

文章编号:2095-7386(2016)01-0001-09

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.01.001

细菌血红蛋白及在生物工程领域的应用研究进展

熊 炜, 许 力, 杨江科

(武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023)

摘 要: 在需氧发酵的过程中,溶解氧是细胞生长的主要限制性因素。在生物工程领域,为维持溶液中合适浓度的溶解氧,则需要有复杂的生物反应器和严谨的发酵参数控制。在发酵条件下,提高细胞的氧的利用效率是克服生物反应器中的氧气不足的一种新型、高效的解决方案。细菌血红蛋白是氧结合蛋白,它能从环境中主动转运氧至代谢过程,并允许细菌即使在微需氧条件下生长。因此,通过细菌血红蛋白的异源表达可获得氧利用率高的“底盘”细胞,提高生产效率。阐述了细菌血红蛋白的分类和分布,重点综述了三类细菌血红蛋白的结构与功能,以及其在生物工程领域的应用状况及进展,拟为后续研究和广泛应用提供参考与借鉴。

关键词: 细菌血红蛋白;分类;结构;功能;应用

中图分类号: Q 939.9

文献标识码: A

Proceeding on the bacteria hemoglobins and their application in biological engineering field

XIONG Wei, XU Li, YANG Jiang-ke

(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

Abstract: In aerobic cultivation process, dissolved oxygen in aqueous solution is critical for the efficient operation of bioreactors. In the field of biological engineering, it needs complex biological reactor design and strict control of fermentation parameters to maintain an appropriate concentration of dissolved oxygen in aqueous solution. Under the fermentation conditions, improving the oxygen utilization efficiency of cells is a novel and efficient solution to overcome the oxygen shortage in bioreactor. Bacteria hemoglobin is an oxygen-binding protein that transfers oxygen from the environment to the metabolism process, and allows bacteria to grow even under microaerophilic conditions. Thus, high oxygen utilization cell can be obtained to improve production efficiency by the expression of heterologous bacterial hemoglobin. This review describes the classification and distribution of bacterial hemoglobin, and focuses on the structure and function of the three bacterial hemoglobins. We also discussed the applications of three bacterial hemoglobins in the field of bioengineering, which will provides reference for the follow-up bio-application and researches.

Key words: bacterial hemoglobin; classification; structure; function

收稿日期:2015-12-02.

作者简介:熊炜(1991-),女,硕士研究生,E-mail:xiongwei910702@126.com.

通信作者:杨江科(1972-),男,博士,E-mail:yangjiangke@yahoo.com.

基金项目:湖北省科技厅科技支撑计划项目(2014BBB007);武汉轻工大学2013年研究生创新基金(2013CX019).

1 引言

氧是需氧微生物生长所必须的要素。氧参与微生物的新陈代谢,可使细胞能最高水平利用底物产生能量,并在细胞内通过改变特定蛋白的功能和影响细胞内转录子进而影响蛋白质的生物合成来参与多种细胞功能的调节^[1]。由于气(氧气)/液(水相)传质阻力,氧的水溶解度非常低。在生物反应器中,由于对最高的生产效率的追求,微生物和培养的细胞的对氧气的需求很高,尤其是在大规模和高细胞密度的生产工艺中,溶解氧已成为细胞生长的主要限制性因素。在工程领域中,通常通过改进发酵工艺参数和生物反应器的构型来满足和缓解细胞对氧的高需求^[2]。这不仅需要复杂的系统设计和工艺设定,而且通过改变发酵参数和反应器等条件只能在有限范围内适用。因此,生产菌对氧的需求量与发酵设备供氧仍是目前在微生物发酵工业中普遍存在的矛盾。

在生物体内,血红蛋白(hemoglobin)是与氧的利用率最密切相关的蛋白质分子。无论是在功能还是在分子结构上,它是最具有典型特征的氧结合蛋白质。很早以前,血红蛋白被认为只存在于哺乳动物,但最近的研究结果表明它不仅存在于哺乳动物,还存在于无脊椎动物、植物和细菌中。

2 细菌血红蛋白的起源和 Vhb

目前,在细菌中共发现有三类血红蛋白,即单结构域血红蛋白、黄素血红蛋白和截断血红蛋白。

1953 年 Keilin 和他的合作者在酵母中发现含黄素部分的血红蛋白样细胞色素,并将之定义为“酵母血红蛋白”^[3]。1979 年 Probst 等将 *Ralstonia eutropha* 中含黄素部分的血红蛋白正式定名为黄素血红蛋白^[4]。截断血红蛋白最早是在草履虫中发现的,通过光谱学实验证明了它属于血红蛋白,但是它比一般的非脊椎动物血红蛋白少 20—40 个氨基酸,后来被命名为截断血红蛋白。透明颤菌血红蛋白(*Vitreoscilla* Hemoglobin, Vhb)是目前研究最为透彻的细菌血红蛋白。1966 年 Webster 和 Hackett 发现透明颤菌(*Vitreoscilla*)中存在一类种氧结合蛋白,即 Vhb^[5]。但 Vhb 一直被误认为是终端呼吸氧化酶或者细胞色素 *c*。1983 年 DeMaio 等在透明颤菌中发现了另一种与膜结合的细胞色素 *c*,它与 CO 配体结合在细胞膜上,并被证明是真正的终端氧化酶^[6]。1986 年 Wakabayashi 等^[7]将 Vhb 的氨基酸

序列与其他物种的血红蛋白序列对比发现 Vhb 与血红蛋白序列相似性很高;进一步实验又证明在有氧条件下,该蛋白的 CO 结合物和氧结合物都会光解,这与终端氧化酶和细胞色素 *c* 功能不同,而与氧结合蛋白如血红蛋白、肌动血红蛋白的功能类似,从而最终证明了 Vhb 不是细胞色素 *c*,而是血红蛋白。

黄素血红蛋白和单结构域血红蛋白的分布比较集中,黄素血红蛋白主要分布在贪铜菌属、伯克氏菌属、假单胞菌属和芽孢杆菌属。单结构域血红蛋白主要分布在贝日阿托氏菌属、梭形杆菌属、芽孢杆菌属和动物性球菌属。截断血红蛋白的分布比较分散,存在的菌属比较多样,基本属于放线菌目和根瘤菌目,如图 1 所示(图中所列序列来源于 GenBank;序列的 Multi-alignment 分析采用 Cluster W 程序进行分析;系统发育关系 Mega 4.0 软件的辅助下,采用 Neighbour-joining 法进行分析)。

由图 1 可知,细菌血红蛋白在系统发育上分为两大类群:黄素血红蛋白和单结构域血红蛋白组成群 I,截断血红蛋白单独聚为群 II。这表明,截断血红蛋白并不仅仅单纯的在一级结构上比单结构域血红蛋白截短一部分或在三级结构上比单结构域血红蛋白少一个 α -螺旋组成,而且更重要的是在系统发育和进化关系上显著不同于后者。

所有的细菌血红蛋白都可以追溯到同一祖先,Scott 和 Lecomte 曾分析现有血红蛋白的氨基酸和基因序列,发现所有的血红蛋白都是从古老的血红素蛋白进化而来,而且早在大气出现之前这些蛋白已经存在^[8]。之后分化成截断血红蛋白和黄素血红蛋白,部分黄素血红蛋白进一步进化成单结构域血红蛋白。

3 细菌血红蛋白的结构与功能

通常,血红蛋白分为脊椎动物和无脊椎生物血红蛋白。脊椎动物的血红蛋白主要是人血红蛋白(human hemoglobin)。人血红蛋白是杂四聚体,由 2 个 α 亚基和 2 个 β 亚基构成,分子形态近似球型,如图 2^[9]所示。人血红蛋白含有 4 个血红素,能结合 4 个 O_2 分子,作为氧结合部位的空穴有两个关键的组氨酸残基(E7 和 F8)和两个疏水残基(Phe CD1 和 Leu F4)。无脊椎生物血红蛋白包括在植物、真菌、原生动物和细菌中发现的血红蛋白。所有血红蛋白的共同特点是它们能可逆地结合氧。对各种来源的血红蛋白的蛋白质序列的比对分析发现尽管血红蛋白一级氨基酸序列高度可变但均具有功能性保

守 Motif。如在 Phe-CD1 和 Trp-H7 周围均有疏水氨基酸簇, 而这对蛋白的折叠和稳定至关重要; His-F8、Tyr-G5 和 Glu-H23 形成了氢键网络, 可能调节血红素铁原子性质^[10]。血红蛋白的三级结构是典型的球蛋白结构, 此高度保守的结构由短的中间环

连接的 6 至 8 个 α -螺旋组成, 分别为 A、B、C、D、E、F、G、H 螺旋, 进而形成 three-over-three 折叠的夹芯状组件。而血红素则被疏水性残基包围在这种夹芯状组件中^[1]。



图 1 细菌血红蛋白系统发育树



图 2 人血红蛋白结构图

根据其结构不同, 细菌血红蛋白主要分为三类: 单结构域血红蛋白 (Single domain Hemoglobin,

sdHb), 只有一个结合氧的结构域; 黄素血红蛋白 (flavo-hemoglobins, flavoHb), 比 sdHb 多一个还原酶

结构域;截断血红蛋白(Truncated Hemoglobin, trHb)。三种血红蛋白的结构示意图及典型氨基酸

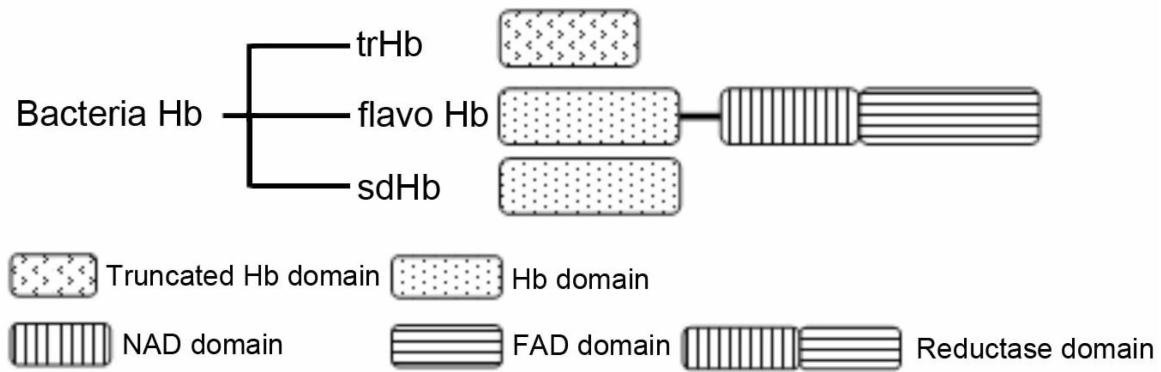


图3 三类细菌血红蛋白的结构特征

		B9	B10	CD1	E7	E11	
FHP	M----	LTQTKDIVKATAPVLA	EHGYDI IKCFYQRMFEAHPELK-NVFNMAHQEQGQQQQA	LARAVYAYAENIEDPNSLM	75		
VHb	M----	LDQQTINI IKATVPVLKEHGV	TITTTTFYKNLFAKHPEVR-PLFDMGRQESLEQPKAL	AMTVLAAAQNIENLPAIL	75		
trHbN	M-----	SLFEQLGGQA	AVTAQFYANI	QADATVA--TFENGIDMPNQTNKTA	AFCAAGGFNAW-----	60	
		F7	F8	G5		H23	
FHP	A--VLKNIAN	KHASLGVKPEQYPIVGEHLLAAI	KEVLGN-AATDDII	SAWAQAYGNLADVLMGMESELYERSAEQPGGWK	152		
VHb	P--AVKKIAV	KHCQAGVAAAHYPIVGEHLLAAI	KEVLGD-AATDDILD	AWGKAYGVIADVFIQVEADLYAQAVE	140		
trHbN	T---GRNLKEV	HANMGVSNAQFTTVIGH	LSALTGAGVAAALVEQTVAVAETVRGDVVTV		117		
				206-209			
FHP	GWRTFVIREKRPESDVITSFILEPADGGPVVNFEPGQYTSVAIDVPALGLQQIRQYSLSDMPNGR	TYRISVKREGG-G-P	230				
FHP	QPPGYVSNLLHDHVNVDQVKLAAPYGSFHIDVDAKTPIVLISGGVGLTPMVSMK-VALQAPPRQVVFVHGARN	SAVHA	309				
FHP	MRDRLREAAKTYENLDFVFDQPL-PEDVQGRDYDYPGLVDVKQIEKSILLP-DADYYICGPIPFMRMQHDALKNLGIH	387					
		394					
FHP	EARIHYEVFGPDLFAE	403					

FHP 是 *R. eutropha* 血红蛋白属于黄素血红蛋白; VHb 是 *Vitreoscilla* 血红蛋白属于单结构域血红蛋白; trHbN 是 *Mycobacterium Tuberculosis* 血红蛋白, 属于截断血红蛋白

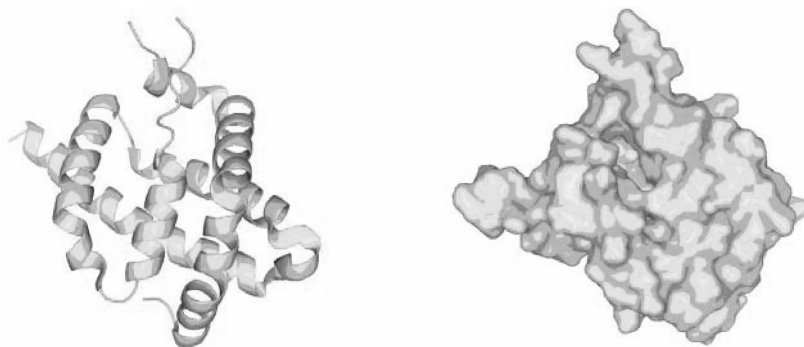
图4 三种典型血红蛋白的氨基酸序列比较

3.1 单结构域血红蛋白

透明颤菌血红蛋白是典型的单结构域的血红蛋白,也是目前研究最为透彻的细菌血红蛋白。

VHb 的晶体结构(图 5^[11])显示,它是由经典的 three-over-three 折叠的球蛋白和结合在保护残基(Phe-CD1, His-F8)上的血红素构成。通常 VHb 是以同型二聚体的形式存在的,这在球蛋白家族中未曾观察到过,是基于螺旋 F 与螺旋 H 两个亚基分子相互作用和涉及的两个亚基之间的范德华力缔合。两个血红素铁原子相互距离为 34 Å^[13]。但是它的亚单体缔合的功能比较弱,在某种条件下 VHb 也能

以具有功能的单体形式存在。VHb 在近端和远端有独特的通过氢键和 TyrB10、GlnE7、ProE8 及 LysE11 四个残基形成的血红素端囊,可能与螺旋 F 与螺旋 E 的干扰有关。另外,大多数血红蛋白的末端 E7 位点都是 His 残基,该残基通过氢键与氧结合,而 VHb 端囊为 Gln-E7。定点突变表明,E7 位点是 Gln 残基而不是 His 残基对 VHb 三维结构影响很大,这也是 VHb 对配体氧亲和力小传送氧速度快的原因^[14]。VHb 在细胞中主要分布在细胞质和细胞周质,分布在细胞周质是由于它 N 末端 16 个氨基酸序列所致^[15]。



A 细菌单结构域血红蛋白三维结构的cartoon图示

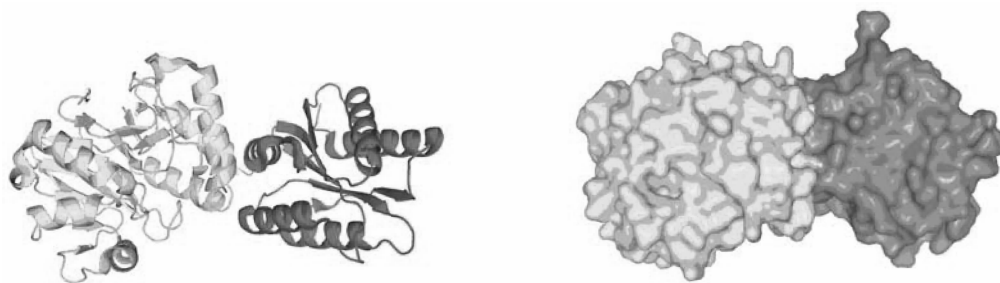
B 细菌单结构域血红蛋白三维结构的surface图示

图5 VHb 结构图

3.2 黄素血红蛋白

黄素血红蛋白(flavoHb)是由N-末端球蛋白结构域(Hb 结构域)和一个C-末端还原酶结构域组成(图6^[16])。与VHb相比,黄素血红蛋白多了一个分子内还原酶结构域。还原酶结构域可以划分成两个功能独立的蛋白质模块:FAD结合域(FAD)和NAD(P)H的结合域(NAD)。flavoHb和VHb的Hb区域是经典的球蛋白折叠。血红素分子嵌入由B,

C,E,F,G,H螺旋形成的疏水裂缝间。多肽链与卟啉环之间的结合力主要是由血红素分子附近的疏水性侧链提供的。flavoHb和VHb结构与哺乳动物Hb很明显的差异就是缺乏D螺旋;C螺旋和E螺旋的氨基酸残基不是采取通常的 α 螺旋构象,而是形成一个环。该环状结构可能是FAD还原酶结构域和球蛋白结构域相互作用位点。



A 细菌黄素血红蛋白三维结构的 cartoon 图示

B 细菌黄素血红蛋白三维结构的 surface 图示

图6 FHP 结构图

相对于经典蛋白折叠结构,flavoHb在结构重排后,近端具有类似于细胞色素c过氧化物酶的催化性质,这为不同生理功能的flavoHb储存氧和传递氧提供强有力的支持。根据拉曼光谱数据,由于与Glu-H23形成强烈的氢键,近端的咪唑环的His-F8拥有咪唑酯的性质^[9]。与单结构域的血红蛋白相比,flavoHb有一个包含NAD(P)H和FAD结合域的C末端还原酶的结构域。还原酶结构域属于NADP⁺铁氧还原蛋白家族^[17]。还原酶结构域可以细分成两个结构上和功能上独立的结构域:FAD结合结构域(FHP中153-258残基,HMP中151-251)和NAD(P)H结合结构域(FHP中266-403残基,HMP中259-396残基)。FAD结合结构域是由一个

六股反向平行 β -桶结构(β -barrel)组成,而NAD(P)H结合结构域是由五股平行的 β -折叠组成。FAD与FHP的全部的三个结构域都以非共价键的方式接触。血红素和FAD分子相互距离分别为6.3 Å(FHP)和5.9 Å(HMP),在由几个氨基酸侧链形成的极性环境中,有利于电子从FAD结构域转移到血红素^[11]。然而,作为NADP⁺铁氧还原蛋白家族的成员,FAD结合结构域和NAD(P)H结合结构域的相对空间重排可能会有差异,但不会影响功能^[17]。

flavoHb的还原酶结构域的一些氨基酸残基是高度保守的。Tyr(FHP:208,HMP:206)联合Lys-F7,Glu(FHP:394,HMP:388)和FAD的异咯嗪环;

Gln(FHP:207,HMP:205),稳定连接 FAD 和血红素的水分子。Arg(FHP:206,HMP:204)、Tyr(FHP:208,HMP:206)和 Ser(FHP:209,HMP:207)稳定 FMN 部分。在 NAD 结合结构域,Glu(FHP:394,HMP:388)是高度保守的,且其侧链与 Lys-F7 形成盐桥。Lys-F7 和 Glu(FHP:394,HMP:388),是极性氨基酸,其主要的大型侧链是所有三个结构域的一部分。这些氨基酸残基可能会影响血红素和 FAD 基团的电势^[9],并且在将电子从 FAD 传递到血红素的结合铁的过程中是必不可少的。Fery 等在 2000 年构建含有 Vhb-NAD(P)H-FAD 的融合蛋白,并检测在宿主细胞中的活力,结果证明这些融合蛋白可以提高在低氧条件下 *E. coli* 菌体生长,比仅含 Vhb 的 *E. coli* 增加 50%—70%^[18]。

flavoHb 能结合各种血红素配体,如 O_2 、CO、NO 和 CN^- 。HMP 能通过 FAD 将电子给血红素结合配体(氧气或 NO)或外部电子受体^[1]。无论在体外还是在体内,在存在氧和 NADH 时,HMP 具有 NADH

氧化酶的活性,且能快速消耗超氧化物和过氧化氢^[19]。

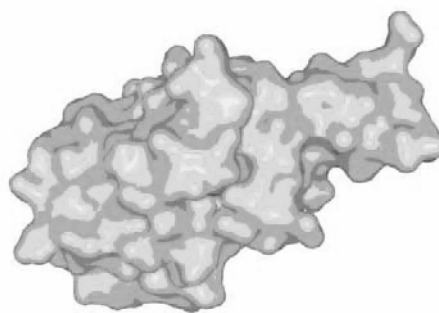
无论在有氧还是厌氧条件下,flavoHb 都有 NO 解毒作用。Gardner^[20]和 Hausladen^[21]指出有氧条件下在 NO 解毒过程中,HMP 在 NO 的诱导产生,消耗 O_2 和 NADH,与一氧化氮双加氧酶将 NO 转化为硝酸盐。在厌氧条件下,伴随着 NAD(P)H 的消耗,NO 与 HMP 的反应产生一氧化二氮(N_2O)。NO 结合在 HMP 的活性位点还原为硝酰基,然后经由二聚中间体反应形成一氧化二氮(N_2O)。此反应进行的速率比在需氧条件下的速率低几个数量级^[22]。

3.3 截断血红蛋白

截断血红蛋白(trHb)氨基酸序列比与它不同源的无脊椎动物的少 20—41 个氨基酸。晶体结构(图 7^[12])显示 trHb 的结构主要是 two-over-two 螺旋折叠,这种三维空间折叠模式是经典球蛋白折叠(three-over-three 折叠)的一部分,也是 trHb 的显著特征^[23]。



A 细菌截断血红蛋白三维结构的 cartoon 图示



B 细菌截断血红蛋白三维结构的 surface 图示

图 7 trHbN 结构图

在 trHb 的 two-over-two 螺旋折叠中,B/E、G/H 形成反向双螺旋对,是该折叠的主要二级结构元件。在 trHb 折叠中,N 端 A 螺旋几乎完全被删除,整个 CD-D 区调整到只有 3 个残基,可能是最小的连接 C 和 E 螺旋之间的多肽桥梁。此外在延伸构象中,大部分 trHb 的近端的 F 螺旋被多肽片段取代。因此, trHb 多肽链并不是一个经典的经典球蛋白折叠的简单截断版本,而是通过特定位置残基的删除或替换来维持构象的稳定。trHb 多肽链的严格保守氨基酸比较少,包括近端的 His-F8 残基和 Phe-B9-Tyr-B10 残基对。其中 Tyr-B10 是参与血红素配体的稳

定。在非脊椎动物的血红蛋白中 CD1 都是 Phe^[23]。此外,从分子表面到血红素的远端位点穿过蛋白矩阵形成几个连续的疏水通道,是配体扩散到血红素的主要途径^[24-25]。trHbs 内部配体扩散通道是由细长蛋白基质隧道和一个封闭的末端构成,与肌动血红蛋白基于 E7 的远端门形成的内部配体扩散通道不同。trHbs 蛋白基质隧道不仅会使氧气更易接近血红素,也对氧气的固定极为关键。这种球蛋白折叠结构的可塑性,给我们展现了一种新的血红蛋白结构和潜在的新功能。

有学者认为,trHbs 显著简化的 two-on-two 球蛋

白折叠结构, 决定它的生物功能不是氧气储存或运输。因此 *trHb* 具有非常高的氧亲和力, 而不具有传递和运输氧的能力, 这可能有利于结合了氧的血红蛋白与 NO 转化为硝酸盐从而达到解毒 NO 的作用^[23]。研究发现, 单细胞绿藻 *Chlamydomonas. eugametos* 的 *trHbs* 受光合作用的诱导, 且有部分 *trHbs* 结合在叶绿体类囊体膜, 念珠藻属的藻青菌 *trHB* 被固定在细胞膜的胞质面上并且只在低氧的环境下表达。此外, 编码 *trHB* 的基因与固氮复合物的基因是共表达的^[26]。*trHB* 的潜在功能可能很多, 但大多都鲜为人知。

4 细菌血红蛋白在生物工程领域的应用

血红蛋白在生物工程领域的研究最早始于 1988 年, Khosla 和 Bailey 将 *vgb* 基因放在大肠杆菌中表达, 有效提高了大肠杆菌的生长水平^[27]。随后, *VHb* 被广泛应用于众多宿主细胞中, 既包括原核细胞, 也包括真核的宿主细胞, 如人细胞和烟草细胞。研究均表明 *vhb* 基因可以提高宿主细胞的各种性质, 包括: 总菌量, 总蛋白, 单独的蛋白, 抗生素以及发酵的产物。如有研究者将 *vgb* 基因通过染色体整合到火木层孔菌。在摇瓶中, 含 *vgb* 基因的表达菌细胞干重增加 1.32 倍, 总黄酮产量增加 1.78 倍, 胞外多糖增加 1.33 倍; 在发酵罐中, 含 *vgh* 的工程菌的细胞干重从 5.40 g/L 增加到 10.90 g/L, 总黄酮和胞外多糖最大生产分别达到 11.43 g/L 和 1.33 g/L。此外, 与对照相比, 工程菌中在烧瓶中乙酸含量从 1.54 g/L 降低至 1.19 g/L, 而在发酵罐中从 1.78 g/L 降至 1.27 g/L^[28]。

所有研究 *VHb* 功能的都是把其作为氧气结合

蛋白。*VHb* 功能可取决于其与各种“伴侣蛋白”(终端呼吸氧化酶, 加氧酶, 还原酶等)的相互作用。在低氧的环境下, *VHb* 将氧气传递给终端呼吸氧化酶, 增强细胞的呼吸作用, 从而提高 ATP 的产量^[29]。*VHb* 的作用除了可以把氧气传递给加氧酶, 还可以与还原酶结构域形成一个嵌合体共表达, 具有解毒 NO 的作用, 在另一方面也可以提高核糖体翻译水平和 tRNAs 的转运水平^[30]。*VHb* 可以影响 300 多种基因的表达, 即有积极的影响, 也有消极的影响。有趣的是, *VHb* 也可以作为终端呼吸氧化酶^[31]。最近研究表明, *VHb* 可以与转录因子直接相互作用^[32]。因此, *VHb* 对细胞新陈代谢的影响是复杂的。

5 结束语

目前, 在细菌中共发现单结构域血红蛋白、黄素血红蛋白和截断血红蛋白等三类血红蛋白。在系统发育上和结构上, 单结构域血红蛋白与黄素血红蛋白的血红蛋白结构域关系密切而与截断血红蛋白关系较远。尽管血红蛋白广泛分布于细菌中, 但目前研究最为透彻, 在生物工程领域应用最多的仅有来自透明颤菌的单结构域的血红蛋白(*VHb*), 而对黄素血红蛋白和截断血红蛋白的研究较少。现有的研究表明, 后者可能具有更丰富、更多样功能, 在生物工程和生物技术领域具有更广泛的潜在用途。这为研究工作者开发新的血红蛋白系统, 以缓解生产菌对氧的需求量与发酵设备供氧的矛盾, 从而推动微生物工业发酵的发展开辟了新的空间。细菌血红蛋白及在生物工程领域中的应用实例如表 1 所示。

表 1 细菌血红蛋白及在生物工程领域中的应用实例

	Host	Products	Reference
<i>VHb</i>	<i>Phellinus igniarius</i>	Exopolysaccharides	Zhu et al. (2010)
	<i>Acetobacter xylinum</i>	cellulase	Setyawati et al. (2007)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Hyaluronic acid	Su et al. (2007)
	<i>Escherichia coli</i>	Lactic acid	Abboud et al. (2010)
	<i>Escherichia coli</i>	Ethanol	Sannv et al. (2010)
	<i>Pichia pastoris</i>	S-adenosylmethionine	Chen et al. (2007)
	<i>Sphingomonas slodea</i>	gellan	Wu et al. (2011)
<i>FlavoHb</i>	<i>Escherichia coli</i>	Protection from nitrosative stress	R. K. et al. (1996)
	<i>Salmonella</i>	Protection from nitrosative stress	M. J. et al. (1998)
<i>TrHb</i>	<i>Roseobacter denitrificans</i>	Involve in the oxidative stress response and peroxidase activity	Wang et al. (2015)
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Display a high reactivity towards NO	Ascenzi et al. (2014)

参考文献:

- [1] Frey A D, Kallio P T. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology [J]. FEMS Microbiol Rev, 2003, 27(4):525-545.
- [2] Konz J O, King J, Cooney C L. Effects of oxygen on recombinant protein expression [J]. Biotechnol Prog, 1998, 14(3):393-409.
- [3] Keiln D. Haemoglobin in fungi; occurrence of haemoglobin in yeast and the supposed stabilization of the oxygenated cytochrome oxidase The purification and properties of cytochrome o from *Vitreoscilla* [J]. Nature, 1953, 172(4374):390-393.
- [4] Probst I, Wolf G, Schlegel H G. An oxygen-binding flavohemoprotein from *Alcaligenes eutrophus* [J]. Biochim Biophys Acta, 1979, 576(2):471-478.
- [5] Webster D A, Hackett D P. The purification and properties of cytochrome o from *Vitreoscilla* [J]. J Biol Chem, 1966, 241:3308-3315.
- [6] DeMaio R A, Webster D A, Chance B. Spectral evidence for the existence of a second cytochrome o in whole cells of *Vitreoscilla* [J]. J Biol Chem, 1983, 258:13768-13771.
- [7] Wakabayashi S, Matsubara H, Webster D A. Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla* [J]. Nature, 1986, 322(6078):481-483.
- [8] Scott N L, Lecomte J E. Cloning, expression, purification and preliminary characterization of a putative hemoglobin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. Protein Sci, 2000, 9:587-597.
- [9] Birukou I, Soman J, Olson J S. Blocking the gate to ligand entry in human hemoglobin [J]. J Biol Chem, 2011, 286(12):10515-10529.
- [10] Ermler U, Siddiqui R A, Cramm R, et al. Crystal structure of the flavohemoglobin from *Alcaligenes eutrophus* at 1.75 Å resolution [J]. EMBO J, 1995, 14(24):6067-6077.
- [11] Ratakonda S, Anand A, Dikshit K, et al. Crystallographic structure determination of B10 mutants of *Vitreoscilla* hemoglobin: role of Tyr29 (B10) in the structure of the ligand-binding site [J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2013, 69(3):215-222.
- [12] Milani M, Ouellet Y, Ouellet H, et al. Cyanide binding to truncated hemoglobins: a crystallographic and kinetic study [J]. Biochemistry, 2004, 43(18):5213-5221.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] El Hammi E, Warkentin E, Demmer U, et al. Structure of *Ralstonia eutropha* flavohemoglobin in complex with three antibiotic azole compounds [J]. Biochemistry, 2011, 50(7):1255-1264.
- [17] Karplus P A, Daniels M J, Herriott J R. Atomic structure of ferredoxin-NADP + reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family [J]. Science, 1991, 251(4989):60-66.
- [18] Frey A K, Bailey J E, Kallio P T. Expression of *Alcaligenes eutrophus* flavohemoglobin and engineered *Vitreoscilla* hemoglobin-reductase fusion protein for improved hypoxic growth of *Escherichia coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66:98-104.
- [19] Mills C E, Sedelnikova S, Soballe B, et al. *Escherichia coli* flavohaemoglobin (Hmp) with equistoichiometric FAD and haem contents has a low affinity for dioxygen in the absence or presence of nitric oxide [J]. Biochem J,

- 2001, 353(2):207-213.
- [20] Gardner P R, Costantino G, Salzman A L. Constitutive and adaptive detoxification of nitric oxide in *Escherichia coli*. Role of nitric-oxide dioxygenase in the protection of aconitase [J]. J Biol Chem, 1998, 273(41):26528-26533.
- [21] Hausladen A, Gow A J, Stamler J S. Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(24):14100-14105.
- [22] Kim S O, Orii Y, Lloyd D, et al. Anoxic function for the *Escherichia coli* flavohemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide [J]. FEBS Lett, 1999, 445(2-3):389-394.
- [23] Wittenberg J B, Bolognesi M, Wittenberg B A, et al. Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants [J]. J Biol Chem, 2002, 277(2):871-874.
- [24] Pesce A, Couture M, Dewilde S, et al. A novel two-over-two alpha-helical sandwich fold is characteristic of the truncated hemoglobin family [J]. EMBO J, 2000, 19(11):2424-2434.
- [25] Milani M, Pesce A, Ouellet Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin N displays a protein tunnel suited for O₂ diffusion to the heme [J]. EMBO J, 2001, 20(15):3902-3909.
- [26] Thorsteinsson M V, Bevan D R, Potts M, et al. A cyanobacterial hemoglobin with unusual ligand binding kinetics and stability properties [J]. Biochemistry, 1999, 38(7):2117-2126.
- [27] Khosla C, Bailey J E. Heterologous expression of a bacterial hemoglobin improves the growth properties of recombinant *Escherichia coli* [J]. Nature, 1988, 331:633-635.
- [28] Zhu H, Sun S, Zhang S. Enhanced production of total flavones and exopolysaccharides via *Vitreoscilla* hemoglobin biosynthesis in *Phellinus igniarius* [J]. Bioresour Technol, 2011, 102(2):1747-1751.
- [29] Ramandeep, Hwang K W, Raje M, et al. *Vitreoscilla* hemoglobin: intracellular localization and binding to membranes [J]. J Biol Chem, 2001, 276:24781-24789.
- [30] Stark B C, Dikshit K L, Pagilla K R. Recent advances in understanding the structure, function, and biotechnological usefulness of the hemoglobin from the bacterium *Vitreoscilla* [J]. Biotechnol Lett, 2011, 33(9):1705-1714.
- [31] Dikshit R P, Dikshit K L, Liu X Y, et al. The bacterial hemoglobin from *Vitreoscilla* can support the aerobic growth of *Escherichia coli* lacking terminal oxidases [J]. Arch Biochem Biophys, 1992, 293:241-245.
- [32] Anand A, Duk B T, Singh S, et al. Redox mediated interactions of VHb (*Vitreoscilla* hemoglobin) with OxyR: novel regulation of VHb biosynthesis under oxidative stress [J]. Biochem J, 2010, 426:271-280.