, *S. b. M7* is a highly antimicrobial activity, interspecific protoplasts fusion (3.54%). Genetic construction of new strains by (pRSH-Ins) and PCR technique was used to detect the gene at~264bp.
6- أظهرت نتائج التفريد الكهروني للبروتين المعزول من الأبو الابره والطفرات على وجود بعض الاختلافات البسيطة بين الطفرات وبعضها وبين الأبو الابره.

6-5  أثبتت التحليل الإحصائي للجيل باستخدام SPSS system وجود مجموعتين (A) (M3,M4,M5,M6,M7) (B) وتشمل M1,M2,M8,W.T 7-6 9% نسبة الدمج بين 26% من الدمجات تحتوي على DNA وعزل DNA عند 260 nm بنسبة 34.5%. %

6-6 8% باستخدام HPLC system وقف الابره في 1.89(ML/M) (A) (M1,M2,M8,W.T) 7-6 9% باستخدام البلازميد PRSH-Ins المتخصص في التأكد من وجود الجين عند التفريد على جيل أجري 31% علبة C.بما مرتين لكل منها.

6-6 1- باستخدام الإبتهال ميثان سلوتونات بتركيزات مختلفة (1000 ميكروفيتر/ملم) ثم عزل 8 طفرات ذات عزز غذائي للأحماض الأمينية والقواعد التراتبية. 6-6 2- أثبت النتائج أن نسبة الإعاقة تقل بزيادة تركيز المطفر حيث إنه عند استخدام 1000 ميكروفيتر/ملم كانت نسبة الإعاقة 7.9%.

6-6 3- قد بينت الدراسة الحالية تفوق بعض الطفرات S.b M7, أكثر السلالات تجميعًا للزنك (M8), S.b M6, S.b M7 في مقدرتها التضادية لبعض الميكروبات.

6-4  4- بينت النتائج تفوق السلالات S.b M7, S.b M1 S.b M7 في الميكروبات لبعض التضادية مقدرتها ونسبة الأملاح من الصفراء. K. lactis, S.boulardii بين S.b M7, S.b M1 في مقدرتها التضادية لبعض الميكروبات.

6-6 5- أظهرت نتائج التفريد الكهروني للبروتين المعزول من الأبو الابره والطفرات على وجود بعض الاختلافات البسيطة بين الطفرات وبعضها وبين الأبو الابره.

6-6 6-7  باستخدام تقنية الدمج البروتوبلاستي بين K. lactis, S.boulardii A حصل على نتائج أفضل الممرضة على النتائج E. coli, P. aeruginosa, E. coli, P. aeruginosa, E. coli. HPLC system دلت أسبة كميات DNA FUS10 vitamin B6 6-6 8-9% باستخدام البلازميد PRSH-Ins المتخصص في التأكد من وجود الجين عند التفريد على جيل أجري 31% علبة C.بما مرتين لكل منها.
٧ - ما هي الجهات التي يمكن أن تستفيد من هذا البحث :

(ذكر هذه الجهات مع شرح أهمية البحث لهذه الجهات بما لا يزيد عن أربعة سطور لكل جهة)

٨ - هل توجد علاقة قائمة بإحدى هذه الجهات :

نعم لا

٨ - في حالة نعم اذكر هذه الجهات :

٠ - ١

ما هي طبيعة العلاقة :

مشروع بحثي

تعاون أكاديمي

مشروع ممول من جهة ثالثة (ذكر ما هي :

بعض التساؤلات العلمية أخرى)