Journal of Advanced Materials and Technologies

Journal Homepage: www.jamt.ir

Materials and Energy Research Center

MERC

Review Article - Extended Abstract

Overview of techniques for extraction and preparation of melanin obtained from squid ink (Sepia pharaonis) for nanobiotechnology applications

Afrah Sepehr [1], Morteza Mehrjoo [2], Mehdi Farokhi [3*], Mohammad Hossein Ghahremani [4*], Fatemeh Mottaghitalab [5*]

[1] *Ph.D. Student, Department of Pharmaceutical Nanotechnology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

[2] *Ph.D., Faculty of Medical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran.*

[3] *Associate Professor, National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.*

[4] *Professor, Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

[5] *Associate Professor, Nanotechnology Research Centre, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

*Corresponding Author's Email: mehdifarokhi83@gmail.com (Mehdi Farokhi)
mhghahremani@tums.ac.ir (Mohammad Hossein Ghahremani)
fmottaghitalab@sina.tums.ac.ir (Fatemeh Mottaghitalab)

Paper History:
Received: 2025-05-07
Revised: 2025-07-06
Accepted: 2025-09-19

Keywords:
Natural Melanin,
Squid Ink,
Melanin Nanoparticles

ABSTRACT Squid ink essence contains large amounts of organic compounds and pigments such as melanin. In this research, a brief overview of the characteristics of natural melanin pigment derived from squid ink and its types is first presented, followed by a discussion of novel methods used for extracting natural melanin using various pre-treatments. Finally, the application of natural melanin in the field of nanobiotechnology is discussed. It should be noted that, melanin can also be utilized in food industry, agriculture, military industries, environmental sectors, water purification, and electronics. Based on the conducted reviews, it has been determined that chemical methods for melanin extraction are not efficient and face limitations. It seems that using alternative methods, such as enzymatic methods, could increase extraction efficiency and, on the other hand, produce a biopolymer with higher purity. Furthermore, the physicochemical properties of squid ink melanin, such as solubility, morphological characteristics, and stability, have been investigated. This study provides a relatively comprehensive outlook for evaluating the potential uses of active marine-derived resources in producing melanin for applications in nanobiotechnology. It is hoped that this article can provide useful information for the development of new extraction methods and applications of natural melanin in various fields.

https://doi.org/10.30501/jamt.2025.521993.1329 URL: https://www.jamt.ir/article_238309.html

1. Introduction

Melanin, a natural biopolymer derived from Sepia pharaonis ink, has emerged as a versatile material for nanobiotechnology due to its unique physicochemical properties, including UV absorption, free radical scavenging, metal chelation, and biocompatibility. As a byproduct of the seafood industry, squid ink offers a sustainable and cost-effective source of melanin, which is primarily composed of 5,6-dihydroxyindole (DHI) and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) units. These structural features enable melanin to function as an antioxidant, antimicrobial agent, and photothermal converter, making it valuable for applications in drug delivery, biosensing, antimicrobial coatings, and environmental remediation. This review comprehensively examines the extraction, purification, and functionalization techniques of Sepia pharaonis melanin, highlighting its potential in advancing nanobiotechnology (Abdullah et al., 2025).

1.1. Extraction methods

1.1.1. Alkali-Acid Hydrolysis

The most widely used method for melanin extraction involves alkaline solubilization (0.5–1 M NaOH) followed by acid precipitation (HCl) to isolate the pigment. This approach yields high-purity melanin but may require additional purification steps to remove residual proteins and polysaccharides. However, harsh acid/base treatments can alter melanin's native structure, leading to decarboxylation and reduced functionality.

1.1.2. Enzymatic Extraction

To preserve melanin's structural integrity, enzymatic methods using proteases (e.g., trypsin) or a combination of neutral and acidic proteases have been developed. For instance, a patented method employs neutral protease (pH 5–6) and acidic protease (pH 1.5–2.5) to hydrolyze bound proteins, reducing extraction time from 12–24 hours to just 4 hours while maintaining high purity. This method is eco-friendly and avoids chemical degradation of melanin's bioactive properties.

1.1.3. Ultrasound-Assisted Extraction

Recent advances include ultrasound-assisted degradation (UAD) under alkaline conditions, which breaks melanin aggregates into smaller nanoparticles

Please cite this article as: Sepehr, A., Mehrjoo, M., Farokhi, M., Ghahremani, M. H., & Mottaghitalab, F. (2025) Overview of techniques for extraction and preparation of melanin obtained from squid ink (Sepia pharaonis) for nanobiotechnology applications. *Journal of Advanced Materials and Technologies*, Vol. 14, No. 3, 48-65. [in Persian]. https://doi.org/10.30501/jamt.2025.521993.1329

2783-0829/© 2025 The Author(s). Published by MERC.
This is an open access article under the CC BY license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

(~150 nm) while retaining antioxidant activity. This technique enhances melanin's bioavailability for therapeutic applications, such as drug delivery systems.

1.1.4. Solvent-Based and Mild Chemical Methods

Organic solvents (e.g., ethanol) and repeated centrifugation/washing with deionized water are employed for milder extraction, preserving melanin's natural morphology. Ethanolic extracts have shown enhanced antimicrobial and antioxidant properties, ideal for functional coatings (Apte et al., 2013).

1.2. Purification and Characterization

Post-extraction, melanin undergoes purification through (Cao et al., 2021):

1.2.1. Dialysis/Ultrafiltration

Removes low-molecular-weight impurities.

1.2.2. Freeze-Drying or Supercritical CO_2

1.2.3. Drying

Freeze-drying produces aggregates, while supercritical drying preserves spherical granules (~150–200 nm) with higher surface area (37.5 m^2/g vs. 21.5 m^2/g).

1.2.4. Spectroscopic and Microscopic Analysis

Techniques like UV-Vis, FTIR, and SEM confirm melanin's structure (e.g., catechol/quinone groups) and morphology.

1.3. Nanobiotechnology Applications

1.3.1. Drug Delivery and Photothermal Therapy

Melanin nanoparticles (MNPs) serve as effective nanocarriers for anticancer drugs (e.g., doxorubicin) due to their high surface area and biocompatibility. Their photothermal conversion efficiency (40%) enables controlled drug release under near-infrared (NIR) irradiation, enhancing tumor ablation in synergistic chemo-photothermal therapies.

1.3.2. Antimicrobial and Antifouling Coatings

Melanin's intrinsic antimicrobial properties inhibit pathogens like E. coli and S. aureus, making it suitable for wound dressings and food packaging. Hybrid coatings combining melanin with CuO nanoparticles or polytetrafluoroethylene (PTFE) exhibit enhanced antifouling activity, reducing biofilm formation on marine surfaces by 60–80% (Cheng et al., 2019).

1.3.3. Antioxidant and Anti-Inflammatory Agents

Sepia pharaonis melanin alleviates oxidative stress by scavenging reactive oxygen species (ROS) and modulating the Nrf2 pathway. It also reduces inflammation in conditions like ethanol-induced gastric ulcers by suppressing pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6).

1.3.4. Biosensors and Bioelectronics

Melanin's electrical conductivity and redox activity facilitate applications in biosensors and organic electronics. Its charge transport properties are exploited for sustainable bioelectronic devices.

2. Results

According to the studies conducted, it has been found that chemical methods for melanin extraction are not efficient and face limitations. It seems that the use of alternative methods such as enzymatic methods can increase the extraction efficiency and on the other hand can produce biopolymer with a higher percentage of purity. Also, the physicochemical properties of squid ink melanin, such as its solubility, morphological characteristics, and stability, have been investigated.

3. Challenges and Future Perspectives

Despite its potential, several challenges remain:

- Scalability: Industrial-scale production requires optimization of green methods (e.g., enzymatic hydrolysis).
- Solubility: Natural melanin's insolubility in water limits biomedical use. Surfactant-based formulations (e.g., Tween 80) are being explored to improve dispersibility.
- Standardization: Variability in melanin properties due to extraction methods necessitates standardized protocols.

Future research should focus on:

- Hybrid Nanomaterials: Combining melanin with polymers (e.g., chitosan) for enhanced drug delivery or water purification.
- Advanced Functionalization: Tailoring melanin for targeted therapies and environmental applications.

4. Conclusion

The extraction and preparation of melanin from Sepia pharaonic ink offer a sustainable pathway for nanobiotechnology innovations. Advances in purification, functionalization, and hybrid material synthesis will further unlock its potential in medicine, environmental science, and industrial applications. Future studies should prioritize scalable, eco-friendly extraction methods and explore novel composite materials to broaden melanin's utility.

ACKNOWLEDGEMENT

The well cooperation and support of all the co-authors is great fully acknowledged.

REFERENCES

1. Abdullah, W., Razak, N. N. A. N. A., Dheyab, M. A., Salem, F., Aziz, A. A., Alanezi, S. T., Oladzadabbasabadi, N., & Ghasemlou, M. (2025). Melanin-Driven Green Synthesis and Surface Modification of Metal and Metal-Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials*, 2503017. https://doi.org/10.1002/adfm.202503017
2. Cheng, W., Zeng, X., Chen, H., Li, Z., Zeng, W., Mei, L., & Zhao, Y. (2019). Versatile polydopamine platforms: synthesis and promising applications for surface modification and advanced nanomedicine. *ACS nano*, *13(8)*, 8537–8565. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04436

فصلنامه مواد و فناوریهای پیشرفته

Journal Homepage: www.jamt.ir

MERC

مقاله مروری

مروری بر شرایط استخراج و فراوری ملانین حاصل از جوهر ماهی مرکب (Sepia pharaonic) به‌منظور استفاده در مطالعات نانوزیست‌فناوری

افراح سپهر[۱]، مرتضی مهرجو[۲]، مهدی فرخی[۳*]، محمدحسین قهرمانی[۴*]، فاطمه متقی‌طلب[۵*]

[۱] دانشجوی دکتری، گروه نانوفناوری دارویی، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[۲] دکتری تخصصی، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

[۳] دانشیار، بانک سلولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

[۴] استاد، گروه سم‌شناسی، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

[۵] دانشیار، مرکز تحقیقات نانوفناوری، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۴/۰۲/۱۷

بازنگری: ۱۴۰۴/۰۴/۱۵

پذیرش قطعی: ۱۴۰۴/۰۹/۱۹

کلیدواژه‌ها:

ملانین طبیعی،

جوهر ماهی مرکب،

نانوذرات ملانین

چکیده جوهر ماهی مرکب، ضایعات مایع حاصل از صنعت فراوری محصولات شیلاتی و حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات آلی ازجمله آنزیم‌ها، پلی‌ساکاریدها، کاتکول‌آمین‌ها (هورمون‌ها) و رنگ‌دانه‌هایی مثل ملانین به‌عنوان نوعی پلیمر زیستی است. در این پژوهش، ابتدا به مرور خلاصه‌ای از مشخصه‌های رنگ‌دانهٔ ملانین طبیعی حاصل از جوهر ماهی مرکب و انواع آن پرداخته شده و سپس به روش‌های نوین مورداستفاده در استخراج ملانین طبیعی با استفاده از پیش‌تیمارهای مختلف، اشاره شده است. نهایتاً در مورد کاربرد ملانین طبیعی در حوزه نانوزیست‌فناوری، بحث شده است. لازم به ذکر است که از ملانین علاوه‌بر حوزه نانوزیست‌فناوری، می‌توان در صنایع غذایی، کشاورزی، صنایع نظامی، محیط‌زیست، تصفیه آب و صنایع الکترونیک نیز بهره گرفت. باتوجه‌به بررسی‌های انجام‌شده، مشخص شده است که روش‌های شیمیایی برای استخراج ملانین کارآمد نبوده و با محدودیت‌هایی مواجه است. به‌نظر می‌رسد که استفاده از روش‌های جایگزین مانند روش‌های آنزیمی بتواند راندمان استخراج را بالا برده و ازطرفی، بتواند زیست‌پلیمری با درصد خلوص بالاتر تولید کند. همچنین، خواص فیزیکوشیمیایی ملانین جوهر ماهی مرکب مانند انحلال‌پذیری، مشخصه‌های ریخت‌شناسی و پایداری آن، مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعه، چشم‌انداز نسبتاً جامعی را جهت ارزیابی مصارف بالقوهٔ منابع فعال با منشأ دریایی در تولید ملانین مورداستفاده در حوزه‌های نانوزیست‌فناوری ارائه می‌دهد. امید است این مقاله بتواند اطلاعات مفیدی را در راستای توسعهٔ روش‌های جدید استخراج و کاربرد ملانین طبیعی در مصارف مختلف، فراهم کند.

https://doi.org/10.30501/jamt.2025.521993.1329 URL: https://www.jamt.ir/article_238309.html

۱- مقدمه

ملانین به‌عنوان یکی از فراوان‌ترین رنگ‌دانه‌های زیستی در طبیعت، اخیراً موردتوجه فراوانی در حوزه نانوزیست‌فناوری قرار گرفته است. ملانین یک ترکیب پلیمری با وزن مولکولی بالا است که به‌طور طبیعی در جوهر ماهی مرکب (Sepia pharaonis) یافت می‌شود و دارای خواص منحصربه‌فردی ازجمله: جذب گسترده نور، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی، عملکرد ضدالتهابی، تعدیل‌کنندهٔ دستگاه ایمنی، محافظت در برابر پرتوهای مضر و پایداری شیمیایی بالا است (Solano, 2014). این ویژگی‌ها ملانین را به یک کاندیدای ایده‌آل برای کاربردهای پیشرفته نانوزیست‌فناوری ازجمله: دارورسانی هدفمند، تصویربرداری پزشکی، حسگرهای زیستی و مهندسی بافت تبدیل کرده است

*عهده‌دار مکاتبات: مهدی فرخی، محمدحسین قهرمانی، فاطمه متقی‌طلب

نشانی: ایران، تهران، انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی

ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی

ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی

پیام نگار: mehdifarokhi83@gmail.com ،mhghahremani@tums.ac.ir ،fmottaghitalab@sina.tums.ac.ir

(Roy & Rhim, 2022). کیسهٔ جوهر ماهی مرکب از منابع دریایی مهم و سرشار از ملانین به‌شمار می‌رود. باتوجه‌به دورریزی کیسهٔ جوهر ماهی مرکب در طی فراوری فراورده‌های شیلاتی، استفاده از ملانین موجود در این کیسه باعث کاهش اتلاف منابع، کاهش آلودگی زیست‌محیطی ناشی از آن و افزایش ارزش افزودهٔ محصولات فرعی در صنعت شیلات می‌شود (El-Naggar & Saber, 2022). سفالوپودها معروف به کَلّه‌ماهی یا ماهیان مرکب (با نام علمی Sepia pharaonis)، آبزیانی از ردهٔ سرپایان و از شاخهٔ نرم‌تنان هستند. یکی از اندام‌های داخلی این ماهی دارای یک کیسه، حاوی مایعی با رنگ‌دانهٔ تیره است. جزء اصلی جوهر ماهی مرکب، ملانین است که به‌عنوان نوعی کوپلیمر یوملانین تحت پلیمریزاسیون اکسیداتیو ترکیبات ایندول و متشکل از دو بخش ۵،۶-دی‌هیدروکسی‌ایندول و ۵،۶-دی‌هیدروکسی‌ایندول-۲-اسیدکربوکسیلیک می‌باشد (Nabhitabhata, 2014; Trigo et al., 2023).

با وجود پتانسیل بالای ملانین در مصارف مختلف، بهینه‌سازی روش‌های استخراج و فراوری آن به‌منظور حفظ یکپارچگی ساختاری و عملکردی این مولکول پیچیده، از چالش‌های اصلی پژوهشگران این حوزه محسوب می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که روش‌های مختلف استخراج می‌توانند تأثیر معناداری بر بازده، خلوص و خواص عملکردی ملانین داشته باشند. درمجموع، ملانین انحلال‌پذیری کمی در آب دارد و این رنگ‌دانه تنها در محلول‌های قلیایی قابل‌حل است؛ بنابراین، استفاده از روش‌های شیمیایی شامل محلول‌های قلیایی و جداسازی اسیدی، از روش‌های رایج جهت استخراج ملانین به‌شمار می‌آیند (Jiang et al., 2020; Leonoline Ebenezer et al., 2020; Sun et al., 2017)؛ بااین‌حال، استفاده از روش‌های هیدرولیز قلیایی و اسیدی بسیار زمان‌بر است و در برخی از موارد، راندمان استخراج قابل قبولی ندارند. به‌علاوه، استفاده از حجم زیاد اسید و قلیا منجر به آلودگی محیط شده و مانع از دستیابی به توسعهٔ پایدار زیست‌محیطی می‌شود. در سال‌های اخیر، روش‌های استخراج آنزیمی، امواج فراصوت و روش‌های ترکیبی به‌عنوان جایگزین‌های معتبر برای جداسازی و خالص‌سازی ملانین طبیعی معرفی شده‌اند (Song et al., 2024; Song et al., 2021; Yang et al., 2023). چندین فراورده با ارزش‌افزودهٔ بالا مثل ملانین، گلیکوزیدهای استویول، آنتوسیانین‌ها و پلی‌فنول‌ها را می‌توان به‌شکل مؤثری با استفاده از این روش‌های استخراج، مورد استفاده قرار داد (Ebenezer et al., 2022; Fitrial & Khusnul Khotimah, 2021) در این روش‌ها، اصل جداسازی ملانین طبیعی مبتنی‌بر حذف یا از بین بردن ترکیبات و ناخالصی‌هایی است که به‌همراه ملانین در جوهر ماهی مرکب وجود دارند؛ بااین‌وجود، باید تأثیر استفاده از هر یک از روش‌های استخراج بر ساختار پیچیدهٔ این پلیمر رنگی و فعالیت زیستی آن را نیز در نظر گرفت (Kasem & Hamza, 2020).

در حوزه نانوزیست‌فناوری، ملانین استخراج‌شده از جوهر ماهی مرکب به‌دلیل سازگاری زیستی بالا و سمیت کم، پتانسیل قابل‌توجهی در توسعه سامانه‌های دارورسانی هوشمند نشان داده است. این ترکیب قادر به ایجاد پیوندهای قوی با نانوذرات فلزی مانند اکسید تیتانیم (TiO_2) از طریق گروه‌های هیدروکسیل خود است که امکان طراحی نانوحامل‌های چندمنظوره را فراهم می‌کند (Marcovici et al., 2022; MiMURA et al., 1982).

همچنین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی ملانین (با بهترین عملکرد در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، آن را به گزینه‌ای جذاب برای کاربردهای محافظت از سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو تبدیل کرده است (Moniri Javadhesari et al., 2022). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ترکیبات استخراج‌شده از جوهر ماهی مرکب (Sepia pharaonic) ازجمله: ملانین و فلاونوئیدها دارای اثرات سیتوتوکسیک انتخابی علیه خطوط سلولی سرطانی مختلف ازجمله: A549 (ریه)، Hep G2 (کبد) و MCF7 (پستان) هستند. سازوکار این اثر از طریق القای آپوپتوز[1] و توقف چرخه سلولی در گام‌های G1 و S صورت می‌گیرد. علاوه‌براین، این ترکیبات، فعالیت ضدمیکروبی قابل‌توجهی علیه طیف وسیعی از پاتوژن‌ها ازجمله کاندیدا آلبیکانس[2] نشان داده‌اند (Mavridi-Printezi et al., 2023).

در راستای توسعه روش‌های سبز سنتز نانوذرات، ملانین دریایی به‌عنوان یک ماده طبیعی و زیست‌سازگار می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های شیمیایی متداول باشد که اغلب از مواد سمی و خطرناک استفاده می‌کنند. این موضوع به‌ویژه در طراحی نانوذرات حساس به محرک‌های مختلف مانند pH، دما

1. Apoptosis

2. Candida albicans

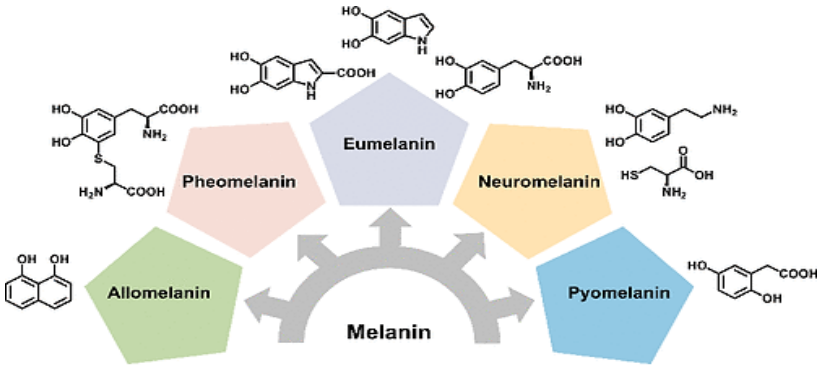
و تابش اهمیت دارد که می‌توانند در سامانه‌های دارورسانی هوشمند مورداستفاده قرار گیرند (Tian et al., 2022).

این مقاله مرور جامعی بر روش‌های بهینه استخراج و فراوری ملانین از جوهر ماهی مرکب Sepia pharaonis ارائه می‌دهد و کاربردهای نویدبخش آن را در حوزه نانوزیست‌فناوری مورد بررسی قرار می‌دهد. باتوجه‌به نیاز روزافزون به مواد زیست‌سازگار با کارکرد چندگانه در پزشکی و فناوری نانو، درک عمیق‌تر از روش‌های استخراج، خواص فیزیکوشیمیایی و فعالیت‌های زیستی ملانین دریایی، می‌تواند راه را برای توسعه نسل جدیدی از مواد هوشمند در نانوزیست‌فناوری هموار کند.

۲- انواع ملانین

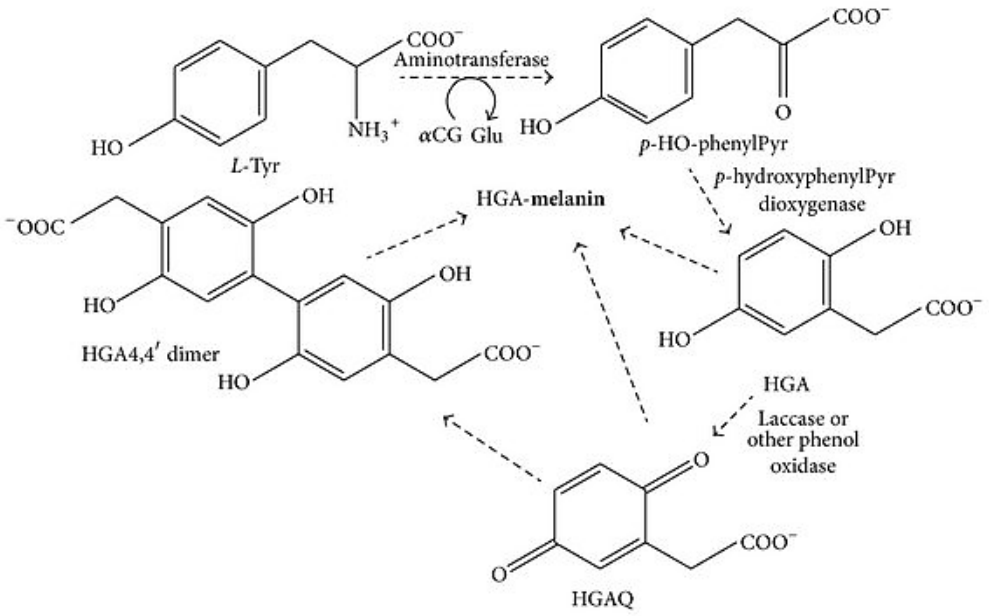
۲-۱- ملانین طبیعی

ملانین یک رنگ‌دانهٔ طبیعی و تیره‌رنگ با ساختار پلیمری است که در موجودات زندهٔ مختلف یافت می‌شود. این پلیمر توسط ارگانیسم‌های زیستی در فرایندی به‌نام ملانوژنز تولید می‌شود که شامل اکسیداسیون و پلیمریزاسیون اسیدآمینهٔ تیروزین است. به‌طورکلی، پنج نوع اصلی از ملانین در طبیعت یافت می‌شوند که شامل یوملانین، فئوملانین، پیوملانین، آلوملانین و نوروملانین هستند که از لحاظ ساختار و عملکرد تاحدی با هم متفاوتند (Ghattavi et al., 2022; Kiran et al., 2014) (شکل ۱). ملانین طبیعی که در موجودات مختلف یافت می‌شود، از زیست‌سازگاری بالایی برخوردار است و همچنین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و قابلیت جذب اشعه می‌باشد. این خواص، از ساختار شیمیایی منحصربه‌فرد ملانین نشات می‌گیرد که حاوی گروه‌های فنولیک، هیدروکسیل، کربوکسیل و آمین است. توانایی ملانین در کاهش و اکسیداسیون سایر مولکول‌ها، تا حد زیادی، توسط خواص اکسایش-کاهش واحدهای مونومری آن تعیین می‌شود (Ghattavi et al., 2022). به همین دلیل، ضروری است که مروری مختصر بر این مونومرها یا بخش‌هایی که در سنتز و ساختار ملانین نقش دارند، داشته باشیم. ملانین در درجهٔ اوّل از دو مونومر کلیدی، ۵،۶-دی‌هیدروکسی‌ایندول (DHI) و ۵،۶-دی‌هیدروکسی‌ایندول-۲-کربوکسیلیک‌اسید (DHICA) و حالت‌های مختلف اکسایش-کاهش و توتومری[1] آنها تولید می‌شود. اولین نکته‌ای که باید به آن توجه کرد این است که مونومرهای اولیه، ارتوهیدروکینون‌ها یا کاتکول‌ها هستند که می‌توانند عملکردی متناسب با ساختار از خود نشان دهند (Jiang et al., 2020). به‌علاوه، این مونومرها در موقعیت‌های ۲، ۴ و ۷ DHI، بسیار واکنش‌پذیر هستند. کاتکول‌ها هم، به اکسیژن حساس هستند و می‌توانند در شرایط ملایم، تحت اکسیداسیون خودبه‌خودی قرار گیرند. باتوجه‌به موارد فوق، به‌نظر می‌رسد که نسبت‌های اولیه متفاوت DHI/DHICA می‌تواند به‌طور عمیقی، چیدمان ساختار الیگومری درون ملانین را تغییر داده و تمایلات مونومرها را برای انباشتگی تغییر دهد (Song et al., 2023). این موضوع، ازآن‌جهت اهمیت دارد که منجر به تفاوت در ساختار ملانین‌های سنتزی و طبیعی می‌شود. ملانین‌های سنتزی معمولاً درحدود ۱۰ درصد، دارای DHICA هستند؛ درحالی‌که ترکیبات طبیعی می‌توانند تا ۵۰ درصد DHICA داشته باشند (Kasem & Hamza, 2020). جزئیات پیچیدهٔ مربوط به تفاوت بین ملانین‌های سنتزی و طبیعی فراتر از محدودهٔ این مقالهٔ مروری است.



شکل ۱. انواع مختلف ملانین به‌همراه ساختار شیمیایی؛ هر یک از انواع ملانین باتوجه‌به نوع ساختار و گروه‌های عاملی فعال می‌تواند عملکردهای متفاوتی از خود بروز دهد (Ghattavi et al., 2022) (جهت بازنشر عکس، از منتشرکننده اجازه گرفته شد).

1. Tautomer



شکل ۲. مسیر تشکیل پیوملانین به‌عنوان انشعابی از مسیر استاندارد کاتابولیسم L-تیروزین.
L-تیروزین تحت ترانس‌آمیناسیون به آلفاکتواسید و با اضافه شدن دی‌اکسیژناز، p-هیدروکسی‌فنیل‌پیرووات به هموژنتیسات (HGA) تبدیل می‌شود. در غیاب فعالیت دی‌اکسیژناز هموژنتیسات، تجمع HGA باعث اکسیداسیون به فرم p-کینون (HGAQ) می‌شود. این اکسیداسیون p-دی‌فنول به‌شکل p-کینون، می‌تواند توسط لاکازها و سایر اکسیدازها کاتالیز شود (Nicy et al., 2017) (جهت بازنشر عکس، از منتشرکننده اجازه گرفته شد).

۲-۱-۱- پیوملانین

پیوملانین شکل قهوه‌ای‌رنگ ملانین است که به‌واسطهٔ اکسیداسیون اسید هموژنتیسیک در واکنش L-تیروزین ایجاد می‌شود. خاصیت اصلی پیوملانین، محافظت از میکروارگانیسم‌ها در برابر اشعهٔ فرابنفش است که تولید رادیکال‌های آزاد را محدود و مقاومت در برابر نور را افزایش می‌دهد. تخریب پیوملانین توسط آنزیم‌ها یا میکروارگانیسم‌ها تا به امروز گزارش نشده است. پیوملانین یک رنگ‌دانهٔ غیرقابل انحلال است.

ذرات بسیار ریز آن معمولاً در محیط‌های آبی، خنثی و در بیشتر محیط‌های آلی، به‌صورت معلق باقی می‌مانند. پیوملانینِ مشتق‌شده از منابع طبیعی، عموماً با ترکیب شدن با سایر مولکول‌ها، تطبیق‌پذیری شیمیایی مناسبی را نشان می‌دهد. پیوملانین از زیست‌سازگاری بالایی برخوردار است و هیچ پاسخ پادگنی[1] را در سلول‌های زنده ایجاد نمی‌کند. ازاین‌حیث، می‌تواند به‌عنوان یک گزینه توانمند در مصارف زیست‌فناوری معرفی شود (Yang et al., 2023). از رنگ‌دانهٔ پیوملانین در موارد مختلفی ازجمله: مصارف آرایشی و بهداشتی، پزشکی و داروشناسی[2] استفاده می‌شود (Vate & Benjakul, 2013). در شکل ۲، مسیر بیوسنتز پیوملانین از اسید آمینه تیروزین، به‌صورت طرحواره رسم شده است. همانگونه که در این تصویر مشخص است، پیوملانین از مسیر استاندارد کاتابولیسم L-تیروزین حاصل می‌شود.

۲-۱-۲- یوملانین

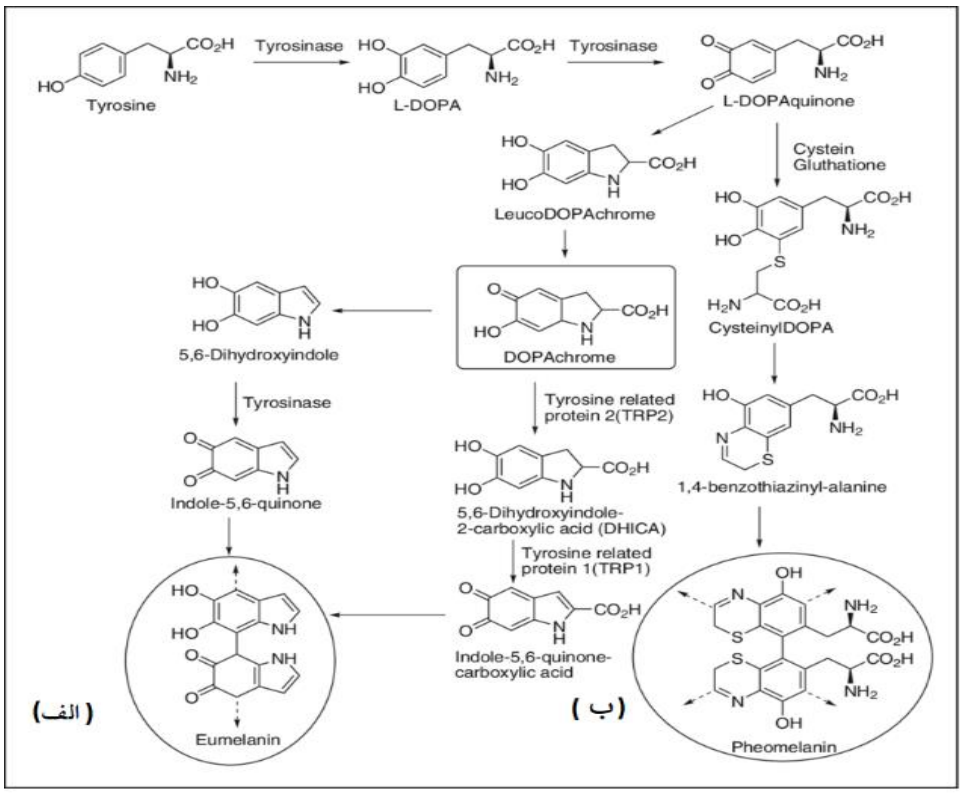
یوملانین یکی از رایج‌ترین انواع ملانین است که به رنگ قهوه‌ای تا سیاه وجود دارد. به‌دلیل وجود گروه‌های عملکردی و تشابهات ساختاری با پلی‌دوپامین، خواص فیزیکوشیمیایی مشابهی را نسبت به انواع سنتتیک ملانین از خود نشان می‌دهد (Cao et al., 2021). یوملانین‌ها دارای طیف جذب گسترده‌ای هستند که از دامنهٔ ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر (طول‌موج‌های مرئی) و ۱۰۰ تا ۴۰ نانومتر (فرابنفش) متغیر هستند (Solano, 2014). رنگ‌دانهٔ قهوه‌ای یا سیاه یوملانین از رایج‌ترین محصولات مشتق‌شده از ملانین است. این ترکیب، محصولی از اکسیداسیون

1. Antigen
2. Pharmacologie

اسیدآمینهٔ L-تیروزین و یا L-دی‌هیدروکسی‌فنیل‌آلانین (L-DOPA) است. یوملانین‌های طبیعی به‌عنوان پلیمرهای ناهمگنی در نظر گرفته می‌شوند که توسط پیوندهای کووالانسی آریل‌آریل در میان حلقه‌ای از ترکیب دوپا و مشتقات آنها تشکیل شده‌اند (Sabzi et al., 2024). به‌طور خلاصه، L-دوپا و یا L-یروزین در مسیر بیوسنتزی و یا مسیر Raper-Mason به L-دوپامین، اکسید می‌شوند (Babaluei, Mojarab, et al., 2023; Babaluei, Mottaghitalab, et al., 2023) درنهایت، تشکیل بعدی دی‌هیدروکسی‌اندول‌ها و پلیمریزاسیون، منجر به شکل‌گیری پلیمر یوملانین می‌شود (Kiran et al., 2014) (شکل ۳-الف).

۲-۱-۳- فئوملانین

فئوملانین به‌رنگ قرمز مایل به زرد در طبیعت وجود دارد. تفاوت اصلی بین یوملانین و فئوملانین، وجود گوگرد در ترکیب ساختاری فئوملانین‌ها است. در فئوملانین، گوگرد از ترکیب اسیدآمینهٔ سیستئین یا برخی از مشتقات آن مانند گلوتاتیون با پیش‌سازهای فنلی به‌دست می‌آید. رنگ‌دانهٔ فتوتوکسیکِ قرمز-زردِ فئوملانین از ترکیب L-تیروزین و L-دی‌هیدروکسی‌فنیل‌آلانین (L-دوپا) یا ترکیب با L-سیستئین تشکیل می‌شود. مطالعات تجزیه‌وتحلیل ساختاری آن نشان می‌دهد که حاوی زیرواحدهای بنزوتیازین است (Vate & Benjakul, 2013). تحریک یوملانین/ فئوملانین انسانی توسط نور فرابنفش، باعث تولید اشکال مختلفی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن (اکسیژن منفرد، سوپراکسید، پراکسید و هیدروکسیل) می‌شود. درعین‌حال، این دو رنگ‌دانه، باعث جذب نوری اکسیژن و محافظت در برابر سرطان پوست می‌شوند. یوملانین و فئوملانین انسانی به‌صورت فتوشیمیایی، محصولات حاصل از تجزیه تولید می‌کنند که با القای دایمرهای سیکلوبوتان-پیریدین از DNA، مسئول تشکیل ملانوم ناشی از نور اشعهٔ فرابنفش هستند (Babaluei, Mottaghitalab, et al., 2023; Karimi et al; 2023) (شکل ۳-ب).



شکل ۳. الف) مسیر سنتز ملانین و ب) مسیر سنتز فئوملانین. فنیل‌آلانین توسط عمل فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز به تیروزین تبدیل می‌شود. سپس اکسیداسیون L-تیروزین به ۳،۴-دی‌هیدروکسی‌فنیل‌آلانین (L-DOPA)، توسط عمل آنزیم‌های تیروزیناز در ملانوزوم ملانوسیت کاتالیز می‌شود. در مرحله بعد، L-DOPA به DOPAquinone اکسید می‌شود. از DOPAquinone، مسیرهای سنتز ملانین از هم جدا شده و یوملانین یا فئوملانین را تولید می‌کنند (Karimi et al., 2023) (جهت بازنشر عکس، از منتشرکننده اجازه گرفته شد).

۲-۱-۴- نورومِلانین

نورومِلانین یک رنگ‌دانهٔ قهوه‌ای تیره و نامحلول درون‌سلولی است که در سلول‌های مغز و عصب وجود دارد. این ترکیب از یون‌های فلزی، پروتئین‌ها، چربی‌ها و ملانین ساخته شده است که رنگ‌دانهٔ آنها در اندامک‌های اتوفاژیک انباشته می‌شود (Song et al., 2023). تا به امروز، نورومِلانین به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است، اما، هیچ اجماعی در مورد عملکرد یا حتّی خواص آن حاصل نشده است. برخی از محققان اظهار داشته‌اند که این ترکیب، شامل ذراتی است که با افزایش سن تجمع می‌یابد. برخی دیگر اظهار داشته‌اند که ممکن است وظیفهٔ آن جمع‌آوری فلزات سنگین و سایر موادی باشد که ممکن است در غیاب این ترکیب، به نورون آسیب برسانند. نورومِلانین همچنین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند و با جمع‌آوری گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن (ROS-RNS)، مانند رادیکال‌های هیدروکسیل، از غشاهای زیستی در برابر پراکسیداسیون لیپید محافظت می‌کند. در شرایط فیزیولوژیکی، نورومِلانین، آهن فریک (سه ظرفیتی) را به آهن دوظرفیتی تبدیل می‌کند. در حدود ۵۰ درصد از نورومِلانین با آهن دوظرفیتی اشباع شده است و می‌تواند به‌عنوان یک مولکول متصل‌شونده به آهن برای تنظیم هموستاز آهن در نورون‌های حاوی نورومِلانین عمل کند (Premi et al., 2015).

۲-۱-۵- آلوملانین

از ملانین‌های دیگر موجود در گیاهان و قارچ‌ها می‌توان از آلوملانین نام برد. آنها اساساً فاقد نیتروژن و گوگرد هستند؛ زیرا،

جدول ۱. ویژگی‌های انواع مختلفی از ملانین.

ملانین	خصوصیات	منبع استخراج	منبع
پیوملانین	ملانین قهوه‌ای رنگی که توسط تیروزینازها از اسید هموجنتیسیک مشتق می‌شود.	–	(Vate & Benjakul, 2013)
یوملانین	رنگ‌دانه‌های نیتروژنی سیاه یا قهوه‌ای، نامحلول در آب و حلال‌های آلی، که از طریق پلیمریزاسیون اکسیداتیو ۵،۶-دی‌هیدروکسی‌ایندول‌های مشتق‌شده از تیروزین ازطریق دی‌هیدروکسی‌فنیل‌آلانین تشکیل می‌شوند.	حیوان (مو، پر، خز، پوست، فلس، عنبیه، گوش داخلی)	(Solano, 2014)
فئوملانین	رنگ‌دانه‌های زرد تا قهوه‌ای مایل به قرمز، محلول در قلیا، حاوی گوگرد علاوه‌بر نیتروژن، که از طریق پلیمریزاسیون اکسیداتیو سیستئین-دی‌هیدروکسی‌فنیل‌آلانین و واسطه‌های ۱،۴-بنزوتیازین تشکیل می‌شوند.	حیوان (موهای قرمز، لکه‌های کوچک و قهوه‌ای‌رنگ بر روی پوست و پر)	(Babaluei, Mojarab, et al., 2023)
نورومِلانین	ساختاری پیچیده حاوی اوملانین و فئوملانین به‌همراه سایر اسیدهای آمینه و محصولات اکسیداسیون مشتق‌شده از دی‌هیدروکسی‌فنیل‌آلانین.	تودهٔ سیاه (Substantia nigra)	(Premi et al., 2015)
آلوملانین	ساختاری با رنگ قهوه‌ای تا سیاه، لکه‌های سیاه روی برگ‌ها و گل‌ها ایجاد می‌کند و در لوبیا و دانه‌ها تجمع می‌یابد.	گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها	(Kiran et al., 2014)
ملانین سنتزی	رنگ‌دانه‌های شبیه به یوملانین، که توسط اکسیداسیون کاتالیز شده و توسط تیروزیناز از L-تیروزین یا L-DOPA تشکیل می‌شوند.	–	(Sabzi et al., 2024)

از پلیمریزاسیون پیش‌سازهای مختلف کاتکولیک و دی‌هیدروکسی‌نفتالین تشکیل می‌شوند (Kiran et al., 2014). آلوملانین به کاتکول ملانین نیز معروف بوده و توسط آنزیم‌های فنل‌اکسیداز از ترکیبات فنلی تولید می‌شود. آلوملانین‌ها محصول اکسیداسیون اسیدکافئیک، اسید-۴-هیدروکسی‌فنیل‌استیک، دی‌هیدروکسی‌نفتالین، کاتکول‌ها، گاما-گلوتامینیل-۴-هیدروکسی‌بنزن و پروتوکسی‌بنزن یا تتراهیدروکسی‌نفتالین هستند. وجود آلوملانین برای افزایش حفاظت ارگانیسم‌ها در برابر آسیب‌های محیطی ضروری است (Cao et al., 2021). در جدول ۱، انواع مختلف ملانین از لحاظ خصوصیات و منبع استخراج با هم مقایسه شده‌اند.

۳- منابع ملانین

ملانین در سراسر قلمرو حیوانات به‌جز عنکبوتیان، ازجمله میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران یافت می‌شود. دی‌فنول‌ها به‌عنوان پیش‌ساز ملانین در قارچ‌ها و باکتری‌ها، با اکسیداسیون آنزیمی به کینون‌ها تبدیل می‌شوند و به‌طور خودبه‌خود پلیمریزه می‌شوند تا ملانین را تشکیل دهند. ساختار شیمیایی ملانین هنوز بحث‌برانگیز است. ولی، این ساختار به‌شدت وابسته به شرایط پلیمریزاسیون و اکسیداسیون در طی سنتز بوده و شکل نهایی ملانین به فرایند سنتز یا منبع استخراج بستگی دارد. بیشتر ملانین‌های میکروبی بر پایهٔ ۱،۸-دی‌هیدروکسی‌فنیل‌آلانین (DOPA) یا c-گلوتامینیل-۳،۴-دی‌هیدروکسی‌بنزن (GDHB) هستند. ملانین ساختار ماکرومولکولی دارد و از واحدهای ۵،۶-دی‌هیدروکسی ایندول (DHI) و گروه‌های ۵،۶-دی‌هیدروکسی ایندول-۲-کربوکسیلیک‌اسید (DHICA) تشکیل شده است، که در آن DHI و DHICA به‌ترتیب از پلیمریزاسیون اکسیداتیو دوپامین و سیستئینیل-دوپامین تولید می‌شوند (Nicy et al., 2017). بزرگ‌ترین تولیدکنندگان این ترکیب، سفالوپودهای دریایی (سرپایان) هستند. این بهترین نوع ملانینِ موردمطالعه تاکنون است که توسط سپیا به‌عنوان یک راهبرد دفاعی در برابر دشمنان خود دفع می‌شود. گیاهان منبع دیگری هستند که در آنها ملانین گیاهی با یک فرایند شیمیایی به‌دست می‌آید، که در آن یک ماده خام گیاهی حاوی پلیمرها یا واحدهای مونومری فلاونوئیدها برای استخراج ملانین پردازش می‌شود. یکی دیگر از منابع کلیدی ملانین، میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها و قارچ‌ها) هستند. توانایی میکروب‌ها در سنتز ملانین تا حد زیادی توسط میل ترکیبی آنها برای ارتباط با میزبان و توانایی آنها در محافظت از خود در برابر استرس‌های محیطی مانند دمای بسیار بالا، اشعه ماوراءبنفش و تابش خورشیدی و همچنین شرایط استرس شیمیایی نامطلوب، مانند آسیب ناشی از اکسیدان‌ها، آنزیم‌های لیتیک، سمیت فلزات سنگین و داروهای ضدمیکروبی، تعیین می‌شود (Sansinenea & Ortiz, 2015). پلیمرهای ملانین سنتزی را نمی‌توان از نظر زیست‌محیطی و همچنین از نظر کیفیت با ملانین طبیعی مقایسه کرد. ملانین طبیعی نسبت به نوع سنتزی، ایمن و مقرون‌به‌صرفه است. برخلاف سایر روش‌های مبتنی‌بر زیست‌شناسی (ملانین دریایی و گیاهی)، میکروارگانیسم‌ها تحت تأثیر مشکلات نوسانات فصلی در طی پیشرفت تولید قرار نمی‌گیرند و می‌توانند سازوکارهای خود را باتوجه‌به ترکیب محیط کشت و شرایط رشد فراهم‌شده، تغییر دهند. به این معنی که، بیوسنتز رنگ‌دانه‌های ملانین توسط میکروب‌ها مستقل از شرایط آب‌وهوائی است که در فرایند تولید، اختلال ایجاد می‌کنند. سهولت و سرعت رشد بدون عواقب مضر و توانایی آنها برای رشد روی بسترهای کم‌هزینه از دیگر مزایای آنهاست (Roy & Rhim, 2022).

۴- روش‌های استخراج، خالص‌سازی و شناسایی ملانین از منابع دریایی

استخراج و خالص‌سازی ملانین، فرایندی به‌شدت وابسته به منبع این پلیمر رنگی (شامل جلبک‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها و منابع دریایی) است (Łopusiewicz, 2018). ازآنجایی‌که پیوند مستحکمی میان ملانین با سایر اجزای سلولی برقرار است، جداسازی ملانین خالص می‌تواند یک کار چالش‌برانگیز باشد (Haining & Achat-Mendes, 2017). استخراج ملانین طبیعی از کیسهٔ جوهر ماهی مرکب یکی از روش‌های نوین و پربازده در بهره‌برداری از منابع زیستی دریایی به‌شمار می‌رود. کیسهٔ جوهر ماهی مرکب یکی از منابع غنی ملانین طبیعی است که می‌توان آن را با روش‌های مختلف استخراج کرد. روش‌های متداول استخراج ملانین از این منبع، شامل استخراج اسیدی، قلیایی، آنزیمی، استفاده از امواج فراصوت، استفاده از حلال‌های آلی (نظیر الکل‌ها) و روش‌های ترکیبی است. هر یک از این روش‌ها، مزایا و معایب خاص خود را دارند و انتخاب روش

مناسب، بسته به هدف نهایی، خلوص موردنظر و شرایط فرایندی انجام می‌شود. در جدول (۲) به مراحل مختلف استخراج، خالص‌سازی و مشخصه‌های ملانین استخراج‌شده از جوهر ماهی مرکب اشاره شده است.

جدول ۲. مروری بر انواع روش‌های استخراج ملانین، ویژگی‌ها و منابع استخراج.

روش استخراج	شرح فرایند	زمان استخراج	راندمان (٪)	مزایا	معایب	منبع
هیدرولیز اسیدی	استفاده از اسیدهای معدنی مانند HCl (۱ مولار) در دمای ۸۰-۷۰ درجه سلسیوس برای تجزیه بافت	۴-۲ ساعت	۷۵-۶۰	هزینه پایین، تجهیزات ساده	تخریب جزیی ملانین، نیاز به خنثی‌سازی پساب اسیدی	(Wang & Rhim, 2019)
هیدرولیز قلیایی	استفاده از NaOH (۰/۵ تا ۱ مولار) در دمای ۷۰-۶۰ درجه سلسیوس	۵-۳ ساعت	۸۵-۷۰	راندمان بالاتر از روش اسیدی، حل شدن بهتر ملانین	خطر تخریب ساختار ملانین در pH بالا	(Song et al., 2023)
استخراج آنزیمی	استفاده از آنزیم پروتئیاز (مانند پروناز یا پاپائین) برای هضم پروتئین‌های همراه	۱۲-۶ ساعت	۹۵-۸۵	ملایم‌تر برای حفظ ساختار ملانین، خلوص بالا	هزینه بالای آنزیم‌ها، زمان‌بر بودن	(Suwannarach et al., 2019)
فراصوت	استفاده از امواج فراصوت (۲۰ تا ۴۰ کیلوهرتز) به‌همراه حلال‌های ملایم (مانند آب)	۴۰-۲۰ دقیقه	۹۰-۸۰	سریع‌ترین روش، کاهش مصرف حلال	نیاز به تجهیزات ویژه، بهینه‌سازی پارامترها ضروری است	(Guo et al., 2014)
استخراج با حلال	استفاده از حلال‌های آلی مانند DMSO و متانول	۲-۱ ساعت	۷۰-۵۰	مناسب برای نمونه‌های کوچک	خطرات سمیت حلال‌ها، خلوص پایین به‌دلیل باقی‌ماندن ناخالصی‌ها	(Song et al., 2021)
روش ترکیبی	استفاده ترکیبی از روش‌های فراصوت و هیدرولیز قلیایی	۲-۱ ساعت	۹۵-۹۰	راندمان بسیار بالا، کاهش زمان فرایند	پیچیدگی روش، نیاز به کنترل دقیق شرایط	(Song et al., 2021)

۴-۱- هیدرولیز اسیدی

این روش مبتنی‌بر تجزیهٔ ماتریکس پروتئینی اطراف ملانین با اسیدهای معدنی است. در این روش برای آماده‌سازی نمونه، ابتدا کیسه‌های جوهر تازه را از ماهی مرکب (Sepia officinalis) جدا کرده و با آب‌مقطر شستشو می‌دهند. سپس در آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک و به پودر تبدیل می‌کنند. برای هیدرولیز اسیدی نمونهٔ پودری، ۱۰ گرم پودر در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک (HCL) یک مولار حل می‌شود و مخلوط تهیه‌شده به‌مدت ۴-۳ ساعت در دمای ۸۰-۷۰ درجه سلسیوس تحت همزدن مداوم (با رفلکس) حرارت داده می‌شود. پس از سرد شدن، pH محلول با NaOH یک مولار خنثی و روی عدد ۷ تنظیم می‌شود. نهایتاً، رسوب سیاه‌رنگ ملانین توسط سانتریفیوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه جداسازی می‌شود. نمونهٔ استخراج‌شده توسط حلال‌هایی مانند آب‌مقطر، اتانول و اتردی‌اتیل با نسبت ۱:۱۰ وزنی- حجمی، خالص‌سازی می‌شود و سپس در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در آون خشک می گردد (Wang & Rhim, 2019). این روش به‌دلیل عدم نیاز به تجهیزات پیچیده، از هزینه پایین برخوردار است و علاوه‌بر آن، در زمان کوتاهی با بازدهی حدود ۷۵٪-۶۰ قابل‌انجام است؛ البته استفاده از این روش با چالش‌هایی نیز روبه‌رو می‌باشد که ازآن‌جمله می‌توان به تخریب ساختار ملانین به‌دلیل شرایط اسیدی، احتمال باقی ماندن ناخالصی (مثلاً باقی ماندن کراتین که در برابر هیدرولیز اسیدی مقاوم است) و نیاز به خنثی‌سازی پساب اسیدی به‌دلایل ملاحظات زیست‌محیطی اشاره کرد. از ملانین استخراج‌شده با این روش می‌توان برای تولید رنگ‌های صنعتی، جاذب فلزات سنگین در فاضلاب و افزودنی در کودهای کشاورزی استفاده کرد (Kiran et al., 2014).

۴-۲- هیدرولیز قلیایی

هیدرولیز قلیایی یکی از متداول‌ترین روش‌های استخراج ملانین با بازدهی بالا ۹۵٪-۷۰ است که از بازهای قوی مانند NaOH یا KOH برای تجزیهٔ ماتریکس پروتئینی اطراف ملانین استفاده می‌کند. در این روش نیز مطابق روش هیدرولیز اسیدی، ابتدا کیسه‌های جوهر تازه را از ماهی مرکب (Sepia officinalis) جدا کرده و با آب‌مقطر شستشو داده و سپس در آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک و به پودر تبدیل می‌کنند. برای هیدرولیز قلیایی نمونه پودری، ۱۰ گرم پودر در ۱۰۰ میلی‌لیتر NaOH (۰/۷ مولار) حل می‌شود و مخلوط تهیه‌شده به‌مدت ۳-۲ ساعت در دمای ۷۰-۶۰ درجه سلسیوس تحت همزدن مداوم (با رفلکس) حرارت داده می‌شود. پس از سرد شدن، pH محلول با HCL یک مولار خنثی و روی عدد ۷ تنظیم شده و رسوب سیاه‌رنگ ملانین توسط سانتریفیوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه جداسازی می‌شود. رسوب تهیه‌شده ۳ بار با آب‌مقطر و ۲ بار با اتانول ۷۰٪ شستشو داده می‌شود و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در آون خشک می‌شود. میزان بازدهی استخراج ملانین با این روش حدود ۹۰٪-۸۰ است (Song et al., 2023). از مزایای این روش نسبت به هیدرولیز اسیدی می‌توان به راندمان بالاتر، حلالیت بهتر ملانین در محیط قلیایی و کاهش احتمال تخریب ساختار ملانین اشاره کرد؛ بااین‌وجود، نیاز به کنترل دقیق pH و دما، وجود ناخالصی‌های یونی و به‌جا گذاشتن پساب قلیایی، از محدودیت‌های روش هیدرولیز قلیایی هستند که برای به حداکثر رساندن بازدهی استخراج می‌بایست شرایط به‌دقّت کنترل و بهینه‌سازی شود. از ملانین استخراج‌شده با این روش می‌توان در مصارف دارویی، آرایشی-بهداشتی و صنایع غذایی استفاده کرد. هیدرولیز قلیایی با تعادل مناسب بین راندمان، هزینه و زمان، یکی از بهترین روش‌های استخراج ملانین برای مصارف صنعتی است (Xie et al., 2021).

۴-۳- روش آنزیمی

روش آنزیمی یکی از ملایم‌ترین و مؤثرترین روش‌های استخراج ملانین است که از آنزیم‌های پروتئولیتیک برای هضم ماتریکس پروتئینی اطراف ملانوزوم‌ها استفاده می‌کند. این روش برای مصارف دارویی و زیستی که نیاز به ملانین با خلوص و کیفیت بالا دارند، ایده‌آل است. در این روش، ابتدا ۱۰ گرم از کیسه جوهر در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl (۵۰ میلی‌مولار) با pH برابر ۷، حل می‌شود و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام فراصوت (۴۰ کیلوهرتز) قرار داده می‌شود. برای هضم آنزیمی ملانین، آنزیم پروتئیناز K را با غلظت نهایی ۲-۱ mg/ml به نمونه اضافه کرده و به‌مدت ۱۲-۶ ساعت در دمای ۴۵-۳۷ درجه سلسیوس انکوبه می‌شود. باید دقت شود که pH در محدوده ۸-۷/۵ نگه‌داشته شود. پس از انکوباسیون، مخلوط به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس حرارت داده می‌شود تا آنزیم، غیرفعال شود و پس از آن به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر

دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. برای خالص‌سازی نمونه، ابتدا رسوب سیاه‌رنگ را با آب‌مقطر استریل شستشو داده و برای حذف باقی‌مانده پروتئین‌ها از دیالیز استفاده می‌شود. محصول نهایی در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در آون خشک می‌شود (Yang et al., 2023). از مزایای روش آنزیمی می‌توان به حفظ کامل ساختار ملانین، خلوص بسیار بالا (۹۸٪-۹۵٪)، امکان استفاده در مصارف دارویی و پزشکی و عدم استفاده از مواد شیمیایی خشن اشاره کرد. درعین‌حال، هزینه بالای آنزیم‌ها، زمان‌بر بودن فرایند (۱۲-۶ ساعت) و نیاز به کنترل دقیق شرایط واکنش، استفاده از این روش را محدود می‌کند. از ملانین استخراج‌شده با روش هضم آنزیمی می‌توان برای تهیه سامانه‌های دارورسانی، ایمپلنت‌های پزشکی، محصولات آرایشی-بهداشتی و مواد ضدمیکروبی بهره گرفت. این روش با وجود هزینه بالاتر، بهترین گزینه برای تولید ملانین با کیفیت دارویی محسوب می‌شود. برای مصارف صنعتی می‌توان آن را با روش‌های دیگر مانند هیدرولیز قلیایی ترکیب کرد تا هزینه‌ها کاهش یابد (Haining & Achat-Mendes, 2017).

۴-۴- روش فراصوت

روش فراصوت یک فن استخراج سریع و کارآمد است که از امواج فراصوت با بسامد بالا (معمولاً ۴۰-۲۰ کیلوهرتز) برای آزادسازی ملانین از ماتریکس سلولی استفاده می‌کند. این روش به‌دلیل سرعت بالا و راندمان خوب، یک جایگزین مناسب برای روش‌های سنتی است. در این روش، ابتدا ۵ گرم پودر کیسه جوهر در ۵۰ میلی‌لیتر حلال (آب‌مقطر یا NaOH ۰/۱ مولار) حل شده و pH محلول بین ۹-۷ تنظیم می‌شود. سپس، نمونه در دمای ۵۰-۴۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۰-۲۰ دقیقه تحت تابش امواج فراصوت با قدرت ۲۰۰-۱۵۰ وات قرار داده می‌شود. چرخه کاری (duty cycle) روی ۷۰٪-۵۰٪ تنظیم می‌شود. برای جداسازی و خالص‌سازی نمونه، ابتدا مخلوط به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب سیاه‌رنگ (ملانین) با آب‌مقطر شستشو داده می‌شود. در صورت نیاز، از دیالیز برای خالص‌سازی بیشتر استفاده می‌شود. برای خشک کردن محصول، نمونه در آون با دمای ۴۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت قرار می‌گیرد و درنهایت محصول به‌صورت پودر سیاه‌رنگ با راندمان ۹۵٪-۸۵٪ به‌دست می‌آید (Suwannarach et al., 2019). در این روش، زمان استخراج کوتاه‌تر (۶۰-۳۰ دقیقه) و راندمان، بالاتر (تا ۹۵٪) است. درعین‌حال، مصرف حلال‌های شیمیایی به حداقل رسیده و ساختار ملانین حفظ می‌شود؛ ولی توجه به این نکته ضروری است که استفاده از روش فراصوت به تجهیزات تخصصی نیاز داشته و بهینه‌سازی پارامترها دشوار است و درعین‌حال ممکن است برای برخی منابع، نیاز به پیش‌تیمار داشته باشد. از ملانین جداسازی‌شده به‌روش فراصوت، می‌توان برای تولید مواد ضدمیکروبی، کاربردهای الکترونیک زیستی، تولید رنگ‌دانه‌های طبیعی و جاذب فلزات سنگین استفاده کرد. این روش به‌دلیل سرعت و کارایی بالا، گزینهٔ مناسبی برای تولید ملانین در مقیاس صنعتی محسوب می‌شود. برای دستیابی به بهترین نتایج، تنظیم دقیق پارامترها برای هر نوع نمونه ضروری است (Pralea et al., 2019).

۴-۵- روش استخراج ملانین با حلال

روش استخراج با حلال یکی از متداول‌ترین روش‌ها برای جداسازی ملانین از منابع مختلف مانند کیسه جوهر ماهی مرکب، قارچ‌ها و باکتری‌ها است. این روش براساس اختلاف حلالیت ملانین در حلال‌های آلی و آبی کار می‌کند و برای نمونه‌های کوچک و تحقیقات آزمایشگاهی مناسب است. برای پیش‌تیمار نمونه، ابتدا ۱۰ گرم پودر کیسه جوهر را در ۵۰ میلی‌لیتر NaOH (۰/۱ مولار) به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده تا ماتریکس پروتئینی تجزیه شود. سپس، نمونهٔ پیش‌تیمارشده با DMSO یا متانول (نسبت ۱:۱۰ وزن به حجم) مخلوط شده و به‌مدت ۴-۲ ساعت در دمای ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس تحت همزدن مداوم قرار می‌گیرد. برای جداسازی ملانین، مخلوط به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی (حاوی ملانین) جمع‌آوری می‌شود. سپس، PH محلول را با اسیدکلریدریک ۱ مولار (HCl) تا pH برابر ۲ اسیدی می‌کنند تا ملانین رسوب کند و رسوب باقی‌مانده با آب‌مقطر و اتانول شستشو داده می‌شود. درنهایت، نمونه با پمپ خلأ یا در آون در دمای ۴۰ درجه سلسیوس خشک می‌شود. از مزایای این روش علاوه‌بر ساده بودن مراحل اجرا، می‌توان به زمان استخراج کوتاه (۴-۲ ساعت) و قابلیت استفاده برای منابع مختلف (قارچ، باکتری، بافت جانوری) اشاره کرد. علاوه‌براین، از معایب این روش باقی ماندن ناخالصی‌های حلال در محصول، گران بودن بعضی حلال‌ها

(مانند DMSO) و نیاز به مرحلهٔ خالص‌سازی اضافی برای مصارف دارویی می‌باشد. از این روش می‌توان برای تولید ملانین برای صنایع رنگ و پوشش، تحقیقات آزمایشگاهی و تولید جوهرهای زیستی استفاده کرد. این روش برای استخراج سریع ملانین در مقیاس آزمایشگاهی مناسب است؛ اما برای مصارف دارویی باید مراحل خالص‌سازی بیشتری انجام شود. ترکیب این روش با فراصوت می‌تواند راندمان جداسازی را افزایش دهد (Dai et al., 2020).

۴-۶- روش ترکیبی استخراج ملانین

روش ترکیبی با تلفیق مزایای هیدرولیز قلیایی و استخراج فراصوت، یکی از کارآمدترین پروتکل‌ها برای استخراج ملانین با راندمان >۹۵٪ و خلوص بالا محسوب می‌شود. این روش به‌ویژه برای منابع پیچیده مانند کیسه جوهر ماهی مرکب (officinalis) و قارچ‌های ملانوژنیک ایده‌آل است. جهت پیش‌تیمار قلیایی، نمونه را در ۱۰۰ میلی‌لیتر NaOH (۰/۵ مولار) به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده و pH روی ۱۱-۱۰ تنظیم می‌شود. سپس، مخلوط تحت تابش امواج فراصوت با بسامد ۲۰ کیلوهرتز، چرخهٔ کاری ۵۰٪ (پالس‌های ۵ ثانیه‌ای)، زمان ۱۵ دقیقه و دمای کنترل‌شده (با حمام یخ)، قرار داده می‌شود. نهایتاً، pH محلول با HCl (۱ مولار) خنثی شده و نمونه به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ می‌شود. جهت خالص‌سازی، از دیالیز استفاده شده و برای نگهداری نمونه، از خشک کردن انجمادی[1] استفاده می‌شود. استفاده از روش ترکیبی، راندمان استخراج را تا حدود ۹۸٪-۹۰ بالاتر برده و علاوه‌براین، مدت‌زمان استخراج و مصرف حلال‌های شیمیایی به حداقل می‌رسد. مهم‌تر از همه این‌که، ساختار ملانین به‌دلیل کنترل دما در حین فراصوت حفظ می‌شود. از این روش می‌توان برای تولید ملانین در مصارف دارورسانی هدفمند (به‌دلیل خلوص بالا)، الکترونیک انعطاف‌پذیر و پوشش‌های ضدمیکروبی استفاده کرد (Łopusiewicz, 2018).

۴- کاربردهای ملانین در نانوزیست‌فناوری

ملانین طبیعی و مصنوعی، به‌دلیل خواص منحصربه‌فرد خود، کاربردهای متنوعی در نانوزیست‌فناوری دارند (شکل ۴). این خواص شامل زیست‌سازگاری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، توانایی شلانه کردن یون‌های فلزی و خواص فوتوترمال است که استفاده از آنها را در زمینه‌هایی مانند تصویربرداری، دارورسانی و درمان سرطان مناسب می‌سازد. به‌علاوه، ملانین‌ها حاوی ساختارهای کاتکولی فراوانی هستند که به آنها اجازه می‌دهد تا به‌ترتیب از طریق واکنش‌های باز شیف و افزایش مایکل[2] با مولکول‌های حاوی انتهای آمین و سولفیدریل واکنش دهند. بنابراین، آنها می‌توانند عامل‌دار کردن سطح نانومواد با سایر مولکول‌های زیستی را برای کاربردهای زیستی خاص تسهیل کرده و با بارگذاری داروی‌های ضدسرطان از طریق برهم‌کنش‌های پیوندی، به‌عنوان سامانه‌های دارورسانی برای درمان تومور و با ماده حاجب تصویربرداری، عمل کنند (Mavridi-Printezi et al., 2023).

وانگ[3] و همکارانش (۲۰۱۸)، مروری بر کاربردهای مختلف پلی‌دوپامین در سامانه‌های دارورسانی هدفمند تومور و شرح جامعی از رفتار رهایش دارو در نانوذرات پلی‌دوپامین حاوی دارو، ارائه داده‌اند. براساس یافته‌های این مقاله، پلی‌دوپامین به‌دلیل ویژگی‌های منحصربه‌فرد ازجمله: زیست‌سازگاری مناسب، پتانسیل بالا در بارگذاری دارو، قابلیت اصلاح سطح، مناسب بودن دسترسی زیستی و خواص فوتوترمال می‌تواند در درمان ترکیبی و ترانوستیک[4] سرطان مورداستفاده قرار گیرد (Wang et al., 2018). چِنگ[5] و همکارانش نیز دستاوردهای ترکیبات مبتنی‌بر پلتفرم پلی‌دوپامین را در نانوپزشکی پیشرفته و اصلاح سطح آن را از سال ۲۰۱۶ تا ۲۰۱۹ مورد بررسی قرار دادند. در این مقاله به بررسی جامع خواص، روش‌های سنتز و کاربردهای گسترده پلی‌دوپامین پرداخته شده و در مروری جامع نشان داده شده که پلی‌دوپامین به‌عنوان یک ماده چندکاره با قابلیت‌های منحصربه‌فرد، پتانسیل بالایی برای تحول در حوزه‌های مختلف به‌ویژه نانوپزشکی دارد. با وجود پیشرفت‌های چشمگیر، هنوز زمینه‌های زیادی برای بهینه‌سازی و کشف

1. Lyophilization
2. Michael Addition Reaction
3. Wang
4. Theranostics
5. Cheng

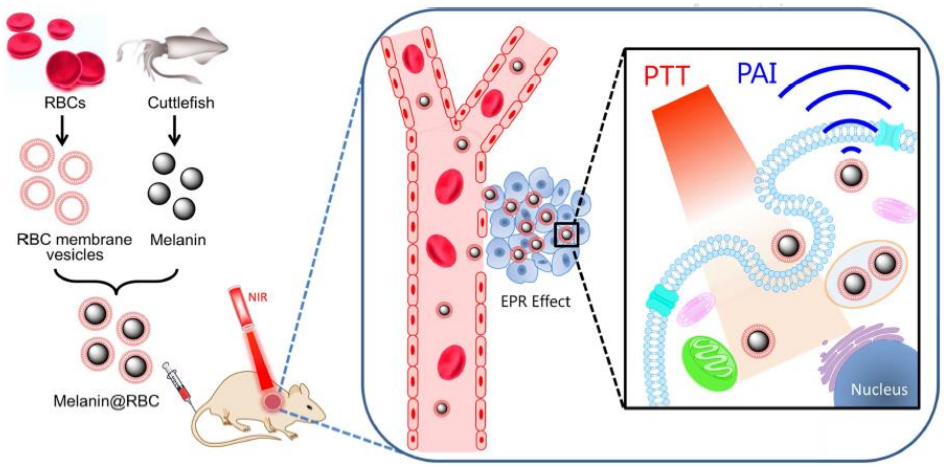
شکل ۴. کاربردهای ملانین طبیعی و مصنوعی در حوزه‌های مختلف؛ همان‌گونه که در تصویر مشخص است، ملانین و گونه‌های مصنوعی آن می‌توانند در زمینه‌های گسترده‌ای مورداستفاده قرار گیرند.

کاربردهای جدید وجود دارد که نیازمند تحقیقات بین‌رشته‌ای عمیق‌تر است (Cheng et al., 2019).

نانوذرات ملانین به‌عنوان یک عامل مؤثر در فتوترمال‌تراپی با راندمان بالا، توجهٔ زیادی را به خود جلب کرد؛ زیرا می‌تواند طیف گسترده‌ای از طول‌موج‌ها را به‌ویژه در ناحیهٔ مادون‌قرمز جذب کرده و انرژی جذب‌شده را به گرما تبدیل کند (Mavridi-Printezi et al., 2023). چندین مطالعهٔ قبلی سعی کردند مشکل حل نشدن طبیعی ملانین را با محصور کردن آن در حامل‌های مختلفی مانند نانوزیکول‌ها (Wang et al., 2018)، نانوذرات پگیله (Cheng et al., 2019) و لیپوزوم‌ها (Kim et al., 2018) حل کنند. در یک مطالعه، دنگ[1] و همکارانش (۲۰۱۹) اقدام به طراحی و تهیهٔ نانوذراتی متشکل از ملانین، اسیدهای آمینه و پلی‌ساکارید استخراج‌شده از ماهی مرکب کردند. نتایج حاصل از مطالعهٔ آنها نشان از اثربخشی معنادار نانوذرات تهیه‌شده در طی فتوترمال‌تراپی در شرایط درون‌تنی[2] داشت (Deng et al., 2019). در همین راستا، جیانگ[3] و همکارانش (۲۰۱۷) اقدام به تهیه نانوذرات ملانین حاصل از جوهر ماهی مرکب و پوشش آن با سلول‌های خونی به‌عنوان عامل مؤثر در طی فتوترمال‌تراپی و بهبود تجمع این نانوذرات در محیط تومور کردند (Jiang et al., 2017). آنها پس از پوشش دادن نانوذرات ملانین با غشای گلبول قرمز توانستند نانوذرات ترکیبی تولید کنند که به‌طور مؤثری احتباس خون و تجمع تومور را در داخل بدن بهبود ببخشد. نانوذرات ترکیبی، خاصیت تصویربرداری فوتوآکوستیک و قابلیت تبدیل فوتوترمال عالی داشتند و در مقایسه با نانوذرات ملانین به‌تنهائی، اثربخشی ضدتوموری بالاتری را در موش‌های حامل تومور A549 نشان دادند (شکل ۵). نتایج مرتبط با سمیت سلولی به‌کمک طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش و اثربخشی فتوترمال ارزیابی شد. این نتایج نشان داد که ملانین قادر به جذب تابش در محدودهٔ طیف وسیعی از امواج در ناحیهٔ مادون‌قرمز است؛ ازاین‌رو، این ترکیب قادر به افزایش حرارت کافی در جهت نابودی سلول‌های تومور به‌واسطهٔ اثر تبدیل تابش به حرارت است. مشخصهٔ اصلی این نوع فعالیت فتوترمال‌تراپی، تبدیل مؤثر و به‌صرفهٔ انرژی در حالت برانگیخته به‌صورت انرژی حرارتی در ریزمحیط تومور است؛ البته، اثر این قابلیت درمانی فتوترمال بایستی قبل از استفاده در مراحل بالینی و مدل‌های حیوانی در رده‌های مختلف سلولی مورداستفاده قرار بگیرد (Jiang et al., 2017).

یکی دیگر از کاربردهای ملانین در نانوزیست‌فناوری، استفاده از ملانین به‌عنوان بستر برای تهیه سایر نانوذرات است. گزارش‌های زیادی در مورد سنتز نانوذرات فلزی (نقره، طلا) یا

1. Deng
2. In vivo
3. Jiang



شکل ۵. تصویری از عملکرد نانوذرات ملانین (MNP) استتارشده با غشای گلبول‌های قرمز (RBC) برای درمان فوتوترمال پیشرفته؛ نانوذرات ترکیبی تولیدشده توانستند به‌طور مؤثری احتباس خون و تجمع نانوذرات در داخل تومور را بهبود بخشند (Jiang et al., 2017).

جدول ۳. سنتز برخی از نانوذرات مختلف با استفاده از ملانین.

نانوذرات	ویژگی‌های نانوذرات تولیدشده با استفاده از بستر ملانین	منابع
نقره	پراکندگی یکنواخت و اندازهٔ متوسط حدود ۱۵ نانومتر	(Jiang et al., 2017)
نقره	ایجاد تقارن مورب در نانوذرات تشکیل‌شده و پراکندگی یکنواخت و اندازهٔ متوسط حدود ۳۰ نانومتر	(Roy et al., 2019)
طلا	ریخت‌شناسی کروی، پراکندگی یکنواخت و اندازهٔ متوسط حدود ۱۵ نانومتر	(Abdullah et al., 2025)
اکسید مس	پراکندگی یکنواخت و اندازهٔ متوسط حدود ۳۰ نانومتر	(Apte et al., 2013)
اکسید روی	ریخت‌شناسی پولکی‌شکل، پراکندگی یکنواخت و اندازهٔ متوسط حدود ۲۶۰-۸۰ نانومتر	(Roy & Rhim, 2019)

اکسید فلزی (مس، روی) با استفاده از ملانین به‌عنوان یک عامل کاهنده سبزتر وجود دارد (جدول ۳). ملانین به‌دلیل ساختار شیمیایی منحصربه‌فرد و خواص فیزیکوشیمیایی ویژه ازجمله: وجود گروه‌های عاملی فعال در ساختار خود، خاصیت احیاکنندگی ذاتی، پایداری کلوئیدی، خواص جذب نور و فوتوترمال و کنترل ریزساختار نانوذرات، بستر ایده‌آلی برای سنتز نانوذرات فلزی محسوب می‌شود. گروه‌های عاملی هیدروکسیل، آمین و کربونیل موجود در ساختار ملانین می‌توانند به‌عنوان مراکز هسته‌زایی برای کاهش یون‌های فلزی عمل کرده و بدین‌ترتیب با این یون‌ها، کمپلکس پایدار تشکیل دهند. ساختار آروماتیک و سیستم کینون/ هیدروکینون موجود در ملانین نیز باعث کاهش خودبه‌خودی یون‌های فلزی و تشکیل نانوذرات می‌شود. همچنین، با کنترل غلظت ملانین و pH محیط می‌توان اندازه و شکل نانوذرات فلزی را کنترل کرد. بدین‌ترتیب ملانین به‌دلیل خواص احیاکنندگی، تثبیت‌کنندگی و زیست‌سازگاری، یک بستر ایده‌آل برای سنتز سبز نانوذرات فلزی است. این ویژگی‌ها باعث می‌شود نانوذرات تولیدشده با این روش برای کاربردهای پزشکی مانند دارورسانی، تصویربرداری و درمان‌های ضدسرطانی مناسب باشند (Deng et al., 2019).

۶- نتیجه‌گیری

باتوجه‌به ویژگی‌های منحصربه‌فرد ملانین طبیعی استخراج‌شده از جوهر ماهی مرکب، این ترکیب به‌عنوان یک بیوپلیمر زیستی ارزشمند، پتانسیل قابل‌توجهی برای کاربرد در حوزه نانوزیست‌فناوری دارد. مرور مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهد که شرایط استخراج، ازجمله pH محیط، نوع حلال، دمای فراوری و زمان واکنش، تأثیر مستقیمی بر خلوص، ساختار، و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ملانین به‌دست‌آمده دارند. همچنین، روش‌های نوین مانند استخراج به‌کمک امواج فراصوت، استفاده از حلال‌های سبز و فن‌های نانوپروسسینگ می‌توانند بازده و کیفیت ملانین را به‌طور چشمگیری افزایش دهند. ملانین حاصل از جوهر ماهی مرکب به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، رسانایی الکتریکی، زیست‌سازگاری و توانایی در جذب نور، گزینهٔ مناسبی برای توسعه نانومواد زیستی، سامانه‌های دارورسانی،

حسگرهای زیستی و کاربردهای زیست‌پزشکی محسوب می‌شود. بااین‌حال، نیاز به مطالعات بیشتر برای استانداردسازی فرایند استخراج، تحلیل ساختارهای نانویی، و ارزیابی عملکرد زیستی آن در محیط‌های واقعی احساس می‌شود. به‌طورکلی، استفاده از ملانین طبیعی به‌عنوان یک منبع زیست‌سازگار و پایدار، می‌تواند راهکاری نوین و مؤثر در توسعه فناوری‌های پیشرفته نانوزیستی باشد. با وجود این دستاوردها، چالش‌هایی باقی است که باید برطرف شوند:

۱. استانداردسازی دقیق فرایند استخراج و خالص‌سازی: نوع منابع زیستی، فصل صید، گونه و شرایط بهینه واکنش، می‌تواند باعث تغییر در مشخصات ذرات استخراج‌شده شود. مطالعات کنترل‌شده و مقایسه‌ای میان روش‌های خشک‌سازی (فریز، فوق‌بحرانی، اسپری) و پردازش‌های پسین ضروری است.

۲. تحلیل ریزساختار و ریزساختار نانومقیاس: استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی[1] (SEM)، میکروسکوپ نیروی اتمی[2] (AFM)، و روش برونوئر–امت–تلر[3] (BET) برای ارزیابی دقیق قطر ذرات، توزیع اندازه، زبری سطح و تحمّل ساختاری تحت شرایط عملیات فیزیکی فرضی، جهت تضمین عملکرد قابل‌پیش‌بینی در کاربردهای زیست‌فناوری الزامی است.

۳. ارزیابی عملکرد در شرایط شبیه‌سازی‌شده در محل[4]، مطالعات سینتیک آزادسازی دارو، پاسخ فتوترمال، و پایداری بیوشیمیایی مثلاً در حضور پروتئین‌ها، نمک‌ها و pH فیزیولوژیک، باید در مدل‌های مقدماتی پیش‌درمانی حیوانی انجام شود تا پتانسیل کاربرد بالینی ارزیابی شود.

٤. بهینه‌سازی روش‌های استخراج پیشرفته: بهره‌گیری از ترکیب فن‌های فراصوت–مایکروویو یا سونوشیمی می‌تواند ضمن کاهش حلال مصرفی و مدت‌زمان استخراج، بازده ماده مؤثر و خلوص نهایی را افزایش دهد. شواهد از سایر منابع نشان می‌دهد که این رویکردها در شرایط مشابه (مثلاً استخراج ملانین از قارچ یا گیاهان) تا افزایش ۷۵٪–۲۵ بازده مؤثر است.

به‌طورکلی، ملانین استخراج‌شده از جوهر ماهی مرکب با ساختار کروی منظم، سطح ویژهٔ بالا، پایداری حرارتی، و جذب طیف گسترده، بستر فنی و کارآمدی را برای توسعه نانومواد زیستی شامل سامانه‌های دارورسانی هدفمند، فتوترمال‌تراپی و حسگرها فراهم می‌آورد. بااینکه پژوهش‌های این حوزه گام‌های بلندی را برداشته‌اند، تحقق کاربرد عملی و بالینی این فناوری نیازمند استانداردسازی فرایندی، تحلیل ساختاری دقیق، و آزمایش‌های عملکردی درون‌تنی می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از افرادی که در انجام این پروژه همکاری داشته‌اند، اعلام می‌دارند.

تضاد منافع

مؤلّفان اظهار داشتند که منافع متقابلی از تألیف یا انتشار این مقاله ندارند.

منابع

1. Abdullah, W., Razak, N. N. A. N. A., Dheyab, M. A., Salem, F., Aziz, A. A., Alanezi, S. T., Oladzadabbasabadi, N., & Ghasemlou, M. (2025). Melanin-Driven Green Synthesis and Surface Modification of Metal and Metal-Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials*, 2503017. https://doi.org/10.1002/adfm.202503017
2. Apte, M., Girme, G., Nair, R., Bankar, A., Kumar, A. R., & Zinjarde, S. (2013). Melanin mediated synthesis of gold nanoparticles by Yarrowia lipolytica. *Materials Letters*, *95*, 149–152. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2012.12.087
3. Babaluei, M., Mojarab, Y., Mottaghitalab, F., & Farokhi, M. (2023). Injectable hydrogel based on silk fibroin/carboxymethyl cellulose/agarose containing polydopamine functionalized graphene oxide with conductivity, hemostasis, antibacterial, and anti-oxidant properties for full-thickness burn healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, *249*, 126051. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126051
4. Babaluei, M., Mojarab, Y., Mottaghitalab, F., Saeb, M. R., & Farokhi, M. (2024). Conductive hydrogels based on tragacanth and silk fibroin containing dopamine functionalized carboxyl-capped aniline pentamer: Merging hemostasis, antibacterial, and anti-oxidant properties into a multifunctional hydrogel for burn wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, *261*, 129932. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129932
5. Babaluei, M., Mottaghitalab, F., Seifalian, A., & Farokhi, M. (2023). Injectable multifunctional hydrogel based on carboxymethylcellulose/polyacrylamide/polydopamine containing vitamin C and curcumin promoted full-thickness burn regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, *236*, 124005. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124005
6. Caldas, M., Santos, A. C., Veiga, F., Rebelo, R., Reis, R. L., & Correlo, V. M. (2020). Melanin nanoparticles as a promising tool for biomedical applications–a review. *Acta biomaterialia*, *105*, 26–43. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.044

1. Scanning electron microscopy
2. Atomic force microscopy
3. Brunauer, Emmett and Teller
4. In situ

Nanotechnology, *29*(41), 415101. https://doi.org/10.1088/1361-6528/aad4da

23. Kiran, G. S., Dhasayan, A., Lipton, A. N., Selvin, J., Arasu, M. V., & Al-Dhabi, N. A. (2014). Melanin-templated rapid synthesis of silver nanostructures. *Journal of Nanobiotechnology*, *12(1)*, 18. https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-18
24. Leonoline Ebenezer, J., Gunapriya, R., Ranganathan, K., & Karthik Ganesh, M. (2020). Biologically active compounds in Sepia pharaonis fish (Ehrenberg, 1831) ink extract from Chennai seacoast isolated by gas chromatography. *Drug Invention Today*, *13*(1). https://openurl.ebsco.com/EPDB%3Agcd%3A7%3A31351815/detailv2?sid=ebsco%3Aplink%3Acrawler&id=ebsco%3Agcd%3A141552671&crl=f&link_origin=www.google.com
25. Liang, Y., Han, Y., Dan, J., Li, R., Sun, H., Wang, J., & Zhang, W. (2023). A high-efficient and stable artificial superoxide dismutase based on functionalized melanin nanoparticles from cuttlefish ink for food preservation. *Food Research International*, *163*, 112211. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112211
26. Łopusiewicz, Ł. (2018). The isolation, purification and analysis of the melanin pigment extracted from Armillaria mellea rhizomorphs. *World Scientific News*(100), 135–153. https://www.researchgate.net/publication/325477798
27. Marcovici, I., Coricovac, D., Pinzaru, I., Macasoi, I. G., Popescu, R., Chioibas, R., Zupko, I., & Dehelean, C. A. (2022). Melanin and melanin-functionalized nanoparticles as promising tools in cancer research—a review. *Cancers*, *14*(7), 1838. https://doi.org/10.3390/cancers14071838
28. Mavridi-Printezi, A., Menichetti, A., Mordini, D., Amorati, R., & Montalti, M. (2023). Recent applications of melanin-like nanoparticles as antioxidant agents. *Antioxidants*, *12*(4), 863. https://doi.org/10.3390/antiox12040863
29. MiMURA, T. S. U. T. O. M. U., MAEDA, K., TSUJIBO, H., SATAKE, M., & FUJITA, T. (1982). Studies on biological activities of melanin from marine animals. II. Purification of melanin from Octopus vulgaris Cuvier and its inhibitory activity on gastric juice secretion in rats. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *30*(4), 1508-1512. https://doi.org/10.1248/cpb.30.1508
30. Moniri Javadhesari, S., Koohi, M., & Jabraili, M. (2022). Nanomaterials: Applications in regeneration of damaged tissues. *Advanced Ceramics Progress*, *8(4)*, 1–14. https://doi.org/10.30501/acp.2022.356039.1100
31. Nabhitabhata, J. (2014). Sepia pharaonis. In Cephalopod culture (pp. 205-224). Dordrecht: Springer Netherlands.
32. Nicy, A. B., Velayutham, P., Shakila, R. J., Ganesan, P., Sundaramoorthy, B., & Kanaga, V. (2017). Antioxidative activity of melanin free ink from cuttlefish, Sepia prabahari. *Journal of Experimental Zoology India*, *20*(2).
33. Pralea, I.-E., Moldovan, R.-C., Petrache, A.-M., Ilieș, M., Hegheș, S.-C., Ielciu, I., Nicoară, R., Moldovan, M., Ene, M., Radu., M, Uifălean., A, & Iuga, C. A. (2019). From extraction to advanced analytical methods: The challenges of melanin analysis. *International journal of molecular sciences*, *20*(16), 3943. https://doi.org/10.3390/ijms20163943
34. Premi, S., Wallisch, S., Mano, C. M., Weiner, A. B., Bacchiocchi, A., Wakamatsu, K., Bechara, E. J., Halaban, R., Douki, T., & Brash, D. E. (2015). Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. *Science*, *347*(6224), 842–847. https://doi.org/10.1126/science.1256022
35. Roy, S., & Rhim, J. W. (2019). Carrageenan-based antimicrobial bionanocomposite films incorporated with ZnO nanoparticles stabilized by melanin. *Food Hydrocolloids*, *90*, 500–507. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.056
36. Roy, S., & Rhim, J.-W. (2022). New insight into melanin for food packaging and biotechnology applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *62*(17), 4629–4655. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1878097
37. Roy, S., Shankar, S., & Rhim, J. W. (2019). Melanin-mediated synthesis of silver nanoparticle and its use for the preparation of carrageenan-based antibacterial films. *Food Hydrocolloids*, *88*, 237–246. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.013
38. Sabzi, S., Habibi, M., Badmasti, F., Shahbazi, S., Karam, M. R. A., & Farokhi, M. (2024). Polydopamine-based nano adjuvant as a promising vaccine carrier induces significant immune responses against Acinetobacter baumannii-associated pneumonia. *International Journal of Pharmaceutics*, *654*, 123961. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.123961
39. Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2015). Melanin: a photoprotection for Bacillus thuringiensis based biopesticides. *Biotechnology*
7. Cao, W., Zhou, X., McCallum, N. C., Hu, Z., Ni, Q. Z., Kapoor, U., Heil, C. M., Cay, K. S., Zand, T., Mantanona, A. J., Jayaraman, A., Dhinojwala, A., Deheyn, D. D., Shawkey, M. D., Burkart, M. D., Rinehart, J. D., & Gianneschi, N. C. (2021). Unraveling the structure and function of melanin through synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, *143*(7), 2622–2637. https://doi.org/10.1021/jacs.0c12322
8. Cheng, W., Zeng, X., Chen, H., Li, Z., Zeng, W., Mei, L., & Zhao, Y. (2019). Versatile polydopamine platforms: synthesis and promising applications for surface modification and advanced nanomedicine. *ACS nano*, *13(8)*, 8537–8565. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04436
9. Dai, C.-Y., Liao, P. R., Zhao, M. Z., Gong, C., Dang, Y., Qu, Y., & Qiu, L. S. (2020). Optimization of ultrasonic flavonoid extraction from Saussurea involucrate, and the ability of flavonoids to block melanin deposition in human melanocytes. *Molecules*, *25*(2), 313. https://doi.org/10.3390/molecules25020313
10. Deng, R. H., Zou, M. Z., Zheng, D., Peng, S. Y., Liu, W., Bai, X. F., Chen, H.-S., Sun, Y., Zhou, P.-H., & Zhang, X.-Z. (2019). Nanoparticles from cuttlefish ink inhibit tumor growth by synergizing immunotherapy and photothermal therapy. *ACS nano*, *13*(8), 8618–8629. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b02993
11. Ebenezer, J. L, Shanmugam, R., & Jayasree, A. (2022). A surge in anti-bacterial and anti-inflammatory activity of Sepia pharaonis ink extract in different solvents-an in-vitro study. *J Pharm Negat*, *13*, 9280–9286. https://doi.org/ 10.47750/pnr.2022.13.S09.1086
12. El-Batal, A. I., El-Sayyad, G. S., El-Ghamery, A., & Gobara, M. (2017). Response surface methodology optimization of melanin production by Streptomyces cyaneus and synthesis of copper oxide nanoparticles using gamma radiation. *Journal of Cluster Science*, *28(3)*, 1083–1112. https://doi.org/10.1007/s10876-017-1273-2
13. El-Naggar, N. E. A., & Saber, W. I. (2022). Natural melanin: Current trends, and future approaches, with especial reference to microbial source. *Polymers*, *14*(7), 1339. https://doi.org/10.3390/polym14071339
14. Fitrial, Y., & Khusnul Khotimah, I. (2021). The Antibacterial Activity of Melanin in the Cuttlefish (Sepia sp.) Ink against Aeromonas sp. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, *25*(4), 689–704. https://doi.org/ 10.21608/ejabf.2021.193982.
15. Ghattavi, K., Homaei, A., Kamrani, E., & Kim, S. K. (2022). Melanin pigment derived from marine organisms and its industrial applications. *Dyes and Pigments*, *201*, 110214. https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110214
16. Guo, X., Chen, S., Hu, Y., Li, G., Liao, N., Ye, X., Liu, D., & Xue, C. (2014). Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its anti-oxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, *51*(12), 3680–3690. https://doi.org/10.1007/s13197-013-0937-7
17. Haining, R. L., & Achat-Mendes, C. (2017). Neuromelanin, one of the most overlooked molecules in modern medicine, is not a spectator. *Neural regeneration research*, *12(3)*, 372–375. https://doi.org/10.4103/1673-5374.202928
18. Jiang, M., Xue, R., Chen, Q., Zhan, P., Han, Q., Peng, R., & Jiang, X. (2020). Histology and ultrastructure of ink gland and melanogenesis in the cuttlefish Sepia pharaonis. *Invertebrate Biology*, *139*(4), e12306. https://doi.org/10.1111/ivb.12306
19. Jiang, Q., Luo, Z., Men, Y., Yang, P., Peng, H., Guo, R., Tian, Y., Pang, Z., & Yang, W. (2017). Red blood cell membrane-camouflaged melanin nanoparticles for enhanced photothermal therapy. *Biomaterials*, *143*, 29–45. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.07.027
20. Karimi, T., Mottaghitalab, F., Keshvari, H., & Farokhi, M. (2023). Carboxymethyl chitosan/sodium carboxymethyl cellulose/agarose hydrogel dressings containing silk fibroin/polydopamine nanoparticles for antibiotic delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *80*, 104134 https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104134
21. Kasem, N., & Hamza, D. S. (2020). Antioxidant effect of sepia pharaonis ink extract and ellagic acid on oxidative stress induced by cyclophosphamide in male albino rats. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology*, *12*(2), 213–227. https://doi.10.21608/eajbsc.2020.158973
22. Kim, M. A., Do Yoon, S., Kim, E.-M., Jeong, H.-J., & Lee, C.-M. (2018). Natural melanin-loaded nanovesicles for near-infrared mediated tumor ablation by photothermal conversion.

letters, *37(3)*, 483–490. https://doi.org/10.1007/s10529-014-1726-8

40. Solano, F. (2014). Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*, *2014(1)*, 498276. https://doi.org/10.1155/2014/498276
41. Solano, F. (2017). Melanin and melanin-related polymers as materials with biomedical and biotechnological applications—Cuttlefish ink and mussel foot proteins as inspired biomolecules. *International journal of molecular sciences*, *18(7)*, 1561. https://doi.org/10.3390/ijms18071561
42. Song, W., Xing, R., Yang, H., Liu, S., Yu, H., & Li, P. (2024). Therapeutic potential of enzymatically extracted eumelanin from squid ink in type 2 diabetes mellitus ICR mice: Multifaceted intervention against hyperglycemia, oxidative stress and depression. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *104*(2), 993–1007. https://doi.org/10.1002/jsfa.12986
43. Song, W., Xing, R. e., Yang, H., Liu, S., & Li, P. (2021). Optimization of extractions of eumelanin from cuttlefish ink and the hypoglycemic effects: In vitro enzyme inhibitory activity and glucose consumption in HepG2 cells. *Journal of Food Processing and Preservation*, *45*(10), e15868. https://doi.org/10.1111/jfpp.15868
44. Song, W., Yang, H., Liu, S., Yu, H., Li, D., Li, P., & Xing, R. (2023). Melanin: insights into structure, analysis, and biological activities for future development. *Journal of Materials Chemistry B*, *11*(32), 7528–7543. https://doi.org/10.1039/D3TB01132A
45. Sun, Y., Tian, L., Wen, J., Zhao, J., Zhang, W., Xie, C., Zhou, M., Qiu, X., & Chen, D. (2017). Morphologies of eumelanins from the ink of six cephalopods species measured by atomic force microscopy. *Journal of Ocean University of China*, *16(3)*, 461–467. https://doi.org/10.1007/s11802-017-3010-8
46. Suwannarach, N., Kumla, J., Watanabe, B., Matsui, K., & Lumyong, S. (2019). Characterization of melanin and optimal conditions for pigment production by an endophytic fungus, Spissiomyces endophytica SDBR-CMU319. *PLoS One*, *14*(9), e0222187. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222187
47. Tian, L., Li, X., Ji, H., Yu, Q., Yang, M., Guo, L., Huang, L., & Gao, W. (2022). Melanin-like nanoparticles: advances in surface modification and tumour photothermal therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, *20*(1), 485. https://doi.org/10.1186/s12951-022-01698-x
48. Trigo, M., Paz, D., Bote, A., & Aubourg, S. P. (2023). Antioxidant activity of an aqueous extract of cuttlefish ink during fish muscle heating. *Antioxidants*, *12*(11), 1996. https://doi.org/10.3390/antiox12111996
49. Vate, N. K., & Benjakul, S. (2013). Antioxidative activity of melanin-free ink from splendid squid (Loligo formosana). *International Aquatic Research, 5(1),* 9. http://www.intaquares.com/content/5/1/9
50. Wang, L. F., & Rhim, J. W. (2019). Isolation and characterization of melanin from black garlic and sepia ink. *Lwt*, *99*, 17–23. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.033
51. Wang, Z., Duan, Y., & Duan, Y. (2018). Application of polydopamine in tumor targeted drug delivery system and its drug release behavior. *Journal of Controlled Release*, *290*, 56–74. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.10.009
52. Xie, J., Li, H., Che, H., Dong, X., Yang, X., & Xie, W. (2021). Extraction, physicochemical characterisation, and bioactive properties of ink melanin from cuttlefish (Sepia esculenta). *International Journal of Food Science and Technology*, *56*(7), 3627–3640. https://doi.org/10.1111/ijfs.14992
53. Yang, X., Tang, C., Zhao, Q., Jia, Y., Qin, Y., & Zhang, J. (2023). Melanin: A promising source of functional food ingredient. *Journal of Functional Foods*, *105*, 105574. https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105574
54. Zhang, L., Sheng, D., Wang, D., Yao, Y., Yang, K., Wang, Z., Deng, L., & Chen, Y. (2018). Bioinspired multifunctional melanin-based nanoliposome for photoacoustic/magnetic resonance imaging-guided efficient photothermal ablation of cancer. *Theranostics*, *8*(6), 1591. https://doi: 10.7150/thno.22430