جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

أستخلاص وتنقية الصبغة الحيوية C-phycocyanin من *Nostoc minutum* ودراسة تأثيرها المضاد للبكتيريا الممرضة والخلايا السرطانية

حامد محمد تقي علي

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة

بإشراف

الأستاذ	الأستاذ
الدكتور يوسف جبار اسماعيل	الدكتور عمر يونس محمد

١٤٤٧هـ ٢٠٢٥م

الخلاصة

تُعد الدراسة الحالية من الدراسات الرائدة في مجال البحوث التطبيقية، فقد تم تنمية وتنقية السيانوبكتريا *Nostoc minutum* بوسط زرعي انتقائي Blue Green -11 السائل والمدعم بالمغذيات مع إضافة فيتامين B12. شخصت العينات مظهريا تحت المجهر الضوئي، وجزيئياً من خلال دراسة تتابع القواعد النتروجينية للمورث 16SrRNA الخاص إذ اظهرت العزلة PP999718.1 نسبة تتطابقٍ مع العزلة KY283055.1 المستودعة في بنك الجينات 99%.

تم خلال هذه الدراسة انتاج الصبغة الحيوية البروتينية C-phycocyanin من السيانوبكيتريا للجنس *N.minutum* والمعزولة من البيئة المحلية. بينت النتائج الفسلجية أن أفضل كثافة للنمو في الوسط الزرعي BG11 كان عند اليوم الخامس عشر بواقع 16.39 كثافة ضوئية ، ولوحظ ان افضل طرق استخلاص للبروتين والصبغة الحيوية الفايكوسيانين هي التجميد والتذويب وطريقة الموجات الفوق الصوتية على التوالي، أذ كانت فعالة في أستخلاص البروتين عالي النقاوة وحققت اعلى قيمة كثافة ضوئية عند الطول الموجي 280 نانوميتر وبواقع 8.77 كثافة ضوئية.

قدرت كمية البروتين في راشح وراسب الخلايا وكان اعلى معدل للبروتين 98.2 و90.2 مايكروغرام/مل على التوالي. بعد ذلك أجريت عملية تنقية البروتين بأستخدام كبريتات الامونيوم بتركيز 70%، وتنقيته بالفرز الغشائي وكروماتوغرافا الترشيح الهلامي وتم الحصول على قمة بروتينية واحدة عند حجم روغان (150-200) مل، ما يشير الى نقاء نسبي للبروتين. قدر الوزن الجزئي للبروتين باستخدام الهجرة الكهربائية، ووجد بانه يساوي تقريبا 13 كليودالتون. تم أيضا تنقية الصبغة الحيوية C-phycocyanin باستخدام كبريتات الامونيوم بتراكيز مختلفة (30–70%) ولوحظ افضل تركيز تنقية للصبغة (70%) بلغت نقاوة صبغة 0.63 ملغم/مل، وهي قيمة مرتفعة تشير إلى نقاوة عالية وقدر الوزن الجزيئي للصبغة بأستخدام الهجرة الكهربائية وتبين وجود وحدتين فرعيتين α و β لها وزن جزيئي تبلغ حوالي 33 و36 كليودالتون على التوالي . تم توصيف الصبغة بتقنية التحليل الطيفي باستخدام الأشعة فوق البنفسجية والمرئية. تبين وجود عدة قمم أمتصاصية عند أطوال موجية مختلفة، إذ برزت قمتان واضحتان عند الاطوال 228 و282 نانوميتر. استخدمت تقنية مطيافية الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) والذي ساهم في الكشف المجموعات الوظيفية الرئيسة المرتبطة بالبنية الجزيئية للصبغة، والتي اشارت إلى وجود روابط هيدروجينية، وسجلت قمم عند 2853 و2922 سم$^{-1}$، والتي تُعزى الى امتدادات C-H، وهي قمم شائعة في المركبات الهيدروكربونية (CH_3).

درست الفعاليه التثبيطية للمركبات المستخلصة ضد عدد من الانواع البكتريا الموجبة والسالية لصبغة كرام، إذ أعطى المستخلص البروتيني النقي والصبغة الحيوية عند التركيزين (7.5، 10.0) ملغم/مل، اعلى تثبيطًا ضد جميع العزلات البكتيرية المدروسة وبالتحديد ضد الانواع البكتريا السالبة لصبغة كرام.

تم تقييم فعالية الصبغة الحيوية C-phycocyanin باستخدام اختبار 3-(4,5-dimethylthiazol-2-y)2,5-diphenyl tetrazolium bromide على خطي خلايا سرطان الثدي MCF-7 والقولون HRT-18 واستخدام خط الخلايا السليم WI-38 كمعاملة مقارنة. أظهرت النتائج ان الصبغة الحيوية عند التركيز (1000) مايكروغرام /مل أثرت على حيوية خطي خلايا سرطان الثدي MCF-7 وسرطان القولون HRT-18 وبنسبة 69.64%، 71.11% على التوالي، بينما لم يظهر تأثير واضح على خط الخلايا السليم.

وتضمنت التغيرات الشكلية الأكثر شيوعًا في المزارع الخلوية لخطوط الخلايا السرطانية MCF-7 و HRT-18 تغيرات خلوية تمثلت في تكاثف الكروماتين،انفصال الخلايا وتغير شكلها إلى شكل دائري، ووجود فجوات وانكماش السايتوبلازم وانخفاض في اعداد وحيوية الخلايا، وفقدن الشكل الطبيعي للخلايا متبوعا بتفتت النواة إلى أجزاء منفصلة.

Summary

This study is a pioneering investigation in the field of applied research. The cyanobacterium *Nostoc minutum* was cultured and purified in a selective liquid medium called Blue Green-11, enriched with nutrients and supplemented with vitamin B12. Samples were identified morphologically using a light microscope and molecularly by sequencing the nitrogenous bases of the specific 16S rRNA gene. The isolate PP999718.1 showed a 99% identity with the isolate KY283055.1, stored in the gene bank.

During this study, the biotinylated protein pigment C-phycocyanin was produced from a cyanobacterium of the genus *N. minutum*, isolated from the local environment. Physiological results showed that the optimal growth density in BG11 culture medium was achieved on the fifteenth day, reaching 16.39 optical density. The most effective methods for extracting the protein and the important pigment phycocyanin were freeze-thaw and ultrasonication, respectively. These methods successfully extracted highly purified protein, with the highest optical density at 280 nm observed as 8.77.

The protein content in the cell filtrate and sediment was estimated, with the highest protein contents being 98.2 and 90.2 µg/ml, respectively. Protein purification was then performed using 70% ammonium sulfate, followed by membrane separation and gel filtration chromatography. A single protein peak was obtained at a volume of 150-200 ml, indicating relative protein purity. The molecular weight of the protein was estimated using electrophoresis and found to be approximately 13 kilodaltons. The vital dye C-phycocyanin was also purified using ammonium sulfate at different concentrations (30-70%). The best purification was observed at 70%, with a dye purity of 0.63 mg/mL, indicating high purity and

concentration. The molecular weight of the dye was determined by electrophoresis, revealing the presence of two subunits, α and β, with molecular weights of approximately 33 and 36 kilodaltons, respectively. The dye was characterized by UV-Vis spectroscopy. Several absorption peaks were found at different wavelengths, with two distinct peaks at 228 and 282 nm. Infrared spectroscopy (FT-IR) was used to identify the main functional groups of the dye's molecular structure, indicating the presence of hydrogen bonds. Peaks recorded at 2853 and 2922 cm^{-1} are attributed to C-H stretching, common in hydrocarbon compounds (CH3).

The inhibitory activity of the extracted compounds against various Gram-positive and Gram-negative bacterial species was examined. The pure protein extract and the vital dye, at concentrations of 7.5 and 10.0 mg/ml, showed the strongest inhibition against all bacterial isolates tested, especially Gram-negative bacterial species.

The effectiveness of the vital dye C-phycocyanin was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide assay on the MCF-7 and HRT-18 breast cancer cell lines, with the healthy WI-38 cell line as a control. The results indicated that the vital dye at a concentration of 1000 µg/ml reduced the viability of the MCF-7 and HRT-18 breast cancer cell lines by 69.64% and 71.11%, respectively, while it had no significant impact on the healthy cell line.

The most common morphological changes in cell cultures of the MCF-7 and HRT-18 cancer cell lines included chromatin condensation, cell separation, and a change in their shape to a round form, the presence of vacuoles and cytoplasmic shrinkage, decreased cell numbers and viability, and loss of normal cell shape, followed by nucleus fragmentation.

University of Mosul

College of Education

for Pure Science

Extraction and purification of the bio-pigment C-phycocyanin from *Nostoc minutum* and study of its effect on bacteria and cancer cells

Hamid Mohammed Taqi Ali

Ph.D. Thesis

Biology

Supervised by

Prof.
Dr. Yousef Jabbar Ismael

Prof.
Dr. Omar Younis Muhmmed

2025 A.D. **1447 A.H.**