Melanin synthesis using some bacteria isolated from marine sediments

Dr. Ahmad Kara- Ali*
Dr. Yaser Hammad**
Dr. Badr Al Ali***
Mais Zwan****

(Received 29 / 5 / 2024. Accepted 22 / 7 /2024)

□ ABSTRACT □

Melanin is one of the important biological dyes produced by organisms, especially bacteria, as it plays an important role in the ecosystem and the life of organisms, and has an important role in various fields (food, pharmaceutical, industrial and others). In this study, the melanin-producing bacteria strain MKa1 was isolated and purified from the marine sediment of the estuary of Alkaber Alshemali River in Latakia on the medium of Agar-Tyrosine. This bacterial strain showed a clean zone around its colony and this means that it is melanin-positive. Next, melanin was produced using MKa1 bacteria in broth-tyrosine medium and incubated at 37°C for 30 days, then the production medium was centrifuged, and the concentration of melanin produced in the medium was determined using a specterophytometer at 400 nm. The functional groups of the produced melanin were identified using the Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). The results showed that the FTIR spectrum of the melanin molecule produced using MKa1 bacteria matched the FTIR spectrum of the standard melanin molecule, which confirms the importance of this research in the production of bioactive melanin using the bacterial strain MKa1 isolated from marine sediments.

Key words: Melanin, marine bacteria, FTIR.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* **Professor - High Institute of Marine Research - Tishreen University–Latakia- Syria**
** **Associate Professor - - Faculty of Agricultural Engineering - Tishreen University - Lattakia-Syria**
*** **Associate Professor -High Institute of Marine Research - Tishreen University - Lattakia – Syria**
**** **PhD Student, High Institute of Marine Research- Tishreen University – Lattakia- Syria**
mais.zwan@tishreen.edu.sy

اصطناع الميلانين باستخدام بعض البكتريا المعزولة من الرسوبيات البحرية

د. أحمد قره علي*
د. ياسر حماد**
د. بدر العلي***
ميس زوان****

(تاريخ الإيداع 29 / 5 / 2024. قبل للنشر في 22 / 7 / 2024)

□ ملخّص □

يعد الميلانين من الأصبغة الحيوية المهمة التي تنتجها الكائنات الحية وخاصة البكتريا حيث يلعب دوراً مهماً في النظام البيئي وحياة الكائنات، وله دور مهم في مجالات مختلفة (الغذائية، الصيدلانية، الصناعية وغيرها). تم في هذه الدراسة عزل وتنقية سلالة البكتريا المنتجة للميلانينMKa1 من الرسوبيات البحرية لمصب النهر الكبير الشمالي في اللاذقية وذلك على وسط آغار–تيروزين. أظهرت هذه السلالة البكتيرية هالة نظيفة حول مستعمرتها وهذا يعني أنها ايجابية الميلانين. بعد ذلك، تم انتاج الميلانين باستخدام البكتريا MKa1 في وسط المرق–التيروزين وتم الحضن عند درجة حرارة °37C لمدة 30 يوماً، ثم تثفيل وسط الإنتاج بعد انتهاء مدة الحضن، وقياس تركيز الميلانين الناتج في الوسط باستخدام السبيكتروفيتومتر عند طول موجة nm400. تم تحديد المجموعات الوظيفية للميلانين الناتج باستخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء (FTIR). بينت النتائج تطابق طيف الFTIR لجزيء الميلانين الناتج باستخدام بكتريا MKa1 مع طيف FTIR لجزيء الميلانين القياسي، مما يؤكد أهمية هذا البحث في إنتاج الميلانين الفعال حيوياً باستخدام السلالة البكتيرية MKa1 المعزولة من الرواسب البحرية.

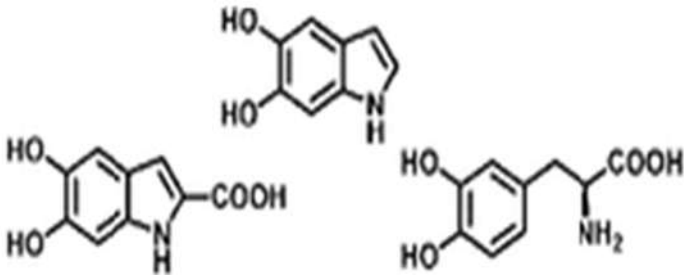
الكلمات المفتاحية: الميلانين، البكتيريا البحرية، FTIR.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين– سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY–NC–SA 04

*أستاذ – المعهد العالي للبحوث البحرية– جامعة تشرين – اللاذقية – سورية
** أستاذ مساعد – كلية الهندسة الزراعية– جامعة تشرين– اللاذقية – سورية
***أستاذ مساعد – المعهد العالي للبحوث البحرية– جامعة تشرين– اللاذقية – سورية
****طالبة دكتوراه – المعهد العالي للبحوث البحرية– جامعة تشرين– اللاذقية – سورية maiszwan22@gmail.com

مقدمة:

أظهرت الدراسات العلمية خطورة استخدام الأصبغة الصناعية على البيئة بشكل عام، وعلى الكائنات الحية والإنسان بشكل خاص، وخطورتها تكمن كونها مركبات كيميائية غير قابلة للتحلل وتسبب مشاكل صحية للكائنات المائية والانسان (كمسببات للسرطان، كعوامل ماسخة،...الخ) (Okafor *et al.,* 2016; Lellis *et al.,* 2019; Berradi *et al.,* 2019). بالنتيجة، إن عملية تطوير الأصبغة الصناعية وإيجاد طرق جديدة لتحللها مكلفة، الأمر الذي دفع التوجهات نحو استخدام الأصبغة الطبيعية المنتجة من الكائنات الحية الدقيقة والتي تتميز بمزايا لا حصر لها للبيئة والإنسان (Chatragadda and Dufossé, 2021). الميلانين عبارة عن أصبغة غير متجانسة ذات ألوان داكنة غالباً ما تكون كارهة للماء تتكون من البلمرة التأكسدية للمركبات الإندولية أو الفينولية(Nosanchuk and Casadevall, 2006; El-Naggar and El-Ewasy, 2017) الشكل (1). يتم تصنيع الميلانين بشكل طبيعي من قبل معظم الكائنات الحية بدءاً من الكائنات الحية الدقيقة وصولاً إلى الانسان وذلك من أجل الحماية من الأشعة فوق البنفسجية الضارة والإجهاد التأكسدي والحراري والبيوكيميائي (كالأكسجين الحر) (Allam and El-Zaher, 2012; El-Naggar and El-Ewasy, 2017). تعد الأحياء الدقيقة البحرية مصدراً محتملاً لإنتاج المركبات الكيميائية الحيوية وخاصة الميلانين كمنتجات طبيعية فعالة حيوياً وإمكانية استثمارها في عدد كبير من تطبيقات التقانة الحيوية، وذلك نظراً لانتشارها الواسع وتنوعها وما تتمتع به من خصائص فريدة (Corinaldesi *et al.,* 2017; Poulose *et al.,* 2020).



الشكل (1): الميلانين (Cao *et al.,* 2021)

يتم استخدام الميلانين حالياً في العديد من التطبيقات المهمة في مجال الصحة منها : كمضاد للإلتهابات و الميكروبات (Manivasagan *et al.,* 2013; Kurian *et al.*, 2015)، مضاد للسرطان (El-Obeid *et al.*, 2006) ومضاد للسموم (Hung *et al.*, 2004). يمتلك الميلانين أيضا العديد من التطبيقات التجميلية (تنعيم وحماية الشعر والجلد من آثار الأشعة فوق البنفسجية)(Poulose *et al.*, 2020) حيث يقوم بامتصاص الأشعة فوق البنفسجية (Allam and El-Zaher, 2012) والأشعة السينية وأشعة γ ويعمل الميلانين كنواقل للأدوية (Ye *et al.*, 2014). كذلك للميلانين تطبيقات زراعية (إنتاج مبيدات حشرية صديقة للبيئة مستقرة للضوء) (Liu, 2013). كما استخدم صناعياً في صناعة الرقائق البلاستيكية الصلبة، العدسات، والدهانات والورنيش وغيرها من البنى لحماية الأسطح وتوفير حماية أكبر من الأشعة الفوق بنفسجية(Gallas and Eisner, 2006)

نظراً لظروف الحصار الاقتصادي الحالي الذي تعيشه سوريا خلال الأعوام الأخيرة وعدم توفر المواد الأولية المستخدمة في المجال الطبي والصيدلاني والصناعي كان لابد من الاعتماد على الموارد الطبيعية وخاصة الموارد البحرية من إنتاج مواد حيوية ذات قيمة طبية، صيدلانية وصناعية.

أهمية البحث وأهدافه:

أهمية البحث:

تكمن أهمية البحث في التقليل من استخدام واصطناع الأصبغة الكيميائية ذات الأثر الصحي والبيئي المدمر من جهة و إنتاج الميلانين باستخدام أحد أهم الموارد الحية البحرية (وهي البكتريا البحرية)، على اعتباره صديقًا للبيئة والبديل الاقتصادي للأصبغة الكيميائية الصناعية. بالإضافة لما تعانيه سورية من حصار اقتصادي حالي وعدم توفر المواد الأولية المستخدمة في المجال الطبي والصيدلاني والصناعي. يتمتع الميلانين بخصائص فيزيوكيميائية فريدة جعلته من أحد أهم البوليميرات الفعالة حيوياً والمهمة لمجموعة متنوعة من التطبيقات (الطبية، الصيدلانية، التجميلية، الزراعية، البيئية، الصناعية، ..إلخ)

أهداف البحث:

- ✓ عزل بعض السلالات البكتيرية البحرية المنتجة للميلانين من العينات الرسوبية.
- ✓ تحديد الميلانين الناتج للعينات المدروسة ودراسته

طرائق البحث ومواده:

1-جمع العينات:

تم جمع العينات الرسوبية من موقع مصب النهر الكبير الشمالي حيث يعد منطقة متأثرة بمصب قنوات الصرف الزراعية والصحية. تم جمع الرسوبيات بواسطة عبوات بلاستيكية معقمة سعة 100مل عام 2023، ومن ثم نقلها مباشرة إلى المعهد العالي للبحوث البحرية لإجراء العزل والتنقية.

2-عزل البكتريا المنتجة للميلانين:

أجريت سلسلة التخفيفات للرسوبيات البحرية وذلك بأخذ 10g منها وتخفيفها بـ 100 مل ماء مقطر معقم، ثم إجراء سلسلة من التخفيفات من 10^{-1} حتى 10^{-6}. ثم عزلها على وسط آغار تيروزين (Kurian *et al.,* 2014,2019) وذلك كاختبار أولي للكشف عن البكتريا المنتجة للميلانين.

إن البكتريا التي استطاعت أن تشكل مناطق واضحة ونظيفة حول مستعمراتها تم عزلها وتنقيتها عدة مرات ورمز لها بـ MKa1 وثم حفظها في الغليسيرول 25% عند الدرجة C° 20- .

3-إنتاج الميلانين

تم إجراء فحص تالي للبكتريا المعزولة واختبارها لإنتاج الميلانين في وسط مرق التيروزين (Yabuuchi and Ohyama, 1972) والذي تم تحضيره كما يلي: KH_2PO_4: 2 g، tyrosine:2 g ، Nacl : 5 g ، $MgSo_4.7H_2o$: 0.1 g ، ph= 7 ، ماء مقطر: 1000 ml ثم تعقيمه بالأتوكلاف عند الدرجة C° 121 لمدة 20 دقيقة. ثم تم تنشيط العزلات البكتيرية موجبة الميلانين في الاختبار الأولي في مرق مغذي عند الدرجة C° 30 درجة مئوية لمدة 24 ساعة.

ثم أضيف 5 مل من معلق المزرعة البكتيرية MKa1 كلاقحة أولية إلى 50 مل من المرق التيروزين المذكور أعلاه وذلك في عبوات زجاجية معقمة سعة 500 مل ثم وضعها على هزاز 140 دورة/ دقيقة عند درجة حرارة C°37 (Kurian and Bhat, 2018) لمدة 30 يوم.

4-تقدير كمية الميلانين في الوسط باستخدام جهاز السبيكتروفيتومتر:

تم قياس إنتاج الميلانين في الوسط أولاً قبل عملية استخلاص بودرة الميلانين، وذلك كالتالي :عند انتهاء مدة التجربة تم تثفيل الوسط ، ثم القياس باستخدام السبيكتروفيتومتر عند طول موجة 400 نانومتر (Turick *et al.,* 2002) بالمقارنة مع الميلانين العياري.

5-استخلاص الميلانين:

عند انتهاء الحضن تم تثفيل وسط الإنتاج المتلون باللون الأسود عند 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق لإزالة الكتلة الحيوية للبكتريا المستزرعة كما في الشكل (2، أ، ب). ثم تم تعديل درجة حموضة المحلول الطافي الحاوي على الميلانين إلى pH =2 باستخدام Hcl 5N وترك جانباً لتمام الترسيب لمدة أسبوع في درجة حرارة الغرفة (Kurian *et al.,* 2015). ثم تثفيل الوسط مرة ثانية عند 8000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة. ثم غسيل حبيبات الصبغة بالماء المقطر مرتين مع التثفيل عند 8000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة.

ثم غسلت مرتين بالإيتانول وجففت بالهواء (Sajjan *et al.,* 2013)، وبعد ذلك خزنت الصبغة عند الدرجة°C 20- لاستخدامها في التحاليل اللاحقة.

6-تحليل الميلانين الناتج باستخدام جهاز فورييه لتحويل طيف الأشعة تحت الحمراء (FTIR):

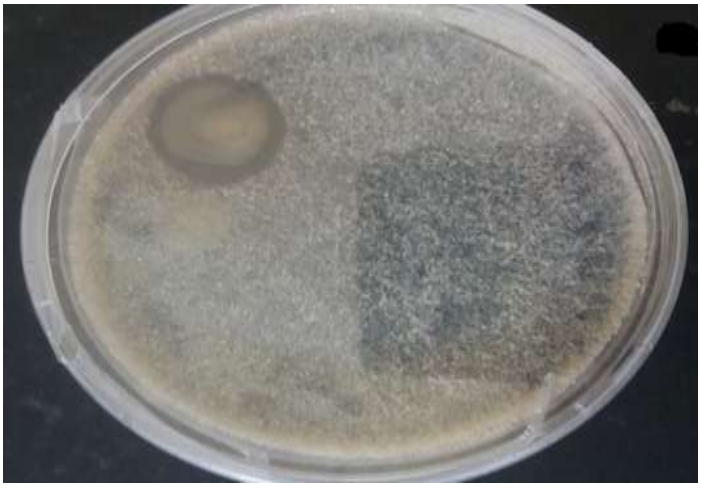
تم مزج 1 mg من بودرة الميلانين مع 12 mg من KBr الجاف النقي وحولت إلى حبيبات، وبعد ذلك تم قياس الكثافة النسبية لنقل طاقة الضوء مقابل الطول الموجي للامتصاص بين $400-4000\ cm^{-1}$.

النتائج والمناقشة:

1-عزل العزلات البكتيرية المنتجة للميلانين:

عند عزل البكتريا من الرسوبيات البحرية على وسط آغار تيروزين أعطت عزلة بكتيرية هالة واضحة نظيفة حول مستعمرتها وهذا يعني استهلاكها للتيروزين (Kurian *et al.,* 2014) والذي يعد أساساً لتركيب الميلانين. فقد كانت MKa1 (عند التخفيف10^{-3}) مستعمرة كبيرة الحجم مكتملة الحواف تبدو بلون أبيض لامع شكل **(3)**. ثم تم عزلها وتنقيتها عدة مرات على وسط آغار مغذي ثم حفظها في الغليسيرول عند الدرجة °C 20- لحين إجراء التجارب اللاحقة عليها.

الشكل (2): (أ) وسط انتاج الميلانين (المرق- التيروزين) باستخدام MKa1 بعد انتهاء التجربة 30يوم عند الدرجة C 37، (ب) المرحلة الأولى من استخلاص الميلانين تثفيل وسط الإنتاج المتلون بعد انقضاء مدة التجربة لترسيب الكتلة الخلوية.



الشكل (3): مستعمرة البكتريا MKa1 تظهر حولها هالة نظيفة على وسط (الآغار- التيروزين) بعد انتهاء الحضن عند الدرجة 37 لمدة 7 أيام

2-تقدير كمية الميلانين في وسط الانتاج:

تم تقدير كمية الميلانين في وسط الإنتاج للسلالة البكتيرية MKa1 باستخدام جهاز السبيكتروفيتومتر عند طول موجة 400 nm بالمقارنة مع الميلانين الصناعي كستاندر، وذلك بعد انقضاء مدة التجربة واجراء التثفيل للتخلص من الخلايا. فقد كان تركيز الميلانين في الوسط المتلون الذي أنتجته العزلة MKa1 هو 0.0679µg/ml

بعد الانتهاء من عملية الاستخلاص تم الحصول على الميلانين الجاف على شكل مسحوق أسود اللون ذو حبيبات دقيقة جداً.

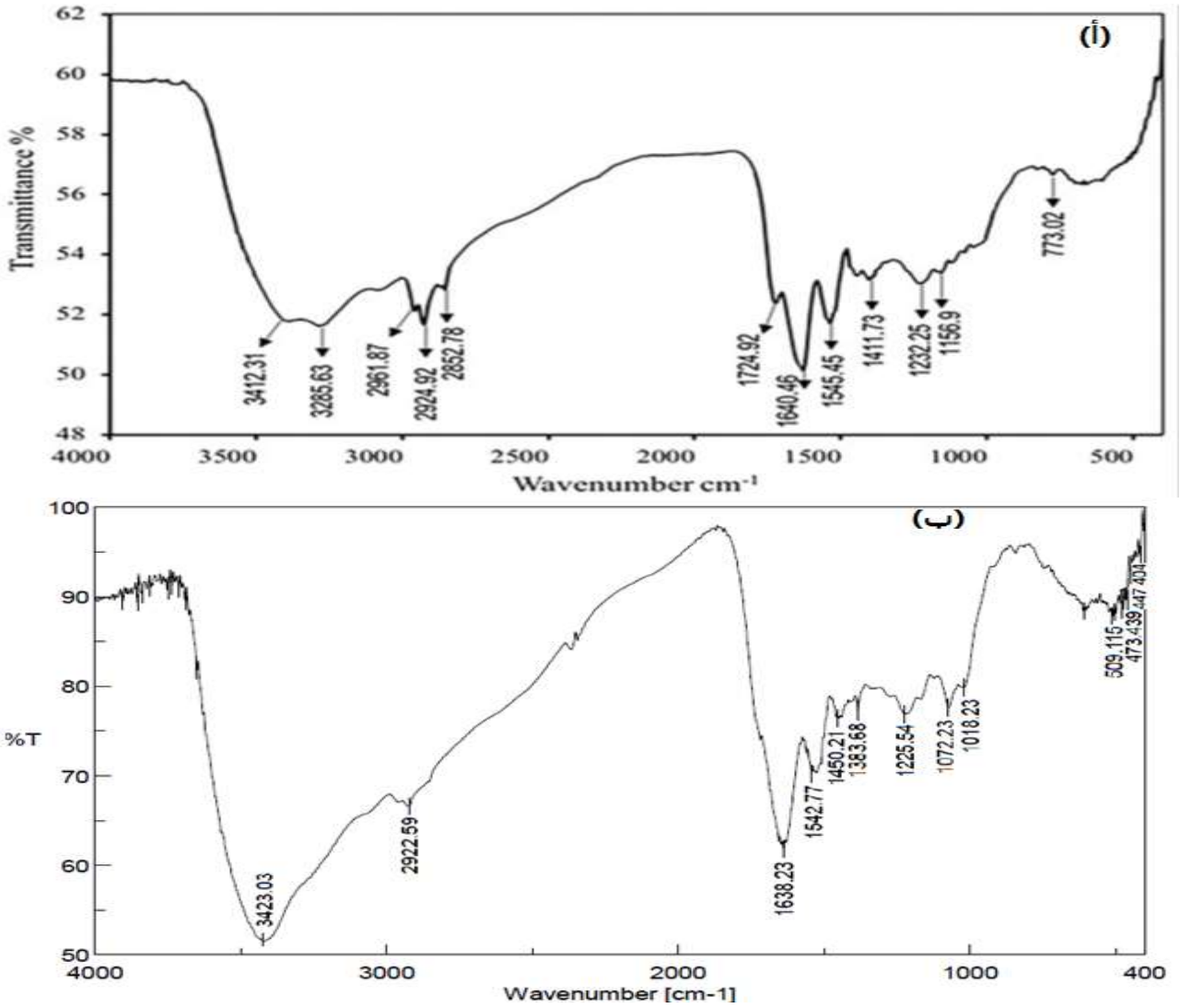
3-مطيافية الأشعة تحت الحمراء(FT-IR):

يشير العدد الموجي للقيم الطيفية والتي تم الحصول عليها أن المركب الناتج يملك بنية مشابهة للميلانين المرجعي الشكل (4، أ، ب). يوضح طيف الـ FT-IR امتصاصاً واسعاً حول $3423\ cm^{-1}$ وهذا يشير إلى وجود رابطة قوية وواسعة الامتطاط لكل من المجموعة الوظيفية لـ – OH و– NH بين الجزيئات (Kurian and Bhat, 2018) كما هو موضح في الشكل (4، ب).

وتعزى القمة الصغيرة التي لوحظت عند $2922\ cm^{-1}$ إلى امتطاط المجموعة الوظيفية C–H الأليفاتية من شقوق الإندول في جزيئات صبغة الميلانين (Joshi *et al.,* 2021). تُعزى القمم الموجودة بين 2800–3600 cm^{-1} إلى امتطاط المجموعات الوظيفية (O–H و N–H) للأمين أو الأميد أو حمض الكربوكسيل، الوظائف الأمينية الحمضية والفينولية والعطرية الموجودة في الأنظمة الاندولية (Magarelli *et al.,* 2010).

سجل طيف الـ FT–IR امتصاصاً واسعاً حول $1638\ cm^{-1}$ وهذا يعزى إلى امتطاط C – C أو C – O وكذلك امتصاصاً عند العدد الموجي $1450\ cm^{-1}$ ويعود هذا إلى حالة انحناء المجموعة C–H وهذا ما تم التوصل إليه في أطياف الـ FT–IR صبغات الميلانين الميكروبية الأخرى (Aghajanyan *et al.,* 2005 ;Kumar *et al.,* 2013; Joshi *et al.,* 2021)

تعود القمم المميزة بين $1450\ cm^{-1}$ و$1638\ cm^{-1}$ إلى الحلقة العطرية امتداد C=C (Kurian and Bhat, 2018)الشكل (4) وهذا يؤكد الطبيعة البوليفينولية والعطرية للميلانين الناتج MKa1



الشكل (4): طيف FTIR لكل من : (أ) جزيء الميلانين مرجعياً (Ghadge *et al.,* 2020)

(ب) جزيء الميلانين الناتج باستخدام بكتريا MKa1

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1.تم عزل السلالة البكتيرية MKa1 من الرسوبيات البحرية القادرة على انتاج الميلانين.

2. تم إنتاج الميلانين باستخدام السلالة المعزولة واستخلاصه من وسط الانتاج.

التوصيات:

الاستمرار في مثل هذه الدراسات لما لها من أهمية اقتصادية كبيرة، واستغلال الموارد الحية البحرية المتجددة و تطبيق نتائج هذه الدراسة في مجالات هامة ومتنوعة.

References:

1. Aghajanyan, A. E.; Hambardzumyan, A. A.; Hovsepyan, A. S.; Asaturian, R. A.;Vardanyan, A. A., & Saghiyan, A. A. . *Isolation, Purification And Physicochemical Characterization Of Water-Soluble Bacillus Thuringiensis Melanin*. Pig.Cell Res., Vol.18, 2005, 130–5.

2. Allam, N. G. & El-Zaher, E. A. *Protective Role Of Aspergillus Fumigatus Melanin Against Ultraviolet (Uv) Irradiation And Bjerkandera Adusta Melanin As A Candidate Vaccine Against Systemic Candidiasis*. Afr. J. Biotechnolm, Vol. 11, 2012, 6566–6577.

3. Berradi, M.; Hsissou, R.; Khudhair, M.; Assouag, M.; Cherkaoui, O.; El Bachiri, A. & El Harfi, A. *Textile Finishing Dyes And Their Impact On Aquatic Environs*. Heliyon, Vol. 5, 2019, E02711

4. Cao, W., Zhou, X., Mccallum, N. C., Hu, Z., Ni, Q. Z., Kapoor, U., ... & Gianneschi, N. C. *Unraveling The Structure And Function Of Melanin Through Synthesis*. Journal Of The American Chemical Society, Vol. 143, N°. 7, 2021, 2622-2637.

5. Chatragadda, R. & Dufossé, L. *Ecological And Biotechnological Aspects Of Pigmented Microbes: A Way Forward In Development Of Food And Pharmaceutical Grade Pigments*. Microorganisms, Vol. 9, 2021, 637. Https://Doi.Org/10.3390/Microorganisms9030637

6. Corinaldesi, C.; Barone, G.; Macellini, F.; Anno, A.D. & Danovarano, R. *Marine Microbial-Derived Molecules And Their Potential Use In Cosmeceutical And Cosmetic Products*. Marine Drugs, Vol. 15, 2017, 118.

7. El-Naggar E. N.& El-Ewasy M. S. *Bioproduction, Characterization, Anticancer And Antioxidant Activities Of Extracellular Melanin Pigment Produced By Newly Isolated Microbial Cell Factories Streptomyces Glaucescens Neae-H*.
Scientific Reports, 2017, Vol. 7, N°. 1, 1-19 Doi: 10.1038/Srep42129

8. El-Obeid, A.; Al-Harbi, S.; Al-Jomah, N. & Hassib, A. *Herbal Melanin Modulates Tumor Necrosis Factor Alpha (Tnf-A), Interleukin 6 (Il-6) And Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Production*. Phytomed , Vol.13, 2006, 324–333.

9. Gallas, J. & Eisner, M. *Melanin Polyvinyl Alcohol Plastic Laminates For Optical Applications*. Us Patent, No. 7, 029, 758, 2006

10. Ghadge, V.A.; Kumar, P.; Singh, S.; Mathew, D.E.; Bhattacharya, S.; Nimse, S.B. & Shinde, P.B. *Natural Melanin Produced By The Endophytic Bacillus Subtilis 4np-Bl Associated With The Halophyte Salicornia Brachiata.* J. Agric. Food Chem. 68, 2020, 6854–6863. Https://Doi.Org/10.1021/Acs.Jafc.0c01997.

11. Hung, Y. C.; Sava V.; Hong, M. Y. & Huang, G. S. *Inhibitory Effects On Phospholipase A2 And Antivenin Activity Of Melanin Extracted From Thea Sinensis Linn*. Life Sci, Vol. 74, 2004, 2037–2047.

12.Joshi, M. H.; Patil, A. A., & Adivarekar, R. V.. *Characterization Of Brown-Black Pigment Isolated From Soil Bacteria, Beijerinckia Fluminensis*. Biorxiv. 2021, 2021-07.
13.Kumar, C. G.; Sahu, N.;Reddy, G. N.; Prasad, R. B. N.; Nagesh, N. & Kamal, V. *Production Of Melanin Pigment From Pseudomonas Stutzeri Isolated From Red Seaweed Hypnea Musciformis*. Letters In Applied Microbiology. Vol. 57, N.°4, 2013, 295–302.
14. Kurian N. K.; Nair H. P. & Bhat S. G. *Melanin Producing Pseudomonas Stutzeri Btcz10 From Marine Sediment At 96 M Depth (Sagar Sampada Cruise #305)*. International Journal Of Current Biotechnology. Vol.2, N.° 5, 2014, 6-11.
15. Kurian, N. K. & Bhat, S. G. *Food, Cosmetic And Biological Applications Of Characterized Dopa-Melanin From Vibrio Alginolyticus Strain Btkks3*. Applied Biological Chemistry, Vol. 61, 2018 , 163-171.
16. Kurian, N. K.; Harisree, N. & Bhat, S. G. *Characterization Of Melanin Producing Bacteria Isolated From 96cm Depth Arabian Sea Sediments*. Rasearch Journal Of Biotechnology, Vol.14, N.° 3, 2019, 64-71.
17. Kurian, N. K.; Nair, H. P. & Bhat, S. G. *Evaluation Of Anti-Inflammatory Property Of Melanin From Marine Bacillus Sp. Btcz31*. Asian Journal Of Pharmaceutical And Clinical Research, Vol. 8, N.° 3, 2015, 251–255.
18. Lellis, B.; Fávaro-Polonio, C.Z.; Pamphile, J.A. & Polonio, J.C. *Effects Of Textile Dyes On Health And The Environment And Bioremediation Potential Of Living Organisms*. Biotechnology Research And Innovation, Vol. 3, N.° 2, 2019, 275–290.
19. Liu, F.; Yang, W.; Ruan, L. & Sun, M. *A Bacillus Thuringiensis Host Strain With High Melanin Production For Preparation Of Light-Stable Biopesticides*. Ann Microbiol , Vol. 63, 2013, 1131–1135. Https://Doi.Org/10.1007/S13213-012-0570-0.
20. Magarelli, M., Passamonti, P. & Renieri, C. *Purification, Characterization And Analysis Of Sepia Melanin From Commercial Sepia Ink (Sepia Officinalis).* Revista Ces Medicina Veterinaria Y Zootecnia, Vol.5, N.° 2, 2010, 18–28.
21. Manivasagan, P.; Venkatesan, J.; Senthilkumar, K.; Sivakumar, K. & Kim, S. K. *Isolation And Characterization Of Biologically Active Melanin From Actinoalloteichus Sp*. Ma-32. International Journal Of Biological Macromolecules, Vol. 58, 2013, 263–274.
22. Nosanchuk J.D. & Casadevall A. (2006) *Impact Of Melanin On Microbial Virulence And Clinical Resistance To Antimicrobial Compounds.* Antimicrobial Agents And Chemotherapy. Vol. 50, N.° 11, 3519-3528.
23. Okafor, S.N.; Obonga, W.; Ezeokonkwo, M.A.; Nurudeen, J.; Orovwigho, U. & Ahiabuike, J. *Assessment Of The Health Implications Of Synthetic And Natural Food Colourants-A Critical Review*. Uk Pharmaceutical And Biosciences Journal, Vol. 4, 2016, 1–11.
24. Poulose, N.; Sajayan, A.; Ravindran, A.; Sreechithra, T.V.; Vardhan, V.; Selvin, J. & Kiran, G.S. *Photoprotectective Effect Of Nanomelanin-Seaweed Concentrate In Formulated Cosmetic Cream: With Improved Antioxidant And Wound Healing Properties*. Journal Of Photochemistry & Photobiology, B:Biology, Vol. 205, 2020, 111816.
25.Sajjan, S. S.; Anjaneya, O.;Kulkarni, G. B.; Nayak, A. S.; Mashetty, S. B., & Karegoudar, T. B. *Properties And Functions Of Melanin Pigment From Klebsiella Sp. Gsk*. Korean Journal Of Microbiology Biotechnology, Vol.41, N.° 1, 2013, 60-69.
26. Turick, C. E.; Tisa, L. S., & Caccavo, Jr, F. *Melanin Production And Use As A Soluble Electron Shuttle For Fe (Iii) Oxide Reduction And As A Terminal Electron Acceptor By Shewanella Algae Bry*. Applied And Environmental Microbiology, Vol.68, N.° 5, 2002, 2436-2444.

27. Yabuuchi E. And Ohyama A. *Characterization Of "Pyome1anin"-Producing Strains Of Pseudomonas Aeruginosa*. International Journal Of Systematic Bacteriology. Vol.22, N.° 2, 1972, 53-64.
28. Ye, M., Guo, G. Y., Lu, Y., Song, S., Wang, H. Y., & Yang, L. *Purification, Structure And Anti-Radiation Activity Of Melanin From Lachnum Ym404*. International Journal Of Biological Macromolecules, Vol. 63, 2014, 170–176.