

Природные и синтетические индигоиды как соединения широкого спектра применения

Е.В. Михайлова, Ю.М. Никоноров, Р.Р. Гарафутдинов, Ал.Х. Баймиев

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского
центра Российской академии наук, Уфа, Российская Федерация,
*E-mail: mikhele@list.ru

Резюме

Сейчас известно, что синий пигмент индиго (точнее его предшественники) содержится у приблизительно 300 видов растений, но основными индигоносами служат лишь несколько видов, среди которых *Indigofera tinctorium*, *Isatis tinctorium*, *Polygonum tinctorium* (*Persikaria tinctoria*), *Strobilanthes cusia* (*Baphicacanthus cusia*). На протяжении нескольких тысячелетий человечество использовало растительный пигмент индиго для окрашивания тканей и раскрашивания людских тел. С развитием цивилизации к ним добавилось применение индиго в народной медицине для лечения различных болезней. Долгие годы индиго добывалось из растительного сырья, но в конце XIX века были разработаны методы химического синтеза этого красителя. В настоящее время природное индиго практически полностью вытеснено крупнотоннажным химическим производством. Около 95% всего синтезируемого красителя расходуется на крашение тканей, в первую очередь денима, идущего для пошива джинсовой одежды. Водорастворимое производное индиго – индигокармин – находит применение в медицине, а также в пищевой промышленности, где с его помощью придают продуктам питания голубую или синюю окраску (пищевая добавка E132). В наступившем тысячелетии, благодаря достижениям биохимии и молекулярной биологии, раскрывшим пути биосинтеза индигоидов в растениях, и клонированным генам ферментов, участвующих в метаболизме индиго, появилась потенциальная возможность использовать индиго в качестве репортерной молекулы при создании трансгенных растений. Стала проявлять интерес к индиго и электронная промышленность.

Ключевые слова: индиго, индигоиды, индиготин, индикан, индоксил, флавин-зависимая монооксигеназа, трансгенные растения, репортерные гены

Цитирование: Михайлова Е.В., Никоноров Ю.М., Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ал.Х. Природные и синтетические индигоиды как соединения широкого спектра применения. *Biomics*. 2025. 17(3). 263-274. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-23

© Авторы, Е.В. Михайлова, Ю.М. Никоноров, Р.Р. Гарафутдинов, Ал.Х. Баймиев, 2025

Natural and synthetic indigoids as compounds of a wide range of applications

E.V. Mikhaylova*, Yu.M. Nikonorov, R.R. Garafutdinov, Al.Kh. Baymiev

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center,
Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

*E-mail: mikhele@list.ru

Resume

It is now known that the blue pigment indigo (in particular, its precursors) is found in about 300 plant species, but only a few species serve as the main sources of indigo, including *Indigofera tinctorium*, *Isatis tinctorium*, *Polygonum tinctorium* (*Persikaria tinctoria*), *Strobilanthes cusia* (*Baphicacanthus cusia*). For several millennia, mankind has been using the plant pigment indigo to dye fabrics and color human bodies. With the development of civilization, indigo also began to be used in traditional medicine to treat various diseases. For many years, indigo was extracted from plant raw materials, but at the end of the 19th century, chemical synthesis of indigo was developed. Nowadays, natural indigo has been almost completely replaced by industrially produced one. About 95% of all synthesized dye is spent on dyeing textile materials, primarily denim, which is used for sewing jeans. The water-soluble indigo derivative, indigocarmine, is employed in medicine, as well as in the food industry as a food additive E132 to give products a cyan or blue color. In the new millennium, due to advances in biochemistry and molecular biology, which revealed the pathways of indigoid biosynthesis in plants and cloned genes of enzymes involved in indigo metabolism, it became possible to use indigo as a reporter molecule in the creation of transgenic plants. The electronics industry also began to show interest in indigo.

Keywords: indigo, indigoids, indigotin, indican, indoxyl, flavin-dependent monooxygenase, transgenic plants, reporter genes

Citation: Mikhaylova E.V., Nikonorov Yu.M., Garafutdinov R.R., Baymiev Al.Kh. Natural and synthetic indigoids as compounds of a wide range of applications. *Biomics*. 2025. 17(3). 263-274. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-23

© **The Authors**, E.V. Mikhaylova, Yu.M. Nikonorov, R.R. Garafutdinov, Al.Kh. Baymiev, 2025

Введение

Индиго – один из древнейших красителей человечества, подтверждением чему служат найденные в Перу окрашенные в синий цвет ткани из хлопка, которым около шести тысяч лет. Источником индиго многие тысячелетия для разных древних цивилизаций служили растения, причем в разных частях Света использовались разные виды. Однако в конце XIX века был разработан химический метод синтеза этого растительного пигмента, ставший вскоре основным способом получения индиго. Причем данный краситель занимает сейчас лидирующие позиции по объему производства среди других красителей, в том числе благодаря его использованию для окрашивания ткани деним, идущей на пошивку популярной джинсовой одежды. Впрочем, синтез этого вещества крайне неэкологичен из-за использования вредного для человека и окружающей среды дитионита натрия $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, применяемого для получения лейкоформы красителя. Разрабатываются биотехнологические пути получения индиго с помощью культивирования некоторых бактерий, в том числе рекомбинантных, но это пока заметно дороже химического синтеза. При этом само индиго безвредно, и поэтому его водорастворимое производное индигокармин используется в качестве разрешенной в большинстве

стран мира¹ пищевой добавки E132, придающей содержащим ее продуктам голубой или синий цвет, а также в качестве лекарственного средства, в том числе издревле - в народной медицине.

В последние годы сфера применения индиго заметно расширяется, и выдвинуты предложения использования данного соединения даже в электронной промышленности. Молекулярная биология и генная инженерия растений также стали проявлять к этому красителю определенный интерес. Поэтому значительное внимание в данной статье будет уделено именно этому направлению исследования и применения индиго. В наступившем столетии вышло несколько обзорных публикаций [Cooksey, 2012; Stasiak et al., 2014; Choi, 2020; Qi-yue et al., 2020; Linke et al., 2023], но в них рассмотрены иные аспекты использования индиго.

Краткая история индиго

Прежде всего стоит коснуться происхождения слова “indigo”. Так, согласно Oxford English Dictionary и конкретно его исторической части, слово “indigo” в английском языке появляется в середине XVI столетия (https://www.oed.com/dictionary/indigo_n?tab=factsheet#699911). Считается, что оно имеет несколько источников происхождения в виде частичного

¹ зарегистрированной также и в России в Межгосударственном стандарте 33293–2015

заимствования из латыни (*indicum*), из итальянского (*endego*) и голландского (*indigo*) языков.

По другой этимологии «индиго» происходит от испанского '*indigo*', через латинский '*indicum*' и от греческого '*indikos*', означающего «индийский». В любом случае это слово связано с Индией, откуда в те годы привозили разные колониальные товары, среди которых важную часть занимал синий краситель, добываемый в тех краях в большем количестве. Индиго из практически одомашненной там индигоферы красильной было намного более высокого качества, чем получаемое из европейского сырья (вайды красильной).

Однако нельзя обойти вниманием и такое средиземноморское название индиго как «техелет» (на иврите - תַּחְלֵת [*təḫēlet*], англ. - *tekhelet*), упоминание которого встречается в Ветхом Завете (согласно Википедии) множество раз, поскольку этот «сине-фиолетовый», «синий» или «бирюзовый» краситель² тогда был в той местности очень дорогим, и использовался для окраски одежды первосвященников.

Безусловно, такой важный природный продукт, ныне известный как индиго, должен был иметь свои названия на разных территориях, тем более, что о нем знали очень давно. Так, при раскопках кургана на севере Перу были обнаружены доказательства на сегодняшний день самого раннего использования индиго для окрашивания тканей из хлопка, возраст которых составляет 6000 лет [Splitstoser et al., 2016]. Проведенный анализ состава красителя показал наличие в нем как индигоина, так и индирубина, но при этом источник их получения остался неизвестен, хотя было высказано предположение, что, скорее всего, это было бобовое растение *Indigofera spp.*, произрастающее в тех краях. До этого самое древнее (4000 лет) применение индиго для окрашивания тканей было отмечено в Египте. Найденный в Европе и Китае окрашенный индиго текстиль имел возраст 3500 и 3400 лет соответственно, а первое письменное упоминание индиго на санскрите в Индии датируется 2600 годами до нашей эры, т.е. ему около 4600 лет [Li et al. 2019]. На всех этих территориях для получения синего красителя использовались различные виды растений, которые будут рассмотрены ниже. При этом заметим,

² другой, еще более дорогостоящий средиземноморский красно-фиолетовый краситель того времени, представляющий собой бромированное производное индиго (6,6'-диброминдиго) и получивший название «Тирский, или королевский пурпур», добываемый из брюхоногих моллюсков семейств Muricidae и Thaisidae, здесь оставляем без внимания.

что все они потеряли хозяйственное значение после разработки эффективного синтеза индиго химическим путем и начала его промышленного производства в 1897 г. Уже в начале XX века синтетический индиго практически полностью вытеснил природный краситель растительного происхождения. Однако сейчас интерес к натуральному индиго в связи с ростом популярности народной медицины опять появляется.

Индиго как химическое соединение

Индиго, или индиготин, это тривиальные названия химического соединения [2(2')*E*]-[2,2'-дииндолилиден]-3,3'(1*H*,1'*H*)-диона, или иначе 2,2'-бис(2,3-дигидро-3-оксоиндолилидена). Химическая брутто-формула индиго - C₁₆H₁₀N₂O₂, молекулярная масса 262,27 Дальтон. Из структурной формулы индиго (рис. 1) видно, что данное вещество является производным индоксила, о котором ниже речь будет идти отдельно.

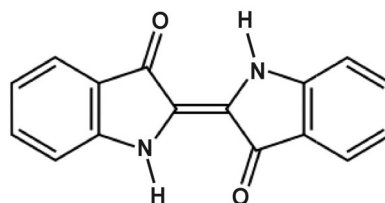


Рис. 1. Структурная формула индиго
Fig. 1. The structural formula of indigo

Индиго представляет собой кристаллы темно-синего цвета с медным отливом, имеющие плотность 1,199 г/см³ и температуру плавления 390 - 392°C, малорастворимые в большинстве органических растворителей и почти нерастворимые в воде. При сульфировании индиго получается водорастворимый индигокармин - динатриевая соль индиго-5,5'-дисульфокислоты (рис. 2). Его химическая брутто-формула - C₁₆H₈N₂Na₂O₈S₂ и молекулярный вес - 466,36 Дальтон.

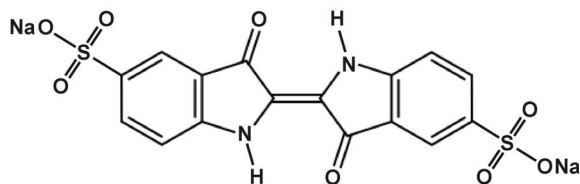


Рис. 2. Структурная формула индигокармина
Fig. 2. The structural formula of indigocarmine

Индиго характеризуется высокой фотостабильностью благодаря тому, что не происходит фотоиндуцируемого перекручивания

центральной С=С связи и цис-транс-изомеризации, чему способствуют и внутримолекулярные водородные связи. Фотостабильность индиго служит причиной его потенциального использования в электронной промышленности. Хотя индиго как краситель не выцветает, он оказывается неустойчив к истиранию, вследствие чего окрашенные им джинсовые изделия приобретают при носке характерные потертости, делающие такую одежду фактически персонафицированной.

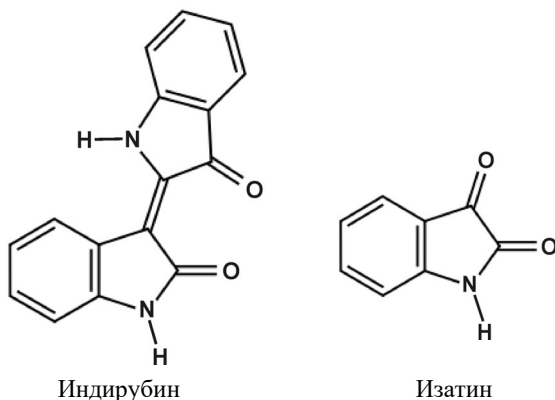


Рис. 3. Структурные формулы некоторых природных индигоидов

Fig. 3. Structural formulas of some natural indigoids

Разнообразие предшественников этого вещества - природных индигоидов, не говоря уже о синтетических аналогах, заметно больше, чему посвящен соответствующий раздел статьи.

Растения – продуценты индигоидов

Известно около 300 видов растений, в которых с разной степенью эффективности происходит синтез индигоидных пигментов. Здесь нужно заметить, что непосредственно водонерастворимый индиго в растениях не образуется, а происходит синтез его водорастворимых предшественников. Само индиго образуется за счет димеризации индоксилы, происходящей под действием кислорода воздуха. При этом признанными источниками этих растительных соединений служит небольшое количество видов, относящихся в основном к классу двудольных. Только одно растение *Phaius flavus* из семейства Orchidaceae класса однодольных продуцирует предшественники индиго в значимых количествах. Из класса двудольных кроме уже упоминавшейся индигоферы красильной *Indigofera tinctorium*, (Fabaceae) следует упомянуть родственные ей виды *In.arrecta*, *In.suffruticosa*, вайду красильную *Isatis tinctorium*. *Is.indigotica* (Brassicaceae), горец красильный *Polygonum*

*tinctorium*³ (Polygonaceae), *Strobilanthes cusia* (Acanthaceae), *Wrightia laevis* (Apocynaceae), *Marsdenia tinctoria* (Asclepiadaceae). Наиболее широко индигофера использовалась в Америке и Индии, вайда – в Европе, горец – в Японии, стробилант – в Китае. Разумеется, столь строгого деления по странам нет, и все зависит от того к какому поясу произрастания то или иное растение относится и соответственно какими климатическими условиями эти территории характеризуются. При этом всем этим растениям присущи разные соотношения индигоидов в виде синего индигоина, красноватого индирубина, оранжеватого изатина и прочих родственных соединений, определяющих оттенки экстрагируемых пигментов.

Хотя в массовых количествах эти растительные пигменты использовались в прошлом, тем не менее, как уже говорилось выше, интерес к индигоидам из растений окончательно не пропал. В недавних статьях проводилось сравнение способов экстракции их из растений-индигоносков разных видов [Lopes et al., 2021; Hartl et al., 2024]. Также разрабатываются биотехнологические способы получения индиго из растений с использованием, в частности, культуры так называемых волосовидных корней (hairly roots), что продемонстрировано для вайды красильной [Jiao et al., 2018], и стробиланта [Devi et al., 2024]. В одной из работ волосовидные корни *Is.indigotica* были трансформированы геном енолпирувиллицимат синтазы из другого индигоноса *Baphicacanthus cusia*⁴ [Yu et al., 2019]. Недавно для четырех видов вайды *Is.tinctoria*, *Is.constricta*, *Is.ermenekensis* и *Is.floribunda* было показано увеличение синтеза индигоина и индирубина в корнях под действием перекиси водорода [Albayrak et al., 2025].

Растущий интерес к растениям, продуцирующим индигоиды, подтверждается работами, в которых сообщается о секвенировании и сборке ядерного генома некоторых из них на уровне хромосом. Так, для *Strobilanthes cusia* секвенирован несущий 32148 белок-кодирующих генов ядерный геном размером около 865 млн.п.н., распределенных по 16 хромосомам [Xu et al., 2020]. Полный ядерный геном секвенирован и для *Persicaria tinctoria* [Li et al., 2024]. Данный вид является тетраплоидом, и размер 10 хромосом его субгенома А был определен равным 888,67 млн.п.н., а субгенома В – 771,58 млн.п.н., при этом размеры хромосом у этих субгеномов варьировали от 72,84 до 100,28 млн.п.н. у субгенома А и от 67,43 до 85,56 млн.п.н. у субгенома В. Предсказанное число кодирующих белки генов для всего генома *P. tinctoria* составило 76742. Однако это

3 нынешнее название *Persicaria tinctoria*

4 иное название *Strobilanthes cusia*

не самый верхний уровень сборки ядерного генома высших организмов, поскольку таковые остаются, по сути, квазигеномами, а для лучшего понимания особенностей метаболизма, в том числе индигоидного, необходимо секвенировать и собирать геномы в фазированном виде по гаплотипам в формате T2T (от теломеры до теломеры), где все аллели генов из парных хромосом становятся ясны, и чему мы недавно уделили значительное внимание, собрав информацию о почти полутора сотнях видов растений, для которых установлены их диплоидные геномы [Baumiev et al., 2025].

Химический синтез индиго

С увеличением потребности в индиго в первую очередь для ткацкой промышленности природного красителя стало не хватать, и ему на смену пришел химический синтез, впервые осуществленный в 1870 г. немецким химиком – будущим Лауреатом Нобелевской премии по химии 1905 г. А. фон Байером. Премия была ему присуждена, в том числе за синтез и исследования индиго. Сначала в качестве молекулы-предшественника Байер использовал природный изатин, в дальнейшем после выяснения им в 1883 г. структурной формулы индиго он и его последователи использовали также другие предшественники. Так, на протяжении 100 с лишним лет исходными соединениями при синтезе индиго служили коричная кислота, анилин, орто-аминобензойная кислота, фенилглицин и другие соединения. В 1897 г. немецкой фирмой BASF началось промышленное производство индиго на основе запатентованной разработки швейцарского химика К. Neumann, которое быстро потеснило с рынка натуральный индиго. В настоящее время в мире синтезируется более 80 тысяч тонн индиго, а также около 20 тысяч тонн индигокармина, и их производство относится к крупнотоннажным.

Биотехнологические (бактериальные) способы получения индиго

Помимо растений и химического синтеза индиго, еще одним источником этого соединения являются микроорганизмы. Так, еще в 1928 г. была впервые найдена и охарактеризована почвенная бактерия *Pseudomonas indoloxidans*, продуцирующая индигоидин из индола [Gray, 1928]. За неполное столетие с того времени найдено немало бактерий, вырабатывающих индигоиды. Эти микроорганизмы принадлежат разным родам и используют различные метаболические пути биосинтеза индиго, что нашло отражение в ряде обзоров [Fabara, Fraaije, 2020; Chandel et al., 2024]. Упомянем из них лишь некоторые бактерии: *Pseudomonas putida*,

P. mendocina, *Comamonas sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Rhodococcus opacus*, *Bacillus megaterium*. Ключевыми ферментами, обеспечивающие наработку индиго в этих микроорганизмах, служат различные оксигеназы: гем-содержащие оксигеназы, цитохром P450 монооксигеназы, пероксигеназы, флаavin-зависимые монооксигеназы, а также некоторые другие ферменты. При этом ведутся работы по увеличению выхода индиго в бактериях. В частности сообщено об оптимизации наработки индиго в штамме *Pseudomonas monteilii* QM, использующем диоксигеназный путь метаболизма при синтезе этого соединения, что позволило авторам считать эту бактерию потенциальным кандидатом для промышленного получения индиго [Qu et al., 2012]. Причем ими же был секвенирован полный геном этой бактерии, как индиго-продуцирующего штамма [Ma et al., 2012].

Отдельный интерес представляют работы по получению индиго с использованием рекомбинантной технологии и кишечной палочки *Escherichia coli* в качестве бактерии-продуцента. Так, сообщалось об использовании двойной культуры *E. coli* в виде двух комплементирующих штаммов; в одном из них был увеличен синтез триптофана как дальнего предшественника индиго, а другой штамм характеризовался увеличенным синтезом флаavin-зависимой монооксигеназы, ведущей к образованию индоксила, из которого индиго образуется под действием кислорода воздуха [Chen et al., 2021]. Ранее рекомбинантный штамм *E. coli* с геном флаavin-зависимой монооксигеназы из *Methylophaga sp.* показал накопление индиго в культуральной среде [Choi et al., 2003]. В другой статье описывается создание штамма *E. coli*, несущего ген монооксигеназы из бактерии *Acinetobacter radioresistens*, что привело к наработке в культуральной среде индиго [Catucci et al., 2022]. Использованию флаavin-зависимых монооксигеназ из разных бактерий в *E. coli* для биосинтеза индиго недавно посвящен специальный обзор [Fan et al., 2024].

С помощью терпеноидной циклазы в рекомбинантной *E. coli* удалось значительно повысить выход индиго и индирубина [Yin et al., 2021]. Внедрив в рекомбинантный штамм *E. coli* сразу 8 различных генов, был фактически создан новый путь биосинтеза индиго из глюкозы [Pham et al., 2024]. Путем дополнительного внесения гена UDP-гликозилтрансферазы в рекомбинантный штамм *E. coli*, уже несущий ферменты для синтеза индоксила (триптофаназу и флаavin-зависимую монооксигеназу), была создана новая система продукции индиго с помощью контроля концентрации глюкозы [Kim et al.,

2025]. Описан способ получения в рекомбинантном штамме *E.coli* с добавлением гена флавин-зависимой монооксигеназы экологически чистого био-индиго в количестве до 2 г/л культуральной среды [Manivannan et al., 2025].

Но не только внедрение бактериальных генов в *E.coli* приводит к биосинтезу индиго. Так, недавно было показано, что ген цитохрома P450 (CYP71B102) из вайды красильной *Isatis tinctoria*, внедренный в *E.coli*, привел в этом рекомбинантном штамме к наработке индиго, индирубина, изатина и 2-оксиндола [Sagwan-Barkdoll et al., 2025].

Смогут ли подобные биотехнологические способы получения индиго по экономичности конкурировать с химическим синтезом в будущем? Вряд ли. Но свою нишу в виде производства био-индиго занять, возможно, смогут.

Основные (и не только) предназначения индиго

Сейчас для окраски различных тканей, в том числе джинсового денима, расходуется около 95% всего синтезируемого индиго, включая различные его аналоги, среди которых с 1956 г. фигурируют и фотохромные производные [Kaplan et al., 2024]. Говоря о джинсах нельзя не коснуться того факта, что индиго является сильным ингибитором ДНК полимеразы при проведении ПЦР, затрудняя анализ оставленных на джинсовых изделиях различных биологических следов (кровь, сперма, потожировые выделения) при расследовании преступлений, в частности при выявлении полиморфизма STR-локусов для ДНК-идентификации личности [Larkin, Harbison, 1999].

Как уже говорилось выше, некоторая часть индиго в виде пищевой добавки E132 идет на придание голубого или синего цвета различным продуктам питания, а также внешним оболочкам лекарств, выпускаемых в таблетированной форме. Синтезированный в 1903 г. водорастворимый индигокармин используется и в медицинских исследованиях, в частности при исследовании работы почек.

В китайской⁵ народной медицине натуральный индиго “indigo naturalis” известен с давних времен и применяется для лечения широкого круга заболеваний. Так, в одном из обзоров китайских авторов упоминается, что био-индиго помогает при лейкемии, псориазе, язвенном колите, имеет антибактериальные, противовирусные, иммуномодуляторные и антиоксидантные свойства [Qi-yue et al., 2020]. Ранее было показано противораковое и антиоксидантное действие экстракта из *Polygonum tinctorium* [Neo et al., 2014].

В ряде работ производное индиго в виде 3-индоксилфосфата использовалось как составная часть геносенсора, чувствительного к неспариванию единичных нуклеотидов при гибридизации цепей ДНК исследуемых образцов⁶ с гибридизационными олигонуклеотидными зондами, меченными биотином, что позволяло использовать ферментный комплекс в виде конъюгата стрептавидина и щелочной фосфатазы, в котором последняя отщепляла фосфатную группу от индоксилфосфата и образовывался водонерастворимый окрашенный индиго [Abad-Valle et al., 2005; 2007; Díaz-González et al., 2008].

Другая группа авторов использовала для анализа нуклеотидных последовательностей некоторых ПЦР ампликонов более сложное производное индиго в виде 5-бромо-4-хлоро-3-индолилфосфата, в котором также через биотин-стрептавидиновую систему с конъюгированной щелочной фосфатазой происходило удаление фосфатной группы и становящийся нерастворимым индиго оседал на детекторах, а его количественная детекция велась импедансной спектроскопией или с помощью частоты колебаний кварцевого резонатора (датчика микровесов), зависящей от массы вещества, нанесенного на его поверхность [Willner et al., 2002; Patolsky et al., 2003].

Некоторый интерес представляет изучение взаимодействия индигокармина с ДНК в присутствии интеркалирующего флуоресцентного красителя бромида этидия, что проводилось с помощью спектроскопии, флуоресценции и кругового дихроизма, в сочетании с измерениями вязкости и исследованиями плавления ДНК [Ma et al., 2012]. В частности в присутствии индиго произошло повышение температуры плавления ДНК, увеличилась вязкость раствора, что говорит о том, что гидрофобные взаимодействия и водородные связи играли преобладающую роль в связывании индигокармина с ДНК.

Недавно сообщено, что индигокармин проявляет селективную инактивацию некоторых бактериофагов (P001, T4, T1, T7, λ), связываясь с их двухцепочечной ДНК [Raza et al., 2025]. При этом с одноцепочечной ДНК и РНК индигокармин не связывался. Авторы сделали вывод, что индигокармин может использоваться как антифаговое средство для промышленного применения.

Потенциально индиго и индигокармин могут использоваться даже в электронной промышленности. Так, в ряде публикаций, одна из которых подготовлена с участием россиян, рассматриваются

⁵ Впрочем, не только в китайской

⁶ в качестве таковых использовались в частности образцы, содержащие коронавирус SARS (2003 года появления), а также велись модельные эксперименты

вопросы изготовления транзисторов на основе производных индиго для так называемой органической электроники [Irimia-Vladu et al., 2012; Głowacki et al., 2013; 2013a]. На основе производного индиго (изоиндиго) показана возможность создания амбиполярного транзистора, способного переносить как дырки, так и электроны [Ashizawa et al., 2016].

Ранее японскими авторами был изготовлен прототип перезаряжаемой литиевой батареи, в которой индигокармин был использован в качестве электрода для положительного заряда, показавшего хорошую стабильность жизненного цикла [Yao et al., 2010]. Имеются предложения использовать получаемый из индигоферы индиго в третьем поколении солнечных батарей, сенсифицируемых органическими красителями [Rajan, Cindrella, 2019]. С использованием синтетического индиго велась разработка энергонезависимого запоминающего устройства типа WORM, содержащего слой индиго толщиной в 100 нм [Wang et al., 2017].

Используется индиго и более тривиально - как красящий синий пигмент в чернилах, акварельных красках, при татуировках, а также для раскрашивания людских тел, что сейчас весьма популярно в некоторых странах, а раньше было распространено еще шире.

В целом глобальный рынок индиго для всех сфер его применения в 2024 г. составил 1,9 млрд. долларов США, а к 2030 прогнозируется рост до 2,51 млрд. (<https://www.researchandmarkets.com/report/indigo-dyes>).

Репортерное значение индиго в генной инженерии

В генной инженерии важное значение иногда имеет быстрое получение информации о произведенной трансформации, для чего в векторы помимо селективных генов добавляют репортерные гены.

Для растений классическими репортерными генами можно считать гены флуоресцентных белков (*GFP*, *YFP*, *mCherry* и др.), проявляющих себя в виде зеленой, желтой, красной флуоресценции; ген *GUS*, кодирующий β-глюкуронидазу, гидролизующую субстрат X-gluc с появлением синей окраски; ген люциферазы, приводящий к биолюминесценции; ген *RUBY*, ведущий к появлению в растении беталаина, имеющего свекольную окраску. Помимо этих репортерных генов для трансгенных растений, имеется еще ряд других, используемых несколько реже. Однако ни тех, ни других здесь касаться не будем, поскольку имеется на этот счет немало обзорных публикаций последних лет с подробными описаниями всевозможных репортерных генов для трансгенных растений [Súnico et al., 2024; Khan, Polturak, 2025; Wang et al., 2025].

Пожалуй, стоит все же вспомнить старую работу⁷, в которой в качестве репортерного был предложен ген сладкого белка тауматина и предлагалось оценивать произведенный трансгенез растений на вкус (органолептически), в том числе в полевых условиях без использования какого-либо оборудования [Witty, 1989; 1992].

Возвращаясь к теме данной статьи, следует заметить, что в случае использования при трансгенезе соответствующих репортерных генов, приводящих к появлению в клетках растений некоторых соединений - предшественников индиго, возникающее окрашивание станет заметно бесприборным способом, поскольку потребуются лишь легкое механическое повреждение тканей. В результате содержащее вакуолей (с молекулами предшественниками) смешается с содержащим хлоропластов (в которых имеется необходимый фермент), после чего под действием кислорода воздуха образуется синий пигмент индиго.

Подобные работы пока не опубликованы, но, по всей видимости, уже ведутся. Однако прежде чем переходить к их рассмотрению, необходимо описать пути метаболизма, приводящие в растениях индигоносах на пути к индиго. Причем, эти метаболические пути несколько отличаются от бактериальных.

Итак, биосинтез индиго в растениях начинается с аминокислоты триптофана, которая под действием фермента триптофаназы превращается в индол, который является предшественником для всевозможных вторичных метаболитов растений, включая фитогормоны. Например, из него образуется хорошо известная индолилуксусная кислота. Далее индол под действием фермента флавин-зависимой монооксигеназы превращается в высокорекреационный и токсичный для растений индоксил, который в присутствии UDP-глюкозы и фермента UDP-глюкозилтрансферазы очень быстро превращается в бесцветный индикан (индоксил-β-D-глюкозид или иначе β-D-глюкозид 3-гидрооксииндола), складирующийся в вакуолях. При механическом повреждении растительных тканей происходит слияние содержимого вакуолей и хлоропластов, содержащих фермент β-глюкозидазу, которая отщепляет углеводный компонент индикана, в свою очередь опять превращается в индоксил, который уже в присутствии кислорода воздуха димеризуется с образованием водонерастворимого пигмента индиго. Таков вкратце путь метаболизма от триптофана к предшественникам индиго в растениях и к самому индиго уже за пределами живых клеток, изображенный на рис. 4.

⁷ не упоминаемую в тех обзорных публикациях

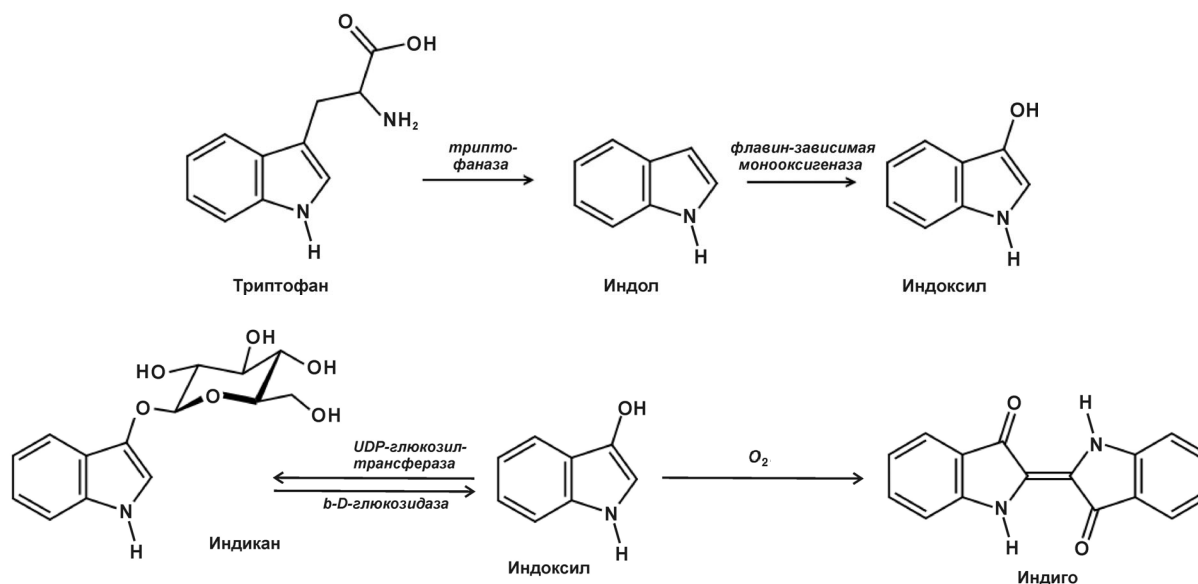


Рис. 4. Биосинтез предшественников индиго в растениях и образование индиго путем димеризации индоксила.
Fig. 4. Biosynthesis of indigo precursors in plants and formation of indigo by dimerization of indoxyl.

За последние десятилетия выполнено немало работ, направленных на поиск и выделение ферментов вышеописанного метаболического пути, клонирования их генов и получения с ними неких продуцентов индиго. Причем большое количество исследований выполнено одной группой японских авторов. Так, в 1997 г. было обнаружено, что у индигоноса *Polygonum tinctorium* фермент β-глюкозидаза локализуется в хлоропластах [Minami et al., 1997]. Спустя пару лет из данного растения теми же авторами был клонирован ген этого фермента [Minami et al., 1999]. В следующем году они охарактеризовали у того же растения фермент UDP-глюкозо:индоксил глюкозилтрансферазу (индоксил глюкозилсинтазу), назвав его индикансинтазой [Minami et al., 2000]. Впоследствии ими было продолжено изучение этого фермента [Inoue et al., 2018], а также аналогичного фермента у другого индигоноса – *Indigofera tinctorium* [Inoue et al., 2017]. А еще ранее эти же авторы провели секвенирование транскриптомов у этих двух видов индигоносов *Indigofera tinctorium* и *Polygonum tinctorium* для обнаружения генов биосинтеза индиго [Sarangi et al., 2015]. Также с той же целью были секвенированы транскриптомы у *Isatis indigotica* [Chen et al., 2013; Tang et al., 2014], *Baphicacanthus cusia* [Lin et al., 2018], *Polygonum tinctorium* [Hsu et al., 2018] и *Phaius flavus* [Zhang et al., 2022].

Позднее все теми же японскими авторами из *Polygonum tinctorium* был клонирован ген флавин-

зависимой монооксигеназы, причем было показано, что когда этот ген экспрессировался в *E.coli*, то присутствие в культуральной среде триптофана приводило к образованию индиго [Inoue et al., 2021]. Коэкспрессия в *E.coli* данного гена вместе с геном индоксил β-D-глюкозилсинтазы тоже приводила к образованию индиго, из чего авторы сделали вывод, что эти ферменты работают последовательно.

Уже достаточно давно выполнена работа, в которой были созданы трансгенные растения табака и соответствующая суспензионная культура из трансформированных клеток, в которые был внедрен ген флавин-зависимой монооксигеназы 2A6 цитохрома P450 человека (CYP2A6) в результате чего добавление в среду индола приводило к образованию бесцветного индикана [Warzecha et al., 2007]. Созданные генно-инженерные растения табака накапливали индикан, но не приобретали синего цвета, поскольку не хватало этапа разрушения клеток и контакта с хлоропластным ферментом β-D-глюкозидазой.

Безусловно, многие растительные ферменты высокоспецифичны, однако некоторым семействам свойственны и взаимодействия с близкими субстратами, так что можно ожидать от трансгенных растений с внедренным в них геном флавин-зависимой монооксидазы не из человека, а из какого-нибудь индигоноса, что остальные ферменты метаболического пути биосинтеза индоксила и в

конечном счете индиго в таком растении работают должным образом.

Заключение

Человечество знакомо с растительным пигментом индиго с незапамятных времен. На протяжении многих тысячелетий он использовался для окрашивания различных тканей, а также нанесения рисунков на кожу человека. В конце позапрошлого столетия началось промышленное производство индиго с помощью химического синтеза, поскольку резко возрос масштаб применения индиго, в результате чего для изготовления джинсовой одежды растительного сырья стало не хватать. В наступившем новом тысячелетии сфера применения индиго постепенно расширяется, в том числе и во многом благодаря достижениям биохимии и молекулярной биологии, поскольку для предшественников индиго в растениях-индигоносах, а также в некоторых бактериях благодаря этим наукам стали известны метаболические пути биосинтеза, включая принимающие в этом участие ферменты, гены которых были в дальнейшем клонированы.

Генная инженерия растений среди своих задач может выдвигать условия быстрого установления произошедшего трансгенеза, для чего предложено использование при создании трансгенных растений так называемых репортерных генов, которых уже известно немало. Среди них большая часть требует использование определенных приборов, в том числе дорогостоящих, для детекции их проявления. Потенциально репортером, экспрессия которого видна невооруженным взглядом, может стать ген флавин-зависимой монооксигеназы из какого-либо растения-индигоноса, например из *Polygonum tinctorium*, кДНК которой имеет размер 1548 п.н. [Inoue et al., 2021]. В трансформированном растении из имеющегося в его клетках аминокислоты триптофана через ряд стадий, осуществляемых с помощью стандартных ферментов и целых их семейств, в том числе характеризующихся не столь высокоспецифичным действием, будет образовываться и накапливаться в вакуолях бесцветный индикан (индоксил-β-D-глюкозид). Под действием содержащейся в хлоропластах β-глюкозидазы после легкого механического разрушения клеток он будет лишен своей углеводной части, а после димеризации образовавшегося в присутствии кислорода воздуха индоксила превратится в индиго, перестанет быть водорастворимым и приобретет синюю окраску, которую и можно будет наблюдать как подтверждение произошедшего трансгенеза.

Безусловно, подобный репортерный ген флавин-зависимой монооксигеназы из подходящего

индигоноса не будет сигнализировать о произведенном трансгенезе для других растений-индигоносов. Аналогично, такой репортер как бетаалаин также не работает с растениями, в которых это соединение изначально имеется.

Помимо классического применения индиго и его производных для окрашивания тканей и прочих задач, эксплуатирующих синий цвет этих соединений, включая использование в пищевой и фармацевтической промышленности, а также в медицине, в последние десятилетия к индиго и его производным возникает интерес и у электронной промышленности в силу некоторых важных особенностей этих молекул.

Литература / References

1. Abad-Valle P, Fernández-Abedul MT, Costa-García A. Genosensor on gold films with enzymatic electrochemical detection of a SARS virus sequence. *Biosens Bioelectron.* 2005. 20(11). 2251-2260. doi: 10.1016/j.bios.2004.10.019
2. Abad-Valle P, Fernández-Abedul MT, Costa-García A. DNA single-base mismatch study with an electrochemical enzymatic genosensor. *Biosens Bioelectron.* 2007. 22(8). 1642-1650. doi: 10.1016/j.bios.2006.07.015
3. Albayrak İ, Cessur A, Demirci T et al. Enhancement of indigotin and indirubin production in root cultures of *Isatis species* by H₂O₂: biochemical and molecular responses. *Sci Rep.* 2025. 15(1). 33637. doi: 10.1038/s41598-025-10242-4
4. Ashizawa M, Masuda N, Higashino T et al. Ambipolar organic transistors based on isoindigo derivatives. *Organic Electronics.* 2016. 35. 95-100. doi: 10.1016/j.orgel.2016.05.013
5. Baymiev AIKh, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR et al. In higher plants as an example, one can see that the era of sequencing of their diploid genomes is coming. *Biomics.* 2025. V.17(1). P. 17 – 41. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-3
6. Catucci G, Turella S, Cheropkina H et al. Green production of indigo and indirubin by an engineered Baeyer–Villiger monooxygenase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 2022. 44. 102458. doi: 10.1016/j.bcab.2022.102458
7. Chandel N, Singh BB, Dureja C et al. Indigo production goes green: a review on opportunities and challenges of fermentative production. *World J Microbiol Biotechnol.* 2024. 40(2). 62. doi: 10.1007/s11274-023-03871-2
8. Chen J, Dong X, Li Q et al. Biosynthesis of the active compounds of *Isatis indigotica* based on transcriptome sequencing and metabolites profiling. *BMC Genomics.* 2013. 14. 857. doi: 10.1186/1471-2164-14-857

9. Chen T, Wang X, Zhuang L et al. Development and optimization of a microbial co-culture system for heterologous indigo biosynthesis. *Microb Cell Fact*. 2021. 20(1). 154. doi: 10.1186/s12934-021-01636-w
10. Choi K-Y. A review of recent progress in the synthesis of bio-indigoids and their biologically assisted end-use applications. *Dyes and Pigments*. 2020. 181. 108570. doi: 10.1016/j.dyepig.2020.108570
11. Choi HS, Kim JK, Cho EH et al. A novel flavin-containing monooxygenase from *Methylophaga* sp strain SK1 and its indigo synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003. 306(4). 930-936. doi: 10.1016/s0006-291x(03)01087-8
12. Cooksey CJ. An annotated bibliography of recent significant publications on indigo and related compounds. *Biotech Histochem*. 2012. 87(7). 439-463. doi: 10.3109/10520295.2012.698308
13. Devi RL, Devi ST, Sanatombi K. Hairy root culture of *Strobilanthes cusia* for the production and enhancement of indigo biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2024. 157. 62. doi: 10.1007/s11240-024-02791-9
14. Díaz-González M, de la Escosura-Muñiz A, González-García MB et al. DNA hybridization biosensors using polylysine modified SPCEs. *Biosens Bioelectron*. 2008. 23(9). 1340-1346. doi: 10.1016/j.bios.2007.12.001
15. Fan C, Xie Z, Zheng D et al. Overview of indigo biosynthesis by Flavin-containing Monooxygenases: History, industrialization challenges, and strategies. *Biotechnol Adv*. 2024. 73. 108374. doi: 10.1016/j.biotechadv.2024.108374
16. Głowacki ED, Voss G, Demirak K et al. A facile protection–deprotection route for obtaining indigo pigments as thin films and their applications in organic bulk heterojunctions. *Chem. Commun*. 2013a. 49(54). 6063-6065. doi: 10.1039/C3CC42889C
17. Głowacki ED, Voss G, Sariciftci NS. 25th anniversary article: progress in chemistry and applications of functional indigos for organic electronics. *Adv Mater*. 2013. 25(47). 6783-6800. doi: 10.1002/adma.201302652
18. Gray PMM. The formation of indigotin from indole by soil bacteria. *Proc Roy Soc Lond Ser B*. 1928. 102. 263–280. doi: 10.1098/rspb.1928.0003
19. Hartl A, Polleichtner A, Novak J. "Purplish Blue" or "Greenish Grey"? Indigo Qualities and Extraction Yields from Six Species. *Plants (Basel)*. 2024. 13(7). 918. doi: 10.3390/plants13070918
20. Heo B-G, Park Y-J, Park Y-S et al. Anticancer and antioxidant effects of extracts from different parts of indigo plant. *Industrial Crops and Products*. 2014. 56. 9-16. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.02.023
21. Hsu TM, Welner DH, Russ ZN et al. Employing a biochemical protecting group for a sustainable indigo dyeing strategy. *Nat Chem Biol*. 2018. 14(3). 256-261. doi: 10.1038/nchembio.2552
22. Inoue S, Morita R, Kuwata K et al. Tissue-specific and intracellular localization of indican synthase from *Polygonum tinctorium*. *Plant Physiol Biochem*. 2018. 132. 138-144. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.08.034
23. Inoue S, Morita R, Minami Y. An indigo-producing plant, *Polygonum tinctorium*, possesses a flavin-containing monooxygenase capable of oxidizing indole. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021. 534. 199-205. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.11.112
24. Inoue S, Moriya T, Morita R et al. Characterization of UDP-glucosyltransferase from *Indigofera tinctoria*. *Plant Physiol Biochem*. 2017. 121. 226-233. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.11.002
25. Irimia-Vladu M, Głowacki ED, Troshin PA et al. Indigo—a natural pigment for high performance ambipolar organic field effect transistors and circuits. *Adv Mater*. 2012. 24(3). 375-80. doi: 10.1002/adma.201102619
26. Jiao J, Gai QY, Yao LP et al. Ultraviolet radiation for flavonoid augmentation in *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures mediated by oxidative stress and biosynthetic gene expression. *Ind Crops Prod*. 2018. 118. 347-354. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.03.046
27. Kaplan G, Seferoğlu Z, Berdnikova DV. Photochromic derivatives of indigo: historical overview of development, challenges and applications. *Beilstein J Org Chem*. 2024. 20. 228-242. doi: 10.3762/bjoc.20.23
28. Khan MI, Polturak G. Biotechnological production and emerging applications of betalains: A review. *Biotechnol Adv*. 2025. 81. 108576. doi: 10.1016/j.biotechadv.2025.108576
29. Kim HJ, Lee Y, Shin Y et al. Finding of the positive impact of glucose on the production of indican over indigo in engineered *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2024. 52. kuae048. doi: 10.1093/jimb/kuae048
30. Langer P. N-Glycosides of indigo, indirubin, and isoindigo: blue, red, and yellow sugars and their cancerostatic activity. *Beilstein J Org Chem*. 2024. 20. 2840-2869. doi: 10.3762/bjoc.20.240
31. Larkin A, Harbison S. An improved method for STR analysis of bloodstained denim. *Int J Legal Med*. 1999. 112(6). 388-390. doi: 10.1007/s004140050020
32. Li Q, Huang H, Fan R et al. Chromosome-level genome assembly of the tetraploid medicinal and natural dye plant *Persicaria tinctoria*. *Sci Data*. 2024. 11(1). 1440. doi: 10.1038/s41597-024-04317-6
33. Li S, Cunningham AB, Fan R et al. Identity blues: the ethnobotany of the indigo dyeing by Landian Yao (Iu Mien) in Yunnan, Southwest China. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2019. 15(1). 13. doi: 10.1186/s13002-019-0289-0

34. Lin W, Huang W, Ning S et al. *De novo* characterization of the *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek transcriptome and analysis of candidate genes involved in indican biosynthesis and metabolism. *PLoS One*. 2018. 13(7). e0199788. doi: 10.1371/journal.pone.0199788
35. Linke JA, Rayat A, Ward JM. Production of indigo by recombinant bacteria. *Bioresour Bioprocess*. 2023. 10(1). 20. doi: 10.1186/s40643-023-00626-7
36. Lopes HFS, Tu Z, Sumi H et al. *Indigofera tinctoria* L. leaf powder promotes initiation of indigo reduction by inducing of rapid transition of the microbial community. *Front Microbiol*. 2022. 13. 957809. doi: 10.3389/fmicb.2022.957809
37. Ma Q, Qu Y, Tang H et al. Genome sequence of a novel indigo-producing strain, *Pseudomonas monteilii* QM. *J Bacteriol*. 2012. 194(16). 4459-4460. doi: 10.1128/JB.00867-12
38. Ma Y, Zhang G, Pan J. Spectroscopic studies of DNA interactions with food colorant indigo carmine with the use of ethidium bromide as a fluorescence probe. *J Agric Food Chem*. 2012. 60(43). 10867-10875. doi: 10.1021/jf303698k
39. Manivannan R, Prabakaran K, SonY-A. Eco-friendly approach of bio-indigo synthesis and developing purification methods towards isolation of indigo from indirubin and bacterial fragments. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2025. 44(3). 101954. doi: 10.1016/j.scp.2025.101954
40. Minami Y, Nishimura O, Hara-Nishimura I et al. Tissue and intracellular localization of indican and the purification and characterization of indican synthase from indigo plants. *Plant Cell Physiol*. 2000. 41(2). 218-25. doi: 10.1093/pcp/41.2.218
41. Minami Y, Shigeta Y, Tokumoto U et al. Cloning, sequencing, characterization, and expression of a β -glucosidase cDNA from the indigo plant. *Plant Science*. 1999. 142(2). 219-226. doi: 10.1016/S0168-9452(99)00015-1.
42. Minami Y, Takao H, Kanafuji T et al. beta-Glucosidase in the indigo plant: intracellular localization and tissue specific expression in leaves. *Plant Cell Physiol*. 1997. 38(9). 1069-1074. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029273
43. O'Connor KE, Dobson AD, Hartmans S. Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. *Appl Environ Microbiol*. 1997. 63(11). 4287-4291. doi: 10.1128/aem.63.11.4287-4291.1997
44. Patolsky F, Lichtenstein A, Willner I. Highly sensitive amplified electronic detection of DNA by biocatalyzed precipitation of an insoluble product onto electrodes. *Chemistry*. 2003. 9(5). 1137-1145. doi: 10.1002/chem.200390131
45. Pham NN, Wu YH, Dai TA et al. Auto-inducible synthetic pathway in *E. coli* enhanced sustainable indigo production from glucose. *Metab Eng*. 2024. 85. 14-25. doi: 10.1016/j.ymben.2024.07.002
46. Qi-Yue Y, Ting Z, Ya-Nan H et al. From natural dye to herbal medicine: a systematic review of chemical constituents, pharmacological effects and clinical applications of indigo naturalis. *Chin Med*. 2020. 15(1). 127. doi: 10.1186/s13020-020-00406-x
47. Qu Y, Ma Q, Zhang X et al. Optimization of indigo production by a newly isolated *Pseudomonas sp.* QM. *J Basic Microbiol*. 2012. 52(6). 687-694. doi: 10.1002/jobm.201100516
48. Qu Y, Pi W, Ma F et al. Influence and optimization of growth substrates on indigo formation by a novel isolate *Acinetobacter sp.* PP-2. *Bioresour Technol*. 2010. 101(12). 4527-4532. doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.033
49. Qu Y, Zhang X, Ma Q et al. Indigo biosynthesis by *Comamonas sp.* MQ. *Biotechnol Lett*. 2012. 34(2). 353-357. doi: 10.1007/s10529-011-0778-2
50. Rajan AK, Cindrella L. Studies on new natural dye sensitizers from *Indigofera tinctoria* in dye-sensitized solar cells. *Optical Materials*. 2019. 88. 39-47. doi: 10.1016/j.optmat.2018.11.016
51. Raza S, Bończak B, Atamas N et al. The activity of indigo carmine against bacteriophages: an edible antiphage agent. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2025. 109(1). 24. doi: 10.1007/s00253-025-13414-4
52. Sagwan-Barkdoll L, Kim MJ, Berim A et al. Plant P450 forms indigo and indirubin when expressed in *Escherichia coli*. *Phytochemistry*. 2025. 229. 114268. doi: 10.1016/j.phytochem.2024.114268
53. Sarangi BK, Minami Y, Thul ST. RNA-Seq analysis for indigo biosynthesis pathway genes in *Indigofera tinctoria* and *Polygonum tinctorium*. *Genom Data*. 2015. 6. 212-3. doi: 10.1016/j.gdata.2015.09.021
54. Splitstoser JC, Dillehay TD, Wouters J et al. Early pre-Hispanic use of indigo blue in Peru. *Sci Adv*. 2016. 2(9). e1501623. doi: 10.1126/sciadv.1501623
55. Stasiak N, Kukuła-Koch W, Głowniak K. Modern industrial and pharmacological applications of indigo dye and its derivatives--a review. *Acta Pol Pharm*. 2014. 71(2). 215-221.
56. Súnico V, Piunti I, Bhattacharjee M et al. Overview on Current Selectable Marker Systems and Novel Marker Free Approaches in Fruit Tree Genetic Engineering. *Int J Mol Sci*. 2024. 25(22). 11902. doi: 10.3390/ijms252211902
57. Tang X, Xiao Y, Lv T et al. High-throughput sequencing and *De Novo* assembly of the *Isatis indigotica* transcriptome. *PLoS One*. 2014. 9(9). e102963. doi: 10.1371/journal.pone.0102963
58. Wang P, Si H, Li C et al. Plant genetic transformation: achievements, current status and future

- prospects. *Plant Biotechnol J.* 2025. 23(6). 2034-2058. doi: 10.1111/pbi.70028
59. Wang Z, Sierros K, Seehra MS et al. Development of indigo-based nonvolatile write-once-read-many-times memory device. *Materials Letters.* 2017. 206. 128-131. doi: 10.1016/j.matlet.2017.06.122
60. Willner I, Patolsky F, Weizmann Y et al. Amplified detection of single-base mismatches in DNA using microgravimetric quartz-crystal-microbalance transduction. *Talanta.* 2002. 56(5). 847-856. doi: 10.1016/s0039-9140(01)00658-0
61. Witty M. Thaumatin II: a simple marker gene for use in plants. *Nucleic Acids Res.* 1989. 17(8). 3312. doi: 10.1093/nar/17.8.3312
62. Witty M. Thaumatin II: a sweet marker gene for use in plants. *Methods Enzymol.* 1992. 216. 441-447. doi: 10.1016/0076-6879(92)16040-q
63. Xu W, Zhang L, Cunningham AB et al. Blue genome: chromosome-scale genome reveals the evolutionary and molecular basis of indigo biosynthesis in *Strobilanthes cusia*. *Plant J.* 2020. 104(4). 864-879. doi: 10.1111/tbj.14992
64. Yin H, Chen H, Yan M et al. Efficient Bioproduction of Indigo and Indirubin by Optimizing a Novel Terpenoid Cyclase Xial in *Escherichia coli*. *ACS Omega.* 2021. 6(31). 20569-20576. doi: 10.1021/acsomega.1c02679
65. Yao M, Araki M, Senoh H et al. Indigo Dye as a Positive-electrode Material for Rechargeable Lithium Batteries. *Chemistry Letters.* 2010. 39(9). 950-952. doi: 10.1246/cl.2010.950
66. Yu J, Zhang Y, Ning S et al. Molecular cloning and metabolomic characterization of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene from *Baphicacanthus cusia*. *BMC Plant Biol.* 2019. 19(1). 485. doi: 10.1186/s12870-019-2035-0
67. Zawirska-Wojtasiak R, Gośliński M, Szwacka M et al. Aroma evaluation of transgenic, thaumatin II-producing cucumber fruits. *J Food Sci.* 2009. 74(3). C204-210. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01082.x
68. Zhang YM, Su Y, Dai ZW et al. Integration of the metabolome and transcriptome reveals indigo biosynthesis in *Phaius flavus* flowers under freezing treatment. *PeerJ.* 2022. 10. e13106. doi: 10.7717/peerj.13106