



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

تنقية عدد من مركبات الايض الثانوي من فطريات كبيرة محلية
وتقييم فعاليتها الطبية والتجميلية

وسام جهاد حسيان خلف العبيدي

اطروحة دكتوراه
علوم الحياة

ياشرف

الأستاذ

الدكتورة شمال يونس عبد الهادي

الخلاصة

في عصر يشهد استثمارات ضخمة في مستحضرات التجميل التي تطلق خطوطاً جديدة كل يوم لا تخضع غالبيتها لضوابط تتحكم بجودتها وامانها , ولاستغلال الموارد المتجددة التي تحقق أهداف التنمية المستدامة كانت الفطريات الكبيرة محط إهتمام في محاولات لتوثيق فعالية مركباتها الأيضية الطبية والتجميلية. إنطلقت رحلات استكشافية وثائقية للكشف عن الفطريات الكبيرة بتاريخ 2023/11/19 واستمرت لمدة خمسة أشهر شملت مسوحات لمناطق مختلفة من مدينة الموصل باقضييتها ونواحيها وتم الحصول على 46 نوعاً مختلفاً من الأجسام الثمرية. وكشفت نتائج العزلة الأولية للعزلات الفطرية المستحصل عليها عن تباين في قابليتها على إنتاج حامض الكوجك لذا إختيرت ثلاث عزلات أكثر إنتاجاً للحامض وكشف عن تبعيتها التصنيفية بعد تضخيم الجين (ITS) Internal Transcribed Spacer بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل والحصول على التتابعات النيوكليوتيدية ومطابقتها مع تتابعات نيوكليوتيدية مرجعية في موقع NCBI عانديتها للأنواع *Morchella importuna* والعزلة *Laetioporus cremeiporus* والعزلة *Fomitopsis pinicola*. استخلص حامض الكوجك من العزلة *M. importuna* ونقي بسلسلة من الخطوات شملت الترويق وكرماتوكرافيا الترشيح الهلامي بإستخدام هلام السيفادكس Sephadex G-100 وكشف عن نقاوة الحامض بتقنية كروماتوكرافيا السائل عالي الأداء والطبقة الرقيقة بينما كشف عن المجاميع الوظيفية الفعالة بطيف الأشعة تحت الحمراء. وبينت نتائج تقييم فعالية مرهم حامض الكوجك المنقى على التئام الجروح المستحدثة في الجهة الظهرية لإنات الجرذان البيض إذ بلغت النسبة المئوية لالتئام الجروح 88.4 % بالتركيز 8 % في اليوم الـ 12 من تلقي العلاج في حين بلغت 91.8% عند المعالجة بكريم الديفيروبرون بالتركيز نفسه ومدة العلاج نفسها.

وللكشف عن فعالية حامض الكوجك المضادة للشيخوخة بينت النتائج أن له القابلية على كبح الجذور الحرة باختلاف التراكيز المستخدمة إلا أنها بلغت الذروة بالتركيز 100 مايكروغرام/مل وكانت 84.29 %، كما سجل تأثيره المضاد لإنزيم Tyrosinase الذي بلغ 72.03 % عند التركيز 100 مايكروغرام/مل كما ثبت فعاليته المضادة لإنزيم Elastase التي بلغت

68.28 % عند التركيز أعلاه. في حين بلغت فعاليته المضادة لكل من إنزيم Collagenase و 81.97 Hyaluronidase و 75.85 % على التوالي.

وصنع كريم حامض الكوجك لتبييض البشرة الذي تمتع بلون بني فاتح متجانس بخواص تمتاز بالثبات بمرور الوقت فضلا عن خلوه من أية آثار جانبية وفعاليته في تحسين مستوى لون البشرة بعد اختباره من قبل عدد من المتطوعات ونيل رضاهم العالي جدا وأذواقهم . كما تبين عدم حدوث أية تغييرات في المقاطع النسجية لجلد الذيل في الجرذان المعاملة بحامض الكوجك بالتركيزين 2 و 4 % بالمقارنة مع المجاميع التجريبية التي جرى معاملتها بالهيدروكينون التي عانت طبقات الجلد من تغييرات نسجية عديدة.

بينما أظهرت نتائج تقييم فعالية مرهم حامض الكوجك على تبييض الجلد عن ظهور بقعة بنية في خلية من خلايا الميلانين بالتركيز 2 % بينما لم تظهر أية بقع للميلانين عند استخدام التركيز 4 % . وأثبت كريم واقى الشمس المصنع من حامض الكوجك كمادة فعالة تمتعه بلمس ناعم وقوام خفيف متجانس وأس هيدروجيني مناسب للجلد فضلا عن خلوه من النتانة وقابليته على الانتشار وامانه عند الاستخدام وحصوله على مستوى عال من الحماية ضد الأشعة فوق البنفسجية بلغت قيمته 50.06 بالمقارنة مع عامل الحماية لكريم واقى الشمس التجاري.

كما استخلص β -glucan من الأجسام الثمرية لعزلة الفطر *L. cremeiporus* ونقي بعد التخلص من البروتينات في المستخلص الخام باستخدام المبادل الأيوني. وكشفت النتائج عن فعالية السكر المتعدد β -glucan المضادة لداء السكر المستحدث في الجرذان المختبرية بمادة الألوكسان، إذ نجح السكر في خفض نسبة السكر في الدم بالتركيز 50 ملغم/كغم وبالتركيز إلى 100 ملغم/كغم من وزن الجسم بالمقارنة مع العقار التجاري Glibnechlamide وبفروق ذات دلالة معنوية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة.

وعند التحري عن المؤشرات الخلوية لوظائف الكلى في المجاميع التجريبية المختلفة , إتضحت فعالية السكر المتعدد، إذ انخفض مستوى اليوريا ومستوى الكرياتينين وتراكيز إنزيمات الكبد في مصل المجاميع التجريبية المختلفة بالمقارنة مع المجموعة المعاملة بالـ Glibnechlamide .

كشفت اختبارات فعاليته التجميلية أن له القابلية على كبح الجذور الحرة وإنزيمات الشيخوخة Hyaluronidase , Elastase , Tyrosinase و Collagenase . ولم تظهر أية تأثيرات سمية للسكر المتعدد على الخلايا الليفية لأجنة الجرذان .

وصنع كريم الترطيب الليلي للبشرة من السكر المتعدد بعدّه مادة فعالة وكشف عن خواصه الكيموحيوية وامانه على البشرة وفعاليته المضادة للمكروبات والتي جاءت متوافقة مع خواص كريم الترطيب التجاري .

وبينت نتائج تقييم الدور الوقائي للسكر المتعدد في الجرذان المعرضة للأشعة فوق البنفسجية فعاليته في الاحتفاظ بالمحتوى المائي للجلد وقدرته على خفض مستوى إنزيمات الإجهاد التاكسدي وزيادة في ألياف الكولاجين من النوع الأول التي توزعت بصورة منتظمة في طبقة الأدمة لإناث الجرذان التي تعرضت للأشعة فوق البنفسجية لمدة 30 يوماً وتلقت جرعة 300 ملغم/ كغم من السكر المتعدد وانخفاض في ألياف الكولاجين من النوع الثالث بالمقارنة مع المجموعة التجريبية الضابطة والمجموعة التي تعرضت للأشعة فوق البنفسجية من دون تلقي علاج وقائي .

كما استخلص الكلوتاثيون من عزلة الفطر *F.pinicola* الذي جرت تنقيته باستخدام المبادل الأيوني. وتبين من عملية التحقق من التنقية حد التجانس عن ظهور قمة واحدة عند زمن احتجاز 7.25 دقيقة . بينت نتائج الاختبارات المضادة للشيخوخة أنه يمتلك فعالية مضادة للأكسدة وفعالية مضادة لإنزيم Tyrosinase و إنزيمات الشيخوخة Elastase , Collagenase و Hyaluronidase .

أمكن تصنيع صابون الكلوتاثيون لتبييض البشرة وإزالة التجاعيد وبينت نتائج الأختبارات الكيموحيوية فعاليته وامانه على البشرة ، فضلا عن قابليته على التنظيف والترطيب وحصوله على درجات رضا عالية من قبل المتطوعين. بينما كشفت نتائج صنع كريم الكلوتاثيون لمعالجة الكلف انه يتمتع بخواص ثبات وامان عالٍ كما احرز تقدماً ملحوظاً في التقليل من الكلف لدى عدد من المتطوعات بعد 30 يوماً من الاستخدام.

أتاح هذا العمل التعرف على عالم الفطريات ونواتجها الأيضية عن كثب فهي تملك مدى واسع من المركبات الأيضية ونأمل أن ما حقق من إنجاز علمي في مهمة شاقة قد يظن

الكثيرون أنها أقرب إلى المستحيل يمثل خطوة رائدة تضاف للنهر الجارف المتجدد يومياً من الإكتشافات العلمية الحديثة أملاً أن تكون مرجعاً مهماً في عالم مستحضرات التجميل الحيوية وتساهم في تسهيل العمل للباحثين الآخرين.

SUMMARY

The contemporary era witnesses substantial investments in cosmetics, with new product lines emerging daily, often lacking adequate quality and safety regulations. This underscores an urgent need for change, a void where academic and industrial scientific research plays a crucial role. In an effort to harness renewable resources and align with sustainable development goals, macrofungi have garnered significant attention due to their potential for medicinally and cosmetically active metabolites. Exploration and Discovery of Macrofungi in Mosul Exploratory and documentary expeditions were conducted to identify macrofungi in the city of Mosul, commencing on November 19, 2023, and continuing for five months. These surveys covered various districts and sub-districts of Mosul. Despite a scarce rainy season, the expeditions revealed a unique fungal diversity, yielding 46 different types of fruiting bodies. Preliminary screening of the isolated fungal strains demonstrated variations in their ability to produce kojic acid. Four isolates, exhibiting the highest kojic acid production, were selected for further taxonomic identification. Their taxonomic affiliations were determined by amplifying the ITS gene using Polymerase Chain Reaction (PCR), followed by nucleotide sequencing and comparison with reference sequences in the NCBI database. The identified species were: *Morchella importuna* (GenBank accession number PP8716.1) *Laetiporus cremeiporus* (GenBank accession number PQ084579.1) *Fomitopsis pinicola* (GenBank accession number PQ084576.1) . Kojic acid was extracted from the *M. importuna* isolate and purified through a series of steps, including clarification and gel filtration chromatography using Sephadex G-100 gel. This process yielded a single peak for the purified

acid, with the highest concentration reaching 4.7 g/L in fraction 20 of the separation column. The purity of the acid was confirmed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Thin-Layer Chromatography (TLC), while active functional groups were identified through Infrared (IR) spectroscopy.

In a meticulously prepared experiment, the efficacy of purified kojic acid ointment on induced dorsal wounds in female albino rats was evaluated. The percentage of wound healing reached 88.4% at a concentration of 8% by day 12 of treatment. For comparison, treatment with Diprprione cream at the same concentration and duration resulted in 91.8% wound healing.

To assess the anti-aging activity of kojic acid, results indicated its ability to inhibit free radicals across various concentrations. This inhibition peaked at a concentration of 100 µg/mL, reaching 84.29%. Furthermore, its inhibitory effect on the tyrosinase enzyme was recorded at 72.03% at a concentration of 100 µg/mL. Kojic acid also demonstrated significant inhibitory effects on elastase, reaching 68.28% at the same concentration of 100 µg/mL. Its inhibitory efficacy against collagenase and hyaluronidase was 81.97% and 75.85%, respectively. Importantly, no cytotoxicity was observed on rat embryo fibroblast cell lines treated with various concentrations of kojic acid for 24 hours, as assessed by the MTT assay.

A kojic acid skin whitening cream was formulated, exhibiting a homogenous light brown color and stable properties over time. It was free from any side effects and proved effective in improving skin tone when tested by a group of female volunteers, who expressed high satisfaction.

Further investigation into the effects of kojic acid and hydroquinone on skin layers revealed no histological changes in tail skin

sections of rats treated with kojic acid at concentrations of 2% and 4%. This contrasts sharply with experimental groups treated with hydroquinone, where the skin layers underwent numerous changes, including increased epidermal thickness and the appearance of multiple layers of keratinocytes at both tested concentrations.

Evaluation of the kojic acid ointment's efficacy in skin whitening showed the appearance of a brown spot in one melanin cell at a 2% concentration, while no melanin spots appeared at a 4% concentration. In contrast, dark brown melanin spots appeared in numerous cells when using both 2% and 4% concentrations of hydroquinone. These spots subsequently decreased when a mixture of kojic acid and hydroquinone (4% each) was applied.

A sunscreen cream formulated with kojic acid as an active ingredient demonstrated a smooth texture, light and homogenous consistency, and a skin-appropriate pH. It was odorless, easily spreadable, and safe to use. Furthermore, it achieved a high level of protection against UV radiation, with a Sun Protection Factor (SPF) of 50.06, significantly outperforming a commercial La Roche sunscreen cream which had an SPF of 33.44.

For the effective utilization of isolated fungal strains, β -glucan polysaccharide was extracted from the fruiting bodies of *L. cremeiporus*. The crude extract was subjected to a two-step purification process following protein removal. The first step, utilizing ion-exchange chromatography, yielded a single polysaccharide peak, with the highest sugar concentration of 25.86 g/L at fraction 55 from the separation column. In the subsequent Sephadex G-150 gel filtration chromatography, the highest sugar concentration reached 32.82 g/L at fraction 28. The purified β -glucan had a molecular weight of 120 kDa

and showed a single peak with a retention time of 3.43 minutes when analyzed for purity by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).

The results revealed the antidiabetic efficacy of β -glucan in alloxan-induced diabetic laboratory rats. The polysaccharide successfully lowered blood glucose levels: at a concentration of 50 mg/kg body weight, blood glucose dropped to 145 mg/dL, and further decreased to 120 mg/dL at a concentration of 100 mg/kg. In comparison, the commercial drug Glibenclamide reduced blood glucose to 112 mg/dL and 82 mg/dL at concentrations of 2.5 mg/kg and 5 mg/kg, respectively, with statistically significant differences compared to the non-alloxan-injected control group, which had a blood glucose level of 85.14 mg/dL.

Investigation into cellular indicators of kidney function in the different experimental groups demonstrated the efficacy of the polysaccharide. Serum urea levels decreased to 36.2 mg/dL at a β -glucan concentration of 50 mg/kg, while the lowest value recorded for the Glibenclamide-treated group was 44.2 mg/dL at a 5 mg/kg concentration. Similar results were observed for serum creatinine levels using β -glucan at 100 mg/kg reduced creatinine to 0.37 mg/dL, whereas Glibenclamide at 2.5 mg/kg and 5 mg/kg resulted in reductions to 0.87 mg/dL and 0.95 mg/dL, respectively.

The polysaccharide also demonstrated effectiveness in reducing liver enzyme concentrations in the alloxan-treated experimental groups. Aspartate aminotransferase (AST) and Alanine transaminase (ALT) levels decreased to 30.6 U/L and 27.8 U/L at β -glucan concentrations of 50 mg/kg and 100 mg/kg, respectively. In contrast, Glibenclamide treatment at 5 mg/kg recorded reductions to 46.3 U/L and 48.14 U/L for AST and ALT, respectively.

Cosmetic efficacy tests revealed the polysaccharide's ability to scavenge free radicals, varying with concentration, peaking at 87.61% at 100 µg/mL. It also demonstrated significant inhibitory activities against various aging enzymes at the same concentration: tyrosinase (76.19%), elastase (70.54%), collagenase (85.12%), and hyaluronidase (75.85%). Importantly, the polysaccharide showed no toxic effects on rat embryo fibroblast cells.

A night moisturizing cream for the skin was formulated using the polysaccharide as an active ingredient. It exhibited favorable biochemical properties, safety for the skin, and antimicrobial activity, all comparable to a commercial moisturizing cream.

Given the severe impact of UV radiation on skin and the need for suitable alternatives, evaluation of the polysaccharide's protective role in UV-exposed rats demonstrated its efficacy in maintaining skin water content, reaching a peak of 70.2% at a dose of 300 mg/kg. It also reduced levels of oxidative stress enzymes and increased Type I collagen fibers, which were regularly distributed in the dermal layer of female rats exposed to UV radiation for 30 days and receiving a 300 mg/kg dose of the polysaccharide. Concurrently, a decrease in Type III collagen fibers was observed, compared to both the untreated control group and the group exposed to UV radiation without protective treatment.

To ensure comprehensive utilization of the obtained fungal isolates, glutathione was extracted from the *F. pinicola* isolate and purified in two steps. The first step, involving ion exchange chromatography, yielded two peaks. The second peak contained glutathione activity, with a quantity of 29 g/L in fraction 60. Subsequent results indicated a single glutathione peak with a quantity of 37.2 g/L in fraction 21 from the column. Purity verification confirmed homogeneity,

showing a single peak at a retention time of 7.25 minutes. Anti-aging tests revealed its antioxidant activity at 79.52% and tyrosinase inhibitory activity at 68.65%. Glutathione also demonstrated significant inhibitory activities against various aging enzymes at a concentration of 100 µg/mL: elastase 71.38%, collagenase 74.77%, and hyaluronidase 71.13%.

Glutathione soap was successfully formulated for skin whitening and wrinkle reduction. Biochemical tests confirmed its efficacy and safety for the skin, in addition to its cleansing and moisturizing properties, receiving high satisfaction scores from volunteers. Furthermore, a glutathione cream for melasma treatment was developed, exhibiting high stability and safety properties. It achieved remarkable progress in reducing melasma among a number of female volunteers after 30 days of use.

This work has provided an in-depth understanding of the world of fungi and their metabolites, revealing their remarkable potential. We hope that the scientific achievements realized through this challenging endeavor, which many might consider close to impossible, represent a pioneering step contributing to the ever-flowing stream of modern scientific discoveries. Our aspiration is that this work will serve as an important reference in the field of bio-cosmetics and facilitate future research for other scientists.

**University of Mosul
College of Education
for Pure Sciences**



**Purification of Some Secondary Metabolic
Compounds from Local Large Fungi and Study
Their Medicinal and Cosmetic Applications**

Wisam Jehad Hasyan Khalaf Al-ubidy

Ph.D. thesis

Biology

Supervised by

Prof.

Dr. Shimal Younis Abdul-Hadi

2025 A.D

1447 A.H