



研究报告

大肠杆菌异源表达的 Indigoidine 与靛蓝的稳定性比较

孙菁兰 朱玉章 王华敏 牛肖凡 张健 高强*

工业发酵微生物教育部重点实验室暨食品生物技术教育部工程研究中心(天津科技大学) 天津市工业微生物重点实验室 天津市微生物代谢与发酵过程控制技术工程中心 天津科技大学生物工程学院
天津 300457

摘要:【背景】Indigoidine 是一种来源于微生物的无毒天然蓝色素。【目的】比较 Indigoidine 和靛蓝的色素稳定性,进而评价 Indigoidine 的色素稳定性。【方法】构建重组菌株 *Escherichia coli* DH5 α /p28s 异源表达 Indigoidine,考察可见光、紫外线、pH、温度、氧化还原剂、食品添加剂和金属离子对其与商品级靛蓝色素稳定性的影响。【结果】以 N,N-二甲基甲酰胺为溶剂,Indigoidine 和靛蓝都对可见光、紫外线敏感;2 种色素在 pH 1.0–11.0 时稳定,强碱性 pH 对色素破坏作用很大;Indigoidine 抗 Vc 还原能力强于靛蓝,氧化剂可不同程度地降低 2 种色素的保存率;2 种色素热稳定性不佳,在 75 °C 以下时 Indigoidine 的色素稳定性优于靛蓝;食品添加剂中的柠檬酸和苯甲酸分别对 Indigoidine 和靛蓝均具有显著的护色效果;对这 2 种色素,Ca²⁺、Mg²⁺均具有护色效果,Na⁺、K⁺、Li⁺总体上没有明显的破坏作用,而 Zn²⁺、Al³⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺则具有显著的破坏作用。【结论】Indigoidine 色素稳定性明显优于靛蓝,具有广阔的开发应用前景。

关键词: indigoidine, 大肠杆菌, 异源表达, 稳定性, 靛蓝

Comparison of stability between heterologous expressed indigoidine in *Escherichia coli* and indigoSUN Jinglan ZHU Yuzhang WANG Huamin NIU Xiaofan ZHANG Jian
GAO Qiang*

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology & Engineering Research Center of Food Biotechnology of Ministry of Education (Tianjin University of Science & Technology); Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology; Tianjin Microbial Metabolism and Fermentation Process Control Technology Engineering Center; College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: [Background] Indigoidine is a nontoxic blue pigment produced by microorganisms.

Foundation items: National Basic Research Program of China (2013CB734004); National Natural Science Foundation of China (31370075, 31471725, 31902193); Foundation of Engineering Research Center of Food Biotechnology, Ministry of Education of China (SPZX001-18); Shandong Provincial Key Research and Development Project of China (Fostering Talent Project) (2016GRC3201)

*Corresponding author: E-mail: gaoqiang@tust.edu.cn

Received: 31-03-2020; **Accepted:** 03-08-2020; **Published online:** 25-09-2020

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(2013CB734004); 国家自然科学基金(31370075, 31471725, 31902193); 食品生物技术教育部工程研究中心工程化应用项目(SPZX001-18); 山东省重点研发计划人才孵育项目(2016GRC3201)

*通信作者: E-mail: gaoqiang@tust.edu.cn

收稿日期: 2020-03-31; **接受日期:** 2020-08-03; **网络首发日期:** 2020-09-25

[Objective] Comparison of the stability of heterologous expressed indigoidine in *Escherichia coli* and commercial indigo. **[Methods]** Recombinant *E. coli* DH5 α /p28s strain was constructed to produce indigoidine. The effects of light, UV, pH, temperature, oxidant, reductant, food additive, metal ion on the stability of the two pigments were investigated. **[Results]** When N,N-dimethylformamide (DMF) was used as solvent, both indigoidine and indigo were sensitive to visible light and UV. The colors of the two pigments were stable at pH 1.0–11.0, but higher pH had a great destructive effect. The tolerance of indigoidine to Vc reduction was stronger than that of indigo. Both maximal absorption values were reduced at a certain degree by oxidant. Indigoidine showed distinguished better thermal stability than indigo below 75 °C, but both were bleached at higher temperature. The food additive citric acid and benzoic acid had significant protective effect on the stability of indigoidine and indigo respectively. Ca²⁺ and Mg²⁺ showed certain color-keeping effect on both pigments, while Na⁺, K⁺ and Li⁺ had no overall destruction impact, but Zn²⁺, Al³⁺, Cu²⁺, Fe²⁺ and Fe³⁺ exhibited notable destruction on both. **[Conclusion]** Indigoidine exhibits much better overall stability than indigo, suggesting a broader prospect of development and application.

Keywords: indigoidine, *Escherichia coli*, heterologous expression, stability, indigo

色素分为天然色素和合成色素, 与合成色素相比, 天然色素具有营养价值高、无毒副作用、来源安全等优点^[1]。天然蓝色素主要来源于植物和微生物, 植物源天然蓝色素主要有靛蓝(Indigo)、栀子蓝等^[2]。某些种类的链霉菌(*Streptomyces*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)等微生物能够产生天然蓝色素, 如兼有抗菌作用的 Indigoidine^[3]和放线菌紫(红)素^[2]。靛蓝是一种广泛用于食品、医药、印染和化妆品等行业的古老蓝色素^[4] (图 1A)。天然靛蓝最初从木蓝、菰蓝、蓼蓝等植物中提取, 目前可用微生物发酵的方法制备天然靛蓝^[4-5]。靛蓝属还原染料, 难溶于水、稀酸和碱溶液, 能够溶解于少数几种有机溶剂, 如吡喃甲醛、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)、硝基苯、吡喃、丙酮、氯仿等, 而且稳定性较差, 容易褪色^[6-7]。靛蓝染色机理为: 由于靛蓝难溶于水, 将其变为隐色体盐形式(可溶于水)上染纺织物, 随后纺织物上的靛蓝隐色体在空气中氧化为靛蓝^[7-8]。

Indigoidine 是一种无毒的细菌天然蓝色产物(图 1B)。Indigoidine 合成酶(Indigoidine Synthetase)是非核糖体肽合成酶, 经 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(Phosphopantetheinyl Transferases, PPTase, EC2.7.8.7)活化, 将微生物体内的 2 分子谷氨酰胺

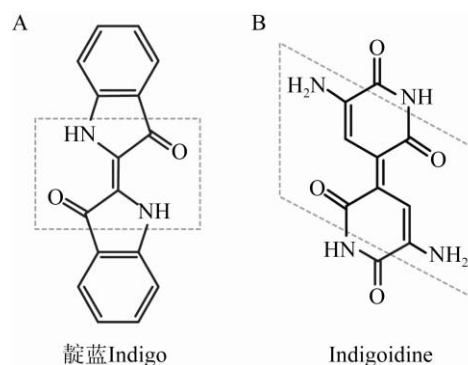


图 1 靛蓝(A)与 Indigoidine (B)的化学结构和发色体^[14]
Figure 1 Chemical structures and chromophores of indigo (A) and indigoidine (B)^[14]

注: 虚线框内为发色体

Note: Chromophore in dotted box

合成为 1 分子 Indigoidine^[9]。近年来, 在某些种类的链霉菌中发现沉默的 Indigoidine 合成酶基因, 可经其他宿主异源表达色素产物^[10-11]。此外, 在吸水链霉菌(*S. hygroscopicus*)中发现合成 Indigoidine 的非核糖体肽合成酶同时参与合成最小霉素(Minimycin)^[12]。Indigoidine 为非水溶性蓝色素, 能够溶解于少数几种有机溶剂, 如 DMF、DMSO、四氢吡喃、吡啶、N-甲基吡咯烷酮等^[9], 还可被连二亚硫酸钠还原为隐色体形式^[13-15]。该色素具有抗菌性^[3]和氧化还原性, 其清除自由基的能力使植物病原菌可耐受植物应激防御反应所分

泌的过氧化物^[16]。该色素明亮深邃的蓝色类似于靛蓝, 能够作为新型天然蓝色素及染料应用于印染、食品和医药行业, 已有报道其用于蛋白质类纤维织物的染色^[17]。在分子生物学研究中, Indigoidine 合成酶基因不仅可以作为标记基因构建筛选体系^[11,13,18], 还通过合成生物学技术使色素基因在玫瑰花中成功表达, 将花瓣变成蓝色, 为培育蓝色玫瑰提供了一种新思路^[19]。Indigoidine 色素分子具有的 1.3 eV 窄禁带及其他化学结构性质, 使其具有作为有机半导体材料的潜能^[20], 在太阳能、信息记录和液晶材料等方面有广阔的开发应用前景。

目前已有文献报道 Indigoidine 合成酶基因在大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 和酵母 (Yeast) 中异源表达并发酵生产 Indigoidine。Xu 等^[21]在大肠杆菌中异源表达来自色褐链霉菌 (*S. chromofuscus*) 的 Indigoidine 合成酶基因, 同时过表达谷氨酰胺合成酶基因, 优化后的摇瓶水平产量为 8.81 ± 0.21 g/L。徐捷^[22]在谷氨酸棒杆菌 (*C. glutamicum*) 中异源表达来自淡紫灰链霉菌 (*S. lavendulae*) 的 Indigoidine 合成酶基因, 优化后的摇瓶水平产量为 1.75 g/L。Wehrs 等^[23]在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中异源表达来自淡紫灰链霉菌的 Indigoidine 合成酶基因, 以葡萄糖为碳源, 通过分批补料发酵最终获得上罐产量为 980 mg/L。随后, Wehrs 等^[24]在圆红冬孢酵母 (*Rhodospiridium toruloides*) 中异源表达来自淡紫灰链霉菌的 Indigoidine 合成酶基因, 利用木质纤维素水解物作为碳源, 经分批发酵获得上罐产量为 2.91 g/L, 利用葡萄糖作为碳源, 经高浓度底物分批补料发酵获得上罐产量为 86.3 ± 7.4 g/L, 这也是目前报道中最高的 Indigoidine 发酵产量。

靛蓝已成为市场上广泛工业化应用的一种蓝色素, 目前对 Indigoidine 色素稳定性影响因素的研究较少, 本实验将大肠杆菌 (*E. coli*) 中异源表达的 Indigoidine 与商品级靛蓝在相同条件下进行色素稳

定性测试, 进而对 Indigoidine 进行比较和评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种

质粒 pCIMt002 (含有 Indigoidine 合成酶基因 *idgS* 和 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶基因 *sfp*) 由中国科学院微生物研究所陈义华研究员惠赠; *E. coli-Staphylococci* 穿梭质粒 pBT2-ET-5R-EGFP 为本实验室前期构建^[25]; *E. coli* DH5 α 感受态为本实验室保藏。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 10.0, 琼脂 20.0 (固体培养基加入), 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

靛蓝(分析纯), 天津市大茂化学试剂厂; N,N-二甲基甲酰胺(DMF, 分析纯), 天津市津东天正精细化学试剂厂; 维生素 C (Vc)、k3 (Vk3) (BR 级), 上海源叶生物技术有限公司; 限制性内切酶 *Hind* III、*Nhe* I 和 T4 DNA Ligase, 宝生物工程(大连)有限公司; 2 \times Rapid *Taq* Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 高纯质粒小量制备试剂盒、多功能 DNA 纯化回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。

紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; pH 计, 梅特勒-托利多仪器有限公司; 高速冷冻离心机, 赛默飞世尔(中国)科技公司; MasterCycler Nexus PCR 仪, Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 *idgS-sfp* 基因的克隆及表达载体 p28s 的构建

重组质粒构建流程如图 2 所示。以 pCIMt002 质粒为模板, 使用引物 *idgS*-F (5'-CCCAAGCTTATGACTCTTCAGGAGACCAGC-3') 和 *sfp*-R (5'-CTAGCTAGCTTATAAAAGCTCTTCGTACGAGACC-3') 扩增 *idgS-sfp* 基因, 下划线为酶切位点。PCR 反应体系: 质粒 DNA 2 μ L, 引物 F 和 R (10 μ mol/L) 各 2 μ L, 2 \times Rapid *Taq* Master Mix 25 μ L, ddH₂O

19 μ L。PCR 反应条件：98 $^{\circ}$ C 5 min；98 $^{\circ}$ C 30 s，55 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 2.5 min，30 个循环；72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经琼脂糖电泳检测，纯化回收并测序分析。用 *Hind* III 和 *Nhe* I 限制性内切酶分别将目的基因 *idgS-sfp* 与质粒 pBT2-ET-5R-EGFP 双酶切，得到线性化目的片段和质粒载体，纯化回收，T4 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。

1.2.2 基因工程菌 *E. coli* DH5 α /p28s 的构建

异源表达 Indigoidine 的基因工程菌 *E. coli* DH5 α /p28s 构建流程如图 2 所示。将连接产物用化学转化法转化至 *E. coli* DH5 α 感受态中^[26]，涂布到含有 0.1 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 抗性平板上进行筛选，37 $^{\circ}$ C 培养 14 h 后，变温 28 $^{\circ}$ C 培养 6 h，挑取菌落变为蓝色的转化子至上述抗性 LB 培养液的试管中，37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 10 h 后，变温至 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 6 h，取适量蓝色菌液提取质

粒，经 *Hind* III 与 *Nhe* I 双酶切鉴定及测序分析(测序委托苏州金唯智生物科技有限公司完成)。

1.2.3 色素发酵

挑取单菌落 *E. coli* DH5 α /p28s 接种到含有 0.1 mg/mL 氨苄青霉素的 50 mL LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 11 h，变温至 28 $^{\circ}$ C，180 r/min 培养 8–10 h。

1.2.4 色素溶液制备

Indigoidine 色素溶液：取发酵液 12 000 r/min 离心 20 min 弃上清，沉淀(菌体与 Indigoidine 色素的混合沉淀)依次用超纯水、甲醇重悬离心反复 2 次，向洗涤后的沉淀加入适量 DMF，超声至溶剂颜色不再加深，12 000 r/min 离心 20 min，取上清，用 DMF 将其稀释至 OD_{590} 为 2.00 ± 0.05 ，经 0.22 μ m 有机微孔滤膜过滤，即为 Indigoidine 色素溶液。

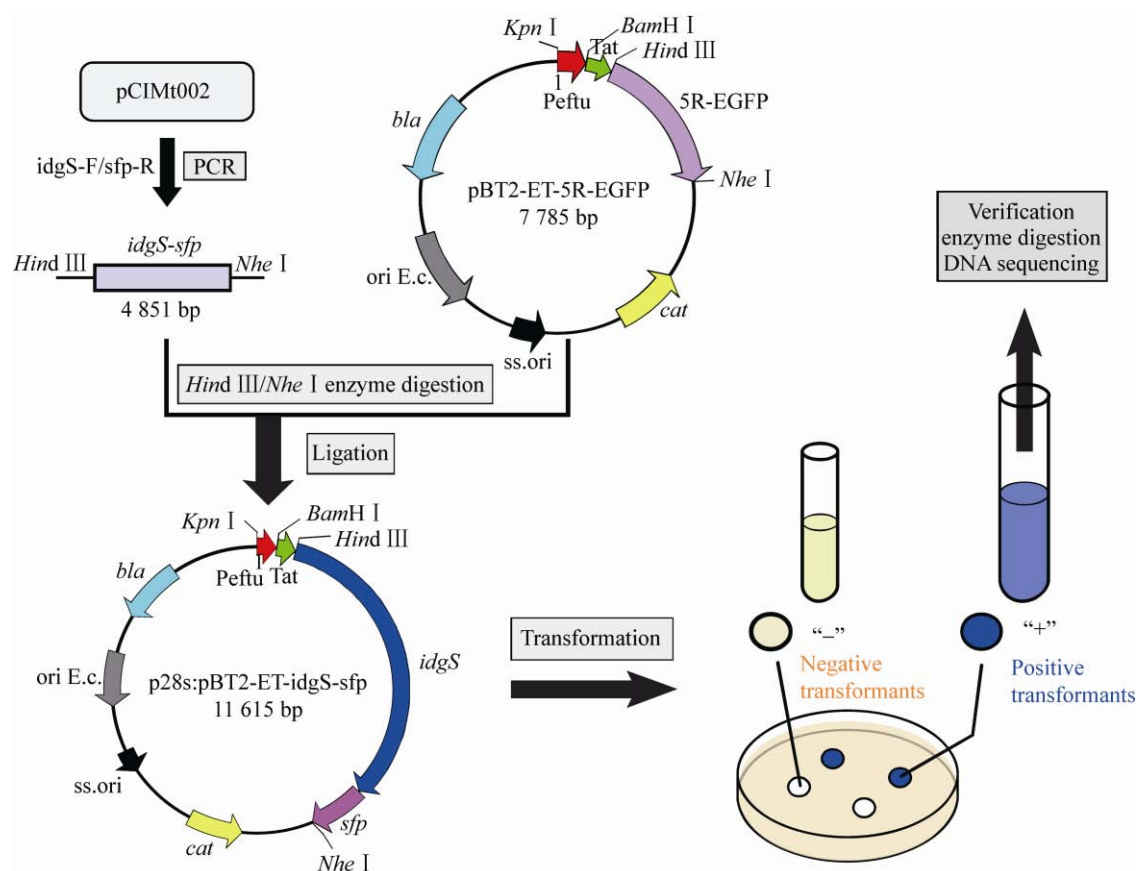


图 2 表达载体 p28s 和基因工程菌株 *E. coli* DH5 α /p28s 的构建

Figure 2 Construction of the expression vector p28s and recombinant strain *E. coli* DH5 α /p28s

靛蓝色素溶液: 取适量靛蓝粉末溶解于 DMF 中稀释至 OD_{610} 为 2.00 ± 0.05 , 即为靛蓝色素溶液。

1.2.5 色素保存率计算方法

$$\text{色素保存率}(\%) = \frac{OD_{\lambda}^n}{OD_{\lambda}^{ck}} \times 100$$

式中 OD_{λ}^n 、 OD_{λ}^{ck} 分别代表某条件处理后的色素溶液和对照色素溶液在 λ 处的吸光光度值, 其中靛蓝色素溶液 $\lambda=610$ nm, Indigoidine 色素溶液 $\lambda=590$ nm。以下实验均设置 3 个重复。

1.2.6 色素光谱特性

将色素溶液置于 1 cm 光程的狭缝石英比色皿中, 用紫外-可见分光光度计扫描色素溶液在 200–800 nm 区间的紫外-可见光吸收光谱, 测得色素的最大吸收波长(λ_{\max})。

1.2.7 紫外线对色素稳定性的影响

两种色素溶液各取 3 mL 于 EP 管中, 置于紫外灯下(功率 8 W, 照射距离 25 cm, 光照强度 80 lx, 25 °C), 在 0–150 min 的测量时间范围内, 每 30 min 取样一次, 记录相应 OD_{λ}^n , 以初始 0 h 未被紫外线照射的色素溶液作为对照, 计算色素保存率。

1.2.8 可见光对色素稳定性的影响

两种色素溶液各取 3 mL 于 EP 管中, 置于日光灯下(功率 8 W, 照射距离 25 cm, 光照强度 800 lx, 25 °C), 分别在第 12 h 和第 24 h 取样, 记录相应 OD_{λ}^n , 以初始 0 h 未被光照的色素溶液作为对照, 计算色素保存率。

1.2.9 pH 对色素稳定性的影响

各取 20 mL 初始色素溶液, 用 1 mol/L HCl、2 mol/L HCl 和 2 mol/L NaOH 分别调溶液至 pH 为 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11.0、13.0、 ≥ 14.0 。混匀后室温避光静置 0 h 和 12 h, 记录相应 OD_{λ}^n , 以 0 h 未调 pH 的初始色素溶液作为对照, 计算色素保存率。

1.2.10 温度对色素稳定性的影响

两种色素溶液各取 3 mL 于 EP 管中, 以 0 h 未处理的色素溶液作为对照, 计算色素保存率。温度因素设置 3 个实验组:

(1) 高温组: 色素溶液分别置于 45、60、75、90 °C 的恒温水浴锅中避光保温, 每 1 h 取样一次, 共取样 4 次, 用自来水冷却至室温后记录相应的 OD_{λ}^n 。

(2) 常温组: 色素溶液分别置于 16、28、37 °C 的生化培养箱中避光恒温存放, 每 12 h 取样一次, 共取样 7 次, 恢复至室温后记录相应的 OD_{λ}^n 。

(3) 低温组: 色素溶液分别置于 -80、-20、4 °C 冰箱中恒温避光存放, 每 12 h 取样一次, 共取样 7 次, 恢复至室温后记录相应的 OD_{λ}^n 。

1.2.11 氧化还原剂对色素稳定性的影响

分别取 1 mL 1%、2% (质量体积分数) 的 Vc、Vk3 溶液, 1%、2% (体积分数) 的植酸、 H_2O_2 , 蒸馏水加入到 3 mL 色素溶液中混匀, 避光室温静置 3 h, 记录相应 OD_{λ}^n , 以 3 h 时蒸馏水与色素溶液的混合液作为对照, 计算色素保留率。

1.2.12 食品添加剂对色素稳定性的影响

分别取 500 μ L 2% (质量体积分数) 的甘露醇、山梨醇、葡萄糖、蔗糖、柠檬酸、苯甲酸、甘油和蒸馏水, 加入到 3 mL 色素溶液中混匀, 室温静置 24 h 和 7 d, 记录相应 OD_{λ}^n , 再分别以对应 24 h 和 7 d 的蒸馏水与色素溶液的混合液作为对照, 计算 24 h 和 7 d 的色素保存率。

1.2.13 金属离子对色素稳定性的影响

分别使用 NaCl、KCl、 $CaCl_2$ 、 $MgSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 、LiCl、 $MnSO_4$ 、 $Al_2(SO_4)_3$ 、 $Pb(CH_3COO)_2$ 、 $CuSO_4$ 、 $FeSO_4$ 、 $FeCl_3$ 配制 0.05、0.2 mol/L 的 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Li^+ 、 Mn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 溶液。分别取 500 μ L 以上金属离子溶液和蒸馏水加入到 3 mL 色素溶液中混匀, 室温避光静置 4 h 和 24 h 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 记录相应 OD_{λ}^n , 分别以对应 4 h 和 24 h 的蒸馏水与色素溶液的混合液作为对照, 计算 4 h 和 24 h 的色素保留率。

2 结果与分析

2.1 表达载体 p28s 和基因工程菌 *E. coli* DH5 α /p28s 的构建

质粒 pCIMt002 中 *idgS* 基因来自淡紫灰(薰衣草)链霉菌 (*S. lavendulae*) CGMCC 4.1386^[11], GenBank 登录号为 AHW58010; *sfp* 基因来自枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*), GenBank 登录号为 X63158.1^[11,18,27-28], UniProt 登录号为 P39135^[19]。

以质粒 pCIMt002 为模板进行 PCR 扩增 *idgS-sfp* 基因, 经电泳检测扩增片段条带约为 4 581 bp, 符合预期(图 3A), 测序结果与 pCIMt002 的 *idgS-sfp* 基因序列匹配度为 100%。抗性平板上单菌落变为蓝色的转化子初步判断为阳性转化子。双酶切验证电泳表明, 重组质粒 p28s 经 *Hind* III 与 *Nhe* I 双酶切后呈现约为 7 040 bp 和 4 575 bp 的 2 条条带, 符合预期(图 3B)。经测序比对, 4 575 bp 片段与 pCIMt002 的 *idgS-sfp* 基因序列匹配度为 100%, 而且重组菌落为蓝色, 说明表达载体 p28s 和基因工程菌株 *E. coli* DH5 α /p28s 均已构建成功。

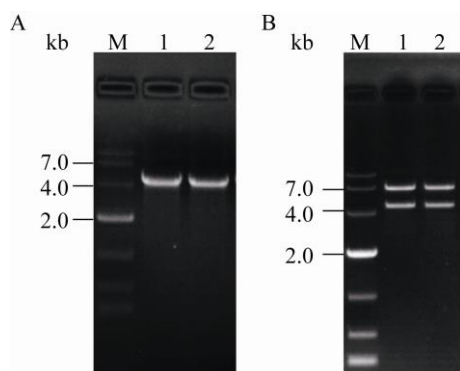


图3 *idgS-sfp* 基因 PCR 扩增(A)和 p28s 质粒双酶切验证(B)

Figure 3 PCR amplification of *idgS-sfp* gene (A) and verification of expression vector p28s by double restriction enzyme digestion with *Hind* III and *Nhe* I (B)

注: M: DL10000 DNA marker; A: 1-2: *idgS-sfp* 基因 PCR 产物; B: 1-2: 表达载体 p28s 的双酶切产物

Note: M: DL10000 DNA marker; A: 1-2: PCR product of *idgS-sfp* gene; B: 1-2: Double enzyme digestion product of expression vector p28s

2.2 Indigoidine 色素光谱特性

图4表明, Indigoidine 色素溶液在 590 nm 处有最大吸收峰 λ_{\max} , 与文献[18]报道一致。

2.3 紫外线对色素稳定性的影响

如图5所示, 紫外线对2种色素都具有显著的破坏作用。两种色素在紫外环境下褪色明显, 稳定性不佳, 30 min 后色素降解率都接近 50%。

2.4 可见光对色素稳定性的影响

如图6所示, 2种色素在可见光光照条件下褪色明显, 光稳定性不佳, 但 Indigoidine 的光稳定性明显优于靛蓝。

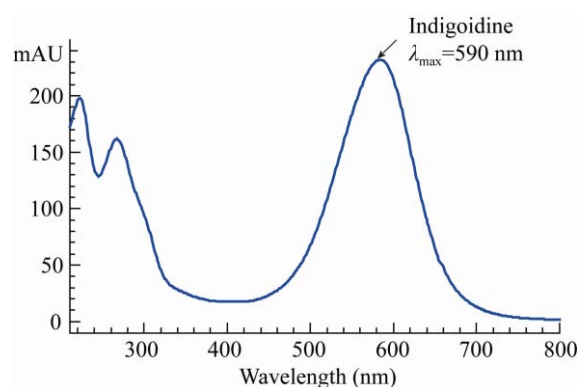


图4 Indigoidine 色素全波长扫描光谱图

Figure 4 A full-wavelength scanning spectrogram of indigoidine

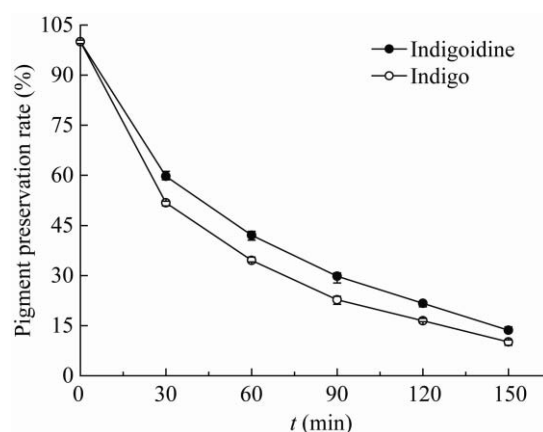


图5 紫外线对色素的影响

Figure 5 The effect of ultraviolet light on the stability of indigoidine and indigo

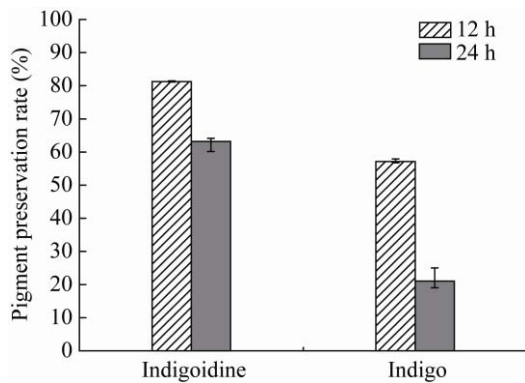


图 6 可见光对色素的影响

Figure 6 The effect of visible light on the stability of indigoidine and indigo

2.5 pH 对色素稳定性的影响

如图 7 所示, 以 DMF 为色素溶剂时, 2 种色素都在 pH 1.0–11.0 时稳定, 一直呈现为初始的蓝色; 在 pH ≥ 13.0 时不稳定, 发生明显的褪色现象, 说明强碱性 pH 对 2 种色素都具有显著的破坏作用。Indigoidine 在 pH 13.0 时为浅蓝色, 但 pH ≥ 14.0 时溶液先变为浅蓝色再变为淡粉色, 12 h 后溶液变为淡黄色。靛蓝在 pH 13.0 时为浅蓝色, 但 pH ≥ 14.0 时溶液先变为浅蓝绿色再变为浅黄色, 12 h 后溶液变为无色。两种色素溶液颜色变化如图 8 所示。对于以上现象, 酸性条件下 DMF

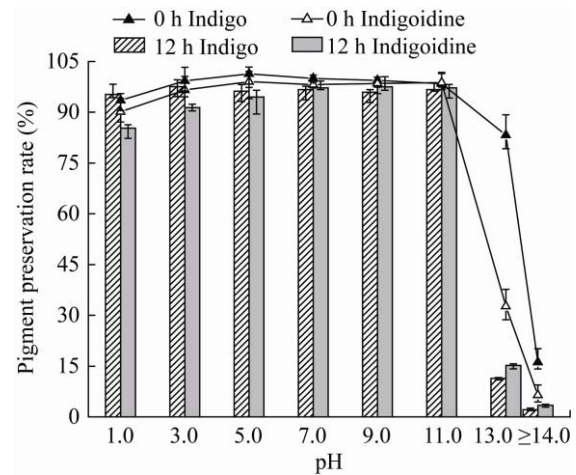


图 7 pH 对色素的影响

Figure 7 The effect of different pH on the stability of indigoidine and indigo

对 2 种色素的结构可能有保护作用, 致使它们在 pH 1.0–5.0 时可保持原始的蓝色; 对于 Indigoidine 在强碱性 pH 下褪色, 是由于 NaOH 可致其发生分解^[15]。

2.6 温度对色素稳定性的影响

高温对 2 种色素均有较大程度的破坏, 温度越高对色素的破坏程度越大。90、75 °C 保温 4 h 后, 2 种色素保存率分别低于 10%、20%; 60、45 °C 保温 4 h 后, Indigoidine 的色素保存率

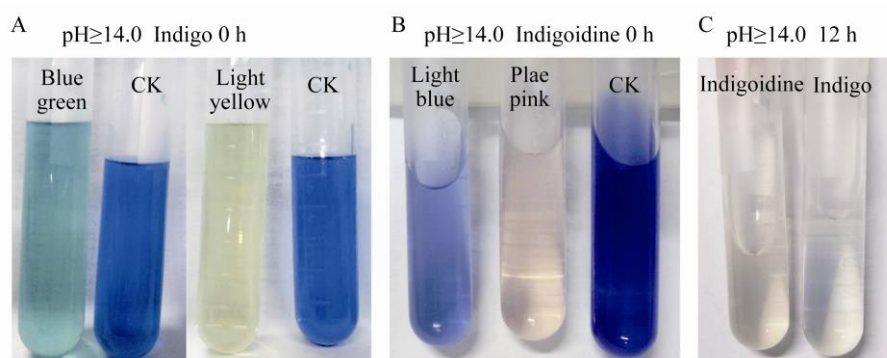
图 8 pH ≥ 14.0 时 2 种色素溶液颜色的变化

Figure 8 Color changes of the two pigment solutions at pH ≥ 14.0

注: A: pH ≥ 14.0 , 0 h 时靛蓝色素溶液颜色变化; B: pH ≥ 14.0 , 0 h 时 Indigoidine 色素溶液颜色变化; C: pH ≥ 14.0 , 12 h 后 2 种色素溶液颜色变化

Note: A: Color change of indigo solution at pH ≥ 14.0 at 0 h; B: Color change of indigoidine solution at pH ≥ 14.0 at 0 h; C: Color change of the two pigment solutions at pH ≥ 14.0 after 12 h

(70.36%、89.72%)明显高于靛蓝的色素保存率(37.27%、61.93%),即2种色素热稳定性不佳,但在75℃以下时 Indigoidine 稳定性显著优于靛蓝(图9)。

常温组中,2种色素的保存率随着温度和时间增加而降低,但 Indigoidine 在28℃恒温84 h的色素保存率(80.23%)远高于靛蓝在16、28℃恒温84 h的色素保存率(52.19%、38.84%)。说明在常温条件下 Indigoidine 的色素稳定性明显优于靛蓝(图10)。

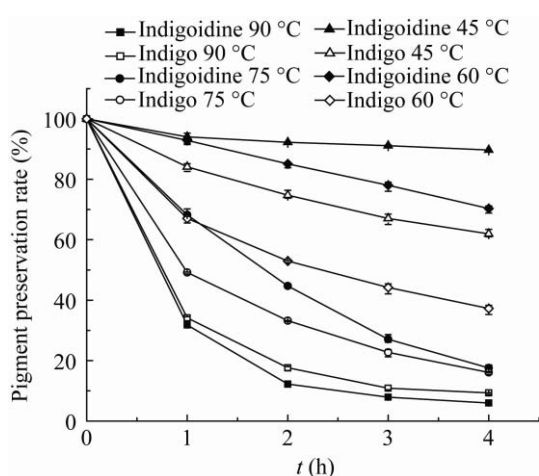


图9 高温对色素的影响

Figure 9 The effect of high temperature on the stability of indigoidine and indigo

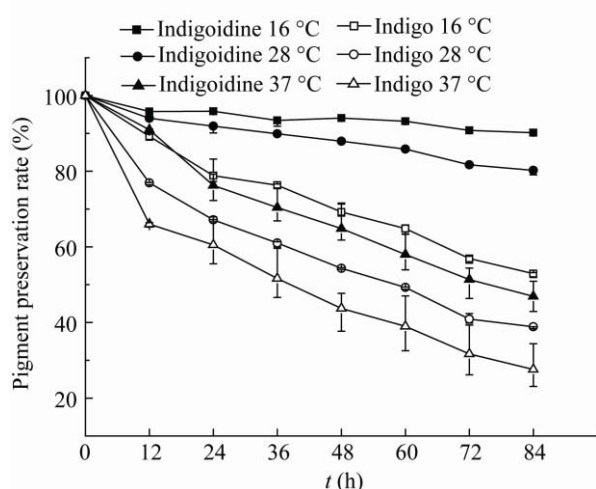


图10 常温对色素的影响

Figure 10 The effect of ordinary temperature on the stability of indigoidine and indigo

低温组中,2种色素在-80、-20℃保存84 h时,色素保存率都在95%以上。但4℃保存84 h时 Indigoidine 保存率为94.09%,明显高于靛蓝保存率的77.56%,即低温时色素稳定性 Indigoidine 显著优于靛蓝(图11)。

综上所述, Indigoidine 色素溶液在75-90℃时热稳定性不佳,但在4-60℃的稳定性较好且优于靛蓝。

2.7 氧化还原剂对色素稳定性的影响

如图12所示,1%-2% Vc对 Indigoidine 有一定破坏作用但不显著。1% Vc对靛蓝影响极大,发生明显的褪色现象,3 h后色素保存率为22.82%;当 Vc 浓度增加到2%时,3 h后色素保存率仅为8.14%,溶液最终为浅黄色。Indigoidine 与靛蓝相比,抗 Vc 还原能力更强。

1%-2%植酸对 Indigoidine 有较弱的护色效果。1%植酸对靛蓝有较弱的护色效果,但2%植酸使其色素保存率稍微降低,可能是植酸具有还原性,随着植酸浓度的增加,靛蓝色素被部分还原。

两种色素保存率都随 H₂O₂ 和 Vk3 的浓度增大而降低,添加2% H₂O₂时,与 Indigoidine 相比,靛蓝的色素保存率降低显著,说明 Indigoidine 抗双氧

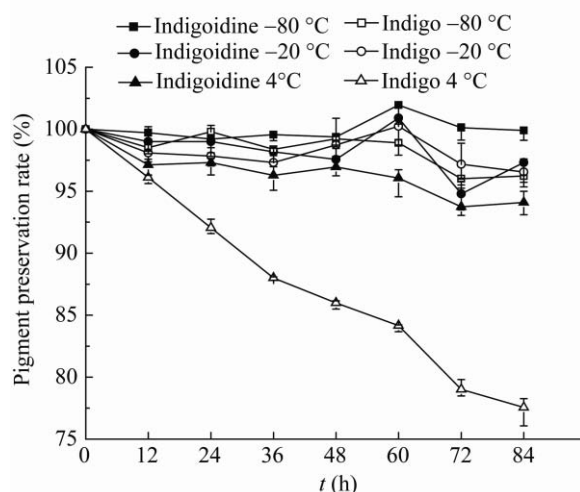


图11 低温对色素的影响

Figure 11 The effect of low temperature on the stability of indigoidine and indigo

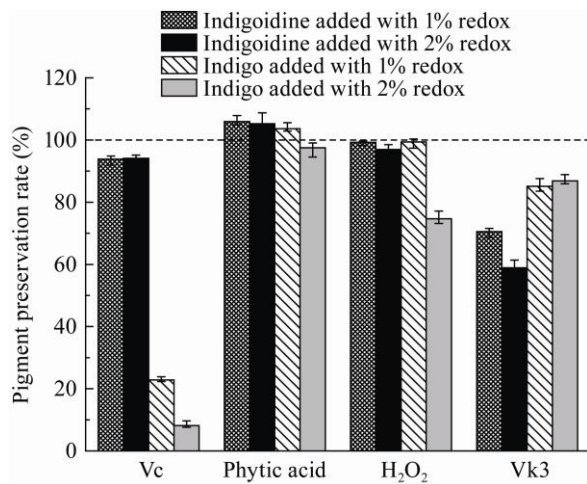


图 12 氧化还原剂对色素的影响

Figure 12 The effect of oxidant and reductants on the stability of indigoidine and indigo

水氧化作用强于靛蓝；而在添加 1%–2% Vk3 时，靛蓝的色素保存率明显大于 Indigoidine，说明靛蓝抗 Vk3 氧化作用比 Indigoidine 更强。可能是双氧水和 Vk3 氧化机理不同，Indigoidine 和靛蓝化学结构不同，导致两者表现出抵抗不同氧化剂的能力差异。

2.8 食品添加剂对色素稳定性的影响

如图 13 所示，总体上，甘油、山梨醇、甘露醇和蔗糖对 2 种色素没有显著的破坏作用，添加甘露醇 7 d 后对靛蓝具有较明显的护色效果，但添加葡萄糖 7 d 后 2 种色素溶液吸光度较对照均有所下降。如图 13 和 14A 所示，苯甲酸对 Indigoidine 有明显的破坏作用，24 h 后色素溶液变为淡粉紫

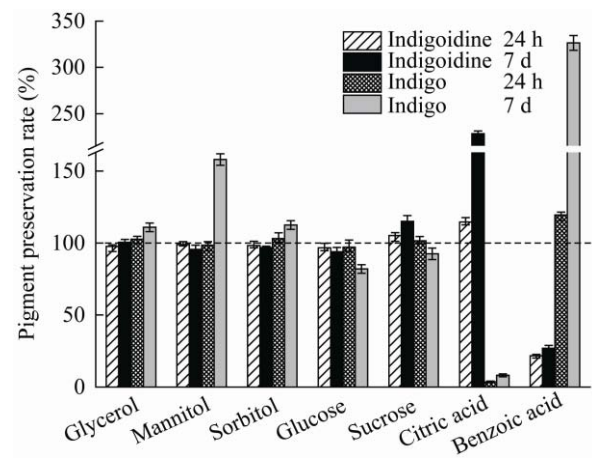


图 13 食品添加剂对色素的影响

Figure 13 The effect of food additives on the stability of indigoidine and indigo

色，但其对靛蓝有显著的护色效果，添加 7 d 后靛蓝的色素保存率为对照的 3.26 倍。如图 13 和 14B 所示，柠檬酸对靛蓝有明显的破坏作用，24 h 后色素溶液变为浅黄色，但其对 Indigoidine 有显著的护色效果，添加 7 d 后 Indigoidine 的色素保存率为对照的 2.28 倍。

2.9 金属离子对色素稳定性的影响

如图 15 所示，对于这 2 种色素，Ca²⁺、Mg²⁺具有不同程度的护色效果，Na⁺、K⁺对 Indigoidine 没有破坏作用，但对靛蓝有较弱的护色效果。Mn²⁺处理 4 h 对 Indigoidine 具有较弱的护色效果，而处理 24 h 却有明显的破坏作用，但总体上对靛蓝具有微弱的护色效果。

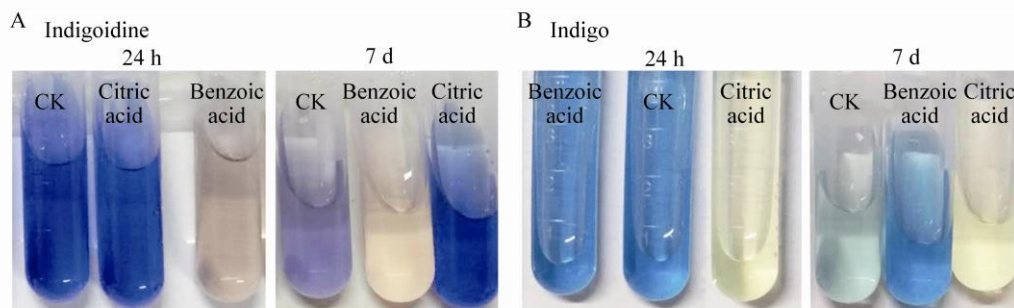


图 14 添加柠檬酸和苯甲酸 24 h 和 7 d 后 Indigoidine (A)和靛蓝(B)溶液颜色的变化

Figure 14 Color changes of indigoidine (A) and indigo (B) solutions after adding citric acid or benzoic acid for 24 h and 7 d

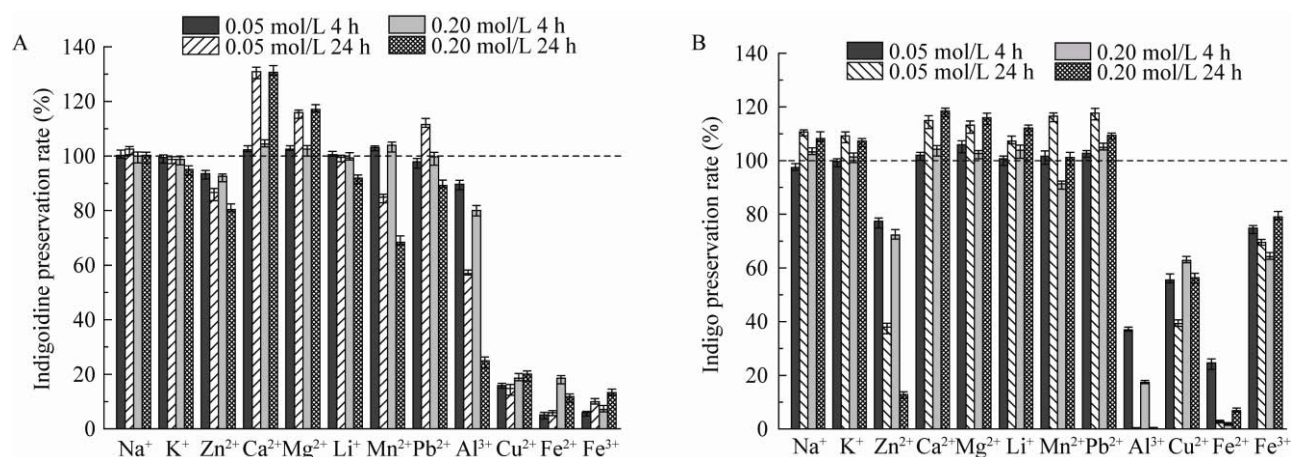


图 15 金属离子对 Indigoidine (A)和靛蓝(B)的影响

Figure 15 The effect of metal ions on the stability of indigoidine (A) and indigo (B)

Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 对 2 种色素均具有明显的破坏作用。 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 使色素褪色，最大吸收波长不移动，对靛蓝的破坏作用比 Indigoidine 更强。 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 使色素褪色，并伴随最大吸收波长的移动。 Cu^{2+} 使 2 种色素溶液变为不同程度的蓝绿色， λ_{max} 移至 770 nm。添加 Fe^{2+} 则使 2 种色素溶液变为不同程度的橘黄色并产生橘黄色沉淀， λ_{max} 移至 420 nm。添加 Fe^{3+} 对 Indigoidine 的破坏作用比靛蓝更大，靛蓝溶液变为草绿色，是由于处理后的溶液 λ_{max} 移至 420 nm (黄色)处且 $\lambda=610$ nm 处仍有部分吸光度值，色素并未完全被

破坏，所以 2 种颜色混合后溶液显示绿色，而 Indigoidine 色素溶液变为黄色，处理后的溶液 λ_{max} 移至 420 nm 处且 $\lambda=590$ nm 处的吸光度值很低，色素几乎完全被破坏，所以溶液显示黄色。分别添加以上 5 种金属离子 24 h 后，2 种色素溶液的颜色变化如图 16 所示。

Li^{+} 对 Indigoidine 几乎没有影响，但对靛蓝却具有较弱的护色效果。 Pb^{2+} 使 2 种色素溶液都产生白色沉淀，离心后的上清色素溶液中，随 Pb^{2+} 浓度增大和处理时间的增加，Indigoidine 色素保存率明显下降，但靛蓝色素保存率略有增加。

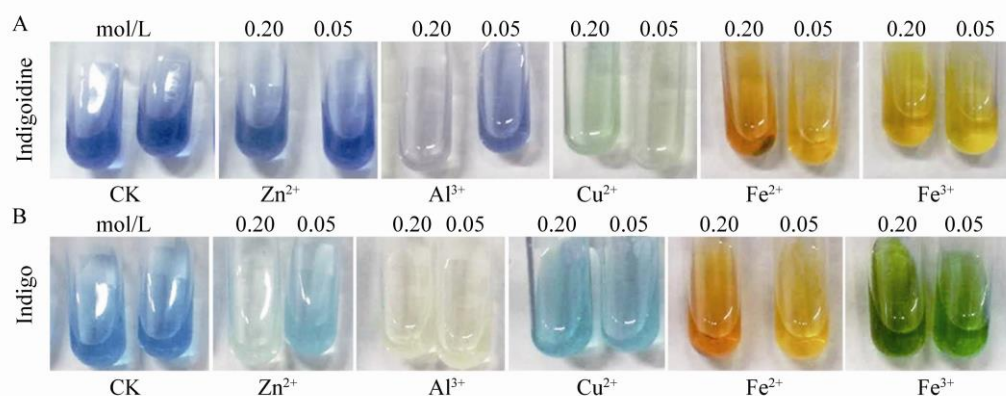


图 16 添加不同浓度 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 离子 24 h 后 Indigoidine (A)和靛蓝(B)色素溶液颜色的变化

Figure 16 Color changes of indigoidine (A) and indigo (B) solutions after adding different concentrations of Zn^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} ions for 24 h, respectively

3 讨论

可见光、紫外线、氧化剂(H_2O_2)、高温对 Indigoidine 和靛蓝 2 种色素均有不同程度的破坏, 即色素最大吸收波长处的吸光值下降, 色素部分或全部损失, 说明色素的发色体(图 1)结构改变或被破坏。Galindo 等^[29]发现在紫外线和 H_2O_2 的联合作用下, 生成具有强氧化作用的羟基自由基, 导致靛蓝胭脂红发色体中间的 $\text{C}=\text{C}$ 双键断裂, 生成靛红磺酸, 其继续被氧化成其他无色物质; Takeuchi 等^[30]发现臭氧导致靛蓝发色体中间的 $\text{C}=\text{C}$ 双键断裂, 生成靛红。光还原与光氧化是染料光褪色的 2 个重要途径^[31], Kuramoto 等^[32]发现单线态氧所致的光氧化反应使靛蓝产生光褪色现象。靛蓝先生成过氧化中间体(Peroxide Intermediate), 而后发色体中间的 $\text{C}=\text{C}$ 双键断裂, 生成靛红(Isatin), 反应过程见图 17。靛红可继续被氧化为邻氨基苯甲酸和二氧化碳。马超群等^[33]认为高温致使靛蓝发色体中间的 $\text{C}=\text{C}$ 双键断裂, 生成芳香胺类化合物。由靛蓝褪色机理推测, Indigoidine 分别在可见光、紫外线、氧化剂(H_2O_2)、高温的条件下褪色, 可能是上述条件导致其发色体中间的 $\text{C}=\text{C}$ 双键断裂, 发色体共轭结构被破坏, 最终生成其他物质。

添加还原剂 Vc 使 2 种色素在其对应的 λ_{max} 处吸光值下降, 而且靛蓝对 Vc 敏感, 吸光度大幅下降, 最终溶液蓝色消失变为浅黄色。推测原因可能是, 2 种色素在还原剂 Vc 的作用下被还原为对应

的隐色体(Leuco-)形式, 原发色体结构改变, 导致吸光度下降, 即靛蓝还原为隐色靛蓝(也称靛白, Leucoindigo), 其结构见图 18A, Indigoidine 被还原为 Leucoindigoidine, 其结构见图 18B。靛蓝可被连二亚硫酸钠还原为隐色靛蓝^[7], Indigoidine 也可被连二亚硫酸钠还原为其隐色体形式 Leucoindigoidine^[13-15]。

4 结论

实验结果表明, 在以 N,N-二甲基甲酰胺为溶剂时, 可见光、紫外线对 2 种色素有显著的破坏作用; pH 1.0–11.0 时 2 种色素稳定, 颜色呈蓝色, 在强碱性 pH 条件下 2 种色素都不稳定, 褪色明显; Indigoidine 抗 Vc 还原能力强于靛蓝, 并对 Vc 有一定的耐受作用, 靛蓝则对 Vc 敏感; 植酸对 Indigoidine 有微弱的护色效果; 氧化剂对 2 种色素都有不同程度的破坏作用, Indigoidine 抗双氧水氧化作用比靛蓝更强, 但抗 V_{K3} 氧化作用明显弱于靛蓝; 2 种色素热稳定性不佳, 在低于 75 °C 时, Indigoidine 的色素稳定性优于靛蓝; 食品添加剂中的柠檬酸对 Indigoidine 有显著的护色效果, 但对靛蓝有明显的破坏作用, 而苯甲酸对 Indigoidine 有明显的破坏作用却对靛蓝有显著的护色效果; 对这 2 种色素, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 具有护色效果, Na^+ 、 K^+ 对 Indigoidine 未见破坏作用, 但对靛蓝均有较弱的护色效果, Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 具有明显的破坏作用; Mn^{2+} 可使 Indigoidine 色素稳定性下降, 但在低浓度时对靛蓝有较弱的护色效果, Li^+

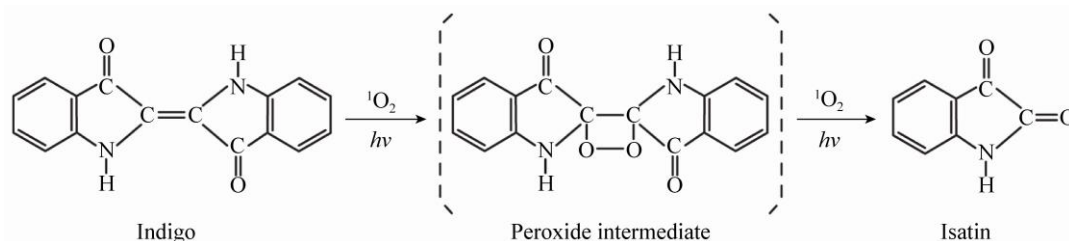


图 17 单线态氧所致靛蓝光氧化反应过程^[31-32]

Figure 17 Photooxidation of indigo by singlet oxygen reaction process^[31-32]

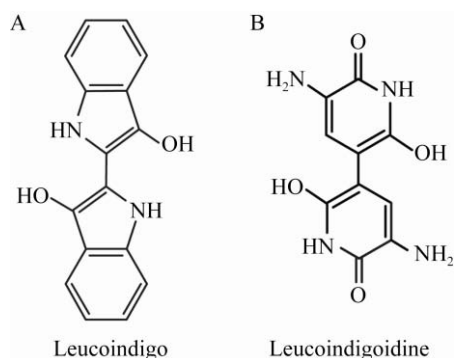


图 18 隐色靛蓝(A)^[7]与 Leucoindigoidine (B)^[13-15]的化学结构

Figure 18 Chemical structures of leucoindigo (A)^[7] and leucoindigoidine (B)^[13-15]

在总体上对 Indigoidine 没有明显的影响,但对靛蓝有较弱的护色效果, Pb^{2+} 使 2 种色素溶液都产生白色沉淀。因此,对 Indigoidine 色素的利用及加工工艺中应注意在避光、常温或低温的条件下进行和保存,尽量避免接触 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 金属离子、强碱性物质和苯甲酸,但可与具有弱氧化还原性的物质适当混合。

总而言之,在可见光、紫外线、温度(高温,常温,低温)、pH、柠檬酸、特定的氧化还原剂与金属离子的影响因素下,Indigoidine 的色素稳定性总体上优于现今市场上常用的靛蓝,因此具有良好的开发应用和市场前景。

致谢:感谢中国科学院微生物研究所陈义华研究员惠赠含有 *idgS* 和 *sfp* 基因的 pCIMt002 质粒。感谢天津科技大学生物工程学院谢周杰副研究员对 Indigoidine 相关研究经验的指导,以及本实验室唐巧巧同学在质粒构建方面的指导和帮助。

REFERENCES

- [1] Xie Y, Xu W, Wang YJ, Sun SQ, Liu XX. Study on the stability of blue pigment from *Streptomyces lividans*[J]. Journal of Jiaxing University, 2013, 25(6): 41-45 (in Chinese)
谢勇, 徐微, 王玉洁, 孙诗清, 刘晓侠. 浅青紫链霉菌蓝色素的稳定性研究[J]. 嘉兴学院学报, 2013, 25(6): 41-45
- [2] Mao DJ, Zhu YL. Review of research situations of natural blue edible pigments in China[J]. China Food Additives, 2011(4): 149-155 (in Chinese)
毛得奖, 朱亚玲. 我国食用天然蓝色素研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2011(4): 149-155
- [3] Cude WN, Mooney J, Tavaneai AA, Hadden MK, Frank AM, Gulvik CA, May AL, Buchan A. Production of the antimicrobial secondary metabolite indigoidine contributes to competitive surface colonization by the marine roseobacter *Phaeobacter* sp. strain Y4I[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(14): 4771-4780
- [4] Ma Q, Qu YY, Zhang XW, Xu BW, Zhou JT. Recent advances in microbial synthesis of indigo[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2012, 18(2): 344-350 (in Chinese)
马桥, 曲媛媛, 张旭旺, 许炳雯, 周集体. 靛蓝的微生物合成研究新进展[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(2): 344-350
- [5] Han XH, Wang W, Xiao XG. Microbial biosynthesis and biotransformation of indigo and indigo-like pigments[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(6): 921-926 (in Chinese)
韩晓红, 王伟, 肖兴国. 靛蓝及其同类色素的微生物生产与转化[J]. 生物工程学报, 2008, 24(6): 921-926
- [6] Du LY, Zhang C, Che YX, Liu WX, Wang MF, Yin S, Wang CT. Construction of gene engineered *Escherichia coli* strain for high-yield production of indigo and its stability[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(16): 229-233 (in Chinese)
杜灵燕, 张策, 车逸心, 刘雯娟, 王孟菲, 尹胜, 王成涛. 高产靛蓝色素大肠杆菌工程菌的构建及靛蓝色素稳定性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 229-233
- [7] Yuan X. Research progress of cotton indigo dyeing mechanism[J]. Shanghai Textile Science and Technology, 2013, 41(6): 1-4 (in Chinese)
袁霞. 靛蓝对棉染色机理的研究进展[J]. 上海纺织科技, 2013, 41(6): 1-4
- [8] Ma GH. Electrochemical and spectroelectrochemical studies of vat dye indigo[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2010 (in Chinese)
马光和. 还原染料靛蓝的电化学与光谱电化学研究[D]. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 2010
- [9] Takahashi H, Kumagai T, Kitani K, Mori M, Matoba Y, Sugiyama M. Cloning and characterization of a *Streptomyces* single module type non-ribosomal peptide synthetase catalyzing a blue pigment synthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(12): 9073-9081
- [10] Yu DY, Xu FC, Valiente J, Wang SY, Zhan JX. An indigoidine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces chromofuscus* ATCC 49982 contains an unusual IndB homologue[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2013, 40(1): 159-168
- [11] Li PW, Li J, Guo ZY, Tang W, Han JS, Meng XX, Hao TT, Zhu YX, Zhang LX, Chen YH. An efficient blue-white

- screening based gene inactivation system for *Streptomyces*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(4): 1923-1933
- [12] Kong LY, Xu GD, Liu XQ, Wang JW, Tang ZL, Cai YS, Shen K, Tao WX, Zheng Y, Deng ZX, et al. Divergent biosynthesis of C-nucleoside minimycin and indigoidine in bacteria[J]. iScience, 2019, 22: 430-440
- [13] Müller M, Ausländer S, Ausländer D, Kemmer C, Fussenegger M. A novel reporter system for bacterial and mammalian cells based on the non-ribosomal peptide indigoidine[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(4): 325-335
- [14] Heumann W, Young D, Gottlich C. Leucoindigoidine formation by an *Arthrobacter* species and its oxidation to indigoidine by other micro-organisms[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1968, 156(2): 429-431
- [15] Kuhn R, Starr MP, Kuhn DA, Bauer H, Knackmuss HJ. Indigoidine and other bacterial pigments related to 3,3'-bipyridyl[J]. Archiv Für Mikrobiologie, 1965, 51(1): 71-84
- [16] Reverchon S, Rouanet C, Expert D, Nasser W. Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(3): 654-665
- [17] Yang YD, Tian L, Chen CJ, Qian Z, Zhong CF. Method for dyeing protein fiber fabric with natural blue pigment indigoidine after color matching: CN, 108894014A[P]. 2018-11-27 (in Chinese)
杨叶东, 田丽, 陈灿军, 钱政, 钟成芳. 染色后的天然蓝色色素 indigoidine 对蛋白质纤维织物染色的方法: 中国, 108894014A[P]. 2018-11-27
- [18] Xie ZJ, Zhang Z, Cao ZJ, Chen M, Li PW, Liu WF, Qin H, Zhao XJ, Tao Y, Chen YH. An external substrate-free blue/white screening system in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2017, 101(9): 3811-3820
- [19] Nanjaraj Urs AN, Hu YL, Li PW, Yuchi AG, Chen YH, Zhang Y. Cloning and expression of a nonribosomal peptide synthetase to generate blue rose[J]. ACS Synthetic Biology, 2019, 8(8): 1698-1704
- [20] Yumusak C, Prochazkova AJ, Apaydin DH, Seelajaroen H, Sariciftci NS, Weiter M, Krajcovic J, Qin Y, Zhang W, Zhan JX, et al. Indigoidine: Biosynthesized organic semiconductor[J]. Dyes and Pigments, 2019, 171: 107768
- [21] Xu FC, Gage D, Zhan JX. Efficient production of indigoidine in *Escherichia coli*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2015, 42(8): 1149-1155
- [22] Xu J. The method and condition optimization of production indigoidine with L-glutamine strain[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2017 (in Chinese)
徐捷. 利用 L-谷氨酰胺高产菌株产新型靛蓝色素的方法及条件优化[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2017
- [23] Wehrs M, Pahl JP, Moon J, Li YC, Tanjore D, Keasling JD, Pray T, Mukhopadhyay A. Production efficiency of the bacterial non-ribosomal peptide indigoidine relies on the respiratory metabolic state in *S. cerevisiae*[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 193
- [24] Wehrs M, Gladden JM, Liu YZ, Platz L, Pahl JP, Moon J, Papa G, Sundstrom E, Geiselman GM, Tanjore D, et al. Sustainable bioproduction of the blue pigment indigoidine: Expanding the range of heterologous products in *R. toruloides* to include non-ribosomal peptides[J]. Green Chemistry, 2019, 21(12): 3394-3406
- [25] Xu BY, Cheng YB, Wang L, Zhou H, Huang L, Tang XY, Gao Q. Construction of *Escherichia coli-Staphylococcus* shuttle vector for EGFP expression and potential secretion via tat pathway[A]//Zhang TC, Nakajima M. Advances in Applied Biotechnology[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015, 333: 171-180
- [26] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2005: 91-92 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2005: 91-92
- [27] Nakano MM, Corbell N, Besson J, Zuber P. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular and General Genetics, 1992, 232(2): 313-321
- [28] Lambalot RH, Gehring AM, Flugel RS, Zuber P, LaCelle M, Marahel MA, Reid R, Khosla C, Walsh CT. A new enzyme superfamily—the phosphopantetheinyl transferases[J]. Chemistry & Biology, 1996, 3(11): 923-936
- [29] Galindo C, Jacques P, Kalt A. Photochemical and photocatalytic degradation of an indigoid dye: A case study of acid blue 74 (AB74)[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2001, 141(1): 47-56
- [30] Takeuchi K, Ibusuki T. Quantitative determination of aqueous-phase ozone by chemiluminescence using indigo-5,5'-disulfonate[J]. Analytical Chemistry, 1989, 61(6): 619-623
- [31] Li JC. Mechanism of photooxidation fading of dyes: the effect of singlet oxygen on photofading of dyes[J]. Dyestuff Industry, 1987(3): 21-27,30 (in Chinese)
李金诚. 染料的光氧化褪色机理: 单线态氧对染料光褪色的作用[J]. 染料工业, 1987(3): 21-27,30
- [32] Kuramoto N, Kitao T. Contribution of singlet oxygen to the photofading of indigo[J]. Journal of the Society of Dyers and Colourists, 1979, 95(7): 257-261
- [33] Ma CQ, Chen GQ, Gao SM, Shi YP, Gu L, Chen C. Study on thermal stability of indigotone based on fluorescence spectrometry[EB/OL]. Beijing: Sciencepaper Online [2011-06-07] (in Chinese)
马超群, 陈国庆, 高淑梅, 史院平, 谷玲, 陈超. 基于荧光光谱法的靛蓝热稳定性研究[EB/OL]. 北京: 中国科技论文在线[2011-06-07]