

**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

APPROVAL 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

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 $\mu\text{l ml}^{-1}$ 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 $\mu\text{l /ml}^{-1}$. 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 change 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 every one 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، ٢٠٠١

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 (تكنولوجيا حيوية) - كلية الزراعة - جامعة القاهرة ، ٢٠٠١

لجنة الحكم

..... دكتور/ عمر الجبالي علي إبراهيم
أستاذ باحث الوراثة - المركز القومي للبحوث

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

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

التاريخ / /

دراسات وراثية على خميرة البروبيوتيك *Saccharomyces*
boulardii

رسالة مقدمة من

رشا جمعة سعيد سالم

بكالوريوس في العلوم الزراعية (تكنولوجيا حيوية) - كلية الزراعة - جامعة القاهرة، ٢٠٠١

للحصول على درجة

الماجستير

في

العلوم الزراعية
(وراثة)

قسم الوراثة
كلية الزراعة
جامعة القاهرة
مصر

٢٠٠٩

اسم الطالب: رشا جمعه سعيد سالم
عنوان الرسالة: دراسات وراثية على خميرة البروبيوتيك *Saccharomyces boulardii* الدرجة: الماجستير

المشرفون : دكتور : احمد نجيب السيد شرف
دكتور: سمير مصطفى محمد
دكتورة : نيفين عبد الرحمن ابو سريع

قسم: الوراثة تاريخ منح الدرجة: / /

المستخلص العربي

يهدف هذا البحث إلي دراسة تأثير بعض المعاملات الوراثة علي كفاءة خميرة *Saccharomyces boulardii* كداعم حيوي باستخدام الايثايل ميثان سلفونات كمطفر كيميائي وتقنية الدمج الخلوي البروتوبلاستي وكذلك النقل الوراثي لجين الأنسولين باستخدام بلازميد (PRSH-Ins) المحتوي علي الجين المسئول عن إنتاج الأنسولين واستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل والبادئات المتخصصة للتأكد من دخول الجين في *S.boulardii*، و لهذا الغرض أجريت هذه الدراسة في معمل الوراثة الميكروبية بالمركز القومي للبحوث و معمل وراثه الكائنات الدقيقة بقسم الوراثة بكلية الزراعة- جامعة القاهرة-الجيزة خلال الفترة ٢٠٠٤-٢٠٠٩.

استخدمت خميرة البروبيوتيك *Saccharomyces boulardii* لدراسه العديد من النقاط المختلفة، مثل القدرة علي تحمل التركيزات العالية من املاح الصفراء، تجميع اكبر قدر ممكن من املاح الزنك و السلنيوم، صفة التضاد الميكروبات المرضه وإنتاجيتها من فيتامين B6 بجانب بعض الصفات الاخرى الهامة مثل إنتاج الأنسولين عن طريق استخدام الايثايل ميثان سلفونات كمطفر كيميائي، الدمج الخلوي البروتوبلاستي والنقل الوراثي. وقد اثبت النتائج مايلي: تم استحداث طفرات في خميرة البروبيوتيك *Saccharomyces boulardii* باستخدام تركيزات مختلفه من الايثايل ميثان سلفونات ١.١٧ جم/م حيث استخدمت ٢٥٠، ٥٠٠، ١٠٠٠ ميكروليتر/م وقد اثبت النتائج بزيادة تركيز المطفر يقل معدل الأعاشه، وقد تم عزل ٨ طفرات و تعريفها ووجد ان الطفرة *S.b M7* تحملت ٥% من املاح الصفراء ، الطفرة *S.b M6* اعطت اعلي معدل من الزنك العضوي داخل الخلايا ، الطفرة *S.b M8* أعلي معدل من السلنيوم العضوي مقارنة بالسلالة البرية ، الطفرة *S.b M7* اعلي نشاط تضاد ميكروبي وعن طريق الدمج الخلوي البروتو بلاستي (٣.٤٥%) أمكن الحصول علي سلالة عالية الانتاج من فيتامين B6 (١.٨٩ ملجم/جم) وعن طريق استخدام البروتين تم اختبار السلالات باستخدام جيل الأكريليميد و مقارنتها بالسلالة البرية في حالة الطفرات وبالاباء الاصلية في حالة الدمج الخلوي وقد ظهرت اختلافات واضحة وهذا يؤكد ان كل سلالة لها بصمة وراثية مختلفة عن الاباء برغم وجود درجات قرابة متفارقة، واجريت عملية النقل الوراثي باستخدام البلازميد PRSH-Ins المحتوي علي جين الانسولين وتم اختبارها باستخدام PCR والبادئات المتخصصة للتأكد من وجود الجين وقد اثبتت النتائج وجود اربعة سلالات جديدة تحتوي علي الجين ٢٦٤ bp تقريبا .

الكلمات الدالة: الطفرات، الايثايل ميثان سلفونات، *S.boulardii* ، الدمج الخلوي، البروتوبلاستي، بصمة البروتين، الزنك، السلنيوم، النشاط الميكروبي، فيتامين B6، النقل الوراثي، جين الانسولين.

استمارة معلومات الرسائل التي تمت مناقشتها

القسم : الوراثة الزراعة الكلية / المعهد :

١ - الدرجة العلمية : ماجستير دكتوراه
٢ - بيانات الرسالة :

عنوان الرسالة باللغة العربية :

" دراسات وراثية على خميرة البروبيوتيك *Saccharomyces Boulardii*"

عنوان الرسالة باللغة الأجنبية:

"Genetic Studies on a Probiotic Yeast Strain *Saccharomyces Boulardii*"

التخصص الدقيق : الوراثة

تاريخ المناقشة : ٢٠٠٩/٧/٢٠

٣ - بيانات الطالب :

الاسم : رشا جمعة سعيد سالم الجنسية : مصرية النوع : أنثى

العنوان : قرية غمازة الصغرى - مركز الصف - محافظة حلوان رقم التليفون : 0118748452

جهة العمل : المركز القومي للبحوث

البريد الإلكتروني : Rasha_Gomma@yahoo.com

٤ - المشرفون على الرسالة :

الاسم	القسم	الكلية	الجامعة
١. أ.د أحمد نجيب السيد شرف	الوراثة	الزراعة	القاهرة
٢. د سمير محمد مصطفى	الوراثة	الزراعة	القاهرة
٣. أ.نيفين عبد الرحمن ابوسريع	الوراثة الميكروبية	المركز القومي للبحوث	

٥ - مستخلص الرسالة (Abstract)

٥ - ١ باللغة العربية : بشرط ألا يزيد عن ٧ أسطر

(الكلمات الدالة : الطفرات، الايثايل ميثان سلفونات، *S.boulardii* ، الدمج الخلوي ، النشاط الميكروبي، فيتامين B6، النقل الوراثي، جين الانسولين. استخدمت خميرة *S. boulardii* لدراسة العديد من النقاط مثل تحمل التركيزات العالية من املاح الصفراء ، صفة التضاد الميكروبي وإنتاج فيتامين B6 ، إنتاج الأنسولين. باستخدام الأيثايل ميثان سلفونات ٢٥٠، ٥٠٠، ١٠٠٠ ميكروليتر/مم ، تحملت الطفرة *S.b M7* ٥% من املاح الصفراء ، *S.b M6* اعطت على معدل من الزنك العضوي، *S.b M8* أعلى معدل من السليوم العضوي ، *S.b M7* اعطت على نشاط ميكروبي، باستخدام الدمج الخلوي (٣.٤٥%) وجدنا سلالة عالية الانتاج من فيتامين B6 (١.٨٩ ملجم/جم) واجرى النقل الوراثي باستخدام البلازميد PRSH-Ins المحتوي على جين الانسولين و باستخدام PCR والبادئات المتخصصة اثبتت النتائج وجود الجين عند ٢٦٤ bp تقريبا.

(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 $\mu\text{l ml}^{-1}$ 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 .

٦ - أهم النتائج التطبيقية التي تم التوصل إليها :

(لا تزيد عن سطرين لكل منها)

٦-1 باستخدام الإيثايل ميثان سلفونات سلفونات بتركيزاته المختلفة (٢٥٠، ٥٠٠، ١٠٠٠ ميكروليتر/مم) تم عزل ٨ طفرات ذات عوز غذائي للأحماض الأمينية والقواعد النتروجينية.

٦-2 اثبتت النتائج أن نسبة الإعاشة تقل بزيادة تركيز المطفر حيث إنه عند استخدام ١٠٠٠ ميكروليتر/مم كانت نسبة الاعاشه ٧.٩% .

٦-٣ قد بينت الدراسة الحالية تفوق بعض الطفرات، *S.b M7*، في تحملها ٥% من أملاح الصفراء ، *S.b M6*، أكثر السلالات تجميعا للزنك (*S.b M8*) ، أفضل السلالات تجميعا للسليوم.

٦-٤ بينت النتائج تفوق السلالات *S.b M1* ، *S.b M7* في مقدرتها التضادية لبعض الميكروبات الممرضة وكانت أفضل النتائج على *P. aeruginosa*، *E. coli* وذلك مقارنة بالأب البرى.

٦-٥ أظهرت نتائج التفريد الكهربى للبروتين المعزول من الأب البرى والطفرات على وجود بعض الاختلافات البسيطة بين الطفرات وبعضها وبين الأب البرى.

6-6 اثبت التحليل الأحصائى للجيل باستخدام SPSS system وجود مجموعتين (A) (*M1, M2, M8, W.T*) و (B) وتشمل (*M3, M4, M5, M6, M7*) درجات قرابة بنسبة ٧٠%.

6-7 باستخدام تقنية الدمج البروتوبلاستى بين *K. lactis*، *S. bouardii* نسبة الدمج بين ٣.٥٤% وب عزل DNA وقياسها عند 260 nm بعض المدمجات تحتوى على DNA ضعف الأباء.

6-8 باستخدام HPLC system أكدت النتائج احتواء بعض المدمجات على كمية أعلى من FUS10 vitamin B6 (١.٨٩ ملجم/جم) مقارنة بالأباء.

٦-٩ باستخدام البلازميد PRSH-Ins المحتوى على جين الانسولين وباستخدام RCR والبادئات المتخصصة تم التأكد من وجود الجين عند التفريد على جيل أجاروز ١% عند ٢٦٤ bp تقريبا .

٧ - ما هي الجهات التي يمكن أن تستفيد من هذا البحث :

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

٧ - ١ شركات الأدوية: بحيث تقوم باخذ السلالات واستخدامها في الصناعات الدوائية مثل اضافتها لمخاليط نقص النمو و النحافة وكذلك في علاج حالات الاسهال حيث يوصى باستخدامها اما لها من فوائد عديدة على الصحة حيث لها نشاط ميكروبي ضد العديد من الممرضات وخاصة المسؤولة عن الاسهال وكذلك تزيد من افراز الاجسام الناعية من نوع IgA

٧ - ٢ شركات الصناعات الغذائية: بحيث يمكن اضافتها لبعض منتجات الالبان لها من فوائد عديدة على الصحة حيث انها غنية بالعديد من الفيتامينات و خاصة مجموعة B complex وبعض الاملاح الضرورية مثل السلينيوم والزنك .

لا

نعم

٨ - هل توجد علاقة قائمة بإحدى هذا الجهات :

في حالة نعم اذكر هذه الجهات :

٨ - ١

ما هي طبيعة العلاقة :

مشروع بحثي

تعاون أكاديمي

مشروع ممول من جهة ثالثة (اذكر ما هي :

أخرى (بعض التساؤلات العلمية