透明颤菌血红蛋白的结构与功能及其在生物医药生产中的应用

曹艳丽[1,2]，朱兵峰[1,2]，时明星[1,2]，王 佩[1,2]，张贵民[1,2]*

（1. 鲁南新时代生物技术有限公司，山东临沂 273400；2. 国家手性制药工程技术研究中心，山东临沂 273400）

摘要：透明颤菌血红蛋白（*Vitreoscilla* hemoglobin，VHb）具有氧结合与传递功能，通过将氧传递到呼吸链，可以改善低氧条件下的细胞呼吸与有氧代谢。VHb 在细菌、真菌甚至高等植物中的异源表达在改善细胞生长、促进蛋白质合成以及提高代谢产物产量等方面具有重要作用，特别是在低氧条件下。本综述介绍了 VHb 的表达调控机制及其结构与功能，重点阐述了 VHb 的异源表达在天然产物药物、药物前体或医药中间体、保健品功能因子及生物医疗材料等生物医药生产中的应用研究。

关键词：透明颤菌血红蛋白；异源表达；生物医药

中图分类号：R915 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2022)01-0037-11

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.01.003

Structure and Function of *Vitreoscilla* Hemoglobin and Its Application in the Production of Biomedicines

CAO Yanli[1,2], ZHU Bingfeng[1,2], SHI Mingxing[1,2], WANG Pei[1,2], ZHANG Guimin[1,2]*

(*1. Lunan New Time Bio-Tech Co., Ltd., Linyi 273400;*

2. National Engineering and Technology Research Center of Chiral Pharmaceutical, Linyi 273400)

ABSTRACT: *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) holds oxygen binding and transmission functions. By transmitting oxygen to the respiratory chain under hypoxic condition, VHb can improve the respiration and aerobic metabolism of cells. The heterologous expression of VHb in bacteria, fungi, and even higher plants plays an important role in enhancing cell growth, promoting protein synthesis, and increasing the production of metabolites, especially under hypoxic condition. This review introduces the expression regulation mechanism, structure and function of VHb, and it mainly focuses on summarizing the research of VHb heterologous expression in the production of biomedicines, including natural product drugs, prodrugs, pharmaceutical intermediates, functional factors of health products, and biomedical materials.

Key Words: *Vitreoscilla* hemoglobin; heterologous expression; biomedicine

透明颤菌血红蛋白（*Vitreoscilla* hemoglobin，VHb）于 1966 年首次在透明颤菌中发现[1]，1986 年被确认为是一种可溶性血红蛋白[2]。透明颤菌作为一种专性好氧的革兰阴性菌能生存在氧气供应有限的淡水沉积物（如沼泽、泥潭）和牛粪中，这主要是因为其自身携带 VHb 编码基因 *vgb*，VHb 可以在低氧条件下被诱导表达[2—3]，获得在低氧环境中生存的能力。1988 年，KHOSLA 和 DIKSHIT 等分别从透明颤菌染色体上克隆出完整的 *vgb* 基因，并测定了 *vgb* 基因的核苷酸序列，首次实现了 VHb 在大肠埃希菌（*Escherichia coli*，*E. coli*）中的异源表达[3—5]。随着分子生物学、生物信息学以及分析检测技术的发展，*vgb*/VHb 的结构与功能及其在代谢工程方面的应用研究取得了一定的进展。*vgb*/VHb 代谢工程被广泛应用于细菌、真菌甚至高等植物中，尤其是在限氧条件下。VHb 对于改善细胞生

收稿日期：2021-02-26

作者简介：曹艳丽(1992—)，女，硕士研究生，专业方向：药物研发菌株的构建及发酵工艺。

E-mail：caoyanli1029@163.com

通信作者：张贵民(1969—)，男，研究员，从事药物研发及工程化研究。

E-mail：lunanzhangguimin@163.com

长、促进蛋白质合成以及提高代谢物产量等具有重要作用，这使 VHb 在生物医药生产中得到了广泛应用。

1 VHb 的表达调控机制

vgb 基因的完整片段约为 500 bp，在其结构上游有由 100 多个核苷酸序列构成的启动子区域 [5]。该区域存在 2 个启动子，即 P1（强启动子）和 P2（弱启动子），这 2 个启动子的转录起始位点虽然不同，但都在转录水平上受溶氧水平调控。当溶氧水平低于 20%时，启动子开始被诱导，VHb 进行表达；当溶氧水平小于 2%时，VHb 表达量达到最高；但在氧气充足或严格厌氧条件下，VHb 基本不表达 [6—7]。另外，启动子区域具有与 *E. coli* 同源的 Pribnow Box 和核糖体结合位点保守序列 [6—7]，这使得 *vgb* 基因启动子可以在 *E. coli* 中被识别并受溶氧水平调控，这种特性为后续利用该启动子构建新型的氧控表达载体提供了依据。2014 年，WU 等在 *E. coli* 中采用 8 个重复串联的 *vgb* 基因启动子 P_{8vgb} 控制聚 β- 羟基丁酸酯（PHB）合成基因的表达，在高密度细胞培养、低溶氧水平时诱导了 PHB 合成基因的表达，使得 PHB 产量显著增加 [8]。2018 年，OUYANG 等利用 P_{8vgb} 同样实现了低溶氧水平诱导 *Halomonas* spp. 生产 PHB 的目标 [9]。但 *vgb* 基因启动子在其他细菌（例如链霉菌）、真菌以及植物细胞中不能被识别，因此需要选择适合细胞自身的启动子来进行基因的诱导表达。

溶氧水平调控并不是直接作用于 *vgb* 基因启动子之上的，而是通过氧响应转录调控蛋白（FNR）作为中间媒介进行调控 [10—12]。FNR 是在细胞进行厌氧呼吸时发挥重要作用的转录调控因子，通过与 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 结合的方式参与细胞对氧的应答。当细胞在低氧环境中生长时，细胞内会发生氧化还原电位的改变，与 FNR 蛋白结合的 Fe^{3+} 被还原为 Fe^{2+}，使得 FNR 蛋白由氧化态变为还原态，其半胱氨酸口袋结构发生变化，继而可与 *vgb* 基因启动子有效结合，激活启动子，使 VHb 进行溶氧调控表达。除 FNR 外，氧响应转录调控因子 Crp 和 ArcA 也参与 VHb 的溶氧表达调控 [13]。另外，在 *vgb* 基因启动子序列中还鉴定到氧化应激调节因子 OxyR 的结合位点 [14]。*vgb* 基因启动子除了受溶氧水平调控之外，还受环腺苷酸受体蛋白（CRP）直接或间接调控 [6]。综上所述，VHb 的表达受多个通路精确控制。

2 VHb 的结构与功能

VHb 是由 2 个相同的亚基（相对分子质量为 15.775×10^3）组成的同型二聚体，每个亚基含有 146 个氨基酸残基和 2 个 b 型血红素（图 1），是第一个被发现的细菌血红蛋白 [2]。无论是在原生宿主透明颤菌还是在异源宿主中进行表达，VHb 的主要功能似乎都是结合与传递氧，特别是在低氧条件下；通过将氧传递到呼吸链，提高末端氧化酶的活性，增强氧化磷酸化效率，从而促进细胞呼吸和有氧代谢 [15—16]。该作用符合 VHb 与氧反应的动力学常数。VHb 具有中等水平的氧结合速率常数［k_{on}= 78 $(\mu mol\cdot s)^{-1}\cdot L$］，但氧解离速率常数（$k_{off}$=5 000 s^{-1}）却异常高于其他血红蛋白 [16—17]，这可能源于 VHb 独特的蛋白结构。虽然 VHb 与真核生物的血红蛋白具有较高的结构同源性，但在远端的 E7 位置却有所不同。大多数血红蛋白的 E7 位置为 His 残基，His 残基与氧一般通过氢键结合，结合能力较强。而 VHb 的 E7 位置为 Gln 残基，并且 VHb 中的多肽片段 Phe-CD1 至 Leu-E1 之间没有形成 α- 螺旋构象，使得 E7 处的 Gln 残基离开了血红素囊区域，导致 Gln 残基不能与捕捉到的氧通过氢键结合，降低了二者的结合能力 [18—21]。定点突变研究表明，当 VHb 的 E7 位置由 Gln 残基突变为 His 残基时，其氧解离常数相比于原始 VHb 显著减小，该研究结果与基于 VHb 晶体学结构的观点一致 [19—21]。VHb 的动力学常数表明，在低氧条件下，虽然 VHb 能结合的氧有所降低，但因其更易释放所结合的氧，就可以提高细胞内的氧转移水平，进而满足细胞有氧代谢、维持细胞生存。

VHb 除了可以将氧传递到呼吸链，还具有其他功能。DIKSHIT 等研究显示，2 个均缺乏细胞色素 *o* 和细胞色素 *d* 末端氧化酶的 *E. coli* 突变体在转化 *vgb* 基因后，均能以底物琥珀酸或乳酸为碳源需氧生长，推测 VHb 可能具有末端氧化酶的功能 [22]。

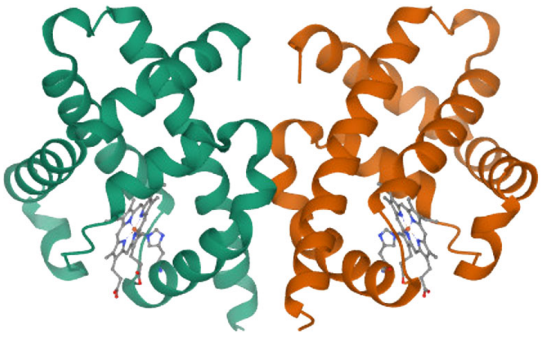


图 1 VHb 的三维结构（PDB ID: 1VHB）
Fig.1 The Three-dimensional Structure of VHb
（PDB ID: 1VHB）

KVIST 等通过对纯化的 VHb 进行体外过氧化物酶活的测定，确认了 VHb 在体外具有过氧化物酶的催化活性[23]。多个研究显示 VHb 可以通过直接输送氧来增强加氧酶的活性[24—26]。另外，转录组与代谢通量分析表明，VHb 可能对宿主基因表达和代谢有显著影响[27—28]。

虽然 VHb 具有很多功能，但目前对 VHb 的作用机制还不明确，研究者提出了 3 种假说，即扩散促进假说[29—30]、氧化还原效应物假说[29—30]，以及末端电子受体假说[10]。扩散促进假说认为 VHb 在细胞周质空间与氧结合，作为氧结合载体增加氧的传递量，从而为呼吸链传递更多的氧，加速 ATP 的生物合成，提高能量代谢水平。氧化还原效应物假说认为 VHb 与氧的结合可能会影响细胞内一些关键的氧化还原敏感性分子的生物活性，例如代谢过程中某些关键酶的调控因子、传感器或酶的变构效应物，最终引起能量代谢效率提高。末端电子受体假说认为 VHb 可以作为呼吸链的末端电子受体参与细胞的氧化还原过程，从而提高贫氧条件下细胞的能量代谢效率。虽然尚未在分子水平上阐明 VHb 的作用机制，但其功能是明确的，即可以改善细胞呼吸和有氧代谢，特别是在低氧条件下，可以缓冲由外界溶氧水平降低所引起的胞内代谢扰动，从而改善细胞生长状况、促进蛋白质合成以及代谢产物生成。

3 VHb 在生物医药生产中的应用

在生物医药生产中，许多天然产物药物、药物前体或医药中间体、保健品功能因子及生物医疗材料等可以由微生物发酵、植物细胞培养或生物酶催化产生，其中就涉及细胞代谢。许多代谢产物的工业化生产需要经过复杂的酶促途径才能得到最终的生物活性分子[16]。在细胞培养时，高密度发酵或高黏度发酵过程中均会出现溶氧不足的问题，低溶氧水平可能会降低代谢途径中的耗氧酶促反应效率，阻碍生物活性分子的合成。近几十年来，人们尝试通过 *vgb*/VHb 代谢工程手段来缓解细胞培养过程中因溶氧不足所产生的不利影响，目前异源表达 VHb 在生物医药生产领域中已取得了一定的成效。

3.1 VHb 在天然抗菌药生产中的应用

作为极具价值的次级代谢产物，抗菌药可由细菌或真菌产生，例如链霉菌及其近亲属（可产 70% 以上的天然抗菌药[31]）、糖多孢菌和霉菌等。在抗菌药的发酵生产中，微生物细胞需要摄取充足的氧来进行有氧代谢。然而，高致密性的菌丝体会增加培养基的黏度，降低培养基中的溶氧水平，影响微生物正常的生理代谢。因此，增强细胞内的氧转移水平在一定程度上会促进抗菌药的生产。

头孢菌素是一类 β- 内酰胺类抗菌药，氧是其生物合成过程中一个至关重要的因素。早在 1993 年，DEMODENA 等在 *Acremonium chrysogenum* 染色体中引入 *vgb* 基因，结果在有限的氧供应条件下，VHb 的表达可使头孢菌素 C 的产量提高 5 倍以上[32]。2010 年，LIU 等在过表达头孢菌素 C 生物合成相关酶的基因工程菌株 *Acremonium chrysogenum* 中表达 VHb，该方法同样有利于促进头孢菌素 C 的生物合成[33]。

纳他霉素是一种用于治疗真菌性角膜炎和支气管肺曲霉病的抗菌药，溶氧不足是纳他霉素发酵生产过程中的一个关键限制因素。2014 年，WANG 等为了减轻低溶氧限制并提高纳他霉素产量，将 *vgb* 基因整合到 *Streptomyces gilvosporeus* 染色体上，并测定定 VHb 的表达及活性情况[34]。结果表

明，在一定的限氧条件下，VHb 表达菌株的纳他霉素产量在 1 L 发酵罐中提高了 131.3%，在摇瓶中提高了 175%。2018 年，WANG 等将纳他霉素生物合成基因簇中的 2 个正向调节基因 *pimE* 和 *pimM* 在 *Streptomyces gilvosporeus* 中共表达，在此基础上，为了缓解发酵过程中的溶氧限制，在基因 *pimE* 和 *pimM* 共表达菌株中额外表达了 VHb，纳他霉素产量进一步提高了 55.7% [35]。

丰加霉素具有抗肿瘤、抗真菌和抗病毒等活性。2014 年，MA 等将 *vgb* 基因整合到 *Streptomyces diastatochromogenes* 1628 染色体上表达 VHb[36]。在 7 L 发酵罐、非限制性溶氧条件下，VHb^+ 菌株的最终生物量比野生型菌株增加 10.3%，丰加霉素产量增加 55.8%；而在有限溶氧的条件下，溶氧浓度急剧下降，VHb^+ 菌株的最终生物量比野生型菌株高 33.3%，丰加霉素产量为野生型菌株的 2.1 倍。这些数据表明，VHb 的表达对于细胞生长和代谢产物的生产具有促进作用，特别是在低氧条件下，促进作用更加明显。次年，该研究团队将 *vgb* 基因、腺苷酸基琥珀酸合成酶编码基因 *toyG* 和核糖体再生因子编码基因 *frr* 在 *Streptomyces diastatochromogenes* 1628 中共表达以构建丰加霉素高产菌株，结果再次证明 VHb 对于细胞生长与代谢产物的生成具有积极影响 [37]。

研究表明，在 *Saccharopolyspora erythraea* 染色体上整合表达 VHb 可以提高红霉素产量；与原始菌株相比，VHb 表达菌株的红霉素产量可提高 60%，时空产率提高 100%，并且重组菌株的遗传稳定性较高，在整个培养过程中不需要添加抗菌药作为选择压力 [38—39]。孟春等在 *Streptomyces aureofaciens* 染色体上整合表达 VHb，在低溶氧条件下进行发酵培养，VHb 表达菌株的金霉素产量比对照菌株提高 40%～60% [40]。LUO 等为了改善 *Saccharopolyspora spinosa* 在高密度发酵过程中生物合成多杀菌素的效价，将 *vgb* 基因整合到该菌株染色体上，发酵结果表明，在非限氧条件和中等限氧条件下，VHb 的表达对于多杀菌素的生物合成均具有显著的促进作用 [41]。WANG 等将 *vgb* 基因同源重组到 *Streptomyces* sp. FR-008 染色体上以表达 VHb，摇瓶发酵数据显示，VHb 表达菌株产生的 FR-008-Ⅲ（七烯大环内酯类抗真菌药）是亲本菌株的 2.3 倍 [42]。为解决吸水链霉菌在发酵生产子囊霉素过程中的低溶氧问题，余志拓等将 *vgb* 基因整合到 *Streptomyces hygroscopicus* 染色体中进行表达，在 5 L 发酵罐中进行培养，结果显示，构建的基因工程菌株在发酵过程中溶氧水平明显得到改善，与野生型菌株相比，子囊霉素产量提高了 38% [43]。利福霉素的生物合成是一种氧依赖合成过程，研究表明 VHb 与细胞色素 P450 单加氧酶在利福霉素生产菌株 *Amycolatopsis mediterranei* 中进行融合表达，可以显著提高利福霉素的生产能力 [44]。土霉素的生物合成过程包括多步加氧步骤，将 VHb 在 *Streptomyces rimosus* 中成功表达可有效促进菌体的生长以及土霉素的生物合成 [45]。

3.2 VHb 在其他天然产物药物生产中的应用

氧是天然产物生物合成过程中所必需的，除抗菌药外，VHb 也被应用到其他天然产物药物的微生物发酵生产中。环孢菌素 A 是一种有效的免疫抑制剂，LEE 等通过在高产环孢菌素 A 的 *Tolypocladium niveum* 中表达 VHb，使环孢菌素 A 的产量提升了 33.5% [46]。白桦脂酸是一种植物三萜类化合物，在抗肿瘤和艾滋病治疗中具有重要作用，LI 等通过基因编辑技术在 *Saccharomyces cerevisiae* 中构建了白桦脂酸的生物合成途径，由于该途径中的几种酶依赖于氧而发挥作用，因此又设计在该基因工程菌株中异源表达 VHb，结果显示白桦脂酸的产量提高了 2.2 倍 [47]。抗菌脂肽 (surfactin) 是一种表面活性素，具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤功效，WANG 等研究表明 *Bacillus subtilis* 在 5 L 发酵罐水平所合成的 surfactin 远低于摇瓶水平，经证实其原因是发酵罐中的溶氧水平较低，因此，研究者将 *vgb* 基因导入 *Bacillus subtilis*，使发酵罐生产 surfactin 的效价提高了 51% [48]。

利用生物反应器可对药用植物毛状根进行培养来合成次级代谢产物，但氧的有效传输是其生产能力的一个制约因素。VHb 在植物体内异源表

达有利于促进氧的输送，从而可以提高某些需氧代谢途径的生产力。*Hyoscyamus muticus* 是一种重要的药用植物，可产生具有药理活性的莨菪烷生物碱，该产物生物合成的最后一步是一个需氧过程。WILHELMSON 等将 *vgb* 基因转入 *Hyoscyamus muticus* 毛状根中表达 VHb，摇瓶培养结果显示，与对照组（VHb^-）相比，试验组（VHb^+）毛状根干重增加了 18%，莨菪碱的产量也有所提高 [49]。GUO 等的研究同样证实了 VHb 能够促进 *Hyoscyamus niger* 毛状根中莨菪碱的积累，并且通过定量逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）分析表明，在 VHb 表达株系中，参与莨菪碱生物合成的关键基因表达量显著增加 [50]。豆科植物 *Astragalus membranaceus* 可产黄芪甲苷Ⅳ，这是一种具有多种药理活性的物质，在 *Astragalus membranaceus* 的毛状根中表达 VHb，可使黄芪甲苷Ⅳ的产量提高至亲本植株的 5 ～ 6 倍 [51]。

3.3 VHb 在药物前体或医药中间体生产中的应用

一些药物前体和医药中间体（或生物催化所用生物酶）的生产可以通过构建基因工程菌株（*E. coli*、酿酒酵母、毕赤酵母等）来实现。高密度细胞培养是微生物生产生物分子的优选系统，基因工程菌株通过高密度发酵可以实现目标产物体积产率的最大化，但发酵后期溶氧不足是影响细胞密度以及产物生成量的关键因素。因此，研究者尝试通过异源表达 VHb 来实现药物前体或医药中间体的高密度发酵生产。

紫穗槐 -4,11- 二烯是抗疟药青蒿素的前体物质，其可以利用基因工程菌株 *Saccharomyces cerevisiae* 生产；伴随着 VHb 的表达，*Saccharomyces cerevisiae* 生产紫穗槐 -4,11- 二烯的产量可增加 2 ～ 3 倍 [52]。葡萄糖二酸衍生物 —— 葡萄糖二酸 -1,4- 内酯可作为一种抗肿瘤成分，肌醇氧化酶的催化速率是葡萄糖二酸生物合成的一个限制因素，该催化过程是一个耗氧过程。通过异源表达 VHb，可以提高基因工程菌株 *Saccharomyces cerevisiae* 生产葡萄糖二酸的能力，在 5 L 发酵罐中，VHb^+ 菌株的生物量以及所生产的葡萄糖二酸产量相较于 VHb^- 菌株分别增加了 21.29% 和 28.76% [53]。左旋多巴是多巴胺的前体药物，KURT 等研究了 VHb 在 *Citrobacter freundii* 和 *Erwinia herbicola* 中表达时对次级代谢产物左旋多巴和多巴胺生产的影响 [54]。结果显示，VHb^+ 菌株产左旋多巴的水平明显高于对照菌株（VHb^-），多巴胺在 VHb 表达菌株 *Citrobacter freundii* 和 *Erwinia herbicola* 中的生成水平分别比亲本菌株高 20 倍和 2 个数量级。此外，可以将 *L*- 酪氨酸转化为左旋多巴的酪氨酸酚裂解酶的活性在 VHb^+ 菌株中也得到了明显提高 [54]。

反式 -4- 羟基 -*L*- 脯氨酸是棘白霉素、宜他霉素和放线菌素等医药中间体的组成成分。在脯氨酸 -4- 羟化酶的催化作用下，*L*- 脯氨酸可转化为反式 -4- 羟基 -*L*- 脯氨酸，这是一个高耗氧过程。ZHAO 等将 *vgb* 基因整合到表达脯氨酸 -4- 羟化酶的基因工程菌株 *E. coli* 染色体中，在 1.4 L 发酵罐中进行分批补料发酵，VHb 的表达使反式 -4- 羟基 -*L*- 脯氨酸的产量提高了 73.2%，菌体生物量提高了 106% [55]。*L*- 苯丙氨酸是具有生理活性的芳香族氨基酸，可作为一些氨基酸类抗肿瘤药物的中间体。WU 等在 *L*- 苯丙氨酸生产菌株 *E. coli* 中异源表达 VHb，并进行分批补料发酵试验 [56]。结果显示，在低曝气条件下，VHb 表达菌株生长更快，*L*- 苯丙氨酸产量也更高（提高 16.6%）；而在高曝气条件下，VHb 表达菌株与非表达菌株的最终生物量虽然没有显著差异，但 VHb 表达菌株中 *L*- 苯丙氨酸的产量提高了 10.1%；另外，VHb 表达菌株表现出了更高的氧吸收率。乙偶姻是重要的医药中间体，有研究分别将 VHb 在 *E. coli* 中与 2,3- 丁二醇脱氢酶、NADH 氧化酶共表达，用于全细胞生物催化 2,3- 丁二醇转化为乙偶姻，结果显示 VHb 的异源表达有利于促进乙偶姻的生成，原因可能是 VHb 促进了细胞内的氧转移水平，从而提高了用于辅助因子 NAD^+ 再生的氧的供应 [57—58]。

在医药中间体的合成过程中，相较于化学合成，生物催化合成具有绿色环保、催化效率高、反应条件温和等优点。羰基还原酶是一类可催化手性酮生成相应手性醇的生物催化剂，是合成手性医药中间

体的重要工具，可用于生产孟鲁司特钠、阿托伐他汀、依折麦布等的医药中间体。脂肪酶是一类可催化医药中间体手性拆分的生物催化剂，而医药中间体单对映体的生产又在制药工业中至关重要，例如氯吡格雷、普瑞巴林、硫酸沃拉帕沙等的合成都需要使用手性医药中间体。因此，提高生物酶产量和酶活对于利用生物催化技术合成医药中间体具有重要意义与价值。近年来，有关利用 VHb 与生物酶在基因工程菌株中的共表达来提高酶产量及酶活的研究相继被报道。

为减轻高密度发酵条件下的呼吸限制并增加脂肪酶 *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2（YlLIP2）的产量，WANG 等将 VHb 和脂肪酶 YlLIP2 在 *Pichia pastoris* 中共表达 [59]，在 10 L 发酵罐、较低的溶氧水平下，VHb^+ 菌株的生物量为 VHb^- 菌株的 1.11 倍，VHb^+ 菌株中脂肪酶 YlLIP2 的最高活性为 VHb^- 菌株的 1.84 倍，综合考虑，VHb^+ 菌株生产脂肪酶 YlLIP2 的能力是 VHb^- 菌株的 1.91 倍。此外，与 VHb^- 菌株相比，VHb^+ 菌株在限氧和非限氧条件下均表现出较高的吸氧率和细胞活力。ZHOU 等也将 VHb 与突变的脂肪酶 YlLIP2 在 *Pichia pastoris* 中共表达，在 3 L 发酵罐中进行培养，发酵结果显示，在高溶氧（50%）和低溶氧（10%）条件下，VHb 表达菌株中的脂肪酶 YlLIP2 均表现出较高的活性 [60]。张晓龙等将 VHb 与 β- 甘露聚糖酶在 *Pichia pastoris* 中共表达，突破了基因工程菌株高密度发酵生产 β- 甘露聚糖酶过程中的溶氧限制，提高了 β- 甘露聚糖酶的产量 [61]。为解决高密度发酵生产 β- 葡萄糖苷酶过程中溶氧不足的问题，邓发军等在 *E. coli* 中共表达 VHb 和 β- 葡萄糖苷酶，在 3 L 发酵罐中进行高密度发酵，相较于 VHb^- 菌株，VHb^+ 菌株的生物量提高了 37.50%，β- 葡萄糖苷酶发酵总酶活提高了 35.57%，原因是 VHb 的表达提升了菌体对低溶氧水平的耐受能力 [62]。

据我们所知，VHb 应用于催化医药中间体所需生物酶生产的直接研究报道比较少，但从 VHb 与其他生物酶共表达所表现出的优势可以看出，VHb 异源表达具有促进细胞高密度发酵生产生物酶的潜力，在一定程度上可以增加利用生物催化技术合成医药中间体所需生物酶的供应来源。

3.4 VHb 在保健品功能因子及生物医疗材料生产中的应用

花生四烯酸（ARA）可作为预防心脑血管疾病以及健脑益智保健品中的功能因子。氧利用效率是影响 *Mortierella alpina* 生长和大规模发酵生产 ARA 的关键因素，ZHANG 等将 VHb 在 *Mortierella alpina* 中进行异源表达，结果显示 VHb 的表达可以显著提高溶氧的利用率 [63]。在限氧和非限氧条件下，VHb^+ 菌株生长均较快；在微氧环境下，VHb^+ 菌株中 ARA 产量是 VHb^- 菌株的 8 倍；在正常条件下，VHb^+ 菌株的 ARA 产量比野生型高 1.6 倍。虾青素是一种强抗氧化剂，可提高组织抗氧化水平；二十二碳六烯酸（DHA）是一种辅助脑细胞发育的功能因子。YE 等报道 VHb 的异源表达可以提高 *Aurantiochytrium* sp. SK4 生物合成虾青素和 DHA 产量 [64]。

生物医疗材料所包含的某些生物大分子聚合物可以通过微生物发酵生产，利用基因工程手段异源表达 VHb 对微生物生产生物大分子聚合物具有促进作用。PHB 是一种药物缓释载体材料，HORNG 等在 *E. coli* 中建立了一种通过 *phaCAB* 基因和 *vgb* 基因共表达来促进 PHB 生物合成的方法，结果显示 VHb 的表达与 PHB 的生物合成呈正相关，并且细胞密度也得到了提高 [65]。γ- 聚谷氨酸（γ-PGA）有利于骨质疏松症患者吸收钙，并且可以作为药物缓释和靶向载体、止血剂以及软组织填充物。ATP 供应在 γ-PGA 生物合成中起重要作用。为缓解发酵过程中低溶氧水平的制约、提高 γ-PGA 的产量，SU 等将 *vgb* 基因整合到 *Bacillus subtilis* 染色体中，并在 γ-PGA 生产过程中进行表达，发酵结果显示 VHb 的表达可使菌株在高密度发酵条件下的生长速率提高 1.26 倍，γ-PGA 产量提高 2.07 倍 [66]。ZHANG 等将 VHb 在产 γ-PGA 菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 中进行表达，最终 γ-PGA 产量增加 30%，生物量增加 7.9% [67]。CAI 等利用 VHb 在 *Bacillus licheniformis* 中的异源表达，使

VHb^+ 重组菌株的 γ-PGA 产量提高了 13.32%，ATP 含量提高了 15.19% [68]。ε- 聚赖氨酸（ε-PL）是一种新型生物活性聚合物，广泛应用于医疗与制药方面。为减轻氧限制并增强深层发酵中 ε-PL 的生物合成，GU 等在 *Streptomyces albulus* NK660 中表达 VHb，结果显示能够促进 ε-PL 的生物合成 [69]。XU 等在 *Streptomyces albulus* PD-1 染色体上整合表达 VHb，也得到了同样的结果；并且通过对发酵过程中氧吸收率、ε-PL 合成酶基因的转录水平以及 ATP 水平的测定，验证了 VHb 的表达可以改善菌株呼吸和 ATP 供应，从而增强 ε-PL 的生物合成 [70]。

细菌纤维素是一种可用于制造人造皮肤、人造血管的新型生物医疗材料，可由醋酸菌属微生物发酵合成。将 *vgb* 基因整合到 *Acetobacter xylinum* 染色体上表达 VHb，在静态及微氧状态下培养，均观察到 VHb^+ 菌株生产的细菌纤维素较 VHb^- 菌株明显提高 [71—72]。此外，LIU 等的研究结果显示，在 *Gluconacetobacter xylinus* 中异源表达 VHb，VHb^+ 菌株在微氧条件下的细菌纤维素产量也较高 [73]。结冷胶可与硫酸化透明质酸组成一种可以防止脊髓粘连的生物医疗材料。有研究分别将 *vgb* 基因在 *Sphingomonas elodea* 和 *Sphingomonas paucimobilis* JLJ 中进行异源表达，结果均显示 VHb 对细胞生长具有显著的促进作用，并且可以提高 VHb^+ 重组菌株发酵生产结冷胶的产量 [74—75]。威兰胶可应用于药物的缓释控制，在 *Alcaligenes* sp. ATCC31555 中异源表达 VHb 可以促进威兰胶的发酵生产 [76]。LIU 等在菌株 *Sphingomonas* sp. HT-1 中异源表达 VHb，通过对重组菌株发酵过程中电子传递链、TCA 循环、威兰胶合成通路关键基因的转录水平以及 ATP 水平进行分析，表明 VHb 可以通过改善呼吸与 ATP 供应促进威兰胶的生物合成 [77]。普鲁兰多糖被广泛应用于药物胶囊的制作，可由 *Aureobasidium* spp. 发酵产生。因普鲁兰多糖的发酵溶液黏度过高，限制了其培养过程中的氧转移水平。XUE 等在普鲁兰多糖生产菌株 *Aureobasidium melanogenum* P16 中过表达 VHb，在 10 L 发酵罐中进行培养，结果显示，VHb 的过表达显著提高了普鲁兰多糖的浓度、产量、生产力以及糖利用率 [78]。赤藓糖醇可用作包衣材料、压片辅料等。MIROŃCZUK 等为使赤藓糖醇生产菌株 *Yarrowia lipolytica* 可以高效生长以及在低氧条件下有效合成赤藓糖醇，将 VHb 在该赤藓糖醇生产菌株中进行异源表达，发酵结果表明，VHb 表达菌株显示出了更高的赤藓糖醇生产能力 [79]。

4 总结

VHb 在细菌、真菌和高等植物中均可以异源表达并具有生物活性。VHb 独特的蛋白结构决定了其特有的功能，以其氧合态参与和氧有关的代谢，通过将氧传递给呼吸链，从而提高氧化磷酸化效率，改善低氧条件下细胞的代谢途径，以至影响到某些基因的表达 [15—16,80]。VHb 可以缓冲由细胞外溶氧波动所引起的胞内氧化还原扰动，有利于维持细胞稳态生长 [81]。另外，VHb 会引起胞内核糖体和 tRNA 水平的提高，可能会促进上调胞内蛋白的翻译水平 [82—83]。因此，VHb 有利于细胞生长、代谢产物合成、重组蛋白表达以及酶活的提升等，特别是在低氧条件下。

利用微生物生产药物及相关医药产品的过程中，高密度细胞培养可以实现体积产率的最大化，但发酵后期溶氧不足往往是限制细胞密度以及产物生成量的重要因素。某些微生物（如链霉菌、霉菌等）在发酵过程中同样也会因产生菌丝体，以及培养基黏稠等因素，出现溶氧不足的问题。在一些药用植物的细胞培养中，也存在氧传输效率不高的制约因素。对于溶氧不足的问题，传统发酵工业通常利用设备加强搅拌和曝气，以及添加纯氧或富氧的方式来增加供氧，这些传统方法通常效率低且成本昂贵，同时也容易对敏感的细胞造成机械压力，并且反应器中也容易形成泡沫。

使用 *vgb*/VHb 代谢工程异源表达 VHb 可以增强微生物或植物生产天然产物药物、药物前体或医药中间体、保健品功能因子及生物医疗材料等化合物的能力，在一定程度上可以提高生物催化医药中间体生成所需生物酶的产量与活力，是一种有效、经济且必要的缓解溶氧不足的手段。虽然利用 *vgb*/

VHb代谢工程在生物医药生产中取得了一定的进展，但是VHb在细胞内的作用机制仍然不是很明确，这在一定程度上限制了VHb潜力的进一步发挥。此外，VHb在细胞代谢中的稳定调控和长期调控仍有待深入研究，以便进一步拓展VHb在生物医药生产中的应用。

参考文献：

[1] WEBSTER D A, HACKETT D P. The purification and properties of cytochrome *o* from *Vitreoscilla* [J]. *J Biol Chem*, 1966, **241**(14): 3308-3315.

[2] WAKABAYASHI S, MATSUBARA H, WEBSTER D A. Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla* [J]. *Nature*, 1986, **322**(6078): 481-483.

[3] KHOSLA C, BAILEY J E. The *Vitreoscilla* hemoglobin gene: molecular cloning, nucleotide sequence and genetic expression in *Escherichia coli* [J]. *Mol Gen Genet,* 1988, **214**(1): 158-161.

[4] KHOSLA C, BAILEY J E. Heterologous expression of a bacterial haemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli* [J]. *Nature*, 1988, **331**(6157): 633-635.

[5] DIKSHIT K L, WEBSTER D A. Cloning, characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli* [J]. *Gene*, 1988, **70**(2): 377-386.

[6] KHOSLA C, BAILEY J E. Characterization of the oxygen-dependent promoter of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 1989, **171**(11): 5995-6004.

[7] DIKSHIT K L, DIKSHIT R P, WEBSTER D A. Study of *Vitreoscilla* globin (*vgb*) gene expression and promoter activity in *E. coli* through transcriptional fusion [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(14): 4149-4155.

[8] WU H, WANG H, CHEN J C, *et al*. Effects of cascaded *vgb* promoters on poly(hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* grown micro-aerobically [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, **98**(24): 10013-10021.

[9] OUYANG P F, WANG H, HAJNAL I, *et al*. Increasing oxygen availability for improving poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas* [J]. *Metab Eng*, 2018, **45**: 20-31.

[10] 吴　奕, 杨胜利. 透明颤菌血红蛋白基因调控与功能的研究[J]. 生物工程学报, 1997, **13**(1): 3-7.

[11] 竺　嘉. *Vitreoscilla*血红蛋白基因的研究[D]. 上海: 中国科学院上海药物研究所博士学位论文, 1994.

[12] JOSHI M, DIKSHIT K L. Oxygen dependent regulation of *Vitreoscilla* globin gene: evidence for positive regulation by FNR [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **202**(1): 535-542.

[13] YANG J G, WEBSTER D A, STARK B C. ArcA works with *Fnr* as a positive regulator of *Vitreoscilla*(bacterial) hemoglobin gene expression in *Escherichia coli* [J]. *Microbiol Res*, 2005, **160**(4): 405-415.

[14] ANAND A, DUK B T, SINGH S, *et al*. Redox-mediated interactions of VHb(*Vitreoscilla* haemoglobin) with OxyR: novel regulation of VHb biosynthesis under oxidative stress [J]. *Biochem J*, 2010, **426**(3): 271-280.

[15] STARK B C, PAGILLA K R, DIKSHIT K L. Recent applications of *Vitreoscilla* hemoglobin technology in bioproduct synthesis and bioremediation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, **99**(4): 1627-1636.

[16] ZHANG L, LI Y J, WANG Z N, *et al*. Recent developments and future prospects of *Vitreoscilla* hemoglobin application in metabolic engineering [J]. *Biotechnol Adv*, 2007, **25**(2): 123-136.

[17] ORII Y, WEBSTER D A. Photodissociation of oxygenated cytochrome *o*(*s*) (*Vitreoscilla*) and kinetic studies of reassociation [J]. *J Biol Chem*, 1986, **261**(8): 3544-3547.

[18] WEBSTER D A. Structure and function of bacterial hemoglobin and related proteins [J]. *Adv Inorg Biochem*, 1988, **7**: 245-265.

[19] DIKSHIT K L, ORII Y, NAVANI N, *et al*. Site-directed mutagenesis of bacterial hemoglobin: the role of glutamine(E7) in oxygen-binding in the distal heme pocket [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, **349**(1): 161-166.

[20] VERMA S, PATEL S, KAUR R, *et al*. Mutational study of the bacterial hemoglobin distal heme pocket [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **326**(2): 290-297.

[21] TARRICONE C, GALIZZI A, CODA A, *et al*. Unusual structure of the oxygen-binding site in the dimeric bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* sp [J]. *Structure*, 1997, **5**(4): 497-507.

[22] DIKSHIT R P, DIKSHIT K L, LIU Y X, *et al*. The bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of *Escherichia coli* lacking terminal oxidases [J]. *Arch*

Biochem Biophys, 1992, **293**(2): 241-245.

[23] KVIST M, RYABOVA E S, NORDLANDER E, *et al*. An investigation of the peroxidase activity of *Vitreoscilla* hemoglobin [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2007, **12**(3): 324-334.

[24] FISH P A, WEBSTER D A, STARK B C. *Vitreoscilla* hemoglobin enhances the first step in 2,4-dinitrotoluene degradation *in vitro* and at low aeration *in vivo* [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2000, **9**(1-3): 75-82.

[25] LIN J M, STARK B C, WEBSTER D A. Effects of *Vitreoscilla* hemoglobin on the 2,4-dinitrotoluene(2,4-DNT) dioxygenase activity of *Burkholderia* and on 2,4-DNT degradation in two-phase bioreactors [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, **30**(6): 362-368.

[26] URGUN-DEMIRTAS M, PAGILLA K R, STARK B C. Enhanced kinetics of genetically engineered *Burkholderia cepacia*: role of *vgb* in the hypoxic metabolism of 2-CBA [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **87**(1): 110-118.

[27] ROOS V, ANDERSSON C I J, BÜLOW L. Gene expression profiling of *Escherichia coli* expressing double *Vitreoscilla* hemoglobin [J]. *J Biotechnol*, 2004, **114**(1/2): 107-120.

[28] ISARANKURA-NA-AYUDHYA C, PANPUMTHONG P, TANGKOSAKUL T, *et al*. Shedding light on the role of *Vitreoscilla* hemoglobin on cellular catabolic regulation by proteomic analysis [J]. *Int J Biol Sci*, 2008, **4**(2): 71-80.

[29] KHOSLA C, BAILEY J E. Evidence for partial export of *Vitreoscilla* hemoglobin into the periplasmic space in *Escherichia coli*. Implications for protein function [J]. *J Mol Biol*, 1989, **210**(1): 79-89.

[30] KALLIO P T, KIM D J, TSAI P S, *et al*. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions [J]. *Eur J Biochem*, 1994, **219**(1/2): 201-208.

[31] TONG Y J, WHITFORD C M, BLIN K, *et al*. CRISPR-Cas9, CRISPRi and CRISPR-BEST-mediated genetic manipulation in *Streptomycetes* [J]. *Nat Protoc*, 2020, **15**(8): 2470-2502.

[32] DEMODENA J A, GUTIÉRREZ S, VELASCO J, *et al*. The production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum* is improved by the intracellular expression of a bacterial hemoglobin [J]. *Biotechnology*(N Y), 1993, **11**(8): 926-929.

[33] LIU Y, GONG G H, XIE L P, *et al*. Improvement of cephalosporin C production by recombinant DNA integration in *Acremonium chrysogenum* [J]. *Mol Biotechnol*, 2010, **44**(2): 101-109.

[34] WANG S H, LIU F, HOU Z W, *et al*. Enhancement of natamycin production on *Streptomyces gilvosporeus* by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene(*vgb*) [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, **30**(4): 1369-1376.

[35] WANG H X, HE X H, SUN C J, *et al*. Enhanced natamycin production by co-expression of *Vitreoscilla* hemoglobin and antibiotic positive regulators in *Streptomyces gilvosporeus* [J]. *Biotechnol Biotec Eq*, 2018, **32**(2): 470-476.

[36] MA Z, LIU J X, BECHTHOLD A, *et al*. Development of intergeneric conjugal gene transfer system in *Streptomyces diastatochromogenes* 1628 and its application for improvement of toyocamycin production [J]. *Curr Microbiol*, 2014, **68**(2): 180-185.

[37] TAO L B, MA Z, XU X H, *et al*. Engineering *Streptomyces diastatochromogenes* 1628 to increase the production of toyocamycin [J]. *Eng Life Sci*, 2015, **15**(8): 779-787.

[38] BRÜNKER P, MINAS W, KALLIO P T, *et al*. Genetic engineering of an industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea* for stable expression of the *Vitreoscilla* haemoglobin gene(*vhb*) [J]. *Microbiology*(Reading), 1998, **144**(Pt 9): 2441-2448.

[39] MINAS W, BRÜNKER P, KALLIO P T, *et al*. Improved erythromycin production in a genetically engineered industrial strain of *Saccharopolyspora erythraea* [J]. *Biotechnol Prog*, 1998, **14**(4): 561-566.

[40] 孟 春, 叶 勤, 石贤爱, 等. 透明颤菌血红蛋白基因在金色链霉菌中的克隆与表达[J]. 微生物学报, 2002, **42**(3): 305-310.

[41] LUO Y S, KOU X X, DING X Z, *et al*. Promotion of spinosad biosynthesis by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Saccharopolyspora spinosa* [J]. *Sci China Life Sci*, 2012, **55**(2): 172-180.

[42] WANG T, BAI L Q, ZHU D Q, *et al*. Enhancing macrolide production in *Streptomyces* by coexpressing three heterologous genes [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2012, **50**(1): 5-9.

[43] 余志拓, 沈晓放, 吴远杰, 等. 在吸水链霉菌中表达透明颤菌血红蛋白基因提高子囊霉素产量[J]. 中国医药工业杂志, 2017, **48**(6): 844-849.

［44］ MEJÍA A, LUNA D, FERNÁNDEZ F J, *et al*. Improving rifamycin production in *Amycolatopsis mediterranei* by expressing a *Vitreoscilla* hemoglobin(*vhb*) gene fused to a cytochrome P450 monooxygenase domain［J］. *3 Biotech*, 2018, **8**(11): 456.

［45］ 倪　辉, MOHSIN A, 曹君书, 等. 透明颤菌血红蛋白基因在龟裂链霉菌中的表达及其对土霉素合成的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2018, **43**(8): 1034-1042.

［46］ LEE M J, DUONG C T P, HAN K, *et al*. Combination strategy to increase cyclosporin A productivity by *Tolypocladium niveum* using random mutagenesis and protoplast transformation［J］. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, **19**(9): 869-872.

［47］ LI J, ZHANG Y S. Modulating betulinic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by managing the intracellular supplies of the co-factor NADPH and oxygen［J］. *J Biosci Bioeng*, 2015, **119**(1): 77-81.

［48］ WANG Q, YU H M, WANG M M, *et al*. Enhanced biosynthesis and characterization of surfactin isoforms with engineered *Bacillus subtilis* through promoter replacement and *Vitreoscilla* hemoglobin co-expression［J］. *Process Biochem*, 2018, **70**: 36-44.

［49］ WILHELMSON A, KALLIO P T, OKSMAN-CALDENTEY K M, *et al*. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin enhances growth of *Hyoscyamus muticus* hairy root cultures［J］. *Planta Med*, 2005, **71**(1): 48-53.

［50］ GUO Z Y, TAN H X, LV Z Y, *et al*. Targeted expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves the production of tropane alkaloids in *Hyoscyamus niger* hairy roots［J］. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 17969.

［51］ 王子艳, 胡之璧, 王峥涛. 透明颤菌血红蛋白对黄芪甲苷生物合成的调控作用[J]. 药学学报, 2011, **46**(3): 355-360.

［52］ SHEN J H, ZHENG H N, ZHI X H, *et al*. Improvement of amorpha-4,11-diene production by a yeast-conform variant of *Vitreoscilla* hemoglobin［J］. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2012, **67**(3-4): 195-207.

［53］ ZHANG X, XU C, LIU Y L, *et al*. Enhancement of glucaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by expressing *Vitreoscilla* hemoglobin［J］. *Biotechnol Lett*, 2020, **42**(11): 2169-2178.

［54］ KURT A G, AYTAN E, OZER U, *et al*. Production of *L*-DOPA and dopamine in recombinant bacteria bearing the *Vitreoscilla* hemoglobin gene［J］. *Biotechnol J*, 2009, **4**(7): 1077-1088.

［55］ ZHAO T X, LI M, ZHENG X, *et al*. Improved production of trans-4-hydroxy-*L*-proline by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene into recombinant *Escherichia coli* with expression of proline-4-hydroxylase［J］. *J Biosci Bioeng*, 2017, **123**(1): 109-115.

［56］ WU W B, GUO X L, ZHANG M L, *et al*. Enhancement of l-phenylalanine production in *Escherichia coli* by heterologous expression of *Vitreoscilla* hemoglobin［J］. *Biotechnol Appl Biochem*, 2018, **65**(3): 476-483.

［57］ GUO Z W, ZHAO X H, HE Y Z, *et al*. Efficient (3*R*)-acetoin production from *meso*-2,3-butanediol using a new whole-cell biocatalyst with co-expression of *meso*-2,3-butanediol dehydrogenase, NADH oxidase, and *Vitreoscilla* hemoglobin［J］. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, **27**(1): 92-100.

［58］ HE Y Z, CHEN F X, SUN M J, *et al*. Efficient (3*S*)-acetoin and (2*S*,3*S*)-2,3-butanediol production from *meso*-2,3-butanediol using whole-cell biocatalysis［J］. *Molecules*, 2018, **23**(3): 691.

［59］ WANG X F, SUN Y C, SHEN X G, *et al*. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves production of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in a recombinant *Pichia pastoris*［J］. *Enzyme Microb Technol*, 2012, **50**(1): 22-28.

［60］ ZHOU Q H, SU Z X, JIAO L C, *et al*. High-level production of a thermostable mutant of *Yarrowia lipolytica* lipase 2 in *Pichia pastoris*［J］. *Int J Mol Sci*, 2019, **21**(1): 279.

［61］ 张晓龙, 肖　静, 王瑞明, 等. 共表达透明颤菌血红蛋白对毕赤酵母产β-甘露聚糖酶发酵过程的影响[J]. 生物技术通报, 2015, **31**(12): 193-199.

［62］ 邓发军, 潘　宇, 常　飞, 等. β-葡萄糖苷酶与透明颤菌血红蛋白在大肠杆菌中的共表达[J]. 生物工程学报, 2018, **34**(3): 379-388.

［63］ ZHANG H D, FENG Y G, CUI Q, *et al*. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin enhances production of arachidonic acid and lipids in *Mortierella alpina*［J］. *BMC Biotechnol*, 2017, **17**(1): 68.

［64］ YE J R, LIU M M, HE M X, *et al*. Illustrating and enhancing the biosynthesis of astaxanthin and docosahexaenoic acid in *Aurantiochytrium* sp. SK4［J］. *Mar Drugs*, 2019, **17**(1): 45.

[65] HORNG Y T, CHANG K C, CHIEN C C, *et al*. Enhanced polyhydroxybutyrate(PHB) production via the coexpressed *phaCAB* and *vgb* genes controlled by arabinose P promoter in *Escherichia coli* [J]. *Lett Appl Microbiol,* 2010, **50**(2): 158-167.

[66] SU Y S, LI X, LIU Q Z, *et al*. Improved poly-gamma-glutamic acid production by chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene(*vgb*) in *Bacillus subtilis* [J]. *Bioresour Technol*, 2010, **101**(12): 4733-4736.

[67] ZHANG W, XIE H, HE Y L, *et al*. Chromosome integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene(*vgb*) mediated by temperature-sensitive plasmid enhances γ-PGA production in *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, **343**(2): 127-134.

[68] CAI D B, CHEN Y Z, HE P H, *et al*. Enhanced production of poly-γ-glutamic acid by improving ATP supply in metabolically engineered *Bacillus licheniformis* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2018, **115**(10): 2541-2553.

[69] GU Y Y, WANG X M, YANG C, *et al*. Effects of chromosomal integration of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene(*vgb*) and *S*-adenosylmethionine synthetase gene(*metK*) on ε-poly-*L*-lysine synthesis in *Streptomyces albulus* NK660 [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, **178**(7): 1445-1457.

[70] XU Z X, CAO C H, SUN Z Z, *et al*. Construction of a genetic system for *Streptomyces albulus* PD-1 and improving poly(ε-*L*-lysine) production through expression of *Vitreoscilla* hemoglobin [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, **25**(11): 1819-1826.

[71] CHIEN L J, CHEN H T, YANG P F, *et al*. Enhancement of cellulose pellicle production by constitutively expressing *Vitreoscilla* hemoglobin in *Acetobacter xylinum* [J]. *Biotechnol Prog*, 2006, **22**(6): 1598-1603.

[72] SETYAWATI M I, CHIEN L J, LEE C K. Expressing *Vitreoscilla* hemoglobin in statically cultured *Acetobacter xylinum* with reduced O_2 tension maximizes bacterial cellulose pellicle production [J]. *J Biotechnol,* 2007, **132**(1): 38-43.

[73] LIU M, LI S Q, XIE Y Z, *et al*. Enhanced bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* via expression of *Vitreoscilla* hemoglobin and oxygen tension regulation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, **102**(3): 1155-1165.

[74] WU X C, CHEN Y M, LI Y D, *et al*. Constitutive expression of *Vitreoscilla* haemoglobin in *Sphingomonas elodea* to improve gellan gum production [J]. *J Appl Microbiol*, 2011, **110**(2): 422-430.

[75] JI Q, LI D, LI X, *et al*. Enhancement of gellan production in *Sphingomonas paucimobilis* JLJ by heterogeneous expression of *Vitreoscilla* hemoglobin [M]// ZHANG T C, NAKAJIMA M. Advances in applied biotechnology. Lecture notes in electrical engineering, vol 332. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015.

[76] ZHANG W W, CHEN Z H, WU M M, *et al*. Improved production of carotenoid-free welan gum in a genetic-engineered *Alcaligenes* sp. ATCC31555 [J]. *Biotechnol Lett*, 2016, **38**(6): 991-997.

[77] LIU X L, ZHU P, JIANG R F, *et al*. Enhancement of welan gum production in *Sphingomonas* sp. HT-1 via heterologous expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, **156**: 135-142.

[78] XUE S J, JIANG H, CHEN L, *et al*. Over-expression of *Vitreoscilla* hemoglobin(VHb) and flavohemoglobin(FHb) genes greatly enhances pullulan production [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **132**: 701-709.

[79] MIROŃCZUK A M, KOSIOROWSKA K E, BIEGALSKA A, *et al*. Heterologous overexpression of bacterial hemoglobin VHb improves erythritol biosynthesis by yeast *Yarrowia lipolytica* [J]. *Microb Cell Fact*, 2019, **18**(1): 176.

[80] 裴海生, 杨 光, 李 春, 等. 透明颤菌血红蛋白的研究进展及其在发酵工业中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2008, **28**(7): 133-138.

[81] TSAI P S, RAO G, BAILEY J E. Improvement of *Escherichia coli* microaerobic oxygen metabolism by *Vitreoscilla* hemoglobin: new insights from NAD(P)H fluorescence and culture redox potential [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **47**(3): 347-354.

[82] NILSSON M, KALLIO P T, BAILEY J E, *et al*. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Escherichia coli* enhances ribosome and tRNA levels: a flow field-flow fractionation study [J]. *Biotechnol Prog*, 1999, **15**(2): 158-163.

[83] ROOS V, ANDERSSON C I, ARFVIDSSON C, *et al*. Expression of double *Vitreoscilla* hemoglobin enhances growth and alters ribosome and tRNA levels in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Prog*, 2002, **18**(3): 652-656.