Baghdad University

Isolation, Identification and Mutagenesis of *Saccharomyces boulardii* and evaluation some of its Therapeutic properties

A DISSERTATION SUBMITTED

BY

Rahem Enad Khudier Alziadi

TO THE COUNCIL OF THE COLLEGE OF AGRICULTURE
AT THE UNIVERSITY OF BAGHDAD
IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN
FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY
(BIOTECHNOLOGY)

Supervised by

Prof. Dr. Amer A. Mohammed *Prof. Dr. Majed H. AL-Jeilawi*

2014 AD **1436AH**

Abstract

This study aimed to isolate and identify *saccharomyces boulardii* from Mangosteen fruits (*Garcinia mangostana* L.) by traditional and molecular identification methods, as well as some of its physiological and probiotic properties were studied. Then, the identified isolates were mutagenized to obtain uracil auxotrophic mutants. These mutants were transformed to generate transformants, which are suitable for genetic engineering and have the potential to produce of recombinant proteins. This study was performed on steps:

The first step included two stages namely, isolation and identification. Ninety isolate were obtained from the fruit. These isolates with two commercial ones were subjected to cultural, morphological and biochemical tests and then followed by investigating some of their physiological characteristics such as growth in different temperatures, resistance to low pH and high concentration of bile salt. Eleven isolates shown best growth at 37 ^{o} C, resistance to low pH and tolerance to high concentration (3%) of bile salts. Adhesion ability (Auto aggregation ability), antagonistic activity for cells and cell free extract and reduction of cholesterol which are considered as probiotic properties were also investigated for these isolates. These isolates shown an average auto aggregative ability of 37.11 – 69.14 %. The isolates *SbR1, SbR2, SbR3*, *SbR4*, *SbR6, SbR7, SbR9*, *SbC1* and *SbC2* shown antagonistic activity toward all tested pathogenic microorganisms. However, isolates *SbR7* and *SbC2* shown best antagonistic activity toward *E. coli O 157:H7*, in which inhibition zone was 18 millimeter. In addition, although cell free extract of *SbR1, SbR7* and *SbC2* isolates shown inhibition ability toward all tested microorganisms, cell free extract of *SbR7* isolate shown the

best inhibition activity toward *E cali O157:H7*, in which inhibition zone was 10 millimeter.

The results shown variations in the ability of isolates to utilize and reduce cholesterol in modified culture media. The best ability in cholesterol reduction during 24 and 48 hrs. of incubation is shown by *SbR7* and *SbR3* isolates and the reduction percentages were 21.69, 21.04% and 56.54, 53.90% respectively.

S. boulardii isolates cannot be identified accurately by cultural, morphological and biochemical characteristics. Therefore, the eleven isolates in the second step were subjected to molecular identification. This was performed by amplification of internal transcribed spacer (ITS) for conservative 5.8S rRNA gene with specific primer for this region using Polymerase Chain Reaction. The amplified fragments were sequenced and the data were compared with the sequence data of the same region for the available strains in gene bank using NCBI – BLAST program. The *SbR7* isolate was selected for its best physiological and probiotic properties. According to molecular identification, this isolate was almost genetically identical (99%) with *S. boulardii* standard strains which are available in gene bank data base.

The third step included mutagenesis of *SbR7* isolate using UV light and isolation of uracil auxotrophic mutant on 5-FOA medium. The results demonstrated that the percentages of survival of *SbR7* cells were decreased by increasing the exposure time of UV radiation. The killing percentage was 100% at exposure time 50sec., while the UV exposure time required to kill 90% of *SbR7* cells was 25sec. Auxotroph mutants were isolated from this treatment (25sec), and four mutants shown stable mutation during 10 days of incubation. Tow mutants *SbR7M7* and *SbR7M10* were chosen for

transformation according to their similar behavior with *SbR7* isolate related to optimum temperature for growth, resistance to low pH and high concentration of bile salt.

The fourth step included extraction of pYES2 from *E. coli Top10* and digested with either Dra l or EcoR V restriction enzymes. Results of gel electrophoresis revealed that two clear bands were observed after digestion with Dra l, in addition to the third band which was appeared in the early stage of electrophoresis, while two closely bands were appeared after digestion with EcoR V .

The two uracil auxotrophic mutants (*SbR7M7* and *SbR7M10*) were transformed with pYES2 and two transformants (*SbR7T7*, *SbR7T10*) obtained. To confirm the transformation of these isolates with pYES2, this plasmid was isolated from these transformants and was also used to transform *E. coli Top10* cells. The plasmid was isolated again from this bacterium to confirm the transformation. Some probiotic properties were studied for these transformants (*SbR7T7*, *SbR7T10*) which included auto aggregation ability, antagonistic ability for cells and their free extract and reduction of cholesterol. The two transformants shown that there was a noticed improvement in auto aggregation ability, which was 69.72 and 68.95% compared with 65.37% for wild type. The results also shown an improvement of antagonistic activity of the two transformants toward *E. coli: O157:H7* and *C. albicans.* The diameter of inhibition zone caused by *SbR7T7* was 20 and 21 millimeters respectively, while that caused by *SbR7T10* was 19 and 21 millimeters respectively, compared with inhibition zone for wild type, which was 18 and 19 millimeters respectively. In addition, cell free extract for both transforments shown best inhibition of *C. albicans* when compared with W. T.

The transformants (*SbR7T7* and *SbR7T10*) were reduced cholesterol ratio to 27.78 and 26.42% respectively after incubation period for 24hrs and these percentages increased to 48.72 and 52.86% after 48hrs incubation period when compared with wild type, which reduced 25.59% and 53.90 of cholesterol in the same incubation periods.

المستخلص

هدفت هذه الدراسة الى عزل وتشخيص *Saccharomyces boulardii* من ثمار المانغستين (*Garcinia mangostana* L.) بطرق التشخيص التقليدية والتشخيص الجزيئي ودراسة بعض الصفات الفسلجية والعلاجية كما تم تطفيرها للحصول على مطفرات تغذوية لليوراسيل وتحويل تلك المطفرات لإنتاج خلايا متحولة مؤهلة للهندسة الوراثية وقادرة على انتاج البروتينات الهجينة ودراسة بعض الصفات العلاجية للمتحولات.

تضمنت المرحلة الأولى العزل والتشخيص، وتبعا لذلك فأن 90 عزلة حصل عليها من ثمار المانغستين فضلا عن عزلتين تجاريتين اخضعت للاختبارات المزرعية والمجهرية والكيموحيوية، تبعها اختبار بعض الصفات الفسلجية التي شملت النمو بدرجات حرارة مختلفة ومقاومة الاس الهيدروجيني المنخفض و التراكيز العالية لأملاح الصفراء، اذ أظهرت العزلات (11 عزلة) افضلية في النمو بدرجة حرارة 37 م ومقاومة للاس الهيدروجيني المنخفض ومقدرة على تحمل التركيز المرتفع (3%) لأملاح الصفراء، كذلك اختبرت بعض الصفات العلاجية للعزلات التي شملت قابلية الالتصاق بدلالة قابلية التجمع والفعالية التضادية للخلايا الحية والفعالية التضادية لمستخلصات الخلايا الحية وتخفيض الكولسترول، أذ تراوح معدل النسبة المئوية لقابلية التجمع للعزلات 37.11–69.14%، وأظهرت العزلات *SbR1* ، *SbR2* ، *SbR3*، *SbR4* ، *SbR6* ، *SbR7* ، *SbR9* ، *SbC1* و *SbC2* فعلا تضاديا اتجاه كل الاحياء المجهرية المرضية المختبرة، فيما أظهرت العزلتان *SbR7* و *SbC2* افضل فعالية تضادية اتجاه بكتريا *E. coli O157:H7* أذ بلغ قطر هالة التثبيط

18 ملم، وان مستخلصات الخلايا الحية للعزلات *SbR1* ، *SbR7* و*SbC2* أظهرت قدرة تثبيطية اتجاه كل الاحياء المجهرية المختبرة، وأظهر مستخلص الخلايا الحية للعزلة *SbR7* افضل فعالية تثبيطية اتجاه بكتريا *E. coli O157:H7* أذ بلغ قطر هالة التثبيط 10 ملم مقارنة بباقي العزلات والعزلتين التجاريتين. بينما اظهرت النتائج تفاوتا في مقدرة العزلات على استهلاك وتخفيض مستوى الكولسترول في الوسط تبعا للعزلة ومدة الحضن، وأظهرت العزلات *SbR7*، *SbR3* افضلية في تخفيض الكولسترول خلال مدتي الحضن 24 و 48ساعة، أذ بلغت نسبة التخفيض 21.69 و21.04 % و56.54 و53.90 % وعلى التوالي مقارنة بالعزلتين التجاريتين وباقي العزلات الأخرى.

ولكون الاختبارات المزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية لا تمكن من التشخيص الدقيق لعزلات *Saccharomyces boulardii*، أخضعت 11 عزلة في المرحلة الثانية الى التشخيص الجزيئي من خلال تفاعل تضخيم السلسلة للمنطقة البينية ITS للجين المحافظ 5.8S rRNA باستعمال بادئ متخصص يستهدف التسلسل النوعي للجين، تبع ذلك تحليل تعاقبات القواعد النيتروجينية، وقورنت بيانات التعاقبات الواردة مع تعاقبات المنطقة البينية ITS للجين المحافظ 5.8S rRNA للسلالات المتوافرة في بنك الجينات من خلال برنامج BLAST في (NCBI database).

انتخبت العزلة *SbR7* التي أظهرت افضلية في الصفات الفسلجية والعلاجية المدروسة، وطبقا لنتائج التشخيص الجزيئي فان هذه العزلة تتماثل جينيا بنسبة 99% مع سلالات *Saccharomyces boulardii* القياسية المتوافرة في بنك الجينات.

تضمنت المرحلة الثالثة تطفير العزلة *SbR7* باستعمال الاشعة فوق البنفسجية وعزل المطفرات التغذوية لليوراسيل على الوسط 5-FOA، اذ بينت النتائج ان نسبة بقاء خلايا *SbR7* تتناقص بزيادة وقت التعرض للأشعة، وان نسبة القتل بلغت 100% عند وقت التعرض 50 ثانية وان الوقت اللازم للتعرض الى الاشعة فوق البنفسجية الذي أدى الى قتل 90% من خلايا *SbR7* (LD90) كان 25 ثانية. عزلت المطفرات التغذوية من المعاملة 25 ثانية، اذ أظهرت 4 مطفرات ثباتية للطفرة خلال مدة 10 أيام من الحضن. انتخبت الطافرتان *SbR7M7* و*SbR7M10* اعتمادا على تشابه سلوكهما

مع العزلة المطفرة *SbR7* في درجة الحرارة المثلى للنمو ومقاومة ظروف الاس الهيدروجيني المنخفض والتراكيز العالية لأملاح الصفراء لأجراء التحول.

تضمنت المرحلة الرابعة استخلاص البلازميد pYES2 من بكتريا *E.coli* Top10 وتقييده بالأنزيمات المقيدة Dra l و EcoR V كلا على حدة، اذ أظهرت نتائج الترحيل على هلام الأكاروز وجود حزمتين واضحتين في مسار ترحيل البلازميد المعامل بأنزيم التقييد Dra l وحزمة ثالثة ظهرت في مراحل الترحيل الأولى، بينما تظهر حزمتان متقاربتان جدا في مسار البلازميد المعامل بأنزيم التقييد EcoR V. أجريت عملية تحويل المطفرتين التغذويتين لليوراسيل *SbR7M7* و *SbR7M10* بالبلازميد pYES2 وتم الحصول على المتحولتين *SbR7T7* و *SbR7T10* ولتأكيد عملية التحول استخلص البلازميد من المتحولات وأجريت عملية التحول لخلايا *E.coli Top10* واختبرت بالنمو على وسط LB المزود بالامبيسلين ثم استخلص البلازميد من البكتريا ورحل لتأكيد التحول.

بعدها تمت دراسة بعض الصفات العلاجية للمتحولات *SbR7T7* و*SbR7T10* التي شملت قابلية الالتصاق بدلالة قابلية التجمع والفعالية التضادية للخلايا الحية والفعالية التضادية لمستخلصات الخلايا الحية وتخفيض الكولسترول، أذ أظهرت العزلتان المتحولتان تحسنا ملحوظا في زيادة قابلية التجمع التي بلغت 69.72 و68.95 % وعلى التوالي، مقارنة بالعزلة البرية التي بلغت قابلية التجمع لها 65.37%. وبينت النتائج تحسنا في الفعالية التضادية للعزلتين المتحولتين *SbR7T7* و*SbR7T10* اتجاه بكتريا *E. coli O157:H7* و *C. albicans*، أذ بلغ قطر هالة التثبيط للعزلة المتحولة *SbR7T7* 20 و21 ملم وعلى التوالي، وللعزلة المتحولة *SbR7T10* 19 و21 ملم وعلى التوالي، مقارنة بقطر هالة التثبيط للعزلة البرية *SbR7W.T* الذي بلغ 18 و 19 ملم وعلى التوالي. كما أظهرت مستخلصات الخلايا الحية للعزلتين المتحولتين *SbR7T7* و*SbR7T10* افضلية في تثبيط *C. albicans* مقارنة بالعزلة *SbR7W.T*، فضلا عن افضليتهما في تثبيط بكتريا *E. coli O157:H7*، فيما بلغت نسبة تخفيض الكولسترول للعزلتين المتحولتين بعد مدة حضن 24 ساعة 27.78 و26.42% وعلى التوالي مقارنة بنسبة تخفيض الكولسترول للعزلة البرية بعد مدة الحضن نفسها والتي بلغت 25.59 %، بينما انخفضت النسبة بعد مدة حضن 48 ساعة اذ بلغت 48.72 و52.86% للعزلتين المتحولتين وعلى التوالي مقارنة بالعزلة البرية 53.90%.