



## BAKTERİYEL HEMOGLOBİN, VITREOSCİLLA HEMOGLOBİN (VHb)

Süleyman Aydın<sup>1</sup>, Nermin Kılıç<sup>1</sup>

### BACTERIAL HEMOGLOBIN, VITREOSCILLA HEMOGLOBIN (VHb)

**Summary:** Bacterial hemoglobin (Vitreoscilla hemoglobin, VHb) was discovered by Dr Webster in 1986. It is produced in the organism to response to hypoxic condition and is a dimeric protein, each of relative molecular weight 15.775 as well as two protohems IX per molecule. The VHb monomer is also composed of 146 amino acid residues. When compared with other hemoglobin, it was found that it has 24 % similarities with Lupine leg hemoglobin and has 56 % similarity with a portion of *B. subtilis* flavo hemoglobin and remarkable similarities with same protein from yeast and other bacteria. Although it is likely that VHb has a common evolutionary ancestor with higher hemoglobin, it needs to be more complete investigations to confirm or refute this.

This article will review the history of the discovery of Vitreoscilla (VHb) and also what is currently studied about its structure (three dimensional structure), properties and first direct evidence that causes increasing of recombinant protein production in genetically engineered bacteria. It will be also given relationship with other hemoglobins (myoglobin, leghemoglobin, plant and animal hemoglobin).

**Key Words:** Bacterial Hemoglobin, Vitreoscilla Hemoglobin, VHb

**Özet:** Bakteri Hemoglobini (Vitreoscilla hemoglobin, VHb) 1986 yılında Dr. Webster tarafından keşfedilmiştir. Hipoksik koşullara cevap olarak üretilmiş olan ve her bir monomeri 146 amino asitten meydana gelen dimerik yapıdaki bu proteinin yapısında iki protohem IX vardır ve ortalama molekül ağırlığı 15.775'dir. Diğer hemoglobinlerle kıyaslandığında kayda değer bir benzerlik göstermektedir (örneğin kök hemoglobiniyle %24; *B. subtilis* flavo hemoglobiniyle %56, maya ve diğer bakterilerin benzer proteinleriyle). VHb muhtemelen evrimsel olarak yüksek organizasyonu canlılardaki hemoglobinlerle ortak atadan gelmesine rağmen bunu teyid etmek ya da reddetmek için daha fazla tamamlanmış araştırmalara ihtiyaç vardır.

Bu makale Vitreoscilla hemoglobininin keşfinin tarihi olaylarını, bugünlerde çalışılmış üç boyutlu yapısını, özelliklerini ve genetik mühendisliği yapılmış bakterilerde rekombinant protein sentezini arttırdığına dair ilk direkt delili gözden geçirmenin yanısıra diğer hemoglobinlerle (miyoglobin, kök hemoglobini, bitki ve hayvan hemoglobini) ilişkisini de tartışacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteri hemoglobini, Vitreoscilla Hemoglobin, VHb

### GİRİŞ

Oksijen bağlayıcı protein olan hemoglobinin prokaryotlardaki varlığı 1986 yılında Dr. Webster ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir(1). Keşfinden bugüne kadar yapılan laboratuvar çalışmalarının önemli sonuçları ve diğer hem proteinleriyle ilişkileri (miyoglobin, leghemoglobin, memeli hemoglobini) kısaca şöyledir:

Vitreoscilla, zorunlu aerob fakat oksijence fakir ortamlarda yaşayan, filamentöz, Gr. (-) bir bakteridir (2) ve Beggiatoa familya mensuplarına benzerliğinden dolayı da başlangıçta bu familya içine yerleştirilmiştir. Daha sonraki çalışmalar, Vitreoscilla'nın mor-fotosentetik bakteri grubunun bir alt grubuna ait olduğunu göstermiştir (3,4). Bu bakteriler hipoksik koşullarda oksijen bağlayıcı protein olan hemoglobini sentezlemekte ve

sentezlenen bu protein de CO fark spektrasıyla 419 nm'de pik vermektedir (5). Bakteri hemoglobini oksijenin sınırlı olduğu durumlarda hücrelerin oksijen açığını ortadan kaldırmaktadır (6).

### I. VITREOSCİLLA HEMOGLOBİNİNİN ÖYKÜSÜ

İlk araştırmalarda bu protein soluble (çözülebilir) sitokrom(o) olarak düşünülmüştür. Çünkü membrana bağlı terminal oksidaz kabul edilen iki tane hemprotein, Vitreoscilla'dan izole edilmiş (7) karbonmonoksit fark spektrasıyla iki farklı fraksiyon gözlenmiştir. Fraksiyonlar fraksiyon I ve II diye adlandırılmış olup fraksiyon I' in maksimum absorbanı 570, 534 ve 419; fraksiyon II'nin maksimum absorbanı ise 566, 532 ve 416 olarak tespit edilmiştir. Bu fraksiyonlar kısmen saflaştırılarak indirgenme-yükseltgenme fark spektrasıyla ölçülmüş ve genellikle fraksiyon I, 580 ve 530 nm; Fraksiyon II ise 564 ve 560 nm dolayında pikler göstermiştir (7).

Sonradan bu piklerin muhtemelen oksihemoglobinle indirgenmiş proteinlerin kontaminasyonunun sonucu olduğu kabul edilmiş, ikisinin de moleküler ağırlıkları tespit edildikten sonra (22.500, 27.000) sitokrom (o) diye adlandırılarak bu iki hem protein çalışmalarına ara verilmiştir. Fakat kısa bir süre sonra Rhizobium'da çözülebilir hemoglobinin varlığı tanımlanmıştır. Moleküler ağırlığı 30.000 olarak tanımlanan bu protein (8) karbon monoksit fark spektrasıyla Vitreoscilla hem proteinlerine benzer şekilde 569, 540 ve 417 nmde pikler göstermiştir. Rhizobium'da bulunan hemoglobinin kök hemoglobiniyle ilişkisinin olmadığı da anlaşılmıştır (9). Rhizobium'daki bu bulgular Vitreoscilla hem proteinlerinin yeniden gözden geçirilmesine sebep olmuştur. Çünkü Vitreoscilla'da da solunum safhasında oksijene olmuş hem proteinlerinin miktarının arttığı bildirilmiştir (10).

### II. BAKTERİYEL HEMOGLOBİNİN KARAKTERİZE EDİLMESİ

Daha sonraki çalışmalardan Vitreoscilla'da bulunan bu hem proteininin bir terminal oksidaz olmadığı gibi sonication sonrasında hücrelerdeki bu proteinin lizozom-EDTA muamelesiyle çözünmesinden dolayı membrana bağlı bir protein de olmadığı anlaşılmıştır. Çünkü karbonmonoksit bağlı hücrelerin 100 °C de fotolizinden Vitreoscilla'da başka bir sitokrom (o)'nun (11) varlığı ve bunun da E. coli' de membrana bağlı bir sitokrom ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Vitreoscilla'da tespit edilen bu sitokrom (o)'nun E. coli'de tespit edilen membrana bağlı sitokrom (o) ile CO ve oksijene yanıtının da aynı olduğu tespit edilmiştir. (12). Vitreoscilla'nın sitokrom (o)'su saflaştırılmış ve bu karbonmonoksit (CO) fark spektrasıyla 416, 534, 570-571 nm de pikler verirken Vitreoscilla hemoglobini (VHb) de benzer şekilde 419, 535 ve 569-570 nmde pikler vermiştir. Vitreoscilla'daki bu proteinin terminal oksidaz olan sitokrom (o)' ya benzemediği, (13) miyoglobin ve hemoglobin gibi oksijen bağladığı (14,15,16) rapor edilmiştir. Vitreoscilla'nın bu proteini oksijene olduğunda infrared (kırmızı ötesi) spektroskopik çalışmalarda oksijen streç bandı oksimiyoglobin ve oksihemoglobin gibi 1134 cm<sup>-1</sup> olup bu da hem ferro demir tipi oksijen bağlanmaya kanıttır (17).

### III. BAKTERİYEL HEMOGLOBİNİN YAPISI

Evrin stüresince bütün hemoglobinlerde hem demirine bağlı proksimal histidin (F8) muhafaza edilirken (VHb dahil) çoğu hemoglobinlerde distal histidin (E7) de muhafaza edilmiştir. Fakat bakteri ve maya hemoglobininde ise fil hemoglobininde olduğu gibi distal hem paketinin E7 pozisyonunda histidin yerine glutamin bulunmaktadır (18). Tarricone ve arkadaşları (19), Vitreoscilla hemoglobinin kristal yapısı çıkarıldığında da heliks D'nin olmadığını (standart globin fold adlandırmasına göre) belirtirken E7- E10 nun da normal alfa heliks konformasyonuna



uymadığını, dolayısıyla Gln53(E7) nin hem paketinin dışında kaldığını rapor etmişlerdir. VHB proteini iki benzer alt üniteden oluşan bir hem proteindir. Molekül ağırlığı 15.775 olan her bir alt ünite iki protohem IX içermekte ve 146 amino asitten oluşmaktadır(1). Oksijen assosiasyonu için hız sabitesi, at miyoglobininin kısmen daha büyükken oksijen disassosiasyon sabitesi ise 500 kat daha büyüktür. Buradan Vitreoscilla hemoglobininin diğer hemoglobinlerle kıyaslandığında bağlı oksijeni çok daha kolay serbest bıraktığı anlaşılmıştır (6).

#### IV. BAKTERİYEL HEMOGLOBİNİN DİĞER HEMOGLOBİNLERLE EVRİMSEL İLİŞKİSİ

Hemoglobinin evrimi hakkında iki şey söylenebilir;

Anaerobik organizma:1) Kendisi için hassasiyet temsil eden durumlarda oksijene duyarlı hücre komponentlerini korumak için bir korunma mekanizması geliştirmelidir.

2) Hüresel hemoglobin konsantrasyonunun yüksek olması veya daha düşük oksijen basıncına maruz kalınması halinde de bundan kurtulmak için etkili bir mekanizma geliştirmelidir.

Organizma oksijeni tutarak, depo ederek ve oksijenin kısıtlı olduğu ortamlarda da hücreye oksijen sağlayarak hayatsal faaliyetlerini devam ettireceğinden ikinci ihtimalin olması çok daha yüksektir. Son yıllarda yapılan kök hemoglobinlerin yapısal analizi, bitki ve hayvan hemoglobinlerinin ortak bir orijinden köken aldığını göstermektedir(8). Vertebrate hemoglobinin alfa zincirinin bir miyoglobin geninin duplikasyonundan türediği genel olarak kabul edilmektedir (20). Vitreoscilla hemoglobininde de 146 amino asit vardır. Bu, 153 amino asit taşıyan sarı lupin kök hemoglobiniyle karşılaştırıldığında 35 amino asidin yerleri aynıdır. Yani % 24 benzerlik ihtiva etmektedir (1). *Bacillus subtilis*'in flavohemoglobini ve mayanın buna benzer proteinleri de Vitreoscilla hemoglobiniyle %56 benzerlik göstermektedir (21).

Diğer taraftan yine Vitreoscilla hemoglobini fil hemoglobiniyle karşılaştırıldığında her ikisinin de E7 pozisyonunda Glutamin (Gln) ve B10 pozisyonunda ise aromatik amino asit taşıdığı belirlenmiştir. B10 pozisyonundaki bu aromatik amino asit Vitreoscilla hemoglobininde tirozin (Tyr), fil hemoglobininde ise fenilalanin (Phe) dir. (18). Başlangıçta E7 pozisyonundaki Gln'nin proteine olağan dışı bir kinetik özellik kazandırdığı düşünülmüş (6) fakat kristalleştirme çalışması bu amino asidin oksijen bağlanması için elverişli olmadığını ortaya koymuştur (19). Bu, Vitreoscilla hemoglobini üzerinde yapılan mutasyonla doğrulanmıştır (22). Evrimsel süreç içerisinde hücreler kendi yaşamları için gerekli olan proteinleri günümüze kadar taşımışlar ve böylece yaşamlarının devamını sağlamışlardır. Oksijenin sınırlı olduğu ortamlarda yaşayan (su birikintileri gibi) Vitreoscilla, belki de günümüze kadar oksijen bağlayan bir protein olarak sentezlediği hemoglobinle ulaşmıştır.

#### V. DOLAŞIM YAPMAYAN BAKTERİ HEMOGLOBİNİNİN (VHB) HÜCREDEKİ ROLÜ

Bir çok doku ve hücrede dolaşımda olmayan hemoglobinler (bitkiler ve invertebratalardaki gibi) vardır. (23, 24,25). Bu hemoglobinlerin sülfid oksidasyonu, hem depolanması, oksijen depolanması, peroksit indirgenmesi, oksijen taşınması, oksijen tamponu veya solunum dışı enzimatik reaksiyonlarda rol alması (örneğin kollojenin hidroksilasyonu) gibi fonksiyonlarının olduğu düşünülmektedir. Fakat bu fonksiyonların kuvvetli delilleri yoktur. Burada yeni bir hem proteini olan VHB fonksiyonu üzerinde durulacaktır. Bu yeni hem proteini hem Vitreoscilla' da hem de recombinat *E. coli*' de sitoplazmik olarak yerleştiği tespit edilmiştir (26). Ekstrasellüler oksijenin düşük olduğu durumlarda bu proteinin sentezinin arttığı ve bağladığı oksijeni eukaryotik hücrede olduğu gibi serbest bıraktığı rapor edilmiştir(27, 28). Bunu destekleyen en kuvvetli delil (29) sodyum nitritle Vitreoscilla hemoglobininin

oksidasyonun sonuçlarından elde edilmiştir. Yapılan deneyde 5 mM veya daha fazla nitrit konsantrasyonlarının ferro demiri ferri demire dönüştürerek hemoglobin proteinini inaktive ettiği dolayısıyla da *Vitreoscilla* hemoglobini taşıyan hücrenin kontrol grubuna göre avantajını yitirdiği rapor edilmiştir. Ayrıca kontrol grubunda ve VHB'li hücredeki elektron transport zincirinde yer alan hem proteinlerinin 20 mM'lık sodyum nitritten fazla etkilenmediği fakat VHB'ndeki demirin okside olduğu bildirilmiştir. VHB'li hücrelerin bazı aromatik bileşiklerin biyolojik yıkımında oksijen gerekli olan basamaklara oksijen sağlayarak yıkılımı da arttırdığı belirtilmiştir (Trinitrotoluen = TNT'nin *Pseudomonas* bakterisinde yıkımı gibi) (30, 31). Benzer şekilde sentez sırasında oksijen gerekli basamaklara oksijen vererek actinorhodin gibi antibiyotiklerin de sentezini arttırmaktadır (32). Aydın ve arkadaşlarının (29) nitritle yaptıkları deneyler bu etkilerden hemoglobin DNA' sını kodlayan gen yerine bu genin sentez ürünü olan hemoglobin proteininin sorumlu olduğunu da ortaya koymuştur.

### SONUÇ

Bakterial hemoglobin ilk kez *Vitreoscilla*'da bulunduğu için 'Vitreoscilla hemoglobin' (VHb) olarak adlandırılmakta ve bazı literatürlerde ise 'mikrobial hemoglobin' olarak rastlanmaktadır.

Hücrede sitoplazmik alanda bulunan (26) bu hemoglobin rekombinant ürünlerin sentezini arttırmanın yanısıra (5, 33, 34, 35) diğer metabolitlerin (29, 36, 37,38) ve aromatik bileşiklerin yıkımını da arttırmakta (31, 30, 38, 39, 40) ve yeni bir konu olduğundan halen araştırmalar devam etmektedir.

Yapısal olarak incelendiğinde ise proksimal histidin tüm diğer hemoglobinlerde olduğu gibi bakteriyel hemoglobinde de evrim süresince muhafaza edilmiştir. Fakat distal hem paketinin E7 konumunda maya ve filde olduğu gibi histidinin

yerini glutamin almaktadır (18). VHb monomeri 146 amino asitten oluşur ve moleküler ağırlığı 15.775' dir (1). Evrimsel olarak tüm hemoglobinlerin aynı kökenden geldiğini söylemek için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

### KAYNAKLAR

1. Wakabayashi, S., Matsubara, H., Webster, D.A. (1986) Primary Sequence of A Dimeric Bacterial Hemoglobin From *Vitreoscilla*. *Nature.*, Jul 31-Aug 6;322(6078):481-3.
2. Pringsheim, E.G. (1951). The *Vitreoscillaceae*: A family of Colorless, Gliding, Filamentous Organisms. *J.Gen. Microbiol.*, 124-149.
3. Woese, C.R., Weisburg, W.G., Paster, B. J., Hahn, C.M., Tanner, R.S., Kreig., N.R., Koops, H. P., Harms, H., and Stackebrandt, E. (1984). The Phylogeny of Purple Bacteria: The Beta Subdivision. *Sys. Appl. Microbiol.*,706-717.
4. Georgiou, C. D., Webster, D. A. (1987) Purification and Partial Characterization of the Membrane-Bound Cytochrome *c* (561,564) from *Vitreoscilla*. *Biochem.*26:6521-6526.
5. Aydın, S. (1999) The Effect of Nitrite on Enhancement of Alpha-Amylase synthesis Afforded By Bacterial Hemoglobin in Genetically Engineered *E. coli*. PhD Thesis. S. 84-85. Chicago/USA.
6. Dikshit, K. L., Dikshit, R. P., and Webster, D. A. (1991). Transcriptional Control of *Vitreoscilla* Hemoglobin Synthesis. In:Structure and Function of Invertebrate Oxygen Carriers Springer-Verlag, NY, s. 313-321.
7. Webster DA., Hackett DP. (1966)The Purification And Properties of Cytochrome *c* From *Vitreoscilla*. *J Biol Chem.*, Jul 25;241(14):3308-15.
8. Appleby C.A. *Ann.Rev. Plant physiology.* (1984) Ludden and J.E. Buris, ed., Elsevier Science publishing Co., Inc., Amsterdam, s. 35-443.
9. Daniel RM, Appleby CA. (1972). Anaerobic-nitrate, symbiotic and aerobic growth of *Rhizobium Japonicum*: Effects on Cytochrome P 450 , Other Haemoproteins, Nitrate And Nitrite Reductases. *Biochim Biophys Acta.* Sep 20;275(3):347-54
10. Webster DA, Orii Y. (1977) Oxygenated Cytochrome *c*. An Active Intermediate Observed in Whole Cells of *Vitreoscilla*. *J Biol Chem .*, Mar 25;252(6):1834-6
11. DeMaio RA, Webster DA, Chance B. (1983) Spectral Evidence For The Existence of A Second Cytochrome *c* in Whole Cells of *Vitreoscilla*. *J Biol Chem.*, Nov 25;258 (22): 13768-71





12. Poole RK, Waring AJ, Chance B. (1979) The Reaction of Cytochrome *c* Heme in *Escherichia coli* With Oxygen. Low-temperature Kinetic And Spectral Studies. *Biochem J.*, Nov 15;184(2):379-89.
13. Orii, Y., and Webster, D.A. (1986). Photodissociation of Oxygenated Cytochrome *c* (s) (*Vitreoscilla*) and Kinetic Studies of Reassociation. *J. Biol. Chem.*, 3544-3547.
14. Gibson Q.H. (1973) The Contribution of The Alpha And Beta Chains to The Kinetics of Oxygen Binding to And Dissociation From Hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Jan;70(1):1-4.
15. Gibson Q. H. (1999) Kinetics of oxygen binding to hemoglobin A. *Biochemistry.*, 1 Apr 20;38(16):5191-9
16. McCray JA. (1972 ) Oxygen Recombination Kinetics Following Laser Photolysis of Oxyhemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun.*, Apr 14;47(1):187-93.
17. Choc MG, Webster DA, Caughey WS. (1982) Oxygenated Intermediate And Carbonyl Species of Cytochrome *c* (*Vitreoscilla*). Characterization By Infrared Spectroscopy. *J Biol Chem.*, Jan 25;257(2):865-9.
18. Bisig, D.A, Di Lorio, E.E., Diederichs, K., Winterhalter, K.H., Piontek, K. (1995) Crystal Structure of Asian Elephant (*Elephas maximus*) Cytochrome *c* Hemoglobin at 1.78 Å Resolution. Phe29 (B10) accounts for Its Unusual Ligand Binding Properties. *J. Biol. Chem.*, 270, 20754-20762.
19. Tarricone, C., Galizzi, A., Coda, A., Ascenzi, P., and Bolognesi, M. (1997) Unusual Structure of The Oxygen-binding Site in The Dimeric Bacterial Hemoglobin From *Vitreoscilla* sp. *Structure.*, 5:497-505.
20. Doolittle R.F 'The Proteins' Vol IV;H. Neurath and R.L.Hill Eds., Academic Press, New York, 1979. s.1-1
21. Vasudevan, S.G., Armarego, W. L.F., Shaw, D. C., Lilley, P. E. and Poole, R. K. (1991) Isolation And Nucleotide Sequence of The *hmp* Gene That Encodes Haemoglobin-like Protein in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.*, 226,49-58.
22. Dikshit, K. L., Orii, Y., Navani, N., Patel, S., Huang, Y. H., Stark, B. C., and Webster, D. A. (1998) Site-Directed Mutagenesis of Bacterial Hemoglobin: The role of Glutamine (E7) in Oxygen-Binding in The Distal Heme Pocket. *Arch. Biochem. Biophys.*, 349:161-166
23. Weber, R E., Vinogradov, S.N. (2001) Nonvertebrate Hemoglobins: Functions And Molecular adaptations. *Physiol Rev.*, Apr;81(2):569-628.
24. Riggs, A. (1965) Functional Properties of Hemoglobins. *Physiol Rev.* Oct;45(4):619-73.
25. Riggs, A., Gibson, Q.H. (1973 ) Oxygen Equilibrium And Kinetics of Isolated Subunits From Hemoglobin Kansas. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Jun;70(6):1718-20.
26. Ramandeep, Hwang KW, Raje M, Kim KJ, Stark BC, Dikshit KL, Webster DA. (2001) *Vitreoscilla* Hemoglobin: Intracellular Localization And Binding to Membranes. *J Biol Chem* Apr 30
27. Boerman, S.J. and Webster, D.A. (1982) Control of Heme Content in *Vitreoscilla* By Oxygen. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 28: 35-43.
28. Dikshit, R. P., Dikshit, K. L., Liu, Y., and Webster, D. A. (1992). The Bacterial Hemoglobin From *Vitreoscilla* Can Support the Aerobic Growth of *Escherichia coli* Lacking Terminal Oxidases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 293: 241- 245.
29. Aydın, S, Webster, D. A, Stark, B. C. (2000) Nitrite Inhibition of *Vitreoscilla* Hemoglobin Vhb in Recombinant *E. coli*, Direct Evidence that Vhb Enhances Recombinant Protein Production. *Biotechnology Process.*, 16: 917-21
30. Liu, S.C., Webster, D.A., Wei, M. L., Stark, B.C. (1996) Genetic Engineering to Contain The *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene Enhances Degradation of Benzoic Acid By *Xanthomonas maltophilia*. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 101-105.
31. Fish, P.A.; Webster, D.A.; Stark, B.C. (2000) *Vitreoscilla* Hemoglobin Enhances The First Step in 2,4-dinitrotoluene Degredation In vitro And at Low Aeration in Vivo. *J.M. Catal.B:Enzyme.*, 9,75-82.
32. DeModena, J.A., Gutierrez, S., Velasco, J., Fernandez, F., Fachini, R.A., Galazza, J.L., Huges, D. E. and Martin, J. F., (1993) The Production of Cephalosporin C By *Acremonium Chrysoogenum* Is Improved By The Intracellular Expression of a Bacterial Hemoglobin. *Bio. Technology.*, 926-929.
33. Chen, W., Huges, D. E. and Bailey, J. E. (1994). Intracellular Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin Alters the aerobic Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* Vol. 10. (308-313).
34. Khosravi, M., Ryan, W., Webster, D. A., and Stark, B. C. (1990). Variation of Oxygen Requirement With Plasmid Size in Recombinant *Escherichia coli*. *Plasmid* 23:138-143.
35. Enayeti, N.C., Parulekar, S.J., Stark, B.C., Webster, D.A. (1999) Production of Alpha-amylase in Fed-batch cultures *vgb+* And *vgb-* Recombinant *E. coli*:Some Observations. *Biotechnol. Prog.*, 58,640-45.
36. Buddenhagen, R.E., Webster, D.A., Stark, B.C. (1996) Enhancement By Bacterial Hemoglobin of Amylase Production in Recombinant *E. coli* Occurs Under Conditions of Low O<sub>2</sub>. *Biotechnol. Lett.*, 1996, 102,695-700.

37. Kallio, P.T., Bailey, J.E. (1996) Intracellular Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin (VHb) Enhances Total Protein Secretion And Improves the Production of Alpha- amylase And Neutral Protease in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.*, 12,31-39.
38. Khosla, C., Curtis, J.E., DeModena, J., Rinas, U., Bailey, J.E. (1990) Expression of Intracellular Hemoglobin Improves Protein Synthesis In Oxygen-limited *Escherichia coli*. *Bio/Technology.*, 8,849-853
39. Wei, M.L., Webster, D.A., Stark, B.C. (1998) Metabolic Engineering of *Serratia marcescens* With bacterial Hemoglobin Gene: Effect of Growth, Oxygen Utilization, And Cell Size. *Biotechnol. Bioeng.*, 59, 640-646.
40. Patel, S.M., Stark, B.C., Hwank, K.W., Dikshit, K.L., Webster, D.A (2000) Cloning And Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene in *Burkholderia* sp. Strain DNT for Enhancement of Dinitrotoluene Degradation . *Biotechnol. Prog.*, 16, 26-30.