Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Isolation and Characterization of Melanin Producing *Pseudomonas stutzeri* Strain UIS2 in the Presence of l-tyrosine and Survey of Biological Properties of Its Melanin

Sahar Eskandari[1], Zahra Etemadifar[1*]

1. Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

10.30699/ijmm.14.1.70

ABSTRACT

Background: Melanin is a negative charge hydrophobic complex pigment. Melanin is produced naturally in bacteria to protect them against UV, free radicals and environmental stresses. Pigment production in bacteria has more advantages than other biosources due to its rapid growth, higher efficiency and easier extraction. The aim of this study was the isolation, biochemical and molecular identification the melanin pigment producing bacterium in the presence of l-tyrosine and the evaluation of the pigment biological properties.

Materials & Methods: The soil sample was collected from the University of Isfahan Park, and cultured in nutrient agar medium containing l-tyrosine. The colony with brown halo was isolated and identified using phenotypic and molecular methods. The bacterial growth and melanin production were evaluated by spectrophotometry at 600 and 400 nm, respectively. The melanin pigment was extracted by increasing the acidity of the broth culture supernatant. The melanin production yield, antioxidant activity and sun protection factor (SPF) of melanin were determined.

Results: *Pseudomonas stutzeri* strain UIS2 capable to grow in nutrient agar and melanin production, was isolated and registered in NCBI GenBank with accession no. MG519615. The maximum melanin production was obtained 600 mg l^{-1} by isolated strain. The antioxidant property of melanin in DPPH test was determined as 74.9% and its SPF was 49.05 U/mL.

Conclusion: The melanin pigment from the isolated Pseudomonas showed high SPF and high antioxidant activity against ROS stresses. So, it can be suggested as a suitable candidate for application in cosmetic, pharmaceutical, and environmental decontaminant.

Keywords: *Antioxidant, SPF, Melanin pigment, Pseudomonas stutzeri*

Received: 2019/01/28; **Accepted**: 2020/02/05; **Published Online:** 2020/03/23

Corresponding Information: **Farzaneh Tafvizi,** Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Email: z.etemadifar@sci.ui.ac.ir

Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Eskandari S, Etemadifar Z. Isolation and Characterization of Melanin Producing Pseudomonas stutzeri Strain UIS2 in the Presence of l-tyrosine and Survey of Biological Properties of Its Melanin. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (1) :70-83

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Melanin is a negative charge hydrophobic complex pigment that is a substance made of small particles virtually insoluble in the environment and is usually used for its color, protective or other characteristics. Pigments are of particular importance in many industries, including the food and pharmaceutical industries **(1)**.

The importance of microbial pigments has been emphasized in a variety of applications including cosmetics, food, pharmaceuticals and textiles, and they also have cytotoxic, antioxidant, antimicrobial, anti-cancer, anti-tumor, and anti-combustion activities **(3-5)**. It is also known as a potent antioxidant, antivirus, and antibiotic, in addition to being able to protect organisms against toxic free radicals, protect

against pathogenic bacteria, and regulate heat. Melanin can be produced in bacteria by chemical synthesis methods based on tyrosine oxidation and enzyme catalysis. One of the problems with the use of melanin extracted by microorganisms is the presence of impurities of toxic secondary metabolites that cannot be used in medicine and food. Other problems include insolubility in water and solubility in organic materials. Melanin is classified into three forms: eumelanin, pheomelanin, and neuromelanin **(7, 4)**.

Melanin producing bacteria include some species of Aeromonas, Streptomyces, Bacillus, Vibrio, and Alteromonas **(3, 11-13)**. Melanin produced from the bacteria *Azotobacter chroococcum* and *Burkholderia cenocepacia* has strong antioxidant properties and therefore they can protect themselves against environmental free radicals **(14)**.

Water-soluble brown pigment pheomelanin can be synthesized by Pseudomonas species including *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Pseudomonas putida* using a tyrosinase mechanism within 24 to 48 hours **(5, 16, 17)**.

In this study, the bacterium *Pseudomonas stutzeri* UIS2 was isolated to produce melanin in the presence of L-tyrosine. This is the first report of a *P. stutzeri* bacterium that produces high levels of melanin only in the presence of L-tyrosine. Melanin pigment extraction and its structure have been studied using spectroscopic analysis methods and its protective properties against sunlight and its antioxidant inhibition have been determined.

Materials and Methods

To separate the melanin producing bacteria from the soil sample, 1 g of each sample was added to 10 mL of 8.5% normal saline buffer in a 50 mL flask, and was shaken (60 rpm) for 30 min at 37°C (18). Initial identification was done by gram staining, morphological and biochemical tests (21–19). Melanin production during bacterial growth was monitored by spectrophotometer at 400 and 600 nm in comparison with melanin standard (7). KOH test was used to confirm the staining. Biochemical tests were used to identify the isolates initially.

After extraction of the isolated strain gene by boiling cell mass grown in Loria-Brittany broth culture, molecular identification using primers 1492R 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3' and 27F-YM 3'-AGAGTTGCT-3AG-AGAGTTGCT-5'. 16SrRNA gene fragment amplification with about 1500 open pairs was performed by PCR and amplified fragment sequencing. Sequence of the above product was blasted in NCBI and MEGA-6 software was used to draw the phylogenetic tree. To do this, the homologous strain sequences were first extracted from the NCBI site and then sequenced by the Muscle program in MEGA-6 software **(7)**.

The melanin pigment was then extracted and then purified. To determine the potency of a sunscreen with a sun protection factor (SPF). To determine the extracted SPF of melanin as a sunscreen metabolite, it was first dissolved in a specific concentration in ethanol and then its UV absorption from a wavelength of 290 to 320 nm at a distance of 5 nm was measured by spectrophotometer and calculated by the following equation **(24)**:

$$SPF=CF \times \sum_{290}^{320} EE\lambda \times I[\lambda] \times Abs[\lambda]$$

The free radical scavenging activity of the pigment extract of Melanin bacterium was measured by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) using modified Brand-Williams *et al.* method. Ascorbic acid was used as standard composition and tested in three replications. The percent inhibition of DPPH compound was calculated using the following equation **(4)**:

DPPH inhibition (%) =
(control absorbance _ test absorbance) × 100

Results

Among the grown bacteria, gram-negative bacillus, strain 2 UIS, was isolated from soil samples of Isfahan University Park with the ability to produce melanin on the L-tyrosine-containing medium. The formation of a brown or black area around the isolated colonies in the culture meThe biochemical properties of this bacterium were able to grow at acidity of 8.5 and at optimum temperature of 35°C under aerobic condition, catalase and oxidase positive conditions, indole, MR, VP and negative H_2S, negative gelatinase, positive citrate intake, casein hydrolysis and positive. The bacterial colonies were pink on MacConkey agar, yellow on nutrient agar, and brown on tyrosine agar.

The gel image corresponding to the PCR strain isolated in Figure 2 shows the product of 1500 matched pairs against the DNA marker. The sequences obtained from the PCR product after blast in NCBI showed 99.92% similarity with *P. stutzeri* (accession number AB680324.1). The isolated strain of melanin pigment generator was accessed at NCBI GenBank National Biotechnology Information Center under accession number MG519615. The phylogenetic tree was constructed by multiple sequences with evolutionary intervals by software. Tree topology was analyzed by bootstrap analysis of 100 datasets using MEGA6.1 software (Figure 3). Its phylogenetic tree also shows the close phylogenetic relationship of the sequenced strain with *P. stutzeri*.

Melanin pigment was produced in the resting phase of bacterial growth after 70 h with the appearance of black pigment in broth medium. Generally, melanin produced by this bacterium was about 600 mg/L. Melanin purity was observed by observing the absorbance peak at 210 nm (Figure 4).

DPPH inhibition was obtained by measuring absorbance at 516 nm at about 75% and close to standard ascorbic acid (78%) as shown in Figure 5.

The results of UV absorption at different wavelengths and SPF calculation are presented in Table 1. The SPF of melanin obtained from *P. stutzeri* UIS2 strain was found to be 49.05 as the inhibitor of ultraviolet radiation.

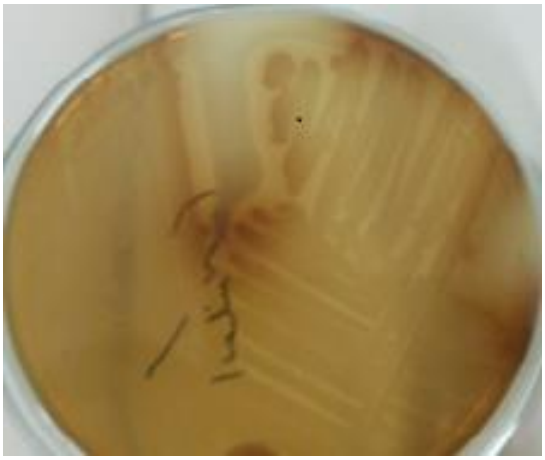


Figure 1. *P. stutzeri* bacterium after 24 h in a 2 g / L l-tyrosine agar medium incubated at 30°C in degrading l-tyrosine and primary melanin production.

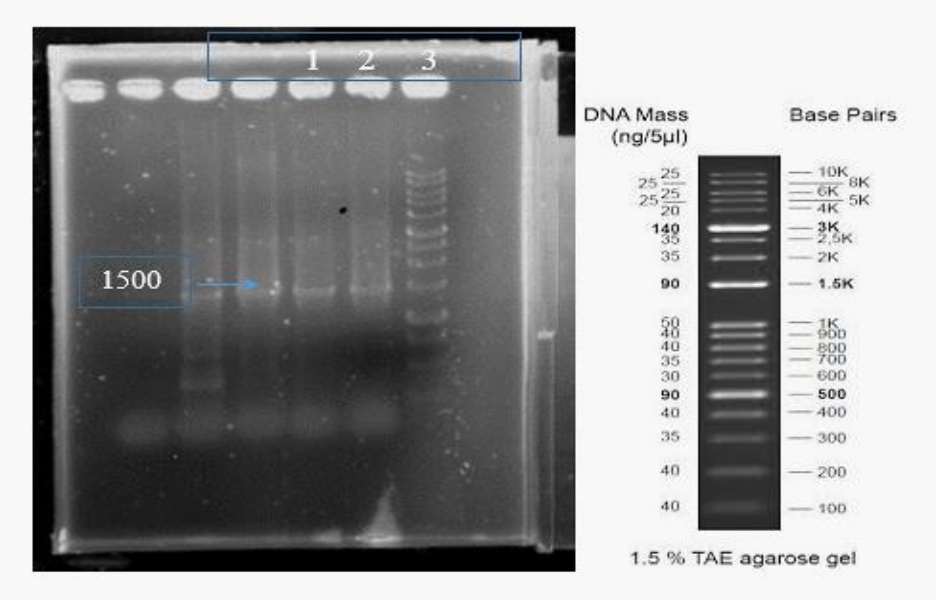


Figure 2. PCR image of 16S rRNA gene of some isolated melanin producing strains: (1) UIS19 strain, (2) UIS2 strain, and (3) 1kb marker DNA.

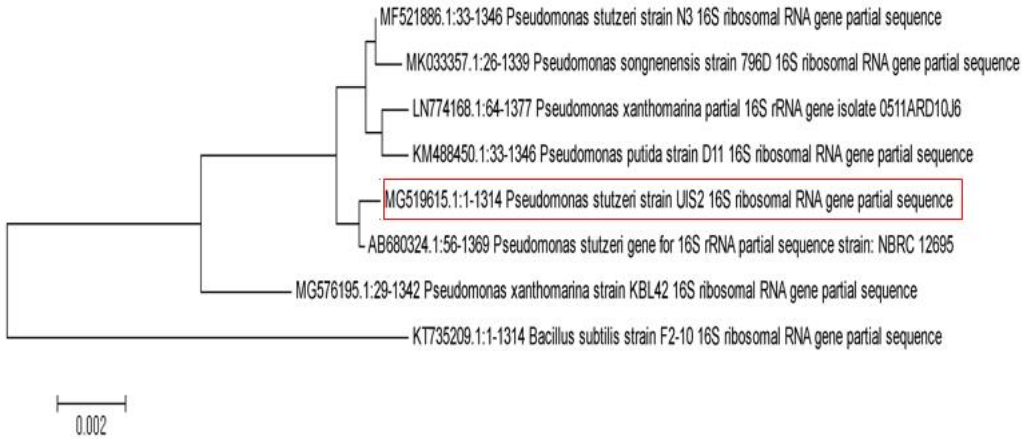


Figure 3. Phylogenetic tree of the melanin-producing UIS2 strain isolated (MG519615 Pseudomonas accession number isolate in the box marked whose 16S rRNA sequence was 99.92% similar to that of *P. stutzeri* bacterium accession number AB680324.1).

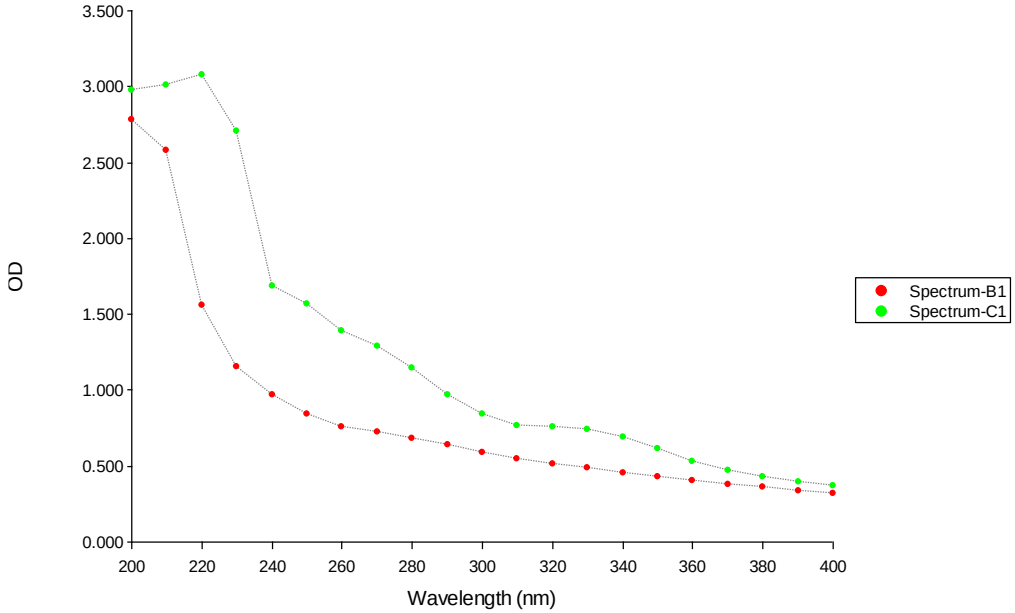


Figure 4. Diagram of absorbance length of standard melanin (B1) and pure melanin UIS2 (C1) strain with UV spectrophotometer

Table 1. Optical Adsorption Results of Melanin Isolated *P. stutzeri* UIS2 Strain by Melanin Dissolution in Methanol for Determination of SPF

λ(nm)	Abs	EE.I	EE.I × Abs
290	0.686	0.015	0.01029
295	0.672	0.0817	0.0549024
300	0.648	0.2874	0.1862352
305	0.831	0.3278	0.2724018
310	0.794	0.1864	0.1480016
315	0.642	0.0839	0.0538638
320	0.632	0.018	0.011376

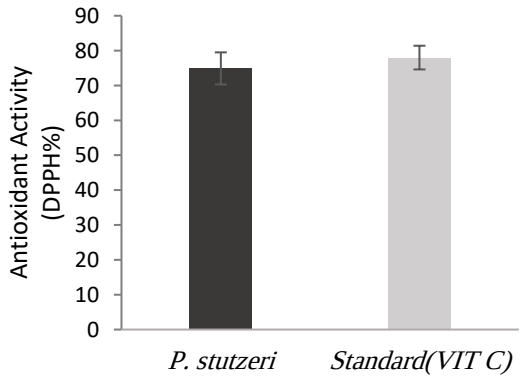


Figure 5. Antioxidant activity of melanin produced from *P. stutzeri* UIS2 in comparison with standard ascorbic acid at concentration of 20 mg/L in DPPH test

Discussion

Pseudomonas stutzeri is a gram-negative bacillus with flagella and grows under aerobic conditions on medium containing starch and maltose and is unable to degrade arginine and glycogen. Its difference with other Pseudomonas strains is that they do not produce fluorescence pigment and are very similar to those of *Pseudomonas alcaligenes*, and *Pseudomonas putida*. This bacterium is difficult to isolate because of limited nutrient requirements for growth and is well grown in medium containing low ammonium nitrate and incubation temperature of 37°C.

The new colonial form of this bacterium differs from that of other Pseudomonas spp. The colonies are dry, hard, wrinkled and branched, but it is easy to remove from the surface of the solid medium and changes in shape and color after some time. For this bacterium, a

very wide growth temperature range between 4 and 45 °C has been reported **(26)**.

Melanization has important roles such as protecting and adapting to various physiological and chemical stressors such as temperature, radiation, humidity, and toxicity by various contaminants in microorganisms **(33)**.

Maximum melanin production in isolated UIS2 strain Pseudomonas was about 600 mg/L, which is 3.6 times higher than that of *Streptomyces bikiniensis* with 166 mg/L melanin in culture medium containing yeast and peptone extracts. In *Yarrowia lipolytica* yeast the production of melanin is about 160 mg/L, and Klebsiella GSK mediated by tyrosine is reported at about 130 mg/L **(34)**. On the other hand, HMGM-7 strain of *Pseudomonas stutzeri* produces about 6.7 g/L of melanin under optimum conditions **(20)**, which is higher than the native isolate in this study due to the optimization performed.

The sun protection factor of the strain isolated in this study was 40.05 which is very good compared to the synthetic and natural ingredients used in cosmetics. It is also worth noting that the production of melanin as a solar UV blocker using non-pathogenic environmental bacteria in the presence of L-tyrosine is much faster and with higher production rates than metabolites produced by algae and cyanobacteria.

Conclusion

Pseudomonas stutzeri was isolated as a melanin producing bacterium in this study, which was able to grow in a simple medium (nutrient agar) containing l-tyrosine and melanin synthesis. The biological properties of the isolated melanin strain have been determined for use in industry. Melanin pigment of this strain showed high antioxidant activity against ultraviolet radiation and oxidative stress ROS. Isolated melanin can be used in cosmetics, pharmaceuticals, agriculture, and environmental contaminants. Its antioxidant properties can inhibit DNA damage and other biological compounds. In addition, melanin is used as a skin protection agent in creams and cosmetics.

Acknowledgement

The authors would like to thank the research assistant of the University of Isfahan for the financial support of this research which was a part a doctoral thesis.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۴ ـ شماره ۱ ـ بهمن و اسفند ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی و شناسایی *سودوموناس استوتزری* سویه UIS2 تولیدکنندهٔ ملانین در حضور ال-تیروزین و بررسی خصوصیات بیولوژیک ملانین آن

سحر اسکندری[۱]، زهرا اعتمادی فر[۱*]

۱. گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۸

پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۰۶

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۱/۰۴

موضوع:

میکروب‌شناسی صنعتی

نویسندهٔ مسئول:

زهرا اعتمادی فر، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

ایمیل: z.etemadifar@sci.ui.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: رنگ‌دانه ملانین ساختار پیچیده آب‌گریز با بار منفی داشته و به‌طور طبیعی در باکتری‌ها برای محافظت در مقابل اشعه فرابنفش، رادیکال‌های آزاد و تنش‌های محیطی تولید می‌شود. تولید رنگ‌دانه در باکتری‌ها به دلیل رشد سریع، بازدهی بالاتر و استخراج راحت‌تر نسبت به سایر منابع زیستی دارای مزایای بیشتری است. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری تولیدکننده ملانین و مطالعه برخی ویژگی‌های زیستی این رنگ‌دانه بوده است.

مواد و روش کار: نمونه خاک پارک دانشگاه اصفهان جمع‌آوری و در محیط کشت نوترینت آگار حاوی ال- تیروزین کشت و باکتری مولد هاله قهوه‌ای‌رنگ جداسازی و با استفاده از روش‌های فنوتیپی و مولکولی شناسایی شد. رشد باکتری در محیط حاوی ال-تیروزین و تولید ملانین با روش اسپکتروفتومتری به‌ترتیب در ۶۰۰ و ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. استخراج رنگ‌دانه بوسیلهٔ افزایش اسیدیته مایع رویی کشت مایع انجام گرفت، و میزان ملانین تولید شده، خواص آنتی‌اکسیدانی (DPPH) و میزان خاصیت محافظتی آن در برابر نور (SPF) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: *سودوموناس استوتزری* سویه UIS2 با توانایی رشد در نوترینت آگار و تولید ملانین جداسازی و با شماره دسترسی MG519615 در بانک ژن NCBI ثبت شد. حداکثر تولید ملانین در این سویه ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی ملانین استخراج شده در آزمایش DPPH ۷۴/۹ ٪ و خاصیت محافظتی در برابر نور آفتاب (SPF) ۴۹/۰۵ واحد بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: رنگ‌دانه ملانین سودوموناس جداشده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در برابر تنش‌های ROS داشته و با SPF بالا می‌تواند به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای کاربردهای آرایشی، دارویی، و رفع آلودگی محیط زیست پیشنهاد شود.

کلید واژه‌ها: آنتی‌اکسیدان، SPF، رنگدانهٔ ملانین، *سودوموناس استوتزری*

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

رنگ‌دانه ماده‌ای است که از ذرات کوچک تشکیل شده و در محیط کاربردی عملاً نامحلول است و به‌دلیل خاصیت رنگی، محافظتی یا سایر خواص آن استفاده می‌شود. رنگ‌دانه‌ها از اهمیت ویژه‌ای در بسیاری از صنایع از جمله صنایع غذایی و دارویی برخوردارند (۱). با توجه به اثرات مضر رنگ‌های مصنوعی بر سلامتی انسان و محیط زیست، روند توسعه برای به‌دست آوردن رنگ‌دانه‌ها از منابع طبیعی در سراسر جهان قابل توجه است. تولید رنگ‌دانه‌های میکروبی به دلیل علاقهٔ روزافزون صنعت به محصولات ایمن‌تر، به‌راحتی قابل تجزیه، سازگار با محیط زیست و بدون ایجاد اثرات زیان‌بار یکی از زمینه‌های نوظهور تحقیقاتی به شمار می‌رود (۲).

اهمیت رنگ‌دانه‌های میکروبی در کاربردهای مختلف از جمله مواد آرایشی، مواد غذایی، دارویی و منسوجات تأکید شده است و این ترکیبات همچنین دارای فعالیت‌های سیتوتوکسیک، آنتی اکسیدان، ضد میکروبی، ضد سرطانی، ضد توموری و ضد احتراق هستند (۳-۵). ملانین‌ها گروهی از رنگ‌دانه‌های سیاه بی‌شکل با وزن مولکولی بالا و اغلب آب‌گریزند که از طریق پلیمریزاسیون اکسیداتیو ترکیبات فنلی یا اندولی موجود در حیوانات، گیاهان،

باکتری‌ها، و قارچ‌ها تشکیل می‌شوند. ملانین برای حیات و رشد موجودات الزامی نیست، اما قادر است توانایی سلول را برای رقابت و زنده ماندن در شرایط نامطلوب محیطی مانند تابش فرا بنفش تقویت کند (۵). همچنین این رنگ‌دانه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، آنتی‌ویروس، و آنتی‌بیوتیک شناخته شده است؛ علاوه‌براین توانایی محافظت از موجودات زنده در برابر رادیکال آزاد سمی، محافظت از باکتری‌های بیماری‌زا در مقابل میزبان، و تنظیم حرارت را دارد (۶). ملانین را می‌توان در باکتری‌ها با روش‌های سنتز شیمیایی بر اساس اکسیداسیون تیروزین و کاتالیز آنزیم تولید کرد. یکی از مشکلات استفاده از ملانین استخراج شده توسط میکروارگانیسم‌ها وجود ناخالصی‌های متابولیت‌های ثانویه سمی است که قابل استفاده در دارو و غذا نمی‌باشد. از مشکلات دیگر آن غیر محلول بودن در آب و محلول بودن در مواد آلی است. ملانین به ۳ شکل یوملانین، فئوملانین، و پیوملانین طبقه بندی می‌شود (۴, ۷). تولید ملانین پاسخ مقاومت به تحریکات محیطی است. این رنگ‌دانه در بیوتکنولوژی کاربردهای وسیعی دارد، از جمله تمایل قوی به فلزات، دارای خاصیت پاکسازی محیط از رادیکال آزاد، دارای خواص انتقال الکترون، تعویض یونی و حمل داروها (۸). انواع ملانین رنگ‌دانه‌هایی هستند که توسط طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها تولید و سبب افزایش توانایی زنده ماندن در حضور تابش اشعه فرا بنفش می‌شوند (۹). ساختار ملانین به‌دلیل مشکلاتی که در جداسازی آن از منابع طبیعی و حلالیت ضعیف رنگ‌دانه وجود دارد، به‌ندرت مطالعه شده است. ملانین در آب و در حلال‌های ارگانیک متداول (مانند هگزان، کلروفرم، اتیل استات، اتانول، و متانول یا استون) نامحلول است. از این رو، تولید رنگ‌دانه‌های میکروبی اخیراً به‌عنوان یکی از زمینه‌های امیدوارکننده و نوظهور در نظر گرفته شده است (۱۰).

باکتری‌های تولید کنندهٔ ملانین شامل برخی از گونه‌های ائروموناس، استرپتومایسس، باسیلوس، ویبریو، و آلتروموناس هستند (۳، ۱۱-۱۳) ملانین تولید شده از باکتری‌های *ازتوباکتر کروکوکوم* و *بورخولدریا سنوسپاسیا* خاصیت آنتی اکسیدانی قوی داشته و به همین دلیل این باکتری‌ها می‌توانند در برابر رادیکال‌های آزاد محیطی از خود محافظت کنند (۱۴) .

جنس سودوموناس گونه‌ای ناهمگن با متابولیسم هوازی است که در آن از اکسیژن استفاده می‌شود. ناهمگونی جنس سودوموناس با مطالعات گسترده طبقه بندی بر اساس آزمایشات فنوتیپی و ژنوتیپی به طور قابل توجهی برطرف شده است. سویه‌های سودوموناس دو نوع رنگ‌دانه محلول شامل پیووردین و پیوسیانین تولید می‌کنند (۱۵). پیوملانین رنگ‌دانه قهوه‌ای محلول در آب توسط گونه‌های سودوموناس از جمله *سودوموناس ائروژینوزا*، *سودوموناس آلکالی‌ژنز*، و *سودوموناس پوتیدا* با استفاده از مکانیسم تیروزیناز در طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت می‌تواند سنتز شود (۵, ۱۶, ۱۷).

در این مطالعه باکتری *سودوموناس استوتزری* UIS2 به منظور تولید ملانین در حضور ال-تیروزین جداسازی شد. این اولین گزارش باکتری *سودوموناس استوتزری* است که فقط در حضور ال-تیروزین در دمای پایین میزان بالایی ملانین تولید می‌کند. رنگ‌دانه ملانین استخراج و ساختار آن با استفاده از روش‌های آنالیز اسپکتروسکوپی بررسی و خواص حفاظتی آن در برابر نور خورشید و مهار آنتی‌اکسیدانی آن تعیین شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری تولید کننده ملانین

برای جداسازی باکتری تولیدکننده ملانین از نمونه خاک، ۱ گرم از هر نمونه به ۱۰ میلی‌لیتر بافر نمکی ۸/۵٪ نرمال در یک فلاسک ۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد، و به مدت ۳۰ دقیقه بر شیکر ۶۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷درجه سلسیوس هم‌زنی شد (۱۸). سپس ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه سوسپانسیون در پلیت‌های نوترینت آگار حاوی ال-تیروزین (۲ گرم در لیتر) با روش کشت سطحی تلقیح شده و به مدت ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شدند. باکتری‌های مورد نظر بر اساس تولید رنگ‌دانه قهوه‌ای سیاه اطراف پرگنه جدا و خالص‌سازی شدند. شناسایی اولیه توسط رنگ‌آمیزی گرم، خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی انجام گرفت (۱۹-۲۱). تولید ملانین در حین رشد باکتری به وسیلهٔ اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۰ و ۶۰۰ نانومتر در مقایسه با استاندارد ملانین بررسی شد (۷).

شناسایی سویه‌ها با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی

با استفاده از پرگنه‌های خالص و تازه باکتری مورد نظر در پلیت، رنگ‌آمیزی گرم انجام شد و برای تأیید آن از تست KOH استفاده شد. برای شناسایی اولیه سویه‌های جدا شده از آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، نوع متابولیسم تخمیری یا اکسیداتیو با استفاده از محیط کشت OF (Oxidation fermentation medium)، رشد در شرایط بی‌هوازی با استفاده از محیط کشت تیوگلیکولات (Thioglycollate Agar)، حرکت، تولید اندول و سولفید هیدروژن

با استفاده از محیط کشت Sulfide Indole Motility Medium (SIM)، نوع تخمیر احتمالی توسط جدایه در محیط کشت MR/VP، مصرف قند (گلوکز، لاکتوز و...)، احیای نیترات، مصرف سیترات، هیدرولیز نشاسته در محیط نشاسته آگار، هیدرولیز ژلاتین، تولید لیپاز و لسیتیناز در محیط EYA (Egg Yolk Agar) و هیدرولیز اوره استفاده شد (۲۲).

آنالیز مولکولی و فیلوژنی باکتری

پس از استخراج ژن سویه جداسازی شده با استفاده از روش جوشاندن تودهٔ سلولی رشد یافته در محیط کشت لوریا-برتانی براث، شناسایی مولکولی با استفاده از پرایمرهای 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') و 27F-YM (5′-AGAGTTTGATYMTGGCTCA-3′) مربوط به ژن 16S rRNA و تکثیر قطعه با اندازه حدود ۱۵۰۰ زوج باز با روش PCR و ارسال قطعه تکثیر یافته برای تعیین توالی انجام پذیرفت. توالی حاصل از محصول فوق در NCBI بلاست شد و به‌منظور رسم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار MEGA-6 استفاده شد. برای این کار توالی‌های همولوگ سویه ابتدا از سایت NCBI گرفته شد و سپس توسط برنامه Muscle موجود در نرم‌افزار MEGA-6 هم ردیف شدند (۷).

استخراج رنگ‌دانه ملانین، و خالص‌سازی آن

برای تولید رنگ‌دانه، ابتدا پرگنه از کشت تازه سویهٔ جداشده به نوترینت براث انتقال داده شد و پس از انکوباسیون در ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت کدورت آن به ۱ رسانده شد و به میزان ۵٪ حجمی به محیط کشت تولید رنگ‌دانه شامل نوترینت براث حاوی ال- تیروزین تلقیح شد. به‌منظور استخراج ملانین، بعد از ۷۲ - ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس که تولید ملانین در محیط کشت به‌صورت رنگ‌دانه سیاه منتشر دیده شد، محیط مایع با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا مایع رویی از سلول‌ها جدا شود. رسوب جامد سلول‌های باکتری به‌صورت یک تودهٔ سفید رنگ در انتهای لوله رسوب کردند. مایع رویی جدا شده و رسوب دور ریخته شد. سپس اسیدیته مایع رویی با استفاده از کلریدریک اسید ۵ نرمال به ۳ رسانده شد. در این شرایط ملانین به‌صورت دانه‌های ریزی حالت معلق در سوپرناتانت پیدا کرده و رسوب یافت. ظرف محتوی ملانین به مدت ۸-۴ ساعت در یک مکان بدون حرکت قرار گرفت تا رسوب در ته ظرف و به‌صورت معلق در سوپرناتانت تشکیل شود. سپس با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا ملانین کاملاً رسوب کند. مایع رویی دور ریخته شد و ملانین جمع‌آوری گردید. رسوب ملانین با محلول استون- متانول به نسبت ۱:۱ دو بار شستشو داده شد، سپس در آون ۵۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی خشک، در حلال DMSO حل، و جذب UV آن در طول موج ۳۰۰-۲۰۰ نانومتر در مقابل ملانین استاندارد خوانده شد (۲۰, ۲۳). همچنین پودر ملانین برای آزمون‌های زیستی در یخچال و دور از نور نگهداری شد. به‌منظور تعیین میزان تولید رنگ‌دانه در شرایط کشت فوق، وزن رسوب نهایی ملانین برحسب میلی‌گرم بر حجم محیط اولیه نیز محاسبه شد.

اندازه‌گیری قدرت مهار اشعه آفتاب (SPF)

قدرت یک فراورده ضد آفتاب را با فاکتور حفاظتی در برابر نور خورشید (Sun Protection factor:SPF) مشخص می‌کنند. برای تعیین SPF ملانین استخراج شده به عنوان متابولیت ضد آفتاب، ابتدا آن را با غلظت مشخص در اتانول حل و سپس جذب UV آن از طول موج ۲۹۰ تا ۳۲۰ نانومتر با فاصله ۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و با معادله زیر محاسبه گردید (۲۴):

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE\lambda \times I[\lambda] \times Abs[\lambda]$$

که در آن EE مخفف طیف اثر اریتمی (Erythema effect spectrum)، I طیف شدت نور خورشیدی (Solar intensity spectrum)، Abs جذب نوری محصول ضد آفتاب (OD)، و CF فاکتور تصحیح (Correction factor) (=۱۰) است.

اندازه‌گیری قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت آزادسازی رادیکال آزاد عصاره رنگ‌دانه ملانین باکتری با استفاده از روش اصلاح شده برند- ویلیامز و همکاران، توسط ۲، ۲ دیفنیل-۱- پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، یک میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH در اتانول به ۲ میلی‌لیتر عصارهٔ ملانین در اتانول (غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد. مخلوط فوق به شدت تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس جذب در ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV-VIS) اندازه‌گیری شد. اسید اسکوربیک به عنوان ترکیب استاندارد استفاده و آزمایش در سه تکرار انجام پذیرفت. درصد مهار ترکیب DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (۴):

$$\text{DPPH inhibition (\%)} = \frac{(\text{control absorbance} - \text{test absorbance})}{\text{control absorbance}} \times 100$$

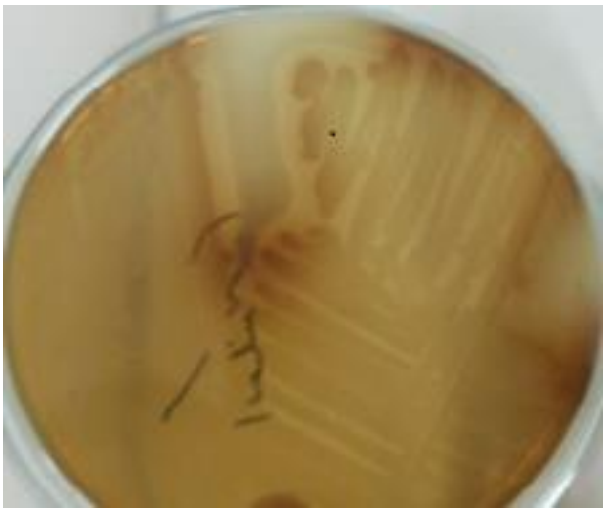
نتایج

جداسازی و غربالگری

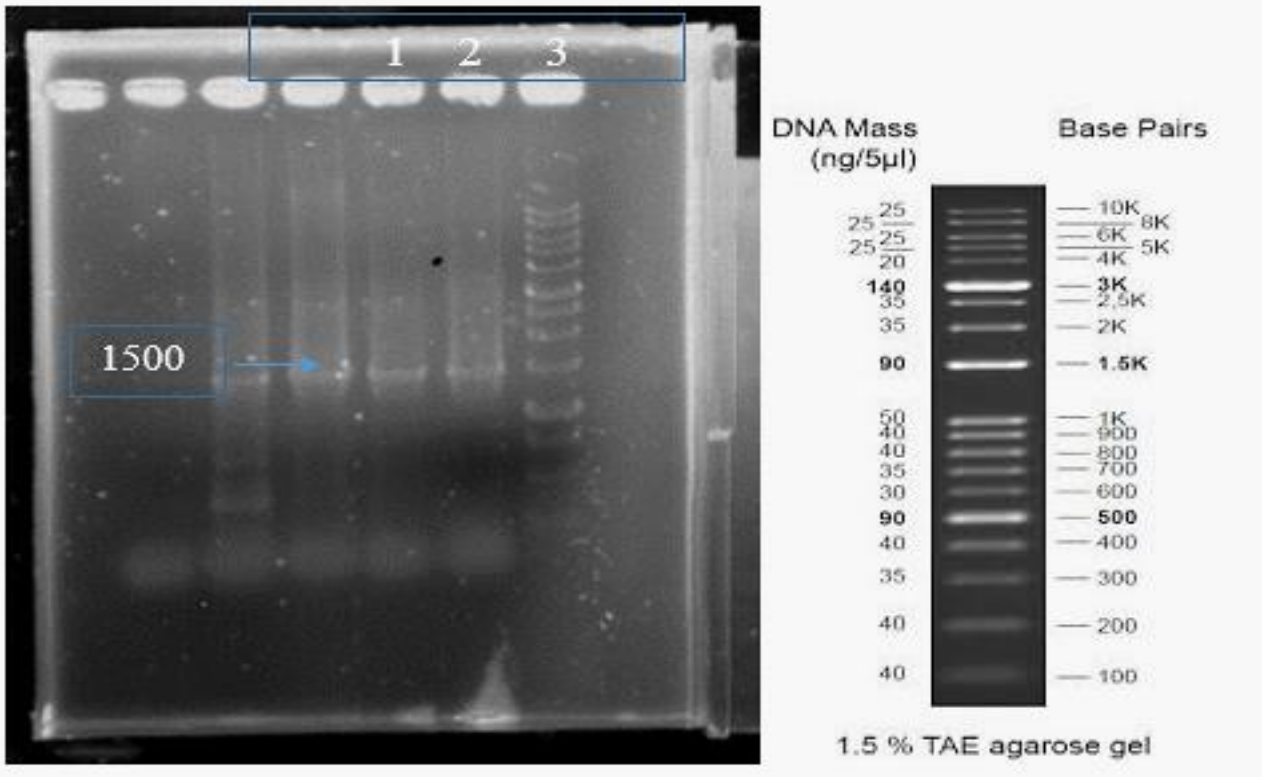
از میان باکتری‌های رشد یافته، باکتری میله‌ای گرم منفی بنام سویه UIS۲ از نمونه خاک پارک دانشگاه اصفهان با توانایی تولید ملانین بر روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی ال-تیروزین جداسازی شد. تشکیل منطقه قهوه‌ای یا سیاه در اطراف کلنی‌های جدا شده در محیط کشت نشان دهنده سنتز ملانین بوده است (شکل ۱).

ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی

سویه UIS۲ باکتری میله‌ای گرم منفی در این مطالعه به‌عنوان سویه‌ای با توانایی تولید ملانین توسط آنزیم تیروزیناز جداسازی شده و در محیط کشت‌های نوترینت آگار، سودوموناس آگار و King's B آگار به‌خوبی رشد یافته است. از مشخصات بیوشیمیایی این باکتری توانایی رشد در اسیدیته ۸.۵ و در دمای مطلوب ۳۵ درجه سلسیوس، در شرایط هوازی، کاتالاز و اکسیداز مثبت، ایندول، MR، VP و H_2S منفی، ژلاتیناز منفی، مصرف سیترات مثبت، هیدرولیز کازئین و نشاسته مثبت بوده است. پرگنه این باکتری به رنگ صورتی بر روی مک‌کانکی آگار، به رنگ زرد روی نوترینت آگار ، و به رنگ قهوه ای در تیروزین آگار دیده شد.



شکل ۱. باکتری *Pseudomonas stutzeri* بعد از ۲۴ ساعت در محیط نوترینت آگار حاوی ۲ گرم در لیتر ال-تیروزین، انکوبه شده در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در حال تجزیه ال-تیروزین و تولید اولیه ملانین.



شکل ۲. تصویر ژل PCR ژن 16S rRNA برخی سویه‌های جداسازی شده مولد ملانین: (۱) سویه UIS19، (۲) سویه UIS2، و (۳) DNA مارکر 1kb.

نتایج PCR، تعیین توالی ژن 16S rRNA و رسم درخت فیلوژنیک

تصویر ژل مربوط به PCR سویه جدا شده در شکل ۲ محصول ۱۵۰۰ زوج بازی را در مقابل مارکر DNA نشان داده است. توالی حاصل از محصول PCR پس از بلاست در NCBI شباهت ۹۹٪/۹۲ با باکتری *سودوموناس استوتزری* (شماره دسترسی AB680324.1) نشان داد. سویه جداسازی شده مولد رنگ‌دانه ملانین با شماره دسترسی MG519615 در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژیک NCBI GenBank ثبت شد. درخت فیلوژنتیک توسط ترازهای متعدد توالی با فواصل تکاملی توسط نرم افزار ساخته شد. توپولوژی درخت با انجام تجزیه‌وتحلیل bootstrap از ۱۰۰ مجموعه داده با نرم افزار MEGA6.1 بررسی شد (شکل ۳). درخت فیلوژنتیک آن نیز ارتباط نزدیک فیلوژنتیک سویه توالی‌یابی شده را با باکتری *سودوموناس استوتزری* نشان می‌دهد.

استخراج رنگ‌دانه قهوه ای سیاه و آنالیز اسپکتروفتومتری UV

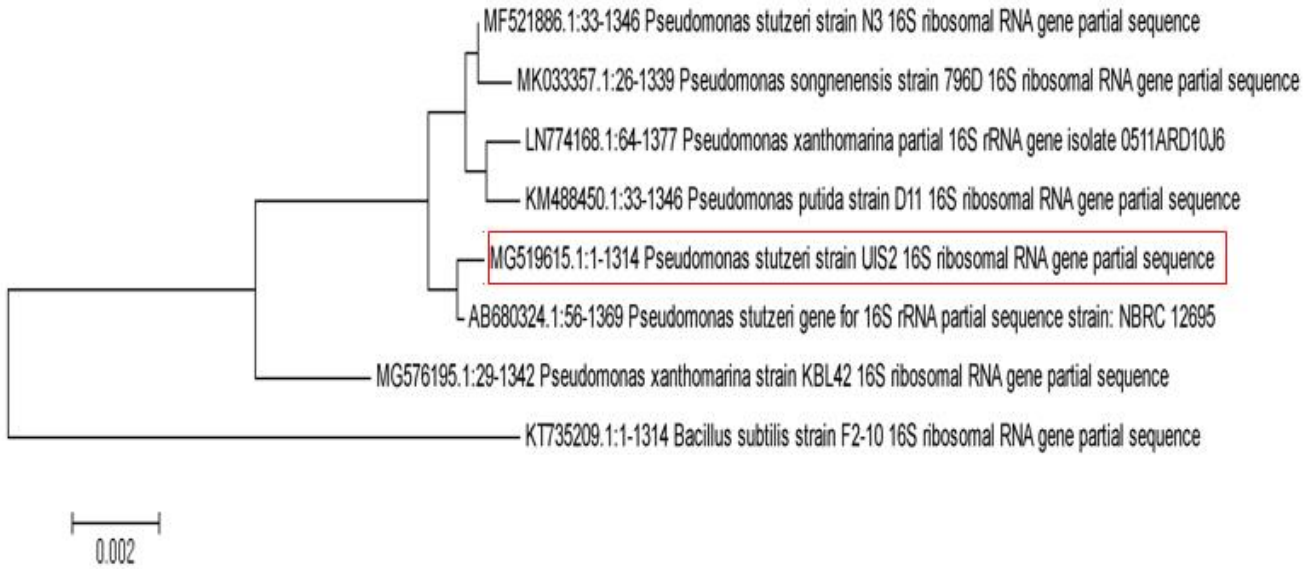
رنگ‌دانه ملانین در فاز سکون رشد باکتری بعد از ۷۰ ساعت با ظهور رنگ‌دانهٔ سیاه در محیط کشت براث تولید شد. به‌طور کلی تولید ملانین از این باکتری حدود ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. میزان خلوص ملانین با مشاهده پیک جذب در طول موج ۲۱۰ نانومتر مشاهده شد (شکل۴).

اندازه گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانتی با روش DPPH

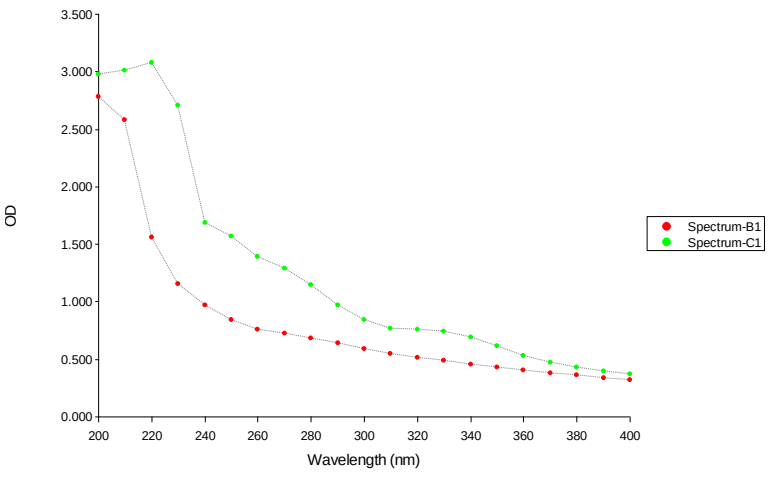
میزان مهار DPPH با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۵۱۶ نانومتر به میزان حدود ۷۵٪ و نزدیک به استاندارد آسکوربیک اسید (۷۸٪) به دست آمد که در شکل ۵ نشان داده شده است.

تعیین مقدار محافظت از آفتاب (SPF)

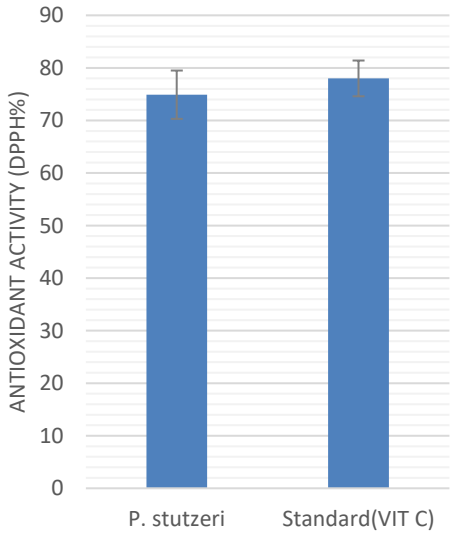
نتایج جذب UV در طول موج‌های مختلف و محاسبه SPF در جدول ۱ آورده شده است. مقدار SPF ملانین حاصل از سودوموناس استوتزری سویه UIS2 به عنوان ممانعت کننده از اشعه فرا بنفش معادل ۴۹/۰۵ به‌دست آمد.



شکل ۴. ندرخت فیلوژنی مربوط به سویه UIS2 جداسازی شده مولد ملانین (MG519615 شماره دسترسی سودوموناس جدا شده در کادر مشخص شده که توالی ژن 16S rRNA آن شباهت ۹۹/۹۲٪ با باکتری سودوموناس استوتزری با شماره دسترسی AB680324.1 داشته است).



شکل ۴. نمودار طول موج جذب ملانین استاندارد (B1) و ملانین خالص سویه UIS2 (C1) با دستگاه اسپکتروفتومتر UV



شکل ۵. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ملانین تولیدشده از *Pseudomonas stutzeri* UIS2 در مقایسه با استاندارد اسید اسکوربیک در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر از این ترکیبات در تست DPPH

جدول ۳. نتایج جذب نوری ملانین سویه جدا شده *Pseudomonas stutzeri* UIS2 به روش انحلال ملانین در متانول برای تعیین SPF

λ(nm)	Abs	EE.I	EE.I × Abs
۲۹۰	۰/۶۸۶	۰/۰۱۵	۰/۰۱۰۲۹
۲۹۵	۰/۶۷۲	۰/۰۸۱۷	۰/۰۵۴۹۰۲۴
۳۰۰	۰/۶۴۸	۰/۲۸۷۴	۰/۱۸۶۲۳۵۲
۳۰۵	۰/۸۳۱	۰/۳۲۷۸	۰/۲۷۲۴۰۱۸
۳۱۰	۰/۷۹۴	۰/۱۸۶۴	۰/۱۴۸۰۰۱۶
۳۱۵	۰/۶۴۲	۰/۰۸۳۹	۰/۰۵۳۸۶۳۸
۳۲۰	۰/۶۳۲	۰/۰۱۸	۰/۰۱۱۳۷۶

بحث

در مجموع در این مطالعه از نمونه خاک پارک دانشگاه اصفهان پرگنه باکتری *سودوموناس استوتزری* که توانایی تولید ملانین در حضور ال-تیروزین در محیط کشت‌های نوترینت برات و نوترینت آگار را داشت جداسازی، شناسایی و ثبت شد. نمونه‌برداری از این منطقه به‌دلیل وجود درخت‌های کاج و وجود اشعه مستقیم خورشید (گرم و خشک) انجام شد. باکتری‌هایی که توانایی رشد در خاک این منطقه بخاطر مخلوط شدن با برگ های سوزنی کاج که مملو از مواد آنتی باکتریال و آنتی‌اکسیدانت هستند بسیار با ارزش می باشند (۲۵).

این باکتری گرم منفی میله‌ای شکل و دارای فلاژل است و در شرایط هوازی و روی محیط کشت حاوی نشاسته و مالتوز رشد می‌کند و توانایی تجزیه آرژنین و گلیکوژن را ندارد. تفاوت آن با دیگر سویه‌های سودوموناس عدم تولید رنگ‌دانه فلورسنس است و بسیار شبیه به سویه‌های *سودوموناس پوتیدا* و *آلکالی‌ژنز* است. جداسازی این باکتری سخت است، زیرا شرایط غذایی محدود برای رشد نیاز دارد و در محیط کشت حاوی کمی نیترات آمونیوم و دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سلسیوس رشد مطلوبی دارد. سویه UIS2 طی مدت ۳ روز در محیط کشت حاوی ال- تیروزین تولید ملانین خارج

سلولی نموده است. تولید بالای ملانین در این سویه باکتری می‌تواند آن را به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای تولید این رنگ‌دانه در فرمانتورهای صنعتی معرفی نماید.

فرم کلنی تازه این باکتری با بقیه سودوموناس‌ها متفاوت است. کلنی به‌صورت خشک و سخت و چروکیده و به‌صورت منشعب دیده می‌شود ولی برداشتن آن از سطح محیط کشت جامد راحت است و بعد از مدتی شکل کلنی و رنگ آن تغییر پیدا می‌کند. برای این باکتری محدوده دمایی رشد بسیار وسیع بین ۴ الی ۴۵ درجه سلسیوس گزارش شده است (۲۶).

سویه UIS2 بومی جداشده به‌عنوان تولید کننده ملانین با استفاده از ال-تیروزین بر روی نوترینت آگار حاوی تیروزین در این پژوهش گزارش شده است. تولید ملانین در سودوموناس استوتزری سویه BTCZ10 برای اولین بار در سال ۲۰۱۴ گزارش شده است (۲۷). تولید ملانین در باکتری‌ها در حضور ال-تیروزین توسط آنزیم تیروزیناز یا واکنش‌های آنزیمی صورت می‌گیرد که بسیار وابسته به فاکتور مواد غذایی و شرایط رشد باکتری است. میزان ال-تیروزین بالا در تولید بیشتر ملانین موثر نیست به‌دلیل اینکه رشد باکتری بعد از مدتی در محیط کشت به‌خاطر کمبود مواد غذایی و فاز مرگ باکتری متوقف می‌شود و امکان استفاده از ال-تیروزین باقیمانده را ندارد. این باکتری به‌دلیل کاربرد وسیعش در بیوتکنولوژی و حذف آلودگی محیطی و همچنین مواد آرایشی مورد توجه بسیاری از محققین بوده است (۲۸).

شرایط تولید ملانین از لحاظ مواد غذایی لازم برای رشد و تولید برای هر خانواده باکتریایی متفاوت است (۲۹). سنجش ملانین توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شده و مقایسه آن با ملانین استاندارد (شرکت سیگما) در محدوده طول موج ۲۰۰-۲۲۰ نانومتر تعیین شده است. تولید ملانین در حضور ال تیروزین در باکتری‌های مختلف مانند استرپتومایسس‌ها (۳۰)، سودوموناس (۲۷, ۳۱, ۳۲)، کلستریدیوم و ازتوباکتر (۶) نیز گزارش شده است.

ملانیزاسیون نقش‌های مهمی مانند محافظت و سازگاری با عوامل تنش‌زا متعدد فیزیکی و شیمیایی مانند دما، تابش، رطوبت، و سمیت توسط آلاینده‌های مختلف در میکروارگانیسم‌ها را دارد (۳۳).

حداکثر تولید ملانین در سودوموناس جدا شده سویه UIS2 حدود ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد که در مقایسه با باکتری *استرپتومایسس بیکینینسیس* (*Streptomyces bikiniensis*) با ۱۶۶ میلی‌گرم بر لیتر ملانین در محیط کشت حاوی عصاره مخمر و پپتون میزان بالاتری است (حدود ۳/۶ برابر). در مخمر *یاروویا لیپولیتیکا* (*Yarrowia lipolytica*) تولید ملانین در حدود ۱۶۰ میلی‌گرم بر لیتر، و توسط کلبسیلا GSK (Klebsiella sp. GSK) با واسطه تیروزین حدود ۱۳۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است (۳۴). از طرفی، سویه HMGM-7 *سودوموناس استوتزری* در شرایط بهینه حدود ۶/۷ گرم بر لیتر تولید ملانین می‌کند (۲۰) که با توجه به بهینه سازی انجام شده در مقایسه با سویه جداسازی شده بومی در این پژوهش میزان بالاتری است.

ملانین تولید شده از قارچ *آسپرژیلوس بریجری* ICTF-201 (*Aspergillus bridgeri* ICTF-201) در کرم برای محافظت از پوست در برابر اشعه آفتاب و آسیب اکسیداتیو استفاده شده است. با توجه به بیماری‌زا بودن این قارچ و جداسازی پرهزینه متابولیت‌ها و خالص سازی آن، استفاده از باکتری‌های محیطی با تولید بالا مثل سویه جداسازی شده در این مطالعه پیشنهاد می‌شود (۲۲). ملانین در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در باکتری *سودوموناس بالریکا* U7 (*P. balearica* U7) فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی (۹۵٪) در مقایسه با اسید اسکوربیک نشان داده است (۵) که مشابه سویه UIS2 جدا شده در این مطالعه بوده است. ملانین باسیلوس TCZ31 فعالیت اصلاح رادیکال به میزان ۶۷/۵٪ را نشان داده است (۳۲). ملانین *سودوموناس گینه* (*P. guineae*) با دوز ۴۴/۷ میکروگرم بر میلی لیتر فعالیت مهار رادیکال بیش از ۹۰٪ را نشان داده است (۱۷). قدرت محافظت در برابر نور خورشید (SPF) سویه جدا شده در این پژوهش ۴۰/۰۵ به‌دست آمده است که در مقایسه با مواد سنتزی و طبیعی مورد استفاده در مواد آرایشی و بهداشتی بسیار مناسب است. همچنین لازم به ذکر است که تولید ملانین به‌عنوان یک ماده جلوگیری کننده از اشعه فرابنفش خورشیدی با استفاده از باکتری‌های محیطی غیر بیماریزا در حضور ال-تیروزین در مقایسه با متابولیت‌های تولید شده از جلبک‌ها و سیانوباکترها بسیار کم هزینه، سریع‌تر و با میزان تولید بالاتر است.

نتیجه‌گیری

سودوموناس استوتزری به عنوان باکتری تولید کننده ملانین در این پژوهش جدا شده که قادر به رشد در محیط ساده (نوترینت آگار) حاوی ال-تیروزین و سنتز ملانین بوده است. خواص بیولوژیکی ملانین سویه جدا شده برای کاربرد در صنعت تعیین شده است. رنگ‌دانهٔ ملانین این سویه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در برابر اشعهٔ فرا بنفش و تنش‌های اکسیداتیو ROS نشان داده است. ملانین جدا شده می‌تواند کاندیدای پیشنهادی برای استفاده در مواد آرایشی، دارویی، کشاورزی، و رفع آلودگی محیط زیست باشد. خواص

آنتی‌اکسیدانی آن می‌تواند آسیب DNA و سایر ترکیبات بیولوژیکی را مهار کند. علاوه بر این، ملانین به‌عنوان یک عامل محافظت کننده پوست در کرم‌ها و مواد آرایشی استفاده می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان بابت حمایت مالی این پژوهش که مربوط به پایان‌نامه دکتری بوده است تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض در منافع

در انجام مطالعهٔ حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته‌اند.

منابع مالی

منابع مالی این تحقیق توسط، دانشگاه اصفهان تامین شده است.

Referance

1. Tarangini K. Studies on pigment production by microorganisms using raw materials of agro-industrial origin: National Institute of Technology Rourkela; 2014.
2. Pombeiro-Sponchiado SR, Sousa GS, Andrade JC, Lisboa HF, Gonçalves R. Production of melanin pigment by fungi and its biotechnological applications. Melanin2017. p. 31. [DOI:10.5772/67375]
3. Kurian N, Bhat SG. Bacterial melanins. Microbial Bioproducts. 2014;1:97-110.
4. Zamanian SN, Etemadifar Z. Radical scavengering of pigments from novel strains of Dietzia schimae and Microbacterium esteraromaticum. Progress in Biological Sciences. 2017;6(2):159-70.
5. Zerrad A, Anissi J, Ghanam J, Sendide K, El Hassouni M. Antioxidant and antimicrobial activities of melanin produced by a Pseudomonas balearica strain. Journal of Biotechnology Letters. 2014;5(1):87-94.
6. Deshmukh KR, Pethe AS. Extraction and analysis of melanin pigment produced by Clostridium tertium isolated from water sample of saline belt in west Vidardha region. International Journal of Science and Research. 2016;5(8):812-4.
7. Gomila M, Pena A, Mulet M, Lalucat J, Garcia-Valdes E. Phylogenomics and systematics in Pseudomonas. Frontiers in Microbiology. 2015;6:214. [DOI:10.3389/fmicb.2015.00214] [PMID] [PMCID]
8. Le Na NT, Hoa PT, Thang ND. Natural melanin as a potential biomaterial for elimination of heavy metals and bacteria from aqueous solution. VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology. 2016;32(1).
9. Huang S, Pan Y, Gan D, Ouyang X, Tang S, Ekunwe SI, et al. Antioxidant activities and UV-protective properties of melanin from the berry of Cinnamomum burmannii and Osmanthus fragrans. Medicinal Chemistry Research. 2011;20(4):475-81. [DOI:10.1007/s00044-010-9341-2]
10. Mason HS. The chemistry of melanin III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. Journal of Biological Chemistry. 1948;172(1):83-99.
11. Sun S, Zhang X, Sun S, Zhang L, Shan S, Zhu H. Production of natural melanin by Auricularia auricula and study on its molecular structure. Food Chemistry. 2016;190:801-7. [DOI:10.1016/j.foodchem.2015.06.042] [PMID]
12. Nosanchuk JD, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. Cellular Microbiology. 2003;5(4):203-23. [DOI:10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x] [PMID]
13. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim S-K. Actinobacterial melanins: current status and perspective for the future. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2013;29(10):1737-50. [DOI:10.1007/s11274-013-1352-y] [PMID]
14. Keith KE, Killip L, He P, Moran G, Valvano M. Burkholderia cenocepacia C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogentisate intermediate. Journal of Bacteriology. 2007;189(24):9057-65. [DOI:10.1128/JB.00436-07] [PMID] [PMCID]
15. Zughaier SM, Ryley HC, Jackson SK. A melanin pigment purified from an epidemic strain of Burkholderia cepacia attenuates monocyte respiratory burst activity by scavenging superoxide anion. Infection and Immunity. 1999;67(2):908-13. [DOI:10.1128/IAI.67.2.908-913.1999] [PMID] [PMCID]
16. Ogunnariwo J, Hamilton-Miller J. Brown-and red-pigmented Pseudomonas aeruginosa: differentiation between melanin and pyorubrin. Journal of Medical Microbiology. 1975;8(1):199-203. [DOI:10.1099/00222615-8-1-199] [PMID]
17. Tarangini K, Mishra S. Production, characterization and analysis of melanin from isolated marine Pseudomonas sp. using vegetable waste. Research Journal of Engineering Sciences. 2013;2(5):40-6.
18. Arulselvi I, Sasidharan P, Raja R, Karthik C, Gurumayum RS. Isolation and characterization of yellow pigment producing Exiguobacterium sps. Journal of Biochemical Technology. 2013;4(4):632-5.

19. Drewnowska JM, Zambrzycka M, Kalska-Szostko B, Fiedoruk K, Swiecicka I. Melanin-like pigment synthesis by soil Bacillus weihenstephanensis isolates from Northeastern Poland. PLoS One. 2015;10(4):e0125428. [DOI:10.1371/journal.pone.0125428] [PMID] [PMCID]

20. Ganesh Kumar C, Sahu N, Narender Reddy G, Prasad RB, Nagesh N, Kamal A. Production of melanin pigment from Pseudomonas stutzeri isolated from red seaweed Hypnea musciformis. Letters in Applied Microbiology. 2013;57(4):295-302. [DOI:10.1111/lam.12111] [PMID]

21. Gholami M, Etemadifar Z. Isolation and characterization of a novel strain of genus Dietzia capable of multiple-extreme resistance. Microbiology. 2015;84(3):389-97. [DOI:10.1134/S0026261715030054]

22. Kumar CG, Mongolla P, Pombala S, Kamle A, Joseph J. Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of Aspergillus bridgeri ICTF-201. Letters in Applied Microbiology. 2011;53(3):350-8. [DOI:10.1111/j.1472-765X.2011.03116.x] [PMID]

23. Peix A, Berge O, Rivas R, Abril A, Velazquez E. Pseudomonas argentinensis sp. nov., a novel yellow pigment-producing bacterial species, isolated from rhizospheric soil in Cordoba, Argentina. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005;55(3):1107-12. [DOI:10.1099/ijs.0.63445-0] [PMID]

24. Kaplan C. High SPF sunscreen formulations. Google Patents; 2000.

25. Kim SJ, Park SY, Lee J, Chang M, Chung Y, Lee T-K. Biochemical compositions and biological activities of extracts from 3 species of Korean pine needles. Journal of Food and Nutrition Research. 2017;5(1):31-6.

26. Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, García-Valdés E, Palleroni NJ. Biology of Pseudomonas stutzeri. Microbiology and Molecular Biology Review. 2006;70(2):510-47. [DOI:10.1128/MMBR.00047-05] [PMID] [PMCID]

27. Kurian N, Nair H, Bhat S. Melanin producing Pseudomonas stutzeri BTCZ10 from marine sediment at 96 m depth (Sagar Sampada cruise 305). International Journal of Current Biotechnology. 2014;2(5):6-11.

28. Cordero RJ, Vij R, Casadevall A. Microbial melanins for radioprotection and bioremediation. Microbial Biotechnology. 2017;10(5):1186-90. [DOI:10.1111/1751-7915.12807] [PMID] [PMCID]

29. Hoa PT, Thuy LB, Thang ND. Natural melanin as a potential biomaterial for elimination of heavy metals and bacteria from aqueous solution. VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology. 2017;32(1S).

30. Dastager S, Li W-J, Dayanand A, Tang S-K, Tian X-P, Zhi X, et al. Seperation, identification and analysis of pigment (melanin) production in Streptomyces. African Journal of Biotechnology. 2006;5(8):1131-4.

31. Kwon SW, Kim JS, Park IC, Yoon SH, Park DH, Lim CK, et al. Pseudomonas koreensis sp. nov., Pseudomonas umsongensis sp. nov. and Pseudomonas jinjuensis sp. nov., novel species from farm soils in Korea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003;53(1):21-7. [DOI:10.1099/ijs.0.02326-0] [PMID]

32. Tarangini K, Mishra S. Production of melanin by soil microbial isolate on fruit waste extract: two step optimization of key parameters. Biotechnology Reports. 2014;4:139-46. [DOI:10.1016/j.btre.2014.10.001] [PMID] [PMCID]

33. Manivasagan P, Venkatesan J, Sivakumar K, Kim SK. Actinobacterial melanins: current status and perspective for the future. World J Microbiol Biotechnol. 2013;29(10):1737-50. [DOI:10.1007/s11274-013-1352-y] [PMID]

34. Sansinenea E, Ortiz A. Melanin: A solution for photoprotection of Bacillus thuringiensis based biopesticides. Biochemistry & Pharmacology. 2014;3(3):e161. [DOI:10.1007/s10529-014-1726-8] [PMID]