

靛蓝及其同类色素的微生物生产与转化

韩晓红, 王伟, 肖兴国

中国农业大学生物学院植物生理学与生物化学国家重点实验室, 北京, 100094

摘要: 靛蓝类色素广泛应用于印染、食品和医药工业, 其环境友好的合成或生产途径越来越受到人们的关注, 特别是微生物生物合成。已经鉴定和分离了能够合成靛蓝类色素的多种微生物, 并且明确了起催化作用的主要是单加氧酶和双加氧酶。已经克隆和利用了一些加氧酶的基因, 构建了工程菌, 优化了其发酵过程。同时, 微生物合成靛蓝的生物转化也已经起步。这些进展将带来环境友好的靛蓝类色素的合成与生产。

关键词: 靛蓝, 靛玉红, 微生物合成, 生物转化

Microbial Biosynthesis and Biotransformation of Indigo and Indigo-like Pigments

Xiaohong Han, Wei Wang, and Xingguo Xiao

State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract: Indigo and indigo-like pigments are widely used in the industry of textile, food and medicine. Now people pays more and more attention to developing an alternative method of indigo production which is “environment-friendly”, especially microbial biosynthesis of indigo. Many microorganisms involved in the biosynthesis of indigo have been isolated and characterized, and monooxygenase and dioxygenase have been identified to catalyze indigo biosynthesis. Some genes encoding for these enzymes have been cloned and used to construct “engineering bacteria”. With this kind of bacteria, more efficient fermentation systems for indigo production have been exploited. In the meantime, biotransformation of the indigo produced by microorganisms has been under investigation. These progresses will bring us a greener method of indigo and indigo-like pigments production.

Keywords: indigo, indirubin, microbial biosynthesis, biotransformation

靛蓝类色素是人类所知最古老的色素之一, 广泛用于印染、医药和食品工业。靛蓝作为织物染料的应用至少可追溯到公元前 2500 年^[1]。古埃及木乃伊穿着的一些服装和我国马王堆出土的蓝色麻织物等都是由靛蓝所染成的^[2], 我国瑶族的一支因其生产和使用靛蓝染布的技术独特而得名“蓝靛瑶”。在食品工业中, 靛蓝以其磺酸钠盐或其铝化的形式

等用作食用色素, 我国称之为“亮蓝”(GB7655.1-1996)和亮蓝铝淀(GB7655.2-1996), 在美国等以其磺酸钠盐形式为主(FD&C Blue No. 2, USA), 被称之为“靛蓝素”(Indigotine)。靛蓝及其同类色素自古就广泛应用于医药业。在传统医学中, 中国、印度和南美等国都利用被称为靛蓝植物(Indigo plant)或产靛蓝植物(Indigo-producing plant)

Received: March 17, 2008; Accepted: April 10, 2008

Supported by: the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA10Z103).

Corresponding author: Xingguo Xiao. Tel: +86-10-62731324; E-mail: xiaoxg@cau.edu.cn

国家 863 项目 (No. 2008AA10Z103)资助。

的叶和/或根来治疗诸多的疾病,包括子宫癌、胃痛、癫痫和其它神经系统病、气管炎、大出血、脾、肺和肾失调、心脏和泌尿系统不调、少年白发脱发和感冒等。

传统的靛蓝生产,几千年来一直是从被统称为“蓝草”的靛蓝植物或产靛蓝植物中提取,这些植物包括菘蓝、欧洲菘蓝、蓼蓝、马蓝、木蓝(又名槐蓝)、野青树和纳塔尔木蓝等。1897年问世的化学合成的靛蓝迅速取代了植物靛蓝(天然靛蓝)的市场地位,到20世纪60年代之后,天然靛蓝退出了历史舞台。现在,几乎所有的靛蓝都是化学合成的。化学合成靛蓝相对植物靛蓝而言具有原料充足、生产简便和靛蓝纯度高等优势,但是在化学合成过程中,使用的原料和催化剂不仅对操作者的呼吸道和中枢神经及肝脏有一定的损害,甚至能诱导产生癌症,而且还会因为产生含有大量的氯化铁、硫酸铁、硫酸钠、氯化钠、苯胺和硝基苯等有毒物质的漂洗废水,对环境也造成严重的污染^[3]。进入20世纪80年代后,随着全社会的环境保护和劳动保护意识的增强和逐渐普及,人们认识到了化学合成靛蓝对人体和环境的严重危害,开始探求“生产者友好型”和“环境友好型”的靛蓝生产方法,其中重要的途径之一就是利用微生物生物合成靛蓝。本文概述靛蓝及其同类色素的微生物生产与转化及其进展,为“生产者友好型”和“环境友好型”的靛蓝生产提供参考。

1 靛蓝类色素的微生物生产

1.1 合成靛蓝类色素的微生物

早在1928年人们就观察到假单胞菌(*Pseudomonas indoloxidaes*)能够氧化吲哚合成靛蓝,1956年观察到真菌 *Schizophyllum commune* 能够在有葡萄糖和胺盐的培养基上直接合成靛蓝,但其机制在当时还不清楚。1983年,Ensley等^[2]发现,将假单胞菌 *P. putida* PpG7质粒NAH7中的片段克隆重组后转入大肠杆菌(*Escherichia coli* HB101),转化子能够在有吲哚或色氨酸的条件下合成靛蓝。Ensley等推测,作为培养基添加剂加入的或由色氨酸的酶促代谢而产生的吲哚,被假单胞菌DNA编码的多组分双加氧酶转化成顺-吲哚-2,3-二氢二醇和3-羟基吲哚(吲哚酚),所产生的3-羟基吲哚在接触空气后被氧化成靛蓝(图1)。自Ensley等1983年

的开创性工作后,许多能够合成靛蓝的微生物种类和菌株被鉴定出,其中多数是可以降解芳香烃的细菌。主要有:以萘为碳源的 *Pseudomonas putida* 菌株 PpG7^[4]、有能够降解甲苯-二甲苯或甲苯其它衍生生物的 *P. putida* mt-2^[5]、降解甲苯的 *P. Mendocina* 菌株 KR1^[6]、降解苯乙烯的 *P. putida* 菌株 S12 和 CA-3^[7]、以1,2,3,4-四氢化萘为碳源的 *Sphingomonas macroglotabida*^[8]等。

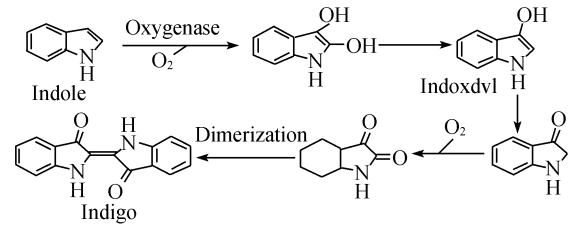


图1 以吲哚为底物合成靛蓝

Fig. 1 The biosynthesis of indigo from indole

1.2 负责靛蓝类色素合成的酶

负责靛蓝类色素合成的酶主要是单加氧酶和双加氧酶,它们可以相应地将单个或双个的氧原子加入到一个有机化合物分子中。这些酶或者其编码基因主要来自 *Pseudomonas* 和 *Rhodococcus* spp.等微生物^[6,9,10]。

1.2.1 单加氧酶

单加氧酶在一般情况下只能将单个氧原子加入到一个有机化合物分子中。按照其加氧反应催化活动中心的结构,基本可分为血红素型单加氧酶和黄素型单加氧酶。大部分单加氧酶的加氧反应需要还原辅助因子,一般为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)或还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)。除此之外,有些酶还需要若干电子传递伴随物,如铁硫蛋白和黄素还原酶等。

在能够催化形成靛蓝的单加氧酶中,来自 *P.putida* 的有些参与甲苯和1-萘酚的代谢,形成靛蓝^[11],另外一些,例如克隆自 *P. putida* MT53的TOL质粒pWW53中的二甲苯氧化酶基因编码的单加氧酶,将吲哚催化为3-羟基吲哚,然后二聚化为靛蓝^[12]。在 *Rhodococcus* sp. Strain 12038中,单加氧酶也参与1-萘酚的代谢,催化吲哚合成靛蓝^[13]。 *Methylophaga* sp. Strain SK1中的黄素单加氧酶也可以催化吲哚合成靛蓝^[14]。目前已知的能够催化形成靛蓝的主要单加氧酶见表1。

1.2.2 双加氧酶

双加氧酶通常将两个氧原子加入到一个有机化合物分子中。与单加氧酶一样, 按照其加氧反应催化活动中心的结构, 基本上也可分为血红素型双加氧酶和黄素型双加氧酶。其中的部分也需要还原辅助因子, 如 NADH 或 NADPH, 有些还需要若干电子传递协同物, 如铁硫蛋白和黄素还原酶等。

含有双加氧酶基因的菌生长在含有芳香烃的培养基上可以使吲哚转化为靛蓝, 催化机制为催化吲哚形成双羟基酚, 然后脱水形成吲哚酚, 在空气中二聚化形成靛蓝^[15]。以吲哚为底物的靛蓝的微生物合成始于 1928 年, 而吲哚通过加氧酶催化合成吲哚酚却是在 1965 年被研究发现。但当时超低的转化率以及大量的需要吲哚这种昂贵和有性的底物阻碍了其商业化生产。1983 年萘双加氧酶首次被鉴定出可以催化吲哚合成靛蓝^[4], 而萘双加氧酶基因的克隆和鉴定使得迅速和高效的催化吲哚合成靛蓝成为可能, 但同时伴有副产物靛玉红的合成。这样, 通过芳香烃双加氧酶催化吲哚合成靛蓝的生物转化, 又由于副产物靛玉红的出现受到了很大的阻碍。

靛玉红是 2-羟基吲哚和 3-羟基吲哚的异二聚体,

例如萘双加氧酶催化吲哚合成靛蓝的过程中, 顺-2, 3-二羟基吲哚可以降解为 2-羟基吲哚和 3-羟基吲哚, 二聚化即生成副产物靛玉红。而靛蓝是 3-羟基吲哚的二聚体。转化率和最终产物的纯度阻碍了吲哚生成靛蓝的生物转化。该问题在 Zennaro E. 等从 *P. fluorescens* ST 中克隆到只催化合成 3-羟基吲哚的苯乙烯单加氧酶基因后得到解决^[16]。

目前已经知道的能够催化形成靛蓝的双加氧酶的种类还不多, 主要的见表 2。

1.2.3 以吲哚的衍生物为底物的加氧酶

加氧酶还可以催化吲哚衍生物合成靛蓝类色素。人细胞色素 P450 2A6 单加氧酶可以催化吲哚的衍生物合成靛蓝^[17]。来自于人的野生型 P450 2A6 不仅作用底物的范围较窄, 而且催化能力很低, 但实验室进化或者突变的 hP450 2A6 突变酶不仅催化能力大为提高^[18-21], 而且还可以催化 26 种吲哚衍生物中的 10 种合成靛蓝类染料^[21]。李红梅等^[22,23]、陆燕等^[24]定向突变了 *Bacillus megaterium* 细胞色素 P450 BM-3, 获得了能够更高效率地将吲哚转化成靛蓝的突变体。实验室进化的或者突变的而不是野生型的加氧酶具有催化吲哚的衍生物合成靛蓝这一

表 1 催化形成靛蓝的主要单加氧酶
Table 1 Monoxygenase involved in indigo production

Name	Sources	Reference
Xylene oxygenase	<i>Pseudomonas putida</i> MT53	Keil <i>et al.</i> , 1987
Toluene-4-monooxygenase	<i>Pseudomonas mendocina</i> KR1	Yen <i>et al.</i> , 1991
2-Naphthoic acid oxygenase	<i>Pseudomonas</i> 2-NAT	Sun <i>et al.</i> , 1995
Monooxygenase	<i>Rhodococcus</i> sp.(NCIMB 12038)	Allen <i>et al.</i> , 1997
Styrene monooxygenase	<i>Pseudomonas putida</i> S12 and CA-3	O'Connor <i>et al.</i> , 1997
Cytochrome P450 monooxygenase	Human	Gillam <i>et al.</i> , 1999
Fatty-acid hydroxylase P450 BM-3	<i>Bacillus megaterium</i>	Li <i>et al.</i> , 2000
Cytochrome P450 2A6	Human	Nakamura <i>et al.</i> , 2001
2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase	<i>Pseudomonas azelaica</i> HBPI	Meyer <i>et al.</i> , 2002
Flavin monooxygenases	<i>Methylophaga</i> sp. strain SK1	Hack <i>et al.</i> , 2003
Cytochrome P450 BM-3 mutant	<i>Bacillus megaterium</i>	Lu <i>et al.</i> , 2006

表 2 催化形成靛蓝的主要双加氧酶
Table 2 Dioxygenase involved in indigo production

Name	Sources	Reference
Naphthalene dioxygenase	<i>Pseudomonas putida</i> PpG7	Ensley <i>et al.</i> , 1983
Toluene dioxygenase	<i>Pseudomonas putida</i> F1	Zylstra <i>et al.</i> , 1989
Naphthalene dioxygenase	<i>Pseudomonas</i> sp. and <i>Bacillus brevis</i>	Wu <i>et al.</i> , 1989
Tetralin dioxygenase	<i>Sphingomonas macrogolita</i> bida Strain	Moreno-Ruiz <i>et al.</i> , 2005

现象也被 Meyer 等在 2-羟基双苯基-3-单加氧酶上观察到^[25]。Kim 等报道, 萘双加氧酶和甲苯双加氧酶能分别催化吡啶衍生物产生 15 和 6 种染料^[26], 来自 *Pseudomonas* sp. KL28 表达的多组分酚羟基化酶可以催化 30 种吡啶的衍生物中的 20 种合成靛蓝类染料^[27]。Kim 等还注意到, 来自 *Pseudomonas* sp. KL28 的多组分酚羟基化酶与萘双加氧酶相比, 它不仅可以利用不同的底物合成相同的染料, 同时也能合成新的不同颜色的染料^[27]。

1.3 合成靛蓝类色素工程菌的研究

随着分子生物学和基因工程技术的发展, 人们在筛选自然界存在的能够合成靛蓝的微生物及菌株的同时, 越来越将注意力放在构建和利用“工程菌”来合成靛蓝类色素, 尽管在 19 世纪 80 年代, 微生物靛蓝的合成主要用来作为重组基因表达的指示染料, 很少有研究关注其特异的合成产率及发酵条件的优化。

在大肠杆菌中表达萘双加氧酶, 以葡萄糖为底物合成吡啶则使微生物合成靛蓝类色素向取代化学合成染料更加靠近了一步^[28], 从而也大大推进了其商业化进程。1994 年, Burt 等将定点突变后可以过量表达色氨酸的色氨酸合成酶系和萘双加氧酶导入大肠杆菌, 得到了可以高效的以葡萄糖为前体通过合成色氨酸然后得到吡啶从而合成靛蓝的工程菌^[29]。2002 年, Berry 等将能够提高内源吡啶合成的经过修饰的色氨酸合成途径以及表达萘双加氧酶的的基因导入大肠杆菌, 从而改进了靛蓝合成的发酵过程^[28]。来源于 *Acinetobacter* sp. STRain ST-550 的多组分酚羟基化酶可以催化吡啶合成靛蓝, 并将该基因克隆到耐有机溶剂的大肠杆菌 OST3410 中, 在有机溶剂-水的双相系统中, 疏水的有机溶剂作为毒性底物吡啶的储存库, 减少其在培养基中的浓度, 解决了毒性底物吡啶抑制宿主的瓶颈^[30]。2005 年, Royo 等将双加氧酶基因融合入细菌染色体, 建立级联扩增的表达异源基因的表达环路, 该级联表达体系可以稳定和高效的表达双加氧酶, 持续表达至少 5 天, 可以严格控制和保证靛蓝的稳定生产^[31]。在国内, 吴云 等^[32]将萘质粒(含有 NDO 基因)导入大肠杆菌后获得能够合成靛蓝的转化子; 1998 年, 李晖和吴云^[33]将萘质粒导入能够产生与类胡萝卜素的分枝杆菌(*Mycobacterium* sp.)菌株 Cr-1-2-39 和节杆菌

(*Arthrobacter* sp.)菌株 2-3 中, 获得同时产生类胡萝卜素和靛蓝的转化菌株。我们自己也将会将含有一种黄素蛋白型单加氧酶基因的质粒导入 *E. coli* 的不同菌株中, 获得靛蓝合成量很高的转化子及由此提取的高纯度的靛蓝(图 2; 未发表结果)。

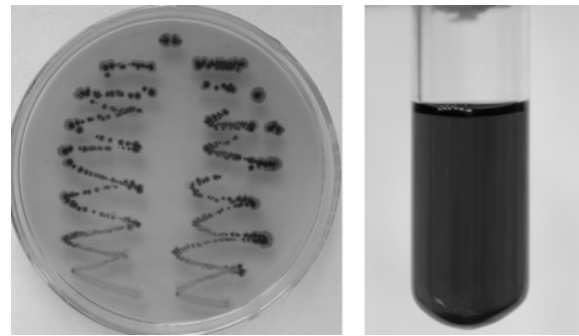


图 2 合成靛蓝能力很强 *E. coli* 转化子(左)及由此直接萃取的高纯度靛蓝(右)

Fig. 2 Recombinant *E. coli* with blue colonies (left) and pure indigo freshly extracted from the blue colonies (right)

2 靛蓝的生物转化

作为靛蓝的同分异构体, 靛玉红在植物和多数微生物合成靛蓝时作为副产物而存在。靛玉红是我国传统药物“芦荟当归丸”和“板蓝根”的有效成分; 是中国科学家在 20 世纪 70 年代中期发现的具有新型结构的抗肿瘤新药, 它对慢粒白血病具有明显的抑制作用且毒副作用小。现在医学研究显示, 靛玉红可以提高 CKD4+CD25+T 细胞的比率, 从而增强受体的免疫力^[34]。

对于以靛蓝为终产物的合成来说, 伴生的靛玉红的存在是很大的麻烦。如果能够将(生物)合成的靛蓝转化成靛玉红对于相关医药行业是非常有利的。Meyer 等(2002 年)在这方面做了有益的探讨, 初步实现了由微生物合成的靛蓝向靛玉红的转化^[25], 尽管这种转化还仅仅停留在定性的基础上。笔者自己优化了 Meyer 等的转化方法, 获得了高纯度的靛玉红(未发表结果)。

总之, 靛蓝及其同类色素的微生物生产的研究和开发已经取得长足的进展, 已经从筛选具有合成靛蓝的野生微生物及其菌株过渡到利用基因工程改造的“工程菌”和蛋白质的定向改造, 并从实验室研究开始进入工业化生产。与传统的植物合成靛蓝相比, 微生物合成具有不受自然环境因素的限制、

效率高、周期快等优点。与化学合成靛蓝类色素相比,微生物合成靛蓝可以降低生产成本、减少能耗,特别是“环境友好”。此外,含有特定加氧酶的微生物合成的靛蓝有可能被转化成具有抗癌作用的靛玉红。由此,具有广阔的开发和应用前景。然而,也应该认识到,微生物合成靛蓝的体系还没有化学合成的体系完整,如何构建和选用合理的加氧酶酶系与高效的工程菌(株),优化发酵参数,简化靛蓝的萃取或提取程序等从而大幅度地降低生产成本和提高生产效益等,仍然有待进一步的研究与开发。此外,现有微生物合成靛蓝或靛蓝的生物转化仍然主要依赖于加氧酶,而加氧酶的稳定性和辅因子再生等也仍然是有待研究的重要问题。尽管随着人们健康意识和环境保护意识的增强,随着分子生物学、基因工程、蛋白质工程、酶工程和发酵工程的技术进步,在不远的将来,靛蓝及其同类色素的微生物合成,即使不能完全替代靛蓝的化学合成,也将成为靛蓝生产的主流。

REFERENCES

- [1] Sandberg G. Indigo Textiles: Technique and History, 1989, London: A & C Black.
- [2] Wu Q. Baeyer and the production of Indigo. *Chemistry*, 2001, **8**: 527–529.
吴祺. 拜耳与靛蓝合成. 化学通报, 2001, **8**: 527–529.
- [3] Gu YG, Lü M, Liu JW. Process wastewater of indigotin production. *Shanghai Chem Ind*, 2001, **16**: 12–14.
顾毓刚, 吕敏, 刘京伟. 靛蓝生产废水治理, 上海化工, 2001, **16**: 12–14.
- [4] Ensley BD, Ratzkin BJ, Osslund TD, et al. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science*, 1983, **222**: 167–169.
- [5] Mermod N, Harayama S, Timmis KN. New route to bacterial production of indigo. *Bio/Technology*, 1986, **4**: 321–324.
- [6] Yen KM, Karl M., Blatt LM, et al. Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 5315–5327.
- [7] O'Connor KE, Dobson ADW, Hartmans S. Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. *Appl and Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4287–4291.
- [8] Moreno-Ruiz E, Hemaiez MJ, Martinez-Perez O, et al. Identification and functional characterization of *Sphingomonas macrogolotabida* Strain TFA genes involved in the first two steps of the tetralin catabolic pathway. *J Bacteriol*, 2003, **185**: 2026–2030.
- [9] Hart S, Koch KR, Woods DR. Identification of indigo-related pigments produced by *Escherichia coli* containing a cloned *Rhodococcus* gene. *J General Microbiol*, 1992, **138**: 211–216.
- [10] Eaton RW, Chapman PJ. Formation of indigo and related compounds from indolecarboxylic acids by aromatic acid-degrading bacteria: chromogenic reactions for cloning genes encoding dioxygenases that act on aromatic acids. *J Bacteriol*, 1995, **177**: 6983–6988.
- [11] Mermod N, Harayama S, Timmis KN. New route to bacterial production of indigo. *Bio/Technology*, 1986, **4**: 321–324.
- [12] Kell H, Saint CM, Williams PA. Gene organization of the first catabolic operon of TOL plasmid pWW53: production of indigo by the xyLA gene product. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 764–770.
- [13] Allen CR, Boyd DR, Larkin MJ, et al. Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038. *Appl and Environ Microbiol*, 1997, **63**: 151–155.
- [14] Hack SC, Jin KK, Eun HC, et al. Yong CK, Jae IK and Si WK. A novel flavin-containing monooxygenase from *Methylophage* sp. strain SK1 and its indigo synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem and Biophys Res Comm*, 2003, **306**: 930–936.
- [15] Murdock D, Ensley BD, Serdar C, et al. Construction of metabolic operons catalyzing the de novo synthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*, 1993, **11**: 381–386.
- [16] Beltrametti F, Marconi AM, Bestitti G, et al. Sequencing and functional analysis of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens* ST. *Appl and Environ Microbiol*, 1997, **63**: 2232–2239.
- [17] Gillam EM, Aguinaldo AM, Notley LM, et al. Formation of indigo by recombinant mammalian cytochrome P450. *Biochem and Biophys Res Comm*, 1999, **265**: 469–472.
- [18] Schwaneberg U, Schmidt-Dannert C., Schmitt J and Schmid RD. A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A. *Analytical Biochem*, 1999, **269**: 359–366.
- [19] Li QS, Schwaneberg U, Fischer P, et al. Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 B M -3 into an indole-hydroxylating catalyst. *Chem Eur J*, 2000, **6**: 1531–1536.
- [20] Li QS, Ogawa J, Schmid RD, et al. Engineering cytochrome P450 BM-3 for oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl and Environ Microbiol*, 2001, **67**: 5735–5740.
- [21] Nakamura K, Martin MV, Guengerich FP. Random mutagenesis of human cytochrome P450 2A6 and screening with indole oxidation products. *Ach Biochem Biophys*, 2001, **395**: 25–31.
- [22] Li HM, Mei LH, Urlacher V, et al. Cytochrome P450BM-3 mutants with improved catalytic properties of

- hydroxylating indole to indigo by error-prone PCR. *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**: 630–635.
- 李红梅, 梅乐和, Urlacher V, 等. 催化吲哚生成靛蓝的细胞色素 P450BM-3 定向进化研究. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**: 630–635.
- [23] Li HM, Mei LH, Urlacher V, et al. Schmid RD. Directed evolution of cytochrome P450BM-3. *Chin J bioprocess eng*(生物加工过程), 2006, **4**: 27–34.
- 李红梅, 梅乐和, Urlacher V, 等. 定向进化细胞色素 P450BM-3 的研究. *生物加工过程*, 2006, **4**: 27–34.
- [24] Lu Y, Mei LH, Sheng Q, et al. Indigo formation from indole by recombinant *E. coli* synthesizing cytochrome P450 BM-3 mutants. *Process in Nat Sci*, 2006, **16**: 1047–1051.
- 陆燕, 梅乐和, 李红梅, 盛清, 等. 重组细胞色素 P450 BM-3 突变酶在大肠杆菌中催化吲哚合成靛蓝. *自然科学进展*, 2006, **16**: 1047–1051.
- [25] Meyer A, Wursten M, Schmid A., et al. Hydroxylation of indole by laboratory evolved 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 34161–34167.
- [26] Kim JY, Lee K, Kim Y, et al. Production of dyestuffs from indole derivatives by naphthalene dioxygenase and toluene dioxygenase. *Lett Appl Microbiol*, 2003, **36**: 343–348.
- [27] Kim JY, Kim JK, Lee SO, et al. Multicomponent phenol hydroxylase-catalysed formation of hydroxyindoles and dyestuffs from indole and its derivatives. *Lett Appl Microbiol*, 2005, **41**: 163–168.
- [28] Berry A, Dodge TC, Pepsin M. Application of metabolic engineering to improve both the production and use of biotech indigo. *J Indust Microbiol and Biotechnol*, 2002, **28**: 127–133.
- [29] Burt DE. Biosynthesis of the textile dye Indigo by a recombinant bacterium. *Internationales Farbensymposium*, 1994, **48**: 491–492.
- [30] Doukyu N, Toyoda K, Aono R. Indigo production by *Escherichia coli* carrying the phenol hydroxylase gene from *Acinetobacter* sp. Strain ST-550 in a water-organic solvent two-phase system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **60**: 720–725.
- [31] Royo JL, Moreno-Ruiz E, Cebolla A et al. Stable long-term indigo production by overexpression of dioxygenase genes using a chromosomal integrated cascade expression circuit, *J Biotechnol*, 2005, **116**: 113–124.
- [32] Wu Y, Zhang SQ, Ma GH, et al. Study on biosynthesis of indigo involving transferring naphthalene plasmid DNA from *Pseudomonas* to *E. coli*. *Acta Genetica Sinica*, 1989, **16**(4): 318–324.
- 吴芸, 张素琴, 马国华, 等. 萘质粒转移到大肠杆菌中合成靛蓝的研究. *遗传学报*, 1989, **16**(4): 318–324.
- [33] Li H, Wu Y. Study on the strain that can synthesize cartenoid and indigo. *Food and ferment ind*, 1998, **24**: 7–10.
- 李晖, 吴云. 产类胡萝卜素又产靛蓝的菌株的研究. *食品与发酵工业*, 1998, **24**: 7–10.
- [34] Zhang AJ, Qu YY, Zhang BJ, et al. The different effects of indirubin on effector and CD4+CD25+ regulatory T cells in mice: potential implication for the treatment of autoimmune diseases. *J Mol Med*, 2007, **85**: 1263–1270.

更正

在本刊第 24 卷第 5 期 844–850 页上刊登的于金龙等作者的文章“大肠杆菌色氨酸生物合成途径关键酶的调控研究”一文需作如下更正:

1. 原中文题目“大肠杆菌色氨酸生物合成途径关键酶的调控”应为“大肠杆菌色氨酸生物合成途径关键酶的调控研究”。
2. 中文摘要中基因“*aroGfbr*”和“*trpEDfbr*”应为“*aroG^{fbr}*”和“*trpED^{fbr}*”。
3. 去掉表 2 中的引物“*trpEf*、*trpEr*、*aroGr* 和 *aroGf*”。

因疏忽而给作者和读者带来不便, 对此我们表示由衷的歉意!

《生物工程学报》编辑部