مجله بوم‌شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

بهینه‌سازی استخراج ترکیب زیستی ملانین از جوهر ماهی مرکب *Sepia pharaonis*

طیبه زارعی کریانی[۱]، مرتضی یوسف زادی[۲*]، معروف زارعی[۳]

[۱] گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

[۳] گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۹/۰۲/۲۰
اصلاح: ۹۹/۰۵/۲۰
پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۴

کلمات کلیدی:
آنتی‌اکسیدان
بی‌مهرگان
سپیا
ملانین

چکیده

ملانین به‌عنوان یکی از اجزای اصلی رنگ‌دانه جوهر ماهی مرکب، باعث ایجاد ارتباط قوی با گروه هیدروکسیل TiO2 می‌شود. پژوهش حاضر با هدف تعیین روش مناسب جهت استخراج ملانین از جوهر ماهی مرکب *(Sepia pharaonis)* انجام گرفت. به‌منظور استخراج ملانین از چهار روش اسید و باز، استخراج با استفاده از رقیق‌سازی جوهر ماهی مرکب، استخراج با استفاده از خشک‌کردن کیسه جوهر و استخراج به‌وسیله شستشو با سانتریفیوژ؛ استفاده شد. همچنین برای سنجش قدرت احیاکنندگی نمونه، روش ردیوس پاور به‌کارگرفته شد. آنالیز داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری درروش های مختلف استخراج وجود داشت، به‌طوری‌که روش شستشو با آب دیونیزه و سانتریفیوژ با ۶۶/۱۲ درصد و روش شستشو با آب دیونیزه و هموژنیزه با ۲۲/۴۲ درصد به‌عنوان روش بهینه تعیین شدند. این در صورتی است که بهترین عملکرد آنتی‌اکسیدانی ملانین درروش شستشو با استفاده از سدیم هیدروکسید و هیدروکلریک اسید و روش شستشو با آب دیونیزه و سانتریفیوژ مشاهده شد. بهترین عملکرد آنتی‌اکسیدانی در هر چهار روش در ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر مشاهده شد. طبق نتایج به‌دست‌آمده، از بین روش‌های موردمطالعه، روش شستشو با آب دیونیزه و سانتریفیوژ بهترین روش استخراج ملانین تعیین شد.

مقدمــه

محیط دریا سرشار از ارگانیسم‌های شناخته‌شده است که از مواد فعال زیستی به‌عنوان یک ابزار معمولی دفاع و یا حفاظت از خود در برابر تهاجم موجودی دیگر استفاده می‌کنند. این ارگانیسم‌ها به‌عنوان غذای دریایی، منبع خوبی از پروتئین حیوانی محسوب می‌شوند، زیرا مقدار زیادی از اسیدهای چرب اشباع‌نشده دارند (Edward and Murugan, 2000). ماهیان مرکب یکی از مهم‌ترین منابع غذایی پروتئینی و منبع خوب ضدمیکروبی هستند. آن‌ها در گروه بی‌مهرگان طبقه‌بندی می‌شوند. این رده شامل حدود ۱۰۰۰ گونه شناخته‌شده است که در حدود ۲/۰۷ درصد از گونه شاخه بی‌مهرگان را تشکیل می‌دهند (Ismail and Riad, 2018). ماهیان مرکب می‌توانند از خود در برابر شکارچیان با خروج جوهر سیاه‌رنگ محافظت کنند. این جوهر

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: morteza110110@gmail.com

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

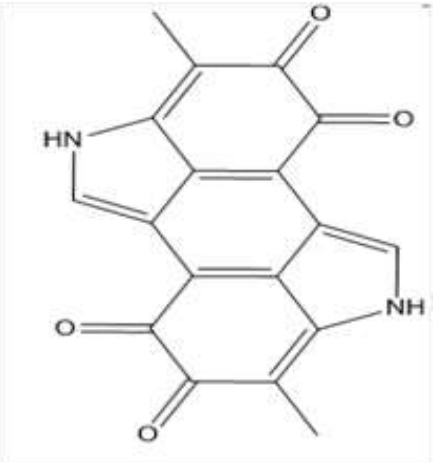
[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.5.2]

حاوی ترکیباتی است که قادر است حساسیت شیمیایی شکارچیان را از کار بیندازد و آن‌ها را گمراه کند (Dong *et al.*, 2017; Harnedy and FitzGerald, 2012; Kim *et al.*, 2012). جوهر ماهی مرکب حاوی CaCO3 ، MgCO3، NaCl وNa2SO4 ، آنزیم‌ها و سایر پلی ساکاریدها است (Brenner *et al.*, 2008; Mbonyiryivuze *et al.*, 2015; Saini *et al.*, 2015). این جوهر ۱/۳ درصد از وزن کل ماهی مرکب را تشکیل می‌دهد و مخلوطی از ترشحات هم‌جنس از کیسه جوهر است که شامل پلی‌ساکاریدهایی (Chen *et al.*, 2010) مانند، تیروزیناز و ملانین است (Kim *et al.*, 2012). ملانین به‌عنوان یکی از اجزای اصلی رنگ‌دانه جوهر ماهی مرکب شناخته‌شده که باعث ایجاد ارتباط قوی بین گروه هیدروکسیل TiO2 می‌شود (Mbonyiryivuze *et al.*, 2015). ملانین خالص ماهی مرکب یک پودر سیاه و یکرنگ هیدروکرومیک است که برای حفظ و جلوگیری از تجزیه آن باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شود (Derby, 2014) و حدود ۱۵,۵ درصد از جوهر ماهی مرکب تازه را تشکیل می‌دهد (Derby, 2014; Wang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). نتایج Derby (۲۰۱۴) نشان داد که مقدار ملانین موجود در کیسه جوهر در حدود ۳۹ درصد از وزن کیسه جوهر است؛ و پروتئین‌ها ۵ درصد – ۸ درصد وزن جوهر ماهی مرکب را تشکیل می‌دهند. در پژوهشی که Roper و همکاران (۱۹۸۴) انجام دادند اعلام کردند که جوهر ماهی مرکب منبع خوبی برای کاربردهای پزشکی و صنعتی است(Ismail and Riad, 2018; Roper,1984). درواقع، رنگ‌دانه‌های ملانین از انواع مختلف واحدهای مونومر تشکیل‌شده است که از طریق پیوندهای قوی کربن-کربن به هم متصل می‌شوند. دستگاه EDS نشان می‌دهد که کربن و اکسیژن، بیشترین فراوانی را در ملانین ماهی مرکب به ترتیب با غلظتی در حدود ۵۷ درصد و ۲۴ درصد دارند. ترکیبات عمده‌ی ملانین در ماهی مرکب شامل: کربن، اکسیژن، سدیم و کلرید که بیشترین درصد را دارند و منیزیم، کلسیم، پتاسیم، سولفور (گوگرد) و نیتروژن می‌شوند که به مقدار کمتری در ملانین وجود دارند (Mbonyiryivuze *et al.*, 2015) (شکل۱). ملانین‌ها یک گروه عمده از پلیمرهای بیولوژیکی فراوانی هستند که مسئولیت بسیاری از تنوع رنگی در جهان حیوانات را بر عهده‌دارند (Mbonyiryivuze *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014). آن‌ها یکی از ارزشمندترین مولکول‌های موجود در زمین هستند که به حفظ زندگی بر روی کره زمین کمک می‌کنند (Herrera and Solis Arias, 2014). ملانینی که در انسان، باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان، حیوانات و فضای بین ستاره‌ای یافت می‌شود (Chen *et al.*, 2010; d'Ischia *et al.*, 2015; Herrera and Solis Arias, 2014; Magarelli *et al.*, 2010) عملکرد متفاوتی دارد؛ مثلاً در انسان به‌عنوان مسئول رنگ‌دانه‌های پوست و همچنین یک محافظ در برابر اشعه فرابنفش خورشید شناخته‌شده است (Aliev *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2010; Kurian *et al.*, 2014; Magarelli *et al.*, 2010; Saini *et al.*, 2015). درحالی‌که در گیاهان به‌عنوان عامل تقویت‌کننده دیواره سلولی و در باکتری‌ها آنها را در مقابل تنش‌های محیطی محافظت می‌کند (Chen *et al.*, 2010; Geng *et al.*, 2008; Hwang *et al.*, 2007; Kurian *et al.*, 2014). بنا بر گزارش‌های اعلام‌شده: در قارچها به‌عنوان یک رنگ‌دانه فتوسنتزی عمل می‌کند که موجب تشعشع می‌شود تا انرژی برای رشد را تولید کند (d'Ischia *et al.*, 2015; Kurian *et al.*, 2014). ملانین‌ها دارای طیف‌های متنوعی از توابع بیوشیمیایی در سیستم‌های زیستی هستند؛ ازجمله آن‌ها حساسیت به نور، جذب یون فلز، فتوتراپی، جذب طیف گسترده‌ای از تابش الکترومغناطیسی، آنتی‌بیوتیک، تنظیم حرارتی و جذب بقایای دارو است (Ismail and Riad, 2018; Liang *et al.*, 2018). به همین ترتیب، ملانین‌ها به‌طور بالقوه در زیست پزشکی، لوازم‌آرایشی و بهداشتی، صنایع کشاورزی، انرژی و دارو کاربرد دارند (Kim and Wijesekara, 2010; Kim *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2018; Manivasagan *et al.*, 2013a; Nam *et al.*, 2012). ملانین همچنین عملکردهای بیولوژیکی مهمی مانند ضد باکتری، ضد تومور، ضدالتهابی و محافظت از کبد را دارد (El-Obeid *et al.*, 2006; Kurian *et al.*, 2015; Manivasagan *et al.*, 2013b; Sava *et al.*, 2003). ملانین شامل سه نوع eumelanin، pheomelanin و allomelanin است (Almeida-Paes *et al.*, 2012). Eumelanin ها رنگ‌دانه‌های قهوه‌ای مایل به سیاه هستند که عمدتاً توسط انسان‌ها و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. Pheomelanin ها رنگ‌دانه‌های قرمز یا زرد هستند که حاوی گوگرد است. Allomelanin ها رنگ‌دانه‌های ناهمگن هستند که حاوی یک گروه عمده از نیتروژن‌ها هستند (Galván *et al.*, 2017; Varga *et al.*, 2016; Vasanthabharathi *et al.*, 2011). ملانین‌ها از منابع مختلفی ازجمله باکتری‌ها (Manirethan *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020)، قارچها (Langfelder *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2020; Pacelli *et al.*, 2020)، گربه‌ماهی‌ها (Kumar *et al.*, 2015)" ماهی مرکب

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.5.2]

(Mbonyiryivuze *et al.*, 2015; Wang and Rhim, 2019) استخراج می‌شود. در این مقاله به بررسی روش‌های مختلف استخراج ملانین از جوهر ماهی مرکب و عملکرد آنتی‌اکسیدان آن پرداخته‌شده است تا درنهایت بهترین روش استخراج ملانین گزارش شود.



شکل ۱. ساختار شیمیایی ملانین ماهی مرکب

مواد و روش‌ها

برای استخراج نمونه ملانین به چهار روش مختلف، از کیسه جوهر استخراج‌شده از ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*) مهم‌ترین گونه خلیج‌فارس استفاده شد. جوهر ماهی مرکب به دو صورت تازه و خشک‌شده از صیدگاه‌های شهرستان بندرعباس و بازار ماهی‌فروشان تهیه شد. سدیم هیدروکسید، هیدروکلریک اسید، کلروفرم، متانول (۱۰۰٪)، اتانول (۷۰٪)، کاغذ صافی، بافر فسفات، فرو سیانید پتاسیم، آب مقطر، TCL، DMSO، کلروفریک، آب دیونیزه (چهار بار تقطیر) از شرکت طبیب تهران خریداری شد.

استخراج ملانین

استخراج ملانین به چهار روش انجام گرفت؛ **روش اول** که درواقع ترکیب دو روش Panzarasa و Zhang است. در این روش پس از تخلیه جوهر از کیسه ماهی مرکب نمونه، به لوله مخصوص سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و در دور ۶۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی فاز مایع، فاز جامد به‌وسیله سدیم هیدروکسید ۱۰ مول در pH ۱۳ تنظیم شد و در ادامه با استفاده از هیدروژن کلرید پنج مول (HCL)، pH آن بر روی دو تنظیم گردید. سپس محلول برای بار دوم به مدت ۳۰ دقیقه و در دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوب به‌دست‌آمده نمونه به‌وسیله سدیم هیدروکسید حل شد، سپس ۰/۲ وزنی – حجمی کلروفرم به محلول اضافه گردید و برای بار سوم نمونه در دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز مایع جداشده و با استفاده از هیدروژن کلرید pH آن به دو رسانده شد، سپس برای بار چهارم محلول به مدت ۱۰ دقیقه و در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس رسوب را جدا کرده و یک‌بار به‌وسیله متانول ۱۰۰٪ و یک‌بار با استفاده از اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و درنهایت نمونه به‌دست‌آمده به‌وسیله آب شستشو داده شد. ماده به‌دست‌آمده برای خشک شدن در معرض هوا و در تاریکی قرار داده شد. نمونه موردنظر برای انجام آزمایش‌های بعد در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Panzarasa *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2007).

روش دوم از روش Liu و Simon (۲۰۰۳) با کمی تغییر انجام شد. استخراج جوهر از کیسه ماهی مرکب و انتقال آن به یک ارلن ۴۰۰ میلی‌لیتری و سپس شستشوی کیسه جوهر به‌وسیله آب دیونیزه و رقیق‌سازی جوهر تا ۲۰۰ میلی‌لیتر انجام گردید. برای رقیق‌سازی بیشتر جوهر ماهی مرکب و به دست آوردن یک ترکیب همگن، ارلن را درون ظرف شیشه‌ای پر از یخ بر روی یک همزن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد تا محلول رقیق شود. سپس محلول رقیق‌شده را به لوله‌های سانتریفیوژ انتقال داده شد و در دور ۱۶۰۰۰rpm ب مدت ۱۵ دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید، فاز رویی را دور

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.5.2]

ریخته و فاز جامد را به‌وسیله یک میله شیشه‌ای از لوله جدا کرده به رسوب جداشده ۱۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه اضافه شد و برای ترکیب آن از ورتکس استفاده گردید تا برای بار دوم درون سانتریفیوژ قرار بگیرد، روش شستشو موردنظر شش مرتبه تکرار شد و درنهایت رسوب به‌دست‌آمده را در آب دیونیزه غوطه‌ور کرده و به‌وسیله دستگاه فریزدرایر به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. نمونه خشک‌شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد.

روش سوم برای به دست آوردن نمونه ملانین در این روش کیسه جوهر را ابتدا در دمای محیط و زیر نور آفتاب به مدت ۳۰ روز قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. سپس کیسه خشک‌شده را با استفاده از هاون سنگی خرده کرده تا به‌صورت یک پودر صاف و یک نواخت دربیاید. پودر به‌دست‌آمده را درون یک ارلن حاوی سدیم هیدروکسید۰/۱ مول ریخته و محلول را به مدت یک ساعت بر روی استیرر جوشانده شد. سپس محلول جوشانده شده به‌وسیله کاغذ صافی برای خروج قطعات بافت جانور صاف شد. در مرحله بعد به ماده موردنظر و برای رسوب دادن نمونه هیدروژن کلرید HCL اضافه گردید، سپس با استفاده از کاغذ صافی رسوب موردنظر جمع‌آوری گردید و به‌وسیله آب دیونیزه شستشو داده شد. و درنهایت محلول به‌دست‌آمده را در دمای محیط و در تاریکی به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. سپس نمونه به‌دست‌آمده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Centeno and Shamir, 2008).

روش چهارم از روش Wang و Rhim (۲۰۱۹) برای استخراج ملانین انجام شد. در این روش ابتدا جوهر از کیسه جوهر ماهی مرکب استخراج شد، سپس محلول موردنظر به لوله‌های سانتریفیوژ انتقال داده شد و نمونه در دور rpm ۱۸۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب به‌دست‌آمده درون یک ارلن ریخته و با استفاده از دستگاه هموژنیزه در دور rpm ۵۰۰۰ به مدت پنج دقیقه هموژنایز شد. برای به دست آوردن نمونه یکنواخت، کار هموژنایز کردن نمونه برای پنج بار تکرار شد. سپس محلول به‌دست‌آمده برای بار دوم با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ در دور rpm۱۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه شستشو شد. روش شستشوی موردنظر برای سه بار تکرار شد تا میزان خلوص ملانین افزایش یابد. سپس نمونه موردنظر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد درون آون قرار داده شد تا خشک شود. درنهایت نمونه موردنظر تا آغاز فرایند آزمایش‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

شناسایی ملانین

برای شناسایی گروه‌های عاملی و تفسیر ساختار ملانین و تائید نمونه ملانین استخراج‌شده از جوهر ماهی مرکب در چهار روش فوق از طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (FTIR) استفاده شد. پودر ملانین را با استفاده از محلول DMSO حل کرده و به مقدار یک قطره برای طیف‌سنجی مورداستفاده قرار گرفت. محلول موردنظر در CM-1 ۴۰۰۰-۶۰۰ با وضوح CM-1 ۲ در طیف‌سنج FTIR اسکن شد.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدان به روش ردیوس پاور

میزان قدرت احیاکنندگی، ردیوس پاور (Radius Power) به روش Huang و همکاران (۲۰۱۱) موردبررسی قرار گرفت. برای انجام این کار غلظت‌های مختلف ملانین‌های به‌دست‌آمده به چهار روش مختلف با بافر فسفات (یک میلی‌لیتر، دو مول، PH ۶/۶) و فرو سیانید پتاسیم (یک میلی‌لیتر، ۱درصد) مخلوط شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه بن ماری در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس آب مقطر (یک میلی‌لیتر) و TCL (یک میلی‌لیتر) و کلروفریک (۰/۰۵FeCl2 میلی‌لیتر، ۱درصد) مخلوط شد و میزان جذب آن در ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Huang *et al.*, 2011).

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و همچنین برای سنجش میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

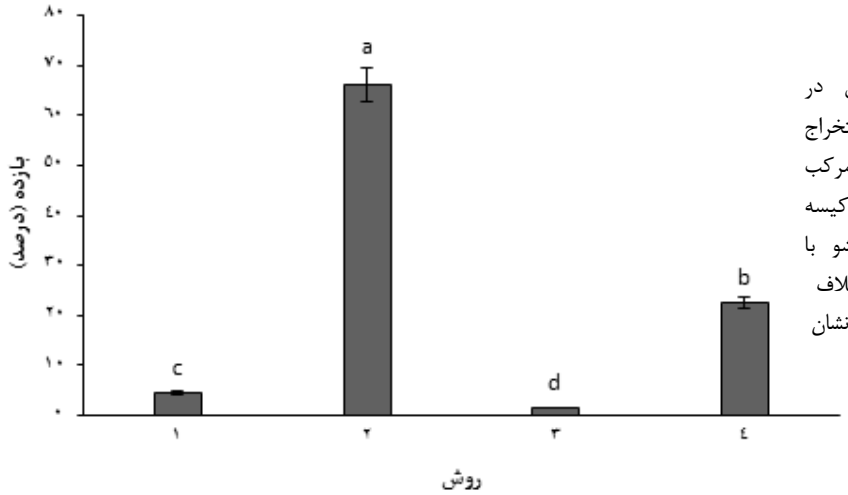
[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.5.2]

نتایـج

هدف از این مطالعه، معرفی بهترین روش استخراج ملانین از جوهر ماهی مرکب است. در این مطالعه بهترین نمونه از نظر میزان بازدهی ملانین و همچنین بهترین نمونه از نظر جذب آنتی‌اکسیدانی مورد ارزیابی قرار گرفت. در جدول ۱، مقدار اولیه جوهر ماهی مرکب و ملانین حاصل از روش‌های استخراج مختلف نشان داده‌شده است. در مطالعه حاضر مقدار اولیه جوهر مورد استفاده جهت استخراج ملانین یکسان نبوده است و به‌منظور جلوگیری از بروز خطا در محاسبات آماری درصد آن‌ها در جدول۱ و شکل ۲ اعلام‌شده است. در روش‌های استخراج؛ چهار کیسه جوهر به اندازه‌های مختلف استفاده شد. درروش اول (Panzarasa *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2007) مقدار اولیه کیسه جوهر ۱۰/۴۶ گرم بود که با شستشوی زیاد این نمونه حجم ملانین به‌دست‌آمده ۰/۴۷ گرم که معادل ۴/۴۹ درصد از وزن کیسه جوهر ملانین استخراج شد. درروش استخراج دوم (Liu and Simon, 2003) مقدار اولیه جوهر مورداستفاده ۹/۸۳ گرم بود و ۶/۵ گرم؛ معادل ۶۶/۱۲ درصد از وزن اولیه کیسه جوهر ملانین به دست آمد. مقدار اولیه جوهر مورد ستفاده درروش استخراج سوم (Centeno and Shamir, 2008) چهارگرم بود و ۰/۰۵۹ گرم؛ معادل ۱/۴۷ درصد از وزن اولیه کیسه جوهر ملانین به دست آمد. میزان بازدهی ملانین درروش استخراج چهارم (Wang and Rhim, 2019) از حجم اولیه کیسه جوهر که ۵/۴۴ گرم است به ۱/۲۲ گرم که معادل ۲۲/۴۲ درصد از وزن اولیه کیسه جوهر ملانین رسیده است. با توجه به مطالب بیان‌شده می‌توان اعلام کرد که روش استخراج دوم (Liu and Simon, 2003) بیشترین بازدهی را داشته است و کمترین بازدهی درروش استخراج سوم (Centeno and Shamir, 2008) مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصل، به‌طورکلی اختلاف معنی‌داری بین مقدار اولیه کیسه جوهر، ملانین به‌دست‌آمده در نمونه‌های حاصل از روش‌های مختلف به کار گرفته‌شده در این مطالعه مشاهده شد ($P< \%5$) (جدول۱ و شکل۲).

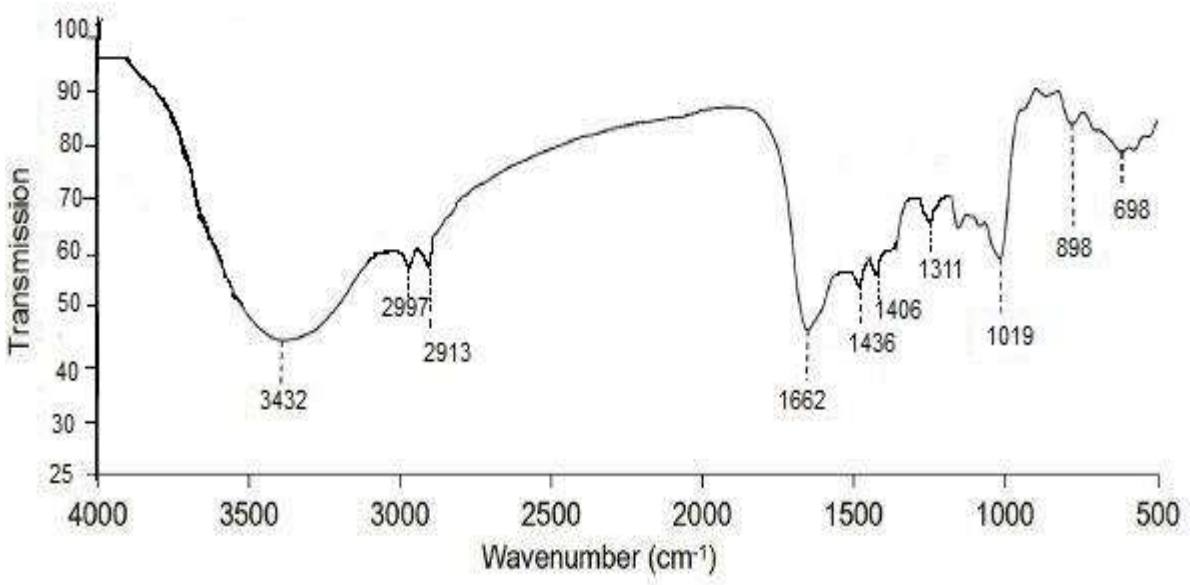
جدول ۱. میزان بازدهی ملانین از چهار روش استخراج

روش استخراج	مقدار اولیه شروع تست (گرم)	مقدار استخراج‌شده ملانین (گرم)	درصد ملانین استخراج‌شده
روش اول	۱۰/۴۶	۰/۴۷	۴/۴۹
روش دوم	۹/۸۳	۶/۵	۶۶/۱۲
روش سوم	۴	۰/ ۰۵۹	۱/۴۷
روش چهارم	۵/۴۴	۱/۲۲	۲۲/۴۲

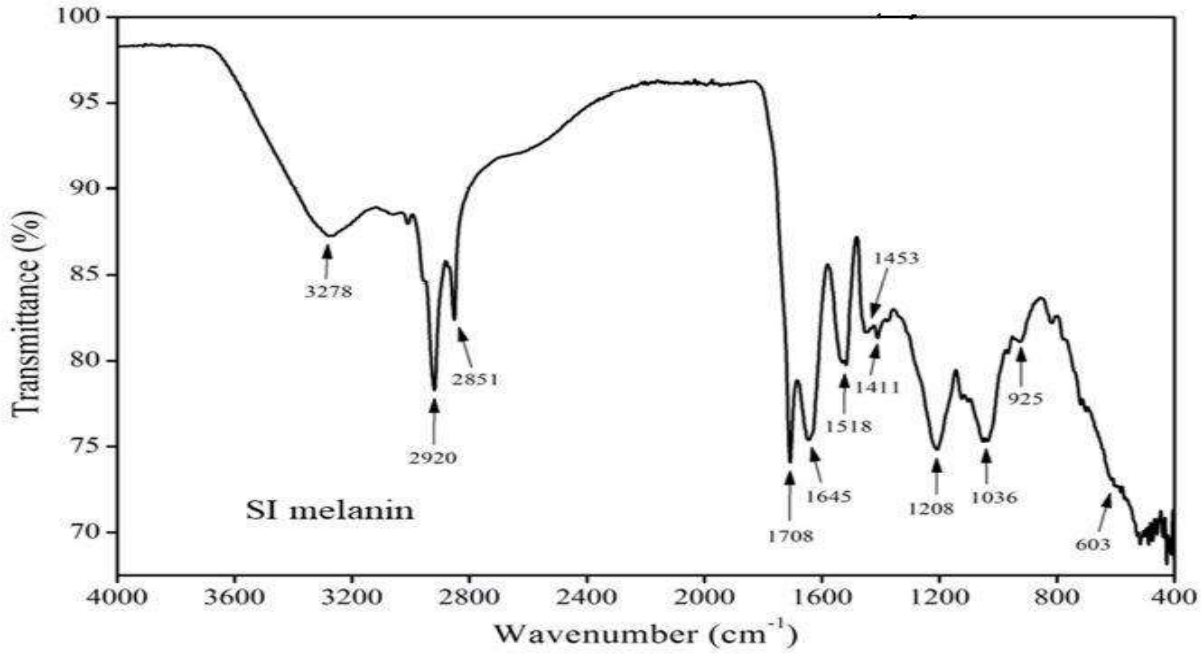


شکل ۲. بازدهی استخراج ملانین در روش‌های استخراج اسید و باز (۱)، استخراج با استفاده از رقیق‌سازی جوهر ماهی مرکب (۲)، استخراج با استفاده از خشک‌کردن کیسه جوهر (۳)، استخراج به‌وسیله شستشو با سانتریفیوژ (۴) حروف غیر یکسان، اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها را مطابق آزمون دانکن نشان می‌دهد.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.5.2]



شکل ۳. FT-IR نمونه ملانین استخراج‌شده ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*)



شکل ۴. نمونه طیف FT-IR استخراج‌شده توسط (Wang and Rhim, 2019)

نتایج بررسی FT-IR نمونه ملانین

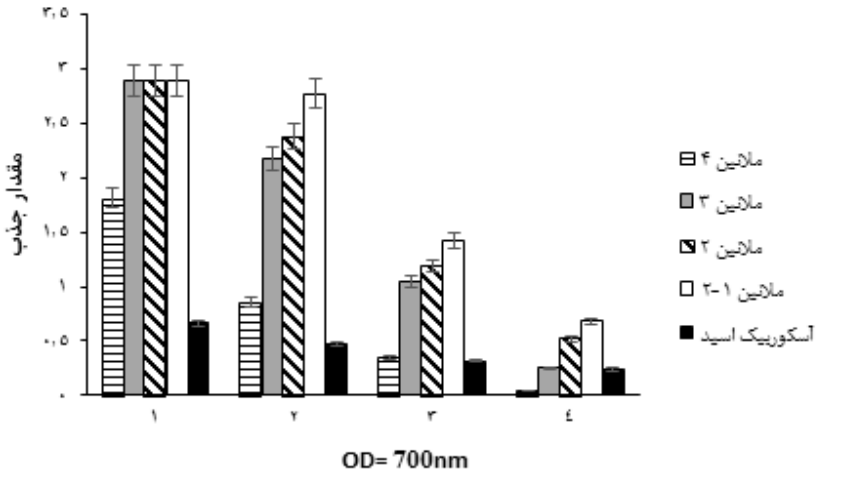
طیف‌سنجی FT- IR برای تفسیر ساختار، ظرفیت اتصال، جذب و سایت‌های یون‌های فلزی در ملانین مهم است. با توجه به شکل ۴ پیک‌های در ۳۴۳۲ cm^{-1} مشاهده می‌شود که در محدوده یک پیک گسترده است. این پیک جذب گسترده نشان‌دهنده حالت‌های ارتعاش کششی N-H یا O-H است. ازآنجاکه رنگ ملانین ناشی از جذب نور توسط الکترون‌های کروموفورها (واحدهای دی هیدرو کسی اندول در eumelanin) است، مرکز جذب ۱۶۶۲ سانتی‌متر از باندهای NH و CN از ملانین ماهی مرکب را نشان می‌دهد.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.5.2]

نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدان ردیوس پاور نمونه‌های ملانین و استاندارد آسکوربیک اسید

میزان قدرت احیاکنندگی (ردیوس پاور) توسط ملانین‌های استخراج‌شده به چهار روش در غلظت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تست آنتی‌اکسیدان در شکل ۵ نشان داده‌شده است. این نتایج نشان‌دهنده قدرت بالای جذب آنتی‌اکسیدانی ملانین است؛ که با افزایش غلظت میزان جذب افزایش می‌یابد که این افزایش جذب مخلوط‌ها نشان‌دهنده افزایش قدرت است. همان‌طور که در شکل مشخص است بالاترین میزان قدرت جذب را در حجم یک میکروگرم/میلی‌لیتر در هر چهار روش استخراج مشاهده شد و کمترین مقدار قدرت احیاکنندگی را در حجم ۰/۰۶۳میکروگرم/میلی‌لیتر در هر چهار روش استخراج مشاهده شد. با توجه به جدول ۱ بهترین عملکرد آنتی‌اکسیدانی را می‌توان درروش استخراج شماره یک مشاهده کرد. در هر چهار غلظت بیشترین میزان قدرت احیاکنندگی را نشان داده است. میزان قدرت احیاکنندگی ردیوس پاور همان‌طور که در جدول شماره ۱ قابل‌مشاهده است در غلظت یک میلی‌گرم برای روش‌های استخراج شماره یک، دو و سه برابر است ولی روش استخراج شماره چهار کمترین قدرت احیاکنندگی را نشان می‌دهد؛ اما همین‌طور که از غلظت نمونه‌ها کم‌تر می‌شود اختلاف بین نمونه‌ها مشاهده می‌شود و تقریباً این اختلاف را تا کمترین مقدار غلظت نمونه‌ها در یک سطح حفظ می‌کند. با مقایسه میزان قدرت احیاکنندگی ملانین‌های استخراج‌شده به روش‌های مختلف با نمونه استاندارد یعنی آسکوربیک اسید می‌توان اعلام کرد که ملانین نسبت به نمونه استاندارد از قدرت احیاکنندگی بالاتری برخوردار است. این اختلاف در همه‌ی غلظت‌ها و همه‌ی ملانین‌ها استخراج‌شده مشاهده می‌شود و تنها در حجم ۰/۰۶۳میکروگرم/ میلی‌لیتر از نمونه ملانین استخراج‌شده با استفاده از روش چهار اختلاف کمی دارد. نتایج آنالیز واریانس، اختلاف معنی‌داری بین فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد؛ این نتایج نیز بیانگر افزایش قدرت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها هم‌زمان با افزایش حجم نمونه‌ها بود ($p < ۰/۰ ۵$).



شکل ۵. نتایج تست آنتی‌اکسیدانی ردیوس پاور ملانین استخراج‌شده به چهار روش اسید و باز (۱-۲)، روش رقیق‌سازی جوهر ماهی مرکب (۲)، استخراج با استفاده از خشک‌کردن کیسه جوهر (۳)، استخراج به‌وسیله شستشو با سانتریفیوژ (۴) و استاندارد آسکوربیک اسید.

بحث

ملانین علاوه بر نقشش به‌عنوان رنگ‌دانه‌های بیولوژیکی؛ ازجمله خواص تشخیص مولکولی، دارای خواص شیمیایی بسیار بالقوه نیز است. در این مطالعه روش‌های مختلفی برای استخراج ملانین مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن با معرفی بهترین روش جهت استخراج ملانین اعلام شد. برای طیف FT-IR نمونه‌های استخراج‌شده تمام نمونه‌ها پیک مشابه داشتند. مشاهده پیک جذبی ۳۴۳۲ تطابق خوبی با گزارش Centeno و Shamir (۲۰۰۸) و Wang و همکاران (۲۰۱۰) دارد که در آن مقاله نیز، طیف FT-IR مربوط به نمونه استخراجی از ماهی مرکب است که شامل پیک‌های گسترده در بازه $۳۴۳۲cm^{-1}$ است (Centeno and Shamir, 2008; Wang and Rhim, 2019). دو فرکانس مشاهده شده در طیف FT-IR در بازه ۲۹۹۷ بر

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.5.2]

سانتی‌متر و ۲۹۱۳ بر سانتی‌متر به‌عنوان کششی CH اختصاص داده شوند (Centeno and Shamir, 2008; Mbonyiryivuze *et al*., 2015). همچنین جذب در ناحیه ۳۲۰۰ تا ۳۴۰۰ می‌تواند نتیجه ارتعاشات کششی N-H یا O-H باشد که شامل OH فنولیک و کربوکسیلیک و گروه‌های آمین در ایندول، پیرول است (Magarelli *et al*., 2010). در محدوده طیفی بین ۱۷۵۰ و ۱۵۵۰ بر سانتی‌متر، ارتعاش کشش پیوند دوگانه C=O (COOH) و همچنین پیوندهای دوگانه کربن کربن، پیوند کربن نیتروژن سیستم آروماتیک و از پیوند دوگانه کربن-اکسیژن از آن دسته از توابع کربوکسیلیک که علاقه‌مند به تشکیل پیوند با گروه‌های فنلی و کربوکسیلیک در منطقه ۱۴۰۰-۱۳۰۰ سانتی‌متر موجود است (Centeno and Shamir, 2008; Magarelli *et al*., 2010). باوجود خاصیت جذب یون‌های فلز در ملانین ماهی مرکب، میدان جذبی در ۱۷۰۰ نانومتر کاهش می‌یابد (Magarelli *et al*., 2010). باندهای ۱۴۰۰ تا ۱۶۰۰ بر سانتی‌متر به ارتعاش خمشی پیوند گروه‌های C-H آلیفاتیک در رنگ‌دانه ملانین نسبت داده می‌شود (Sajjan *et al*., 2010). مرکز جذب در ۱۴۳۶ بر سانتی‌متر ارتعاش خمشی CH3 - CH2 یکی از خواص ملانین است. کشش فنلی C-OH در ۱۳۱۱ بر سانتی‌متر مربوط به ترکیبات فنلی است. مرکز جذب در ۱۰۱۹ بر سانتی‌متر نشانگر ارتعاش کششی C=O از ساختار آلیفاتیک است که این نیز ویژگی رنگ‌دانه ملانین است (Yao *et al*., 2012). مرکز مشاهده‌شده در ۹۵۲ تا ۷۵۰ بر سانتی‌متر ناشی از خم شدن خارج از صفحه از گروه C-H آروماتیک است. باندهای زیر ۷۰۰ بر سانتی‌متر به آلکن جایگزین C-H در رنگ‌دانه ملانین نسبت داده می‌شوند (Wang and Rhim, 2019; Yao and Qi, 2016). تفاوت در پیک ۲۹۱۳ بر سانتی‌متر نشان داد که ملانین ماهی مرکب دارای محتوای بالایی از ساختارهای آلیفاتیک است. از آنجا که رنگ ملانین ناشی از جذب نور توسط الکترون‌های کروموفورها (واحدهای دی هیدرو کسی ایندول در eumelanin است، مرکز جذب ۱۶۶۲ سانتی‌متر از باندهای NH و CN از ملانین ماهی مرکب را نشان می‌دهد (Wang *et al*., 2019). در بررسی آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها، تمام نمونه‌های ملانین در حجم یک میلی‌گرم بهترین عملکرد را نشان دادند که با بررسی‌های (Wang and Rhim, 2019) تطابق داشت. آن‌ها در این مقاله به بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه ملانین پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داده که ملانین استخراج‌شده دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی با توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH قوی بوده است؛ و همچنین (Wang and Rhim, 2019) که روش استخراج ملانین به روش شماره چهار بوده است فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن را به دور روش DPPH و ABTS موردبررسی قراردادند. نتایج آن‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبتاً قوی را نشان داد که با گالیک اسید قابل مقایسه است. ملانین با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه از پتانسیل بالایی برای استفاده در مواد غذایی و زیست پزشکی به‌منظور جلوگیری از آسیب و یا از بین رفتن آن‌ها براثر فعالیت گونه‌های اکسیژن فعال برخوردار است (Roy and Rhim, 2019). انتظار می‌رود با افزودن ملانین در فیلم‌های بسته‌بندی برای بهبود پایداری محصولات حساس به اکسیداسیون در توسعه سیستم‌های بسته‌بندی آنتی‌اکسیدانی فعال استفاده شود.

در پژوهش حاضر به‌منظور دست‌یابی و معرفی بهترین نمونه ملانین چه ازنظر بازدهی و چه ازنظر خواص زیستی به استخراج ملانین به چهار روش مختلف پرداخته شد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد؛ با توجه به دست‌یابی ملانین در هر چهار روش استخراج میزان بازدهی و عملکرد آنتی‌اکسیدانی متفاوتی مشاهده شد که با مقایسه مقدار جذب آنتی‌اکسیدانی نمونه ملانین در هر چهار روش استخراج نشان داد که بیشترین میزان جذب آنتی‌اکسیدانی را درروش استخراج شماره یک (Panzarasa *et al*., 2018; Zhang *et al*., 2007) دارد و این در صورتی است که کمترین میزان بازدهی را درروش استخراج شماره سوم (Centeno and Shamir, 2008) با ۱/۴۷مشاهده‌شده است و کمترین مقدار جذب آنتی‌اکسیدانی را درروش استخراج شماره چهار (Wang and Rhim, 2019) و بیشترین مقدار بازدهی ملانین را درروش استخراج شماره دو (Liu and Simon, 2003) با ۶۶/۱۲ درصد مشاهده شد. ملانین یک پلیمر زیست فعال است که در گونه‌های زیادی از موجودات یافت می‌شود که دارای فعالیت‌های بیولوژیکی زیادی و کاربردهای فراوانی است. بنابراین پیشنهاد می‌شود به‌عنوان مطالعه بعدی به بررسی خواص آنتی بیوفیلم ملانین استخراج‌شده از جوهر ماهی مرکب پرداخته شود.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.5.2]

منابـع

Almeida-Paes, R., Frases, S., Araújo, G.D.S., de Oliveira, M.M.E., Gerfen, G.J., Nosanchuk, J.D., Zancopé- Oliveira, R.M. 2012. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix complex* in the presence of L-tyrosine. Applied and Environmental Microbiology. 78(24): 8623-8630.

Brenner, M., Hearing, V.J. 2008. The protective role of melanin against UV damage in human skin. Photochemistry and Photobiology. 84(3): 539-549.

Centeno, S.A., Shamir, J. 2008. Surface enhanced Raman scattering (SERS) and FTIR characterization of the sepia melanin pigment used in works of art. Journal of Molecular Structure. 873(1-3): 149-159.

Chen, S., Wang, J., Xue, C., Li, H., Sun, B., Xue, Y., Chai, W. 2010. Sulfation of a squid ink polysaccharide and its inhibitory effect on tumor cell metastasis. Carbohydrate Polymers. 81(3): 560-566.

d'Ischia, M., Wakamatsu, K., Cicoira, F., Di Mauro, E., Garcia-Borron, J.C., Commo, S., Galván, I., Ghanem, G., Kenzo, K., Meredith, P., Pezzella, A. 2015. Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications. Pigment Cell & Melanoma Research. 28(5): 520-544.

Derby, C.D. 2014. Cephalopod ink: production, chemistry, functions and applications. Marine Drugs. 12(5): 2700-2730.

Dong, H., Song, W., Wang, C., Mu, C., Li, R. 2017. Effects of melanin from *Sepiella Maindroni* ink (MSMI) on the intestinal microbiome of mice. BMC Microbiology. 17(1): 1-10.

Edward, J.P., Murugan, A. 2000. Screening of cephalopods for bioactivity. Phuket Marine Biological Center Special Publication. 21(1): 253-256.

El-Obeid, A., Al-Harbi, S., Al-Jomah, N., Hassib, A. 2006. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. Phytomedicine. 13(5): 324-333.

Galván, I., Moraleda, V., Otero, I., Álvarez, E., Inácio, Â. 2017. Genetic favouring of pheomelanin-based pigmentation limits physiological benefits of coloniality in lesser kestrels Falco naumanni. Molecular Ecology. 26(20): 5594-5602.

Geng, J., Tang, W., Wan, X., Zhou, Q., Wang, X.J., Shen, P., Lei, T.C., Chen, X.D. 2008. Photoprotection of bacterial-derived melanin against ultraviolet A–induced cell death and its potential application as an active sunscreen. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 22(7): 852-858.

Harnedy, P.A., FitzGerald, R.J. 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. Journal of Functional Foods. 4(1): 6-24.

Herrera, A.S., Solis Arias, P.E. 2014. Einstein cosmological constant, the cell, and the intrinsic property of melanin to split and re-form the water molecule. MOJ Cell Science & Report. 1(2): 00011.

Huang, S., Pan, Y., Gan, D., Ouyang, X., Tang, S., Ekunwe, S.I., Wang, H. 2011. Antioxidant activities and UV-protective properties of melanin from the berry of *Cinnamomum burmannii* and *Osmanthus fragrans*. Medicinal Chemistry Research. 20(4): 475-481.

Hwang, J.H., Lee, B.M. 2007. Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-DOPA oxidation, and melanin synthesis. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 70(5): 393-407.

Ismail, M., Riad, R. 2018. research article screening the antimicrobial activity of different *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Sepioidea) parts collected from Alexandria Mediterranean Waters, Egypt Against Some Human Pathogens….

Kim, D.J., Ju, K.Y., Lee, J.K. 2012. The synthetic melanin nanoparticles having an excellent binding capacity of heavy metal ions. Bulletin of the Korean Chemical Society. 33(11): 3788-3792.

Kim, S.K., Wijesekara, I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. Journal of Functional Foods. 2(1): 1-9.

Kim, Y.J., Wu, W., Chun, S.E., Whitacre, J.F., Bettinger, C.J. 2013. Biologically derived melanin electrodes in aqueous sodium-ion energy storage devices. Proceedings of the National Academy of Sciences. 110(52): 20912-20917.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.5.2]

Kumar, A., Vishwakarma, H.S., Singh, J., Dwivedi, S., Kumar, M. 2015. Microbial pigments: production and their applications in various industries. International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences. 5(1): 203-212.

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

Kurian, N.K., Nair, H.P., Bhat, S.G. 2015. Evaluation of anti-inflammatory property of melanin from marine *Bacillus* spp. *BTCZ31*. Evaluation. 8(3): 251-255.

Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., Brakhage, A.A. 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. Fungal Genetics and Biology. 38(2): 143-158.

Liang, Y., Sun, L., Wang, X. 2018. Photodegradation and aggregation prevention of natural melanin nanoparticles by silica coating method. Journal of Materials Science and Chemical Engineering. 6(1): 1-10.

Liu, Y., Simon, J.D. 2003. The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of *Sepia officinalis*. Pigment Cell Research. 16(1): 72-80.

Magarelli, M., Passamonti, P., Renieri, C. 2010. Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia Officinalis*). Revista CES Medicina Veterinariay Zootecnia. 5(2): 18-28.

Manirethan, V., Raval, K., Balakrishnan, R.M. 2020. Adsorptive removal of trivalent and pentavalent arsenic from aqueous solutions using iron and copper impregnated melanin extracted from the marine bacterium *Pseudomonas stutzeri*. Environmental Pollution. 257: 113576.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., Kim, S.K. 2013a. Isolation and characterization of biologically active melanin from *Actinoalloteichus* sp. MA-32. International Journal of Biological Macromolecules. 58: 263-274.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., Kim, S.K. 2013b. Actinobacterial melanins: current status and perspective for the future. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 29(10): 1737-1750.

Mbonyiryivuze, A., Nuru, Z.Y., Ngom, B.D., Mwakikunga, B., Dhlamini, S.M., Park, E., Maaza, M. 2015. Morphological and chemical composition characterization of commercial sepia melanin. American Journal of Nanomaterials. 3(1): 22-27.

Nam, H.J., Kim, B., Ko, M.J., Jin, M., Kim, J.M., Jung, D.Y. 2012. A new mussel-inspired polydopamine sensitizer for dye-sensitized solar cells: controlled synthesis and charge transfer. Chemistry–A European Journal. 18(44): 1400-1407.

Oh, J.J., Kim, J.Y., Kwon, S.L., Hwang, D.H., Choi, Y.E., Kim, G.H. 2020. Production and characterization of melanin pigments derived from Amorphotheca resinae. Journal of Microbiology. 58(8): 648-656.

Pacelli, C., Cassaro, A., Maturilli, A., Timperio, A.M., Gevi, F., Cavalazzi, B., Stefan, M., Ghica, D., Onofri, S. 2020. Multidisciplinary characterization of melanin pigments from the black fungus *Cryomyces antarcticus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 104(14): 6385-6395.

Panzarasa, G., Osypova, A., Consolati, G., Quasso, F., Soliveri, G., Ribera, J., Schwarze, F.W. 2018. Preparation of a sepia melanin and poly (ethylene-alt-maleic anhydride) hybrid material as an adsorbent for water purification. Nanomaterials. 8(2): 54-62.

Roper, C.F.E., Sweeney, M.J., Nauen, C.E. 1984. Cephalopods of the world: An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fish Synop. 125(3): 157-181.

Roy, S., Rhim, J.W. 2019. Agar-based antioxidant composite films incorporated with melanin nanoparticles. Food Hydrocolloids. 94: 391-398.

Saini, A.S., Tripathi, A., Melo, J.S. 2015. On-column enzymatic synthesis of melanin nanoparticles using cryogenic poly (AAM-co-AGE) monolith and its free radical scavenging and electro-catalytic properties. RSC Advances. 5(106): 87206-87215.

Sajjan, S., Kulkarni, G., Yaligara, V., Lee, K., Karegoudar, T.B. 2010. Purification and physiochemical characterization of melanin pigment from Klebsiella sp. GSK. Journal of Microbiology and Biotechnology. 20(11): 1513-1520.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.5.2]

Sava, V.M., Hung, Y.C., Blagodarsky, V.A., Hong, M.Y., Huang, G.S. 2003. The liver-protecting activity of melanin-like pigment derived from black tea. Food Research International. 36(5): 505-511.

Varga, M., Berkesi, O., Darula, Z., May, N.V., Palágyi, A. 2016. Structural characterization of allomelanin from black oat. Phytochemistry. 130: 313-320.

Vasanthabharathi, V., Lakshminarayanan, R., Jayalakshmi, S. 2011. Melanin production from marine Streptomyces. African Journal of Biotechnology. 10(54): 11224-11234.

Wang, F.R., Xie, Z.G., Ye, X.Q., Deng, S.G., Hu, Y.Q., Guo, X., Chen, S.G. 2014. Effectiveness of treatment of iron deficiency anemia in rats with squid ink melanin–Fe. Food and Function. 5(1): 123-128.

Wang, L.F., Rhim, J.W. 2019. Isolation and characterization of melanin from black garlic and sepia ink. LWT- Food Science and Technology. 99: 17-23.

Wang, L., Li, Y., Li, Y. 2019. Metal ions driven production, characterization and bioactivity of extracellular melanin from Streptomyces sp. ZL-24. International Journal of Biological Macromolecules. 123: 521-530.

Wang, Y., Su, J., Li, T., Ma, P., Bai, H., Xie, Y., Chen, M., Dong, W. 2017. A novel UV-shielding and transparent polymer film: when bioinspired dopamine–melanin hollow nanoparticles join polymers. ACS Applied Materials & Interfaces. 9(41): 36281-36289.

Wang, Z., Tschirhart, T., Schultzhaus, Z., Kelly, E.E., Chen, A., Oh, E., Nag, O., Glaser, E.R., Kim, E., Lloyd, P.F., Charles, P.T. 2020. Melanin produced by the fast-growing marine bacterium Vibrio natriegens through heterologous biosynthesis: characterization and application. Applied and Environmental Microbiology. 86(5): E 02749-19.

Yao, Z.Y., Qi, J.H. 2016. Comparison of antioxidant activities of melanin fractions from chestnut shell. Molecules. 21(4): 487-498.

Yao, Z., Qi, J., Wang, L. 2012. Isolation, fractionation and characterization of melanin-like pigments from chestnut (*Castanea mollissima*) shells. Journal of Food Science. *77*(6): C671-C676.

Zhang, J., Cai, J., Deng, Y., Chen, Y., Ren, G. 2007. Characterization of melanin produced by a wild-type strain of *Bacillus cereus*. Frontiers of Biology in China. 2(1): 26-29.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1400.11.3.5.2]