

海洋头足类墨黑色素的提取及生物活性研究进展

Research progress on extraction and bioactivity of melanin from marine cephalopod ink

谢静雯¹杨锡洪^{1,2}车红霞^{1,2}张景禹¹XIE Jing-wen¹YANG Xi-hong^{1,2}CHE Hong-xia^{1,2}ZHANG Jing-yu¹郁东兴^{3,4}解万翠^{1,2,3,4}YU Dong-xing^{3,4}XIE Wan-cui^{1,2,3,4}

(1. 青岛科技大学海洋科学与生物工程学院, 山东 青岛 266042; 2. 山东省生物化学工程重点实验室,

山东 青岛 266042; 3. 青岛智科检验检测有限公司, 山东 青岛 266002;

4. 尚好科技有限公司, 山东 青岛 266002)

(1. College of Marine Science and Biological Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao, Shandong 266042, China; 2. Key Laboratory for Biochemical Engineering of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266042, China; 3. Qingdao Zhike Inspection and Testing Co., Ltd., Qingdao, Shandong 266002, China; 4. Shanghao Science and Technology Co., Ltd., Qingdao, Shandong 266002, China)

摘要:文章基于其分子结构及理化性质,比较不同方法分离纯化鱿鱼等海洋头足类动物的墨黑色素的特点,概述了墨黑色素的抗氧化、免疫调节、防辐射、抗病毒、螯合金属离子、抗肿瘤、器官保护、抗炎抗菌和DNA保护等生物活性,重点探讨了抗氧化、金属螯合、抗肿瘤和防辐射作用的特点及机制,展望了制备方式和生物活性的研究方向。

关键词:海洋头足类;鱿鱼;墨鱼;墨黑色素;提取;生物活性

Abstract:Based on molecular structure and physical and chemical properties, we compare the characteristics of melanin separation and purification by different methods, and summarizes the antioxidant, immunomodulation, radiation protection, antiviral, chelated metal ions, antitumor, organ protection, anti-inflammatory and antibacterial properties of melanin. Biological activities, such as DNA protection, focus on the characteristics and mechanisms of antioxidant, metal chelation, anti-tumor, and radiation protection, and provide guidance for the higher value utilization

of melanin.

Keywords: marine cephalopods; squid; cuttlefish; ink melanin; extraction; biological activity

海洋头足类有500多种,如墨鱼、鱿鱼等,是食品加工的丰富来源。目前以捕捞为主,中国已成功培育曼氏无针乌贼(*Sepiella maindroni de Rochebrune*)幼苗^[1],有望实现规模化养殖。头足类加工方式主要为冷冻冷藏、干制、复合调理食品等,加工过程中需弃除内脏、墨囊等,产生大量副产物。如乌贼墨囊汁约为其体重的1.28%^[2],头足类墨囊汁成分复杂,含有墨黑色素、多糖、蛋白质、脂肪、灰分等多种物质^[3],其中蛋白质、多糖都具有良好的生物活性。

墨黑色素是一种多聚体颗粒,化学特性表现为耐酸、不溶于水,不溶于丙醇、丁醇和氯仿等大多数有机溶剂,可溶于碱性溶液和部分盐溶液^[3]。黑色素化学性质稳定,组成成分和理化性质分析发现^[4],黑色素与蛋白质、糖类牢固地结合在一起,很难分离纯化,且元素分析测定表明其富含钙、铁、镁、锌等金属。

Nicolaus等^[5]利用浓盐酸水解分离纯化墨鱼黑色素,经分析推测黑色素含有吡啶单元,并证实了羧基的存在。José等^[6]分析了黑色素的组成,认为光吸收特性是由其吡啶共轭结构决定,光保护作用 and 防辐射效应也是黑色素生物活性研究的前沿和基础。近年来,墨黑色素的天然

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2018YFD0901105);国家自然科学基金项目(编号:31671825)

作者简介:谢静雯,女,青岛科技大学在读硕士研究生。

通信作者:杨锡洪(1963—),男,青岛科技大学教授,博士。

E-mail: yangxihong63@163.com

解万翠(1969—),女,青岛科技大学教授,博士。

E-mail: xiewancui@163.com

收稿日期:2020-03-03

然活性作用备受关注,Chen 等^[7]利用蛋白酶水解黑色素,尝试开发一种经济高效的分离方法,但其高纯度样品的制备工艺尚不成熟,黑色素完善的结构模型也尚未建立。Araújo 等^[8]对于黑色素在肠道和结肠内的 pH 靶向治疗进行了初探,发现了黑色素在制药和生物医学领域的潜能,但具体的作用机制尚未明确。

文章拟通过阐述墨黑色素提取、结构和生物活性的研究现状,探讨墨黑色素的高值化利用途径,以期对墨黑色素的深入探索和资源开发提供参考。

1 墨黑色素提取纯化及结构解析

在墨囊中,墨黑色素颗粒中含有蛋白、多糖等分子,其杂聚性、难溶性等特点给墨黑色素的分离纯化带来了难题。制备纯度较高、结构完整的墨黑色素样品,是进一步研究物质结构和功能的重要前提,因此,优化提取工艺、完善制备流程是墨黑色素的重要研究方向。

1.1 头足类海洋动物中墨黑色素的形成

墨黑色素在头足类动物的墨囊中,底部的墨腺是黑色素的合成工厂,黑色素在囊泡内不断积累,通过胞吐排出细胞外后,黑色素游离于细胞间隙形成墨汁颗粒。乌贼体内黑色素的生物合成如图 1 所示^[9]。

酪氨酸经过酪氨酸酶催化生成多巴,进一步氧化生成多巴醌,通过聚化反应合成多巴色素^[10]。在异构酶的作用下,多巴色素脱羧、羟化为 5,6-二羟基吲哚(5,6-dihydroxyindole, DHI)和二羟吲哚羧酸(dihydroxyindole carboxylic acid, DHICA),经过酶的催化氧化形成黑色素前体^[11]。头足类动物墨腺的特异性过氧化酶催化 DHI 和 DHICA 单体聚合成墨黑色素。

1.2 墨黑色素的分离、提取及纯化

海洋头足类动物的墨汁是一种混合悬浊液,其中的黑色素与蛋白、多糖等呈结合态,不溶于水,是游离存在的

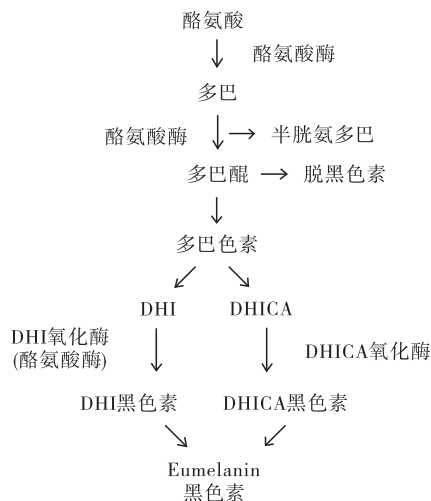


图 1 黑色素在生物体内生成过程^[9]

Figure 1 The process of melanin production in the body

球状小颗粒。目前主要通过水洗离心、酸/碱水解、碱溶酸沉、酶水解、超声波处理等方式,去除墨汁中的蛋白、多糖和脂类等杂质,制备墨黑色素。

通过重复洗涤可以去除水溶性杂质,Liu 等^[12]将墨汁多次水洗离心,沉淀真空冷冻干燥,分离出黑色素粗样品,但与黑色素结合的蛋白等不溶性杂质未能去除。高浓度酸碱可精制纯度较高的黑色素,Varga 等^[13]从酸性水解开始,去除碳水化合物和蛋白质,用有机溶剂洗涤去除脂质,最后经过多次离心除去酚类化合物。碱溶酸沉法是目前应用较多的制备方式,刘显威等^[14]以提取率为目标,确定最佳碱提液料比 17:1 (mL/g)、酸沉 pH 值 1.85,此条件下墨黑色素提取率约 16.69%。而不同的水解方式会导致黑色素成分和形态改变,且酸和碱浓度的增加也影响提纯效率,污染环境。Liu 等^[15]探讨了墨黑色素分离纯化的不同干燥方法,结果显示喷雾干燥会引起聚集从而减少表面积,而超临界干燥使得产生的黑色素表面粗糙,表明干燥方式对黑色素的形貌也有较大影响。

酶解条件温和,不破坏黑色素形态,是较理想的纯化方式。何健等^[16]选用水解能力最强的酸性蛋白酶,得到最佳酶解条件为 pH 3.5、温度 50 °C、酶解 2 h、加酶量 3.0%,此条件下乌贼墨水解度 11.45%。从产业化角度出发,以产出率为导向,高然等^[17]确定碱性蛋白酶为最适酶,在 pH 10.40,酶解温度 65 °C,加酶量 2.60%,酶解时间 2.45 h 的条件下,鱿鱼黑色素得率(83.89±0.21)%。超声降解可增加水溶性,利于理化分析和活性检测。袁丽等^[18]利用超声破碎黑色素,生成更小的聚集单元,对其特征结构 DHI 没有显著影响,降解效果良好,也利于工业化生产。

墨黑色素不溶于大多数液体介质,限制了其应用发展。酸碱水解反应剧烈,破坏黑色素,而高速离心法则只能去除水溶性杂质。酶法较温和,能有效去除与黑色素结合的蛋白质、脂类和多糖。采取几种方法相结合的提取工艺,可实现优势互补。Guo 等^[19]采用超声波辅助降解法,在碱性条件下制备了水溶性鱿鱼黑色素组分,试验结果显示,黑色素基本结构保持不变,且具有良好的溶解性。

墨汁中成分复杂,目前常用的提取流程见图 2。不同分离纯化方法获得的黑色素样品的纯度、形态、粒径大小等均有所不同^[20]。

1.3 墨黑色素的结构特点及鉴定

Piattelli 等^[21]通过甲基取代的方式,研究黑色素的化学组成,利用碱降解证实黑色素是以二羟吲哚为单元的聚合物。红外光谱表明,墨黑色素是一种高度交联和不规则的聚合物,由两种基本单位 DHI 和 DHICA 及其衍生物为结构元件组成,单体结构如图 3 所示。

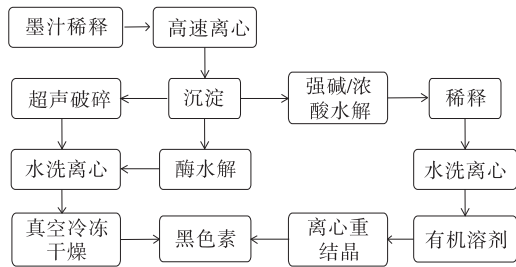


图 2 提取工艺流程图

Figure 2 The extraction process flow chart

根据黑色素分子结构,紫外和可见光光谱显示,其包含酚羟基(OH)、羧基(COOH)和氨基(NH⁺)基团作为金属离子的潜在结合位点,研究^[11]发现,黑色素是 DHI 和 DHICA 单体组成的共聚物。Magarelli 等^[22]通过高效液相色谱定量分析,认为黑色素由 20% DHI 和 75% DHICA 组成。而后有报道^[23]提出 DHI : DHICA 约为 5 : 1,但酶促合成与 5 : 1 的比例不完全匹配,据推测^[24],可能由于铜、锌等金属会促进多巴色素重排为 DHICA。

Duchon^[25]提出头足类动物墨囊中的“黑素体”是球形且均匀的,直径 150~250 nm。Schraermeyer^[26]认为其应称为黑色素颗粒,而不是黑素体。Chedekel 等^[27]提出

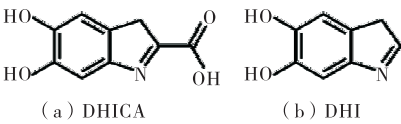


图 3 DHICA 和 DHI 的结构式^[22]

Figure 3 The structural formulas of DHICA and DHI

分离纯化黑色素的方法,从扫描电子显微镜(SEM)发现,墨黑色素以初级粒子混合物和多毫米级聚集体存在,具有多孔性,平均直径 159.530 nm。Longuet-Higgins^[28]研究了黑色素的二级结构杂聚模型,推断单体间是随机结合,该理论逐渐得到更多研究的认可和支持。结构研究^[29]揭示了墨黑色素由许多不超过 5 个或 6 个的吲哚单体平面堆叠而成,单体高度聚合,单元间通过横向和纵向相互连接,聚合度不均一。

2 墨黑色素的生物活性

墨黑色素由吲哚单体聚合而成,能够吸收紫外和可见光,是一种天然的内源性功能物质,能够保护生物体免受辐射伤害,还能显著清除自由基,在体内外都具有阳离子吸附性。其生物活性与其组成和结构密切相关,诸多研究通过体内外的细胞和模型试验,取得了初步的成果(表 1)。

表 1 部分黑色素生物活性研究结果

Table1 Some melanin biological activity research results

活性功能	研究结论
免疫调节	黑色素及其衍生物能显著提高小鼠的特异性和非特异性免疫、体液免疫和细胞免疫功能 ^[30]
抗炎作用	增加优势菌落比例,协调肠道微环境,降低炎症发病率 ^[31]
抗菌活性	可明显破坏细胞膜的完整性,增加细胞内容物的渗漏,降低细胞膜电位 ^[32]
肾病调节	改善肾组织的氧化应激,保护高糖下敏感的肾组织 ^[33]
抗病毒	黑色素能与病毒蛋白末端相互作用,抑制病毒感染细胞中的特异蛋白异常形成,降低病毒蛋白水平,减少感染发生率 ^[34]
保肝作用	对急性酒精性肝损伤小鼠,通过延长扶正反射的持续时间,缩短恢复时间保护小鼠免受乙醇诱导的肝损伤 ^[35]
DNA 保护	小鼠辐照组显示抗氧化酶活性降低,丙二醛水平升高,DNA 损伤增加了 3~10 倍。黑色素处理可保护细胞免受 DNA 损伤和死亡,恢复酶活性并减少丙二醛产生 ^[36]

墨黑色素的生物活性具有多样性,其中最具有代表性特征的是抗氧化、金属螯合、抗肿瘤和防辐射等功能,逐渐成为黑色素活性研究的热点和趋势。其具体的作用机制也得到了广泛的关注,仍需要进一步的研究。

2.1 抗氧化

自由基是人体细胞正常代谢的产物,它与生物体的氧化、衰老和损伤等密切相关。正常组织中,抗氧化系统处在平衡状态,墨黑色素可介导自由基信号的转导^[37],进而对抗氧化酶进行了反馈调节。Sichel 等^[38]研究了黑色素和超氧化物歧化酶(SOD)活性对超氧阴离子的清除作用,结果表明黑色素的抗氧化活性可以部分模拟 SOD 的功能。Zou 等^[39]研究发现,黑色素对 DPPH 自由基、超氧自由基和羟基自由基均表现了较强的活性,半抑制浓度

IC₅₀值分别为 0.18,0.59,0.34 mg/mL,且清除能力随黑色素浓度增加而增加,清除效果显著高于商品抗氧化剂。周月越等^[40]研究表明,墨黑色素能抑制脂质过氧化、减轻抗氧化酶的抑制、有效拮抗大脑神经元的氧化损伤。除此之外,赵云等^[41]根据糖基化衰老学说,验证了墨黑色素对小鼠心脏抗衰老的能力,并发现衰老产物清除效果与黑色素剂量呈正比。

2.2 螯合金属离子

Zdybel 等^[42]将共振光谱应用于黑色素与金属离子的相互作用,测定了不同浓度黑色素—镉复合物的性质,结果表明络合物的形成与镉的浓度有相关性。袁翊朦等^[43]通过电镜扫描发现,鱿鱼墨黑色素在吸附了金属离子之后,其球形颗粒相互聚集,形成了大量聚合物。Lian

等^[44]研究了 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 等金属离子和黑色素的 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 和 $-OH$ 等官能团的相互作用,离子的结合可通过红外吸收光谱法检测。Lei 等^[45]研究表明,墨黑色素铁可有效改善 IDA 大鼠的贫血症状,促进骨髓红系造血,减轻贫血程度。Szpoganicz 等^[46]发现,不同 pH 条件下黑色素溶液中对苯二酚和苯醌两种基团分别主导着金属离子螯合的过程。

2.3 抗肿瘤

肿瘤的产生是细胞异常增殖的结果,抗肿瘤的关键在于对肿瘤细胞迁移和增殖的抑制。江凯等^[47]以人肺腺癌细胞系 A549 为对象,通过体外培养,发现鱿鱼墨黑色素对肿瘤增殖具有较好的抑制作用,随着时间的延长,肿瘤抑制效果增加明显(48 h 时 IC_{50} 为 0.747 mg/mL,作用 72 h 时 IC_{50} 为 0.396 mg/mL)。刘亮等^[48]通过 MTT 法和划痕试验,检测了 5 种常见的肿瘤细胞,证明墨黑色素对肿瘤细胞的增殖有浓度依赖性抑制作用,并抑制肿瘤细胞的非定向迁移。苏伟明等^[49]采用超声波处理、低温离心、过滤等方法制备枪乌贼的墨汁提取物,对肿瘤细胞进行体外培养,对小鼠体内移植性肉瘤和肝癌进行腹腔注射和灌胃,结果均显示了墨黑色素显著的抑制效果,且不影响动物体重,可在此基础上进一步探索墨黑色素的抗肿瘤功效和机理。

2.4 防辐射

光吸收是黑色素多聚物最显著的特性,由高度共轭结构引发,可抵挡机体的光辐射。Ye 等^[50]发现紫外照射下黑色素可显著提高大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和酿酒酵母的存活率,连续 4 周紫外线暴露测试也表明,黑色素小鼠试验组皮肤未见晒伤,抗氧化酶体系活性显著升高,提示黑色素具有较强的抗辐射作用。从辐射中产生的活性氧会引起机体光损伤,Dontsov 等^[51]检测了紫外线诱导的脂质过氧化,通过测定自由基和氧化产物的水平,证实了黑色素不仅阻滞了光和热的灼伤,也启动了内源酶防御和抗氧化应激。

3 高值化应用研究趋势

根据墨黑色素抗辐射、螯合金属等活性特点,可进行新型生物活性配料及产品的研发,为天然生物活性分子的高效改良和应用带来了新的思路和理论基础。

3.1 吸附剂、补铁剂

可利用黑色素的吸附性进行重金属脱除,也可以与铁等元素螯合,制成补充剂。不仅可作为体内重金属的天然解毒剂,还可作为着色剂添加于食品中,或研发成为阳离子吸附剂。与无机铁剂相比,黑色素铁效果更显著^[52],易于机体吸收,提高铁的生物利用度,可开发安全有效、新型天然的铁强化剂。

3.2 防辐射制品

黑色素能保护生物免受辐射损伤,具有优越的防护

功能。目前,对于苏云金芽胞杆菌生物杀虫剂的紫外防护上,黑色素已经取得了显著成效,减少光损伤,延长杀虫时效^[53]。除此之外,还可利用黑色素制成保护材料或生物制剂涂层等,对于不耐光或辐照的产品起到防护作用。

3.3 免疫制剂

黑色素可发展成为一种有效的阳性免疫调节剂,增强特异性和非特异性免疫,促进细胞增殖和活化,在医疗领域有广泛的应用前景。黑色素可以提高体液免疫和细胞免疫,通过提升血清溶血素水平来促进抗体形成^[54],在此基础上可进行免疫保健品的开发,或免疫药物的研制。

深度开发墨黑色素的高值化利用途径,如特医食品、军需食品、护肤品、保健用品、新型药物等,充分发挥生物活性作用价值,具有巨大的经济、社会和环境效益。

4 结论及展望

随着生物技术的发展,可进一步分析墨黑色素的结构组成和理化特征,同时借助先进仪器,探究墨黑色素的构效关系和生物活性功能。① 墨黑色素难以分离纯化,提取工艺有待改良,可研究超声破碎、多重酶联反应、有机溶剂等协同分离方法,或借鉴超临界、微波、微滤膜、大孔树脂交换等新型提纯技术。② 墨黑色素在生物体内如何吸收利用和转化,抗病毒、抗肿瘤等活性如何发挥效应尚不明确。下一步有关生物活性研究应聚焦于具体的作用机制和靶点,从分子水平上探索其功能作用机理。③ 墨黑色素是否有其他层面的生物活性,未探索过的脏器、疾病、血液及其他生理生化途径是否存在显著作用,如肠道调节、脑功能、止血凝血等值得进一步研究。

参考文献

- [1] 张涛,史会来,平洪领,等. 曼氏无针乌贼繁殖现状[J]. 科学养鱼, 2018, 1(12): 49-50.
- [2] KUMAR P, KANNAN M, ARUNPRASANNA V, et al. Proteomics analysis of crude squid ink isolated from *Sepia esculenta* for their antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic properties[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 116: 345-350.
- [3] 杨贤庆,杨丽芝,黄卉,等. 南海鳶乌贼墨汁营养成分分析与评价[J]. 南方水产科学, 2015, 11(5): 138-142.
- [4] BURMASOVA M A, SYSOEVA M A. Chemical composition and biological activity of the BuOH fraction from Chaga Melanin[J]. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2017, 51(12): 292-294.
- [5] NICOLAUS R A, PIATTELLI M, NARNI G. The structure of sepiomelanin[J]. Tetrahedron Letters, 1959, 1(21): 14-17.
- [6] ROSA José Maria De La, MARTIN-SANCHEZ P M, SANCHEZ-CORTES S, et al. Structure of melanins from the fungi *Ochroconis lascauxensis* and *Ochroconis anomala* contaminating rock art in the Lascaux Cave[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1-11.

- [7] CHEN Si-rui, JIANG Bin, ZHENG Jiang-xia, et al. Isolation and characterization of natural melanin derived from silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson)[J]. Food Chemistry, 2008, 111(3): 745-749.
- [8] ARAÚJO M, VIVEIROS R, CORREIA T R, et al. Natural melanin: A potential pH-responsive drug release device[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2014, 469(1): 140-145.
- [9] RIBERA J, PANZARASA G, STOBBE A, et al. Scalable biosynthesis of melanin by the basidiomycete *armillaria cepistipes*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(1): 132-139.
- [10] BAREK H, VERAKSA A, SUGUMARAN M. *Drosophila melanogaster* has the enzymatic machinery to make the melanin component of neuromelanin[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2018, 31(6): 683-692.
- [11] RZEPKA Z, BUSZMAN E, BEBEROK A, et al. From tyrosine to melanin: Signaling pathways and factors regulating melanogenesis[J]. Postępy Higieny i Medycyny Do Wiedzy, 2016, 70: 695-708.
- [12] LIU Yan, SIMON J D. The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of *sepia officinalis*[J]. Pigment Cell Research, 2003, 16(1): 72-80.
- [13] VARGA M, BERKESI O, DARULA Z, et al. Structural characterization of allomelanin from black oat[J]. Phytochemistry, 2016, 130(8): 313-320.
- [14] 刘显威, 刘淑集, 张学勤, 等. 响应面法优化鱿鱼墨黑色素的制备工艺[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2016, 34(1): 25-32.
- [15] LIU Yan, KEMPF V R, NOFSINGER J B, et al. Comparison of the structural and physical properties of human hair eumelanin following enzymatic or acid/base extraction[J]. Pigment Cell Research, 2003, 16(4): 355-365.
- [16] 何健, 刘娥, 李小娟, 等. 乌贼墨黑色素粗提物的提取工艺优化及其抗氧化能力测定[J]. 渔业研究, 2019, 41(3): 217-224.
- [17] 高然, 陈俊德, 李剑瑛, 等. 鱿鱼(*Uroteuthis chinensis*)黑色素酶法制备工艺优化及理化特征分析[J]. 食品工业科技, 2019, 40(18): 14-21, 27.
- [18] 袁丽, 高瑞昌, 薛长湖, 等. 超声波对鱿鱼墨黑色素成分和物理结构的影响[J]. 农业工程学报, 2011, 27(14): 376-380.
- [19] GUO Xin, CHEN Shi-guo, HU Ya-qin, et al. Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its anti-oxidant activity[J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(12): 3 680-3 690.
- [20] LU Ying, YE Ming, SONG Sheng, et al. Isolation, Purification, and anti-aging activity of melanin from *Lachnum singerianum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(2): 762-771.
- [21] PIATTELLI M, NICOLAUS R A. The structure of melanins and melanogenesis I: The structure of melanin in *Sepia*[J]. Tetrahedron, 1961, 15(4): 66-75.
- [22] MAGARELLI M, PASSAMONTI P, RENIERI C. Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia Officinalis*)[J]. Rev CES Med Vet Zootec, 2010, 5(2): 18-28.
- [23] DERBY C. Cephalopod ink: Production, chemistry, functions, and applications[J]. Marine Drugs, 2014, 12(5): 2 700-2 730.
- [24] MICILLO R, PANZELLA L, KOIKE K, et al. "Fifty shades" of black and red or how carboxyl groups fine tune eumelanin and pheomelanin properties [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(5): 1-13.
- [25] DUCHON J. Chemistry and biochemistry of melanin[J]. Dermatologische Monatschrift, 1970, 156(5): 348-360.
- [26] SCHRAERMEYER U. Transport of endocytosed material into melanin granules in cultured choroidal melanocytes of cattle: New insights into the relationship of melanosomes with lysosomes[J]. Pigment Cell Research, 1995, 8(4): 209-214.
- [27] CHEDEKEL M R, MURR B L, ZEISE L. Melanin standard method: Empirical formula[J]. Pigment Cell Research, 1992, 5(3): 143-147.
- [28] LONGUET-HIGGINS H C. On the origin of the free radical property of melanins[J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 1960, 86(2): 231-232.
- [29] TIAN Zhen, HWANG W, KIM Y J. Mechanistic understanding of monovalent cation transport in eumelanin pigments[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2019, 7: 6 355-6 361.
- [30] LI Lan, SHI Fang, LI Jing-lei, et al. Immunoregulatory effect assessment of a novel melanin and its carboxymethyl derivative[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2017, 27(8): 1 831-1 834.
- [31] DONG Hui, SONG Wei-wei, WANG Chun-lin, et al. Effects of melanin from *Sepiella Maindroni* ink (MSMI) on the intestinal Microbiome of mice[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 147-157.
- [32] XU Can, LI Jing-lei, YANG Liu-qing, et al. Antibacterial activity and a membrane damage mechanism of *Lachnum* YM30 melanin against *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus*[J]. Food Control, 2016, 73: 1 445-1 451.
- [33] 董慧, 徐洋洋, 王春琳, 等. 乌贼墨汁黑色素对糖尿病肾病小鼠肾脏的保护作用[J]. 食品科学, 2018, 39(5): 192-198.
- [34] HAMANAKA T, NISHIZAWA K, SAKASEGAWA Y, et al. Melanin or a melanin-like substance interacts with the N-terminal portion of prion protein and inhibits abnormal prion protein formation in prion-infected cells[J]. Journal of

- Virology, 2017, 91(6): 1-19.
- [35] HOU Ruo-lin, LIU Xin, YAN Jun-jie, et al. Characterization of natural melanin from *Auricularia auricula* and its hepatoprotective effect on acute alcohol liver injury in mice[J]. Food & Function, 2019, 10(2): 1 017-1 027.
- [36] RAGEH M M, EL-GEHALY R H. Melanin nanoparticles: Antioxidant activities and effects on γ -ray-induced DNA damage in the mouse[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2018, 828: 15-22.
- [37] ZDYBEL M, PILAWA B, DREWNOWSKA J M, et al. Comparative EPR studies of free radicals in melanin synthesized by *Bacillus weihenstephanensis* soil strains [J]. Chemical Physics Letters, 2017, 679: 185-192.
- [38] SICHEL G M, CORSARO C, SCALIA M, et al. Relationship between melanin content and superoxide dismutase (SOD) activity in the liver of various species of animals[J]. Cell Biochemistry and Function, 1987, 5(2): 123-128.
- [39] ZOU Yu, ZHAO Yue, HU Wen-zhong. Chemical composition and radical scavenging activity of melanin from *Auricularia auricula* fruiting bodies[J]. Food Science and Technology: Campinas, 2015, 35(2): 253-258.
- [40] 周月越, 王力东, 杜美凤, 等. 曼氏无针乌贼墨汁黑色素对亚急性衰老模型小鼠抗氧化功能的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(9): 1 663-1 667.
- [41] 赵云, 杨华, 冀雄飞, 等. 2 种乌贼墨黑色素对衰老小鼠心脏糖基化末端产物的清除作用[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2019, 32(5): 7-11.
- [42] ZDYBEL M, PILAWA B, CHODUREK E. Effect of cadmium(II) on free radicals in DOPA-melanin tested by EPR spectroscopy[J]. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2015, 72(5): 901-907.
- [43] 袁翊朦, 李康秀, 王春琳, 等. 乌贼墨汁黑色素对小鼠体内重金属的脱除作用[J]. 生物学杂志, 2017, 34(3): 37-41.
- [44] LIAN Hong, SIMON J D. Insight into the binding of divalent cations to sepia eumelanin from IR absorption spectroscopy[J]. Photochemistry & Photobiology, 2006, 82(5): 1 265-1 269.
- [45] LEI Min, XUE Chang-hu, WANG Yu-ming, et al. Effect of squid ink melanin-Fe on iron deficiency anemia remission[J]. Journal of Food Science, 2008, 73(8): 207-211.
- [46] SZPOGANICZ B, GIDANIAN S, KONG P, et al. Metal binding by melanins: Studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by Cu (II) and Zn (II) ions[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002, 89(1/2): 45-53.
- [47] 江凯, 刘亮, 曹少谦, 等. 鱿鱼墨黑色素的提取及其对 A549 细胞的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(3): 215-221.
- [48] 刘亮, 曹少谦, 刘合生, 等. 鱿鱼墨黑色素提取物对肿瘤细胞的抑制作用[J]. 核农学报, 2017, (10): 1 972-1 978.
- [49] 苏伟明, 马润娣, 于立坚, 等. 中国枪乌贼墨汁提取物的抗肿瘤作用[J]. 中国海洋药物, 2005, 24(2): 47-50.
- [50] YE Ming, GUO Geng-yi, LU Ying, et al. Purification, structure and anti-radiation activity of melanin from *Lachnum YM404* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 63: 170-176.
- [51] DONTSOV A E, SAKINA N L, KOROMYSLOVA A D, et al. Effect of UV radiation and hydrogen peroxide on the antiradical and antioxidant activities of DOPA-melanin and melanosomes from retinal pigment epithelial cells[J]. Russian Chemical Bulletin, 2015, 64(7): 1 623-1 628.
- [52] SONG Sheng, YANG Liu, YE Ming, et al. Antioxidant activity of a *Lachnum YM226* melanin-iron complex and its influence on cytokine production in mice with iron deficiency anemia[J]. Food & Function, 2016, 7(3): 1 508-1 514.
- [53] SANSINENEA E, ORTIZ A. Melanin: A photoprotection for *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(3): 483-490.
- [54] 董慧, 王力东, 王春琳, 等. 曼氏无针乌贼墨汁黑色素对免疫低下模型小鼠的调节作用[J]. 生物学杂志, 2016, 33(5): 27-30.
- (上接第 229 页)
- [68] 申远, 冯印, 王袭, 等. 超声处理对树莓干红酒抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技, 2015, 35(9): 120-123.
- [69] AKCY Y D, YILIRIM H K, GUVENC U, et al. The effects of consumption of organic and nonorganic redwine on low-density lipoprotein oxidation and antioxidant capacity in humans[J]. Nutrition Research, 2004, 24(7): 541-554.
- [70] NATELLA F, GHISELLI A, GUIDI A, et al. Red wine mitigates the postprandial increase of LDL susceptibility to oxidation[J]. Free Rad Biol Med, 2001, 30(9): 1 036-1 044.
- [71] JUNG J, SON M, JUNG S, et al. Antioxidant properties of Korean black raspberry wines and their apoptotic effects on cancer cells[J]. Science of Food and Agriculture, 2009, 89(6): 970-977.
- [72] JEONG J, JUNG H, LEE S, et al. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine [J]. Food Chemistry, 2010, 123(2): 338-344.
- [73] CHANG K J, LIZ-THACN M W, OLSEN J. Wine and health perceptions: Exploring the impact of gender, age and ethnicity on consumer perceptions of wine and health[J]. Wine Economics and Policy, 2016, 5(2): 105-113.
- [74] 魏焘, 曾敏, 李珂, 等. 以秀丽隐杆线虫为模式生物的蓝莓果酒抗氧化及抗衰研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(5): 16-19.