

Уже более века химики полностью владеют рынком красителей. Поэтому утрата их монополии на производство синего красителя — индиго, если такое случится, окажется весьма примечательным событием. А случиться это может в не очень отдаленном будущем, ведь конкуренты наступают с трех сторон. Тут и природный индиго, и биосинтетический, и даже совсем не индиго, а синий трансгенный хлопок, которому вообще никакие красители не нужны. Каковы силы атакующих и почему индиго вдруг привлеч такое внимание?



Вайда красильная

Индиго

нестареющий и невыцветающий

А.С.Садовский

Краситель всех времен и народов

Чтобы сделать красивую ткань любого цвета, достаточно трех красителей — красного, синего и желтого. Все остальные цвета получаются в результате их смешивания. Древний красный краситель — это ализарин (см. «Химию и жизнь», 2002, № 7). А столь же древний синий — индиго. В старину ими красили больше трех четвертей всех тканей.

Молекула индиго состоит из двух конденсированных оксипроизводных индола. Собственно индиго как такового в растениях-«индигоносах» нет. Ведь даже цветы у них не обязательно синие, а, как правило, желтые. В стеблях и листьях присутствует лишь его половинка, полупродукт индоксил, и то связанный с глюкозой в виде гликозида индикана. В ходе извлечения и ферментации высвобождается именно индоксил, а уже при окислении на воздухе две его молекулы превращаются в краситель.

Индиго — это органический пигмент, почти ни в чем не растворимый. Для крашения ткани сначала получают «куб» — раствор соли бесцветной восстановленной енольной формы этого вещества, которая называется лейкоиндиго. При крашении ткань вбирает ее, а при сушке на воздухе она вновь окисляется до индиго. В природе есть цветы и насекомые синего цвета, но этот цвет им придают другие красящие вещества. Они не растворимы в воде, их трудно извлечь и тем более использовать в качестве красителей.

Индигоносами могут служить довольно много видов растений из разных се-

мейств, которые распространены по всему земному шару. Зачем они накапливают индикан в столь значительных количествах (0,5–1,5%), сказать трудно. В глубокую старину европейцы извлекали индиго из вайды красильной (*Isatis tinctoria*), ее родиной считают юг России. Но в эпоху развитого колониализма этот промысел исчез, индиго стали привозить из Индии, отсюда и название синей краски. Здесь, а потом и в других южных колониях развели громадные плантации индигоноски красильной (род *Indigofera*), из нее получалось в три раза больше красителя, чем из вайды.

У индиго есть и родственники, только не синего, а красного цвета. Самый известный — тирийский пурпур, он же диброминдиго. Его добывали, выдавливая сок из желез морских моллюсков *Murex brandaris*. На одно животное приходится 0,1–0,01 мг красителя, поэтому его хватало лишь на ритуальную одежду высшей власти.

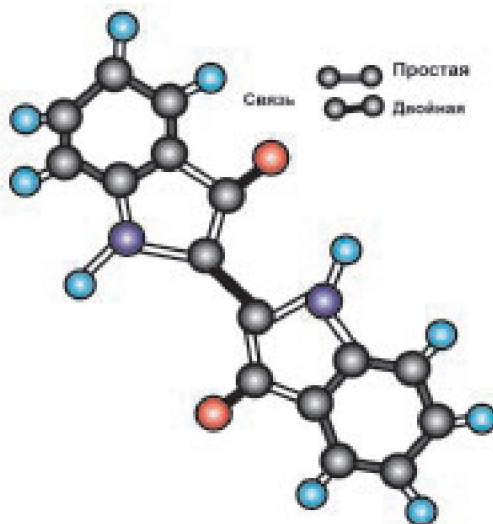
Торжество интеллекта

Теперь от плантаций индигоносов, не говоря о промысле моллюсков, почти ничего не осталось. На смену природному веществу в конце XIX века пришел дешевый синтетический краситель. А фон Байеру (нобелевский лауреат 1905 года) после восемнадцати лет упорной работы в 1883 году удалось выяснить структуру индиго, а уже спустя семь лет К.Хейманн предложил вполне экономичный способ его получения. Этот синтез из анилина через фенилглицин лежит в основе современного производства.

Выпуск красителя составляет порядка 80 тысяч тонн в год, в денежном выражении это около миллиарда долларов, или десятая часть оборота всей отрасли. Только на окраску ткани denim («джинсовки») в год расходуются 16 тысяч тонн индиго.

Индиго — родоначальник большой группы кубовых красителей, которые удается синтезировать. У некоторых из них есть природные аналоги, но сами они практического интереса не представляют. Вот, например, индирубин, он же «индиго красный», несимметричный изомер синего красителя. В виде примеси он часто сопровождает индиго. Нетрудно сейчас получать и пурпурный диброминдиго, но прочность его окраски оказывается хуже, чем у других, более дешевых, синтетических красителей. Прочность окраски индиго также не очень высока, однако это дешевое вещество. Частицы красителя химически стойки, но при трении могут механически стираться, что и придает ткани вошедший в моду джинсовый стиль (см. «Химию и жизнь», 2002, № 3). Порой, «живую» окраску потертой сразу имитируют специальными обработками. Этот стиль нравится людям, поэтому немецкие джинсы из немнущейся ткани, покрашенной очень стойким кубовым красителем индантеном, не прижились.

Индиго и в истории химической технологии занимает особое место. Это был локомотив промышленного органического синтеза, тянувший за собой многие полупродукты и процессы. Синтетическое индиго в этом плане сравнивали со способом получения соды



ВЕЩИ И ВЕЩЕСТВА

по Леблану для неорганики. Однако в начале XXI века стали появляться мысли о том, что имеет смысл отказаться от его синтеза.

Есть ли путь назад?

В Англии сотрудники агрономической станции Бристольского университета уже несколько лет работают над проектом AICR по частичной замене синтетических красителей природными. Эта идея на первый взгляд кажется странной. Ведь синтетические красители популярны не только потому, что дешевы. Их список огромен и разнообразен. Красители, не имеющие природных аналогов, более технологичны, зачастую их окраска ярче и прочнее. Тем не менее энтузиасты, ставшие на тропу конкуренции, хотят обеспечить растительным сырьем все основные цвета: синий, желтый, красный.

Ситуация с красными и желтыми природными красителями совсем иная, чем с индиго. Они — гидроксиды антрахиноны вроде ализарина и флавоноиды, такие, как лутеолин, уже присутствуют в растениях в готовом виде. Их довольно легко извлекать из сырья водными растворами. Для получения в этом случае несмываемой, прочной окраски ткань нужно подготовить, а именно протравить. В этом-то и состоит первое слабое место природной технологии: индиго принципиально иной, кубовый, краситель. А одну и ту же ткань покрасить одновременно и кубовым, и протравным красителем невозможно. Получается, что даже минимальный ряд природных однотипных

основных красителей собрать нельзя. Значит, конкурентная война может быть только локальной.

Публикации борцов за природные красители обычно содержат общие фразы о сохранении нефти за счет перехода на возобновляемые источники сырья или об экологической чистоте производства. Однако производство красителей отнюдь не главный потребитель нефти, так что переход на другое сырье запасы ископаемых углеводородов нам не сэкономит.

Есть, правда, у этой задачки еще одно решение. Дело в том, что эксперты пришли к выводу о неэкономичности выращивания злаков или масличных культур в условиях Англии — готовую продукцию дешевле ввозить из-за рубежа. Освобождающуюся при этом землю и пахарей все-таки нужно чем-то занять. Отсюда, возможно, и происходит всплеск интереса к индигоносам умеренной полосы. Аграрная политика в ЕЭС непроста, заметим, что проект AICR получает финансовую поддержку к удовлетворению «зеленых». Нынче плантации индигоносов имеются не только в Англии, но в других местах Европы — от солнечной Италии до приполярной Финляндии. Этому благоприятствует и то, что природный индиго отнюдь не полностью вытеснен с мирового рынка. Производят его раз в сто меньше, чем синтетического, а применяют, например, для окраски коллекционных моделей джинсов или реставрации старинных тканей. Согласно опросам 5% потребителей в принципе готовы перейти на природный краситель, но при опросе им не говорили, что ткань, выращенная индиго из вайды, подорожает на 10%.

Авторы проекта надеются, что по мере совершенствования агротехники и кустарных способов переработки сырья экономические факторы будут выравниваться. Предпосылки для этого действительно имеются. Выход продукта из вайды можно поднять не только селекцией, но и выбором оптималь-

ных сроков выращивания культуры, так как накопление индоксильных производных зависит помимо прочего и от полученной дозы ультрафиолетового облучения. Кроме того, в отличие от тропической индигоноски, в вайде индоксил присутствует в виде двух производных: индикана и изатина, а их ферментативное разложение происходит в разных условиях. Если это учитывать, то из выращенного на склонах английских холмов растения удастся извлекать столько же красителя, что и из обитателя тропиков.

А вот с загрязнением окружающей среды при производстве красителя из растения все гораздо печальнее, чем кажется сторонникам «зеленых» методов. Специфика процесса такова, что место проведения ферментации, если все делать в соответствии со старинными рецептами, то есть замачивать в чанах, может превратиться в зловонную помойку. Именно эта стадия нуждается в серьезной доработке.

Получить индиго — полдела. Нужно еще суметь покрасить им ткань. Ведь краситель не растворим в воде и имеет вид суспензии. Потом требуется к обоим атомам кислорода добавить по атому водорода и, таким образом, восстановить индиго до растворимой лейкоформы. Это делают в щелочной среде чаще всего с помощью гидросульфита натрия. Правда, викинги, у которых никаких химикатов не было, получали красильный куб, поддерживая по наитию нужный pH раствора добавлением древесной золы. (Согласно одной из версий, если бы они не умели этого делать, музеи не могли бы демонстрировать элементы их одежды синего цвета. Да и Один имел обыкновение разгуливать по земле в плаще синего цвета. Впрочем, некоторые археологи считают, что ткань не красили на месте, а привозили с юга.) Это наводит на мысль, что без биотехнологии тут не обошлось, раз уж людям химическая технология была недоступна. И действительно, британские ученые из университета Ридинга обнаружили, что в красильной ванне, точнее, в осадке, который скапливается на ее дне, живут неизвестные ранее бактерии, которых назвали *Clostridium isatidis*. Другие виды

бактерий из этого рода доставляют человеку массу неприятностей, вызывая ботулизм, гангрену, сепсисы, гастроэнтерит и гастрит. *C. isotidis* непатогенна. Она восстанавливает индиго, превращая его в лейкоформу, что служит ей в качестве одной из стадий цикла пролучения энергии.

При всем этом остается неясным ответ на вопрос: раз выращивать хлеб в Индии дешевле, чем в Европе, неужели индигоноска оттуда окажется дороже английской вайды? Наверняка если уж пытаться делать краситель из растений, то возделывать их нужно там, где тепло, а заработная плата — низкая.

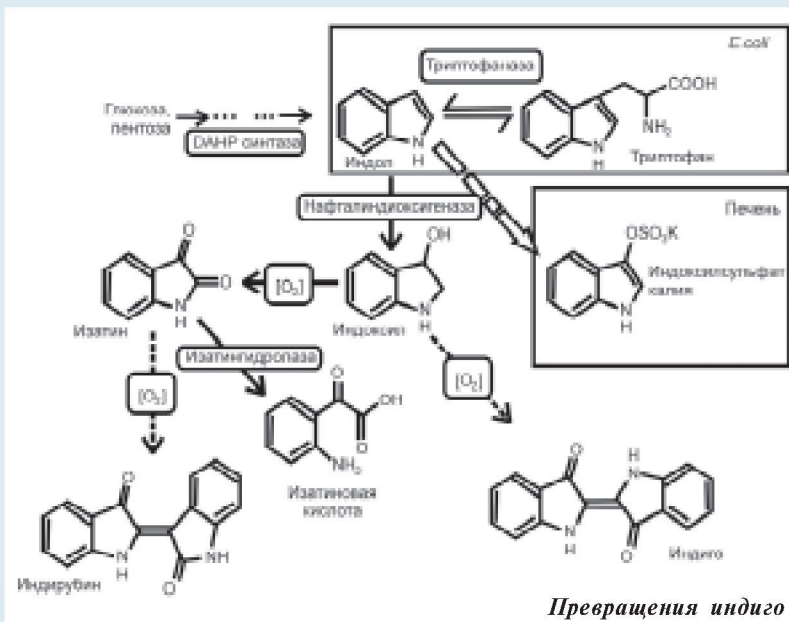
Голубой индиго «зеленеет», не краснея

Под похожим заголовком примерно год назад, в марте 2002-го, прошла информация «Nature News» об успехах американской компании «Genencor» в создании штамма бактерии *E. coli*, пригодного для промышленного производства индиго. Биоиндиго «зеленее» синтетического, не в оптическом, а в политическом смысле — принято считать, что биотехнология оказывает меньшую нагрузку на окружающую среду. *Escherichia coli* — это, как известно, наш симбионт, то есть естественный обитатель кишечника.

Генная инженерия превратила эту живую палочку длиной всего 2 микрометра в стендовую установку. Внутри нее можно собрать целую технологическую схему примерно следующим образом. Для желаемого химического превращения на стороне ищут катализатор — фермент. Далее отработанными приемами вставляют кодирующий его отрезок ДНК в хорошо изученную ДНК *E. coli*. Выращивают трансгенные клетки и проверяют, заработали ли. Если нужно, деятельность ферментов корректируют, изменяя их строение теми же приемами вмешательства в ДНК. После отладки промышленный реактор (ферментер) начинают этими «ДНК-микросхемами» до нужной производительности.

Наиболее впечатляющее достижение генной инженерии — превращение *E. coli* в продуцента человеческого инсулина, что впервые американские биоинженеры сделали в 1978 году. Это было большим прорывом, ведь около четверти диабетиков не усваивают бычий инсулин, и раньше они были обречены на преждевременную смерть. Таких примеров много. Например, трансгенную *E. coli* также приучили делать для нас из углеводов одну из незаменимых аминокислот — триптофана.

При отладке подобной микротехнологической схемы для окисления



Превращения индиго

Люди как индигоносы

Индигоносами нас вынуждает быть собственная микрофлора кишечника. Некоторые бактерии (включая *E. coli*) превращают нужный нам триптофан в метилиндола (скатол — это то, что имеет очень сильный фекальный запах) и индола (см. схему). Последний токсичен и обезвреживается в печени с образованием «животного индикана». Это калиевая соль сульфозифира индоксила, а не гликозид, как в растениях. Индоксилсульфат калия переходит в кровь и далее в мочу. В принципе его также можно превратить в индиго. Однако количество этого вещества невелико, и здоровый организм легко справляется с издержками симбиоза. При некоторых заболеваниях, например раке или брюшном тифе, баланс нарушается. Патологическое превышение нормальной концентрации индоксилсульфата в крови — это индиканемия, а в моче — индиканурия.

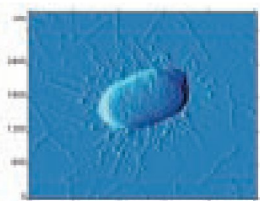
Заодно по схеме посмотрим, чем же мы отличаемся от ферментера с трансгенной *E. coli* (конечно, не с точки зрения производительности по индоксилу). Превращения, которые идут внутри нас, ограничены на схеме рам-

ками. По тому, как изображены углеводы, можно подумать, что наша «домашняя» *E. coli* не тратит нашу глюкозу. Это не совсем верно. Углеводы нашей палочке также необходимы, но только для роста и энергетических затрат, а в синтез индола она их не вовлекает.

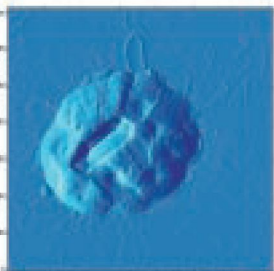
Штамм кишечной палочки, которая делает чисто-синий индиго, отличается от предыдущих тем, что в него еще «зашита» последовательность, кодирующая изаитингидролазу, которую, так же как и ранее, позаимствовали у бактерии *Pseudomonas putida*. Этот фермент, обеспечивая окисление изаитина до изаитиновой кислоты, резко снизил образование индирубина, происходящее уже вне клетки в питательном растворе. Непредвиденным оказался кинетический фактор: промежуточные продукты превращения индоксила в индиго тормозят стадии образования индола из углеводов, частично блокируя ДАHP-синтазу. В результате скорость всего процесса падает в два раза. Видимо, именно на корректировку этой стадии и будут направлены дальнейшие усилия микробиологов.

с помощью бактерии *Pseudomonas putida* нафталина в салициловую кислоту заметили, что питательный раствор, содержащий немного триптофана, синеет. Исследование показало, что при этом образуется индиго. Это не случайно, ведь синтез триптофана в этой бактерии идет через образование индола. А когда в дело вмешивается новый фермент, нафталиндиоксигеназа, то путь синтеза изменяется и вместо триптофана из индола как раз и должно в ко-

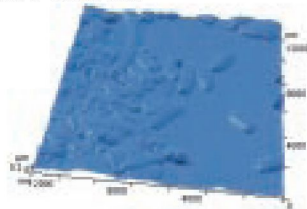
нечном счете получиться индиго. После того как в кишечную палочку, которая и так умела синтезировать триптофан, ввели позаимствованную у псевдомонады плазмиду с геном нафталиндиоксигеназы, получилась штамм *E. coli* для биосинтеза синего красителя. Правда, клетка не вышла на ожидаемую мощность, но, очевидно, специалисты рано или поздно сумеют добиться своего. А продуктивность штамма — решающий фактор, определяющий экономичность.



Так обычно выглядит кишечная палочка (M109)



Другой штамм кишечной палочки (S04)



Кишечные палочки под зондовым микроскопом



ВЕЩИ И ВЕЩЕСТВА

Изображения бактерий получены с помощью атомно-силового микроскопа Nanoscope IIIa и любезно предоставлены научным сотрудником химфака МГУ Большаковой А.В. (см. Атлас бактерий по данным АСМ <http://www.nanoscopy.org>)



Примерно из такой псевдомонады вынули ген, после пересадки которого кишечная палочка стала превращать триптофан в индиго

Теперь о том, почему индиго не краснеет. У предыдущего штамма *E. coli* индиго получался с примесью индирубина. Чтобы продукт не уступал очищенному синтетическому красителю, в клетку нового штамма добавили еще один кодируемый фермент и примесь убрали. Наверное, поспешили, ведь сейчас мода вроде бы пошла именно на голубые джинсы с красноватым отливом, что достигают, добавляя в куб кукурузный сироп. Возможно, это имитация цвета природного индиго. По крайней мере, индиго вайды содержит примесь индирубина.

Самокрасящийся хлопок

Природа сама создала цветной хлопчатник, но в ограниченном ассортименте — только зеленый и коричневый. По механическим свойствам он уступает белому, универсальному, и цветным хлопком занимаются меньше. Однако знатоки, наверное, знают о существовании коричневых джинсов «Levi's» из патентованной ткани «Fox Fibre». Она сделана как раз из такого хлопка, и по мере ношения натуральный цвет джинсов даже усиливается.

Разговоры о создании синего трансгенного хлопка идут давно, в том числе и среди противников трансгенных растений. Однако до сих пор не видно не только результатов, но и сведений о подходах к их достижению. Планка поставлена: качество, как у ткани деним. Денежное вознаграждение весьма велико, поэтому исследования имеют коммерческую направленность, и их проводят без лишней огласки.

Как можно понять из редких публикаций, для решения задачи сотрудни-

ки компании «Agrocetus» пытаются заставить посинеть белый хлопок. Вникнуть в положение дел по патентной литературе было бы непросто и специалисту со стороны. Здесь в контексте с джинсами уместно вспомнить историю швейной машинки. Для того чтобы застолбить сразу весь способ машинного шитья, не нужно было патентовать швейную машинку целиком. Вполне достаточным оказался патент лишь на иглу, отличающуюся тем, что отверстие для нитки (ушко) расположено у нее вблизи острия. Последующие изобретатели всевозможных швейных автоматов обошли этот патент уже не могли. В истории джинсов тоже есть подобный эпизод, но не столь яркий по последствиям. Эта популярнейшая теперь форма брюк официально родилась в период «золотой лихорадки» 1873 года, когда Д.Дэвис и Л.Стросс запатентовали «Б заклепок» для укрепления швов у «поясных комбинезонов». Идея исходила от удачливых старателей, карманы которых отрывались под тяжестью золотых самородков.

Компания «Agrocetus» получила подобные патенты США, в которых заявлено, куда именно и каким способом

«вшивать» посторонние гены в ДНК хлопчатника. Сами же эти гены могут быть любыми. Уже сейчас в это растение встроен фрагмент, взятый от микроба *Bacillus thuringensis*. Он вырабатывает биоинсектицид против хлопкового вредителя — лепидоптеры. Возможно, следует аналогичным образом взять что-то от растения с синими цветами. Правда, чем будет вызвана синева у хлопка, пока неясно. Если ориентироваться на индиго, то не следует забывать: раз этого вещества в растениях нет, то нет и готового гена, контролирующего его синтез. Сорта трансгенного хлопчатника выращивают в США и Австралии, но голубого среди них пока нет. Впрочем, никто не может утверждать, что этот хлопок не появится на поле уже через год.

Получается, что индиго был локомотивом для развития производства анило красок, а теперь, как видно, превратился в платформу для геной инженерии и биотехнологии. Производство индиго может стать вторым после акриламида (см. «Химия и жизнь», 1992, № 8) случаем, когда микробиологи и генетики в крупнотоннажном органическом синтезе потеснят химиков.



Голубой салат

Поскольку вайда красильная — близкий родственник капусты, некоторые люди попробовали ее употреблять в пищу. В частности, Н.Г.Замятина из Ботанического сада Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова, автор извест-

ной книги «Кухня Робинзона», где приведены рецепты блюд из дикорастущих трав, считает, что салат из вайды красильной вполне способен украсить праздничный стол и заинтриговать гостей. Дело в том, что при недолгом стоянии порубленной зелени вайды в ее соке при участии майонеза идут процессы, которые разлагают гликозид-предшественник, и из его обломков формируются молекулы индиго. Они придают майонезу нежный голубой цвет, который и виден на фотографии. Хотя рецепт этого салата и не вошел в знаменитую книгу, ее автор неоднократно употребляла такую пищу, невзирая на необычный внешний вид. Еще бы, ведь индигоносы используют как лекарственные растения. Салат же делать просто: нарубленные листочки вайды, майонез и соль по вкусу.