The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
Mosul University / College of Science
Department of Biology

Extraction of some active compounds from Oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* and assessment of their Bioactivity

Safaa Mahmood Sultan Ahmed

Ph.D. thesis
Biology / Botany

Supervised by

Asst. Prof.

Dr. Faten Noori Abed Mula Abed

1444 A.H **2023 A.D**

ABSTRACT

This stuby included isolation of the genus *Pleurotus* spp. from different sites in Mosul city from November 7, 2021 to January ٢١, 2022 with its identification at microscope and molecular level.

DNA were extracted then used for the molecular identification of *Pleurotus* spp. by polymerase chain reaction (PCR) usd specialized primers belong to the internal transcribed spacer ITS gene. The results of PCR products after electrophoresis showed that all selected isolates have one band with (650 bp). ITS gene sequencing of the gene was achieved and used for the confirmation of the identification for *Pleurotus ostreatus.* The diagnosed isolates were registered in the (national center for biotechnology information) (NCBI).

This study succeeded in identified three compounds β-D–glucan, tannin and hexane dichloromethane from water and petroleum ether extract of fungus fruiting bodies by High-performance liquid chromatography (HPLC) technique. Results showed tannin and hexane dichlormethane concentrations were more than in the aqueous extract, D-glucan concentrations were significantly higher in the organic solvent extraction when compared to the aqueous extract.

This compounds were extracted and purified used HPLC and sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-page) techniques. The molecular weight was estimated to be about (504.45, 1701.8 and 84.93 KDa) to each of β-D–glucan, tannin, hexane dichloromethane respectively. The atomic and three-dimensional crystal shape of the three compounds were identified using pymol analysis.

The effect of three combiomd β-D–glucan, tannin and hexane dichloromethane on the (*E. coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, and Proteus vulgaris*) and (*Candida albicans, Candida Nakaseomyses, Candida tropicales, and Candida lusitaniae*) whre achieved at different concentrationry using micro-plate and the result refere that β-D–glucan has an inhibitory effect

against the bacterial and fungal species at a concentration of 200 µg/ml/ml. The inhibitory effect increases with the increase of the compound concentration. Generally, *Staphylococcus aureus* was the most affected types of bacteria by β-D–glucan while *E. coli* was the most resistant bacteria. Also, *C. albicans* were the most affected by β-D–glucan among the other species under study *while C. lusitaniae* showed higher resistance to the compound. The results also found that tannin at a concentration of 50 µg/ml had a high inhibitory effect against *B. subtillis* while *P. vulgaris* was more resistant at the same attention. Moreover, *C. tropicales* was the most inhibited, whereas *E. coli* was less affected by the tannin. For hexane dichlormethane *C. albicans* was the most sensitive to it at a concentration of 100 µg/ml, while Staphylococcus aureus showed resistance to the compound. *C. albicans* showed more sensitivity to the compound unlike *C. lusitaniae*, which demonstrated high resistance to the tannin.

Biology, the present study also found that pure β-D–glucan has a beneficial effect on the serum lipid profile than standard β-D–glucan in the blood of rets treated wih them after 60 days from dosing.

In the environmental applications, the biomass of *P. ostreatus* had the ability to liquefy low-quality coal and convert it into oil droplets on the surface of the fungal colony.

Also, the result study discovered that the fungus *Pleurotus ostreatus* had the ability to process and degrade complex hydrocarbon compounds of crude oil at three concentrations (1, 2, and 4%) for a period of five days when used in the bioremediation process. In comparison to the control sample's 45.00 mm-diameter mushroom colony, the diameter of the mushroom colony at a concentration of 1% crude oil was 20.86 mm, 10.65 mm at a concentration of 2%, and 10.33 cm at a concentration of 4%.

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية عزل فطر *Pleurotus* spp. من مواقع مختلفة في مدينة الموصل من من الفترة ٧ تشرين الثاني (نوفمبر) ٢٠٢١ إلى ٢١ كانون الثاني(ديسمبر) ٢٠٢٢ ، تلاها التحري عن المواد الفعالة الموجودة في مستخلص الفطر وتحديده على المستوى المجهري والجزيئي.

تم استخلاص الحمض النووي لاستخدامه للتشخيص الجزيئي للفطرالبازيدي Pleurotus spp. بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بناء على البادئات المتخصصة التي تنتمي إلى جين منطقة ITS. أظهرت نتائج منتجات تفاعل البوليميريز المتسلسل بعد الترحيل الكهربائي أن جميع العزلات المختارة لها حزمة واحدة ب (٦٥٠ نقطة أساس). تم تحقيق التسلسل الجيني ل ITS للجين واستخدامه لتأكيد تشخيص *Pleurotus ostreatus*. تم تسجيل العزلات المشخصة في (المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية) (NCBI).

نجحت هذه الدراسة في تحديد ثلاثة مركبات β-D-glucan و tannin و hexane dichloromethane من المستخلص المائي و البترواليوم ايثر للأجسام المثمرة للفطريات بتقنية HPLC. أظهرت النتائج أن التراكيز المركبات hexane dichloromethane, tannin كانت أكثر من المستخلص المائي عند مقارنتها بالمستخلص العضوي ، وكانت تركيز β-D-glucan أعلى معنويا في استخلاص المذيب العضوي عند مقارنتها بالمستخلص المائي.

تم استخراج هذه المركبات وتنقيتها باستخدام تقنيات HPLC و SDS-page. قدر الوزن الجزيئي بحوالي (٥٠٤.٤٥ و ١٧٠١.٨ و ٨٤.٩٣ كيلو دالتون) لكل من β-Dglucan و tannin و hexane dichlormethane على التوالي. تم تحديد الشكل البلوري الذري وثلاثي الأبعاد للمركبات الثلاثة باستخدام تحليل برنامج ال pymol.

تم الكشف عن التأثيرات المضادة للبكتيريا (*E. coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, and Proteus vulgaris*) والتأثيرات المضادة للفطريات (*Candida albicans, Candida Nakaseomyses, Candida tropicales, and Candida lusitaniae*) للمركبات النشطة الثلاثة بتركيزات مختلفة باستخدام تقنية الصفائح الدقيقة. وجدت النتائج أن β-D glucan له تأثير مثبط ضد الأنواع البكتيرية وSPP *Candida* بتركيز 200 ميكروغرام. يزداد التأثير المثبط مع زيادة تركيز المركب. بشكل عام، كانت بكتيريا *Staphylococcus aureus* أكثر أنواع البكتيريا حساسية من β-Dglucan بينما كانت *E. coli,* هي البكتيريا الأكثر مقاومة. كما أن *C. albicans* كانت الأكثر حساسية من β-D glucan بين الأنواع الأخرى المستخدمة قيد الدراسة بينما أظهرت *C. lusitaniae* مقاومة أعلى للمركب. وجدت النتائج أيضا أن التانين بتركيز 50 ميكروغرام كان له تأثير مثبط عالي ضد *Bacillus subtilis* بينما كانت *Proteus vulgaris i* أكثر مقاومة بنفس التركيز.

علاوة على ذلك ، كان *C. tropicales* هو الأكثر تثبيطا ، في حين كان *C. lusitaniae* أقل تأثرا ب Tannin. بالنسبة hexane dichlormethane ، كانت *Staphylococcus aureus* هي الأكثر حساسية لها بتركيز 100 ميكروغرام ، بينما أظهرت *E. coli* مقاومة للمركب. أظهرت *C. albicans* حساسية أكبر للمركب على عكس *C. tropicales* ، والتي أظهرت مقاومة عالية ضد Tannin.

من الناحية الطبية الحيوية ، وجدت الدراسة الحالية أيضا أن β-D glucan النقي له تأثير مفيد, على الكولسترول في الدم مقارنة β-D glucan.

في التطبيقات البيئية ، كان للكتلة الحيوية للفطر *P. ostreatus* القدرة على تسييل الفحم منخفض الجودة وتحويله إلى قطرات زيتية على سطح المستعمرة الفطرية.أيضا ، اكتشفت الدراسة أن فطر *P. ostreatus* لديه القدرة على معالجة وتحلل المركبات الهيدروكربونية المعقدة من النفط الخام بثلاثة تركيزات (1 و 2 و 4%) لمدة خمسة أيام عند استخدامها في عملية المعالجة الحيوية. بالمقارنة مع مستعمرة الفطر التي يبلغ قطرها 45 ملم في عينة السيطرة ، كان قطر مستعمرة الفطر بتركيز 1% من النفط الخام 20,86 ملم ، و 10,65 ملم بتركيز 2% ، و 10,33 ملم بتركيز 4%.

تحقيق التسلسل الجيني لـ ITS للجين واستخدم لتأكيد تشخيص *Pleurotus ostreatus*. تم تسجيل العزلات المشخصة في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI).

تم اختيار ثلاثة مركبات فعالة للتعرف على بعض المكونات النشطة الموجودة في أجسام الثمار للفطر: β-D glucan و tannin و hexane dichlormethane. تم إنتاج هذه المركبات باستخدام طريقتين مختلفتين للاستخراج: الماء والمستخلص العضوي. أظهرت النتائج أنه في حين كانت تركيزات tannin وhexane dichlormethane أعلى في المستخلص المائي ، كانت تركيزات D-glucan أعلى بشكل ملحوظ في استخلاص المذيب العضوي مقارنة بالمستخلص المائي. وفقًا لمنطقة العينة ، لوحظ أيضًا اختلافات في تركيز المركبات النشطة الثلاثة.

تم استخلاص المركبات النشطة الثلاثة ثم تنقيتها باستخدام تقنيات HPLC و SDS-page. قدر الوزن الجزيئي بحوالي (٥٤٦.٤ ، ١٧٠١١٨ ، ١٨٠٨.٤ كيلو دالتون) لكل من β-D–glucan ، tannin ، hexane dichlormethane على التوالي. تم تحديد الشكل البلوري الذري وثلاثي الأبعاد للمركبات الثلاثة باستخدام تحليل البيمول.

تم دراسة التأثيرات المضادة للبكتيريا (ضد *E. coli* ، و *Staphylococcus aureus* ، و *Bacillus subtilis* ، و *Proteus vulgaris*) والمضادة للفطريات (ضد *Candida albicans* و *Candida Nakaseomyses* و *Candida Tropicales* و *Candida lusitaniae*) بتركيزات مختلفة باستخدام الميكرو– تقنية اللوحة. وجدت النتائج أن β-D–glucan له تأثير مثبط ضد الأنواع البكتيرية و*Candida* sp بتركيز ٢٠٠ بيكوغرام ، إلا أن التأثير المثبط يزيد مع زيادة تركيز المركب.

بشكل عام ، كانت *E.coli* هي أكثر أنواع البكتيريا تأثراً بـ β-D glucan بينما كانت البكتيريا *Proteus vulgaris* أكثر أنواع البكتيريا مقاومة. أيضا ، كانت *C. albicans* هي الأكثر تاثرا من β-D – glucan بين الأنواع الأخرى قيد الدراسة بينما أظهرت C. lusitaniaeمقاومة أعلى للمركب. كما وجدت النتائج أن Tannin بتركيز ٥٠ ميكروغرام له تأثير مثبط عالي ضد P. vulgaris بينما كانت *E.coli* أكثر مقاومة عند نفس التركيز. علاوة على ذلك ، كان *C. albicans* هو الأكثر تأثرا ، بينما كان *C. Nakaseomyses* أقل تأثرا بTannin. بالنسبة dichlormethane hexane ، كانت *Staphylococcus aureus* هي الأكثر حساسية لها بتركيز ١٠٠ ميكروغرام ، بينما أظهرت E.coliمقاومة للمركب. أظهرت *C. albicans* حساسية أكبر للمركب على عكس *C. Tropes* ، التي أظهرت مقاومة عالية Tannin.

من الناحية البايولوجية ، وجدت الدراسة الحالية أيضًا أن β-D glucan النقي له تأثير مفيد على مستوى الدهون في الدم مقارنة بـ β-D glucan القياسي.

في التطبيقات البيئية ، كان للكتلة الحيوية لفطر *Pleurotus ostreatus* القدرة على تسييل الفحم ذي الجودة المنخفضة وتحويله إلى قطرات زيت على سطح المستعمرة الفطرية.

أيضا ، اكتشفت الدراسة الحالية أن فطر *P. ostreatus* لديه القدرة على معالجة وتحطيم المركبات الهيدروكربونية المعقدة من النفط الخام بثلاثة تركيزات (١ ، ٢ ، ٤٪) لمدة خمسة أيام عند استخدامه في عملية المعالجة الحيوية. بالمقارنة مع مستعمرة الفطر بقطر ٤٥.٠٠ ملم لعينة السيطرة ، كان قطر مستعمرة الفطر بتركيز ١٪ نفط خام ٢٠.٨٦ ملم ، ١٠.٦٥ ملم بتركيز ٢٪ ، و ١٠.٣٣ ملم بتركيز ٤٪.

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

استخلاص بعض المركبات الفعالة من الفطر المحاري *Pleurotus ostreatus* وتقييم فعاليتها الحيوية

صفاء محمود سلطان احمد

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة / علم النبات

باشراف
الأستاذ المساعد
الدكتورة فاتن نوري عبد ملاعبد

١٤٤٤هـ ٢٠٢٣م