

СТВОРЕННЯ ПРОДУЦЕНТІВ ГЕМУ ТА ГЕМОГЛОБІНІВ НА ОСНОВІ МІКРООРГАНІЗМІВ

О.Г. ПІДКУРГАННА¹, Л.Б. ЗЕЛЕНА^{1,2}, С.М. ШУЛЬГА^{1,*}

¹ Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України, Київ, 04214, Україна

² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, 03143, Україна

E-mail: pidkurhanna@gmail.com, zelenalyubov@hotmail.com, shulga5@i.ua *

Автор для кореспонденції – Шутьга С.М., e-mail: shulga5@i.ua

*Отримання гемоглобінів з використанням мікроорганізмів є наразі актуальною та нагальною проблемою для вирішення потреб медицини і харчової промисловості. Одним з кроків отримання даного білку є його мікробіологічний синтез з використанням попередника – гему. Проаналізовано результати досліджень з отримання гему та гемовмісних білків з прокаріотичних (*Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*), та еукаріотичних (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*) мікроорганізмів. Показано, що продуценти, створені на основі *E. coli* та *C. glutamicum*, синтезували вільний гем екзогенно, а дріжджі *P. pastoris* та *S. cerevisiae* є найбільш ефективними продуцентами для синтезу як ендо-, так і екзогенно складних гемовмісних білків – гемоглобіну та легемоглобіну. Показано, що створення ефективних продуцентів гему та гемоглобіну ґрунтується на зміні генетичного матеріалу мікроорганізмів та визначено етапи синтезу гему та точки можливих модифікацій цього процесу. Охарактеризовано генетично-модифіковані моделі дріжджів – продуцентів гемовмісних білків. Виходячи з узагальнення проаналізованих даних визначено, що найбільш перспективними продуцентами для подальшого вдосконалення та отримання надсинтезу гемовмісних білків є дріжджові клітини.*

Ключові слова: гем, легемоглобін, гемоглобін, синтез, генетично-модифіковані організми.

Вступ

Гемоглобін – залізовмісний киснево-транспортний металопротейн, належить до групи складних залізовмісних білків, що зустрічаються як в еукаріотичних клітинах і беруть участь у зв'язуванні та транспорті кисню, так і в прокаріотичних клітинах, де основна їх функція – протидія токсичному ефекту кисню (O₂), монооксиду вуглецю (CO) та монооксиду азоту (NO) (Gell, 2018). В організмі людини гемоглобін це основний компонент

крові, що забезпечує транспорт кисню (НВОС – hemoglobin-based oxygen carriers), тому на його основі розробляють сучасні кровозамінники (Gupta, 2019).

Гемоглобін отримують, в основному, з донорської крові або мікробіологічним способом. Відновлення гемоглобіну з крові це витратна, малоефективна та тривала процедура, що має численні недоліки – лімітовані обсяги, необхідність приймати до уваги групу крові, запобігання наявності патогенів, обмежений термін та забезпечення необхідних умов зберігання під час транспортування (Jia et al, 2017), тому біосинтез гемоглобіну мікроорганізмами може бути реальною альтернативою відновленню гемоглобіну з крові (Zhao et al, 2021).

Гем, кофактор гемоглобіну, отриманий мікробіологічним шляхом як біодоступна добавка заліза використовується у промисловості дієтичних добавок. Гем має червоне забарвлення, впливає на запах і колір під час термообробки м'яса. Легемоглобін – білок, що містить гем, отриманий з бобових, нещодавно почав використовуватись для імітації кольору та аромату справжнього м'яса у рослинних ізолятах (рослинне м'ясо). Крім того, залізо гема найкраще засвоюється організмом (Piskin et al, 2022), а це важливо для вегетаріанської чи веганської дієти. Гем привертає увагу і завдяки його багатообіцяючому застосуванню не тільки в харчовій але і в медичній промисловості. Проте, поточні титри та продуктивність рекомбінантних мікроорганізмів, що виробляють гем, недостатньо високі для створення промислової технології.

Метою роботи було проаналізувати і порівняти методи та різні стратегії отримання мікроорганізмів-продуцентів гему, легемоглобіну і гемоглобіну та визначити ефективний метод створення штамів-продуцентів рекомбінантного гемоглобіну для вибору найбільш

ефективного методу створення штамів-над-продуцентів рекомбінантного гемоглобіну.

Шляхи синтезу гему

Гем – залізовмісний порфірин і кофактор гемоглобіну, що належить до групи циклічних металовмісних тетрапіролів. Доступність гему в клітині це ключовий фактор, що визначає рівень синтезу рекомбінантного гемоглобіну. Процес синтезу та утилізації гему у клітині скоординований та доволі консервативний у різних організмах (таблиця). Метаболічні шляхи на сьогоднішній день добре досліджені (Layer et al, 2010). Контроль і регуляція метаболізму гему здійснюються на багатьох рівнях, а саме: наявності субстрату, розподілу проміжних продуктів синтезу гему між мітохондріями і цитозолем, прямій регуляції ферментів утворення гема (Sun et al, 2015).

Розрізняють два основні шляхи синтезу гему: С4-шлях (Shemin pathway), характерний

для тварин, грибів та α -протеобактерій та С5-шлях (глутаматний шлях), який використовують рослини, археї та решта бактерій (Layer et al, 2010). В роботі (Dailey et al, 2017) показано, що вибір С4 чи С5 шляху відбувається в процесі синтезу амінолевуленової кислоти, першого проміжного продукту синтезу гему. Серед прокаріотів є три різні метаболічні шляхи, що завершуються формуванням уропорфіриногену III і початкові етапи яких співпадають. Відомий шлях, виявлений у археїв, перетворює сірогем у протогем за допомогою процесу, незалежного від кисню, з використанням чотирьох ферментів. Бактерії використовують початкові етапи основного шляху з введенням додаткового етапу – утворення копропорфіриногену III. Далі грампозитивні організми окислюють копропорфіриноген III до копропорфірину III та проходить інтеркаляція заліза для утворення копрогему і, нарешті, відбувається декарбоксиляція копрогемом до про-

Ферменти основних процесів гомеостазу гему (Swenson et al, 2020)

Гомеостатичні процеси	Enzyme	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Homo sapiens</i>
Синтез	Синтаза 5-амінолевулінової кислоти	<i>Hem1</i>	<i>ALAS1/ALAS2</i>
	порфобіліноген	<i>Hem2</i>	<i>PBG5</i>
	синтаза		
	гідроксиметилбілан	<i>Hem3</i>	<i>HMBS</i>
	синтаза		
	уропорфіриноген	<i>Hem4</i>	<i>URO5</i>
	синтаза		
	уропорфіриноген	<i>Hem12</i>	<i>UROD</i>
	декарбоксилаза		
копропорфіриноген	оксидаза	<i>Hem13</i>	<i>CPOX</i>
	протопорфіриноген	<i>Hem14</i>	<i>PPOX</i>
	оксидаза		
	ферохелатаза	<i>Hem15</i>	<i>FECH</i>
Деградація	Гемоксигеназа	<i>Hmx1</i>	<i>Hmx1/Hmx2</i>
Імпорт	FLVCR2	–	+
	HRG4	–	–
Експорт	FLVCR1	–	+
	MRP5	–	<i>ABCC5</i>
	Pug1	+	–
	HRG3	–	–
Трафік	PGRMC1/2	<i>Dap1</i>	<i>PGRMC1/2</i>
	GAPDH	<i>Tdh1/2/3</i>	<i>GAPDH</i>
	HRG1	–	+

тогему. Грамнегативні бактерії спочатку декарбоксілюють копропорфіриноген III до протопорфіриногену IX, а далі окислюють протопорфіриноген IX до протопорфірину IX і приєднують метал для утворення протогему. Більшість організмів мають власний механізм синтезу гему і можуть самостійно його продукувати. Однак, геноми деяких бактерій, наприклад *Enterococcus faecalis*, містять гени, що кодують апогемопротейни, але не можуть синтезувати свій власний гем (Baureder and Hederstedt, 2012). Такі бактерії здатні використовувати екзогенний гем та поєднувати його з апопротейнами для формування зрілого гемопротейну.

Процес біосинтезу гему поділяють на три частини: (i) утворення молекули-попередника амінолевуленової кислоти (ALA), (ii) утворення першого циклічного тетрапіролу – уропорфіриногену III і (iii) перетворення уропорфіриногену III в гем (Layer et al, 2010).

Загальна схема синтезу гему

Першим спільним попередником синтезу всіх тетрапіролів є амінолевуленова кислота (ALA). Відомо два альтернативних метаболічних шляхи її синтезу (рис. 1). За першим механізмом ALA утворюється з гліцину та сукциніл-КоА за допомогою ферменту ALA-синтази. Цей C4-шлях описано в роботі (Kresge et al, 2006) та тривалий час вважався єдиним способом синтезу ALA у всіх організмах. Наразі відомо, що C4-шлях присутній у тварин, грибів і деяких бактерій (*Rhizobium*, *Brucella*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Caulobacter*, *Rickettsia*) (Dailey et al, 2017). У клітинах еукаріот ALA синтезується в мітохондріальному матриксі і транспортується в цитозоль для подальших перетворень.

Еволюційно початковим, хоча і відкритим пізніше, є C5-шлях синтезу ALA з глутамінової кислоти (зв'язаної з tRNA) ферментами – глутаміл-tRNA редуктазою та глутамат-1-семіальдегід 2,1-аміномутазою. Цей шлях вперше був описаний в сім'ядолях огірка (Beale and Castelfranco, 1973) і саме так ALA синтезується в клітинах архей, рослин та більшості бактерій. В клітинах рослин синтез проходить в хлоропластах. Дві молекули ALA за участі ферменту порфобіліноген синтази

асиметрично конденсуються і утворюють порфобіліноген (PBG). Наступний фермент – гідроксиметилбілан синтаза (також, порфобіліноген деаміназа) – деамінує молекули PBG і з'єднує їх в ланцюг, утворюючи лінійний тетрапірол гідроксиметилбілан (GMB). Далі за допомогою уропорфіриноген синтази GMB перетворюється в уропорфіриноген (UPG) III. За відсутності фермента може спонтанно утворитись ізомер – уропорфіриноген I. Три етапи перетворення амінолевуленової кислоти до UPG III є консервативними і однаковими для всіх тетрапіролів і у всіх організмів.

Подальше перетворення UPG III до гему (рис. 2) може відбуватися кількома шляхами (Dailey et al, 2017; Layer, 2021). Найбільш дослідженим є шлях перетворення через протопорфірин. Він складається з чотирьох ензиматичних реакцій. Спочатку UPG III декарбоксилаза модифікує ацетатні бічні ланцюги, залишаючи метильні групи і утворюючи копропорфіриноген (CPG) III. Далі, відбувається декарбоксилювання пропіонатних ланцюгів в двох пірольних кільцях (A і B) до вінільних груп і утворення протопорфіриногену IX (PPG). Це перетворення може каталізувати два ферменти – оксигензалежна CPG III декарбоксилаза (у еукаріот та кількох грам-негативних бактерій) та оксигеннезалежна CPG III дегідрогеназа (виключно у бактерій). Наступний крок – окиснення PPG IX до протопорфірину IX – також у різних організмів каталізують різні ферменти: оксигензалежна PPG IX оксидаза у еукаріот та деяких грам-негативних бактерій і оксигеннезалежна PPG IX дегідрогеназа у більшості бактерій. Насамкінець, протопорфірин IX ферохелатаза вбудовує в макроцикл Fe^{2+} утворюючи гем.

Другий шлях перетворення UPG III в гем розпочинається з ідентичної реакції декарбоксилювання та утворення CPG III і каталізується тим же ферментом. Далі, напочатку CPG III оксидаза окислює CPG III до копропорфірину III, потім ферохелатаза вбудовує Fe^{2+} в макроцикл копропорфірину III, утворюючи копрогем, і вже після цього копрогем декарбоксилаза декарбоксилює пропіонатні ланцюги у A і B циклів до вінільних груп. Такий механізм притаманний, в основному, грам-позитивним бактеріям, за кількома виключен-

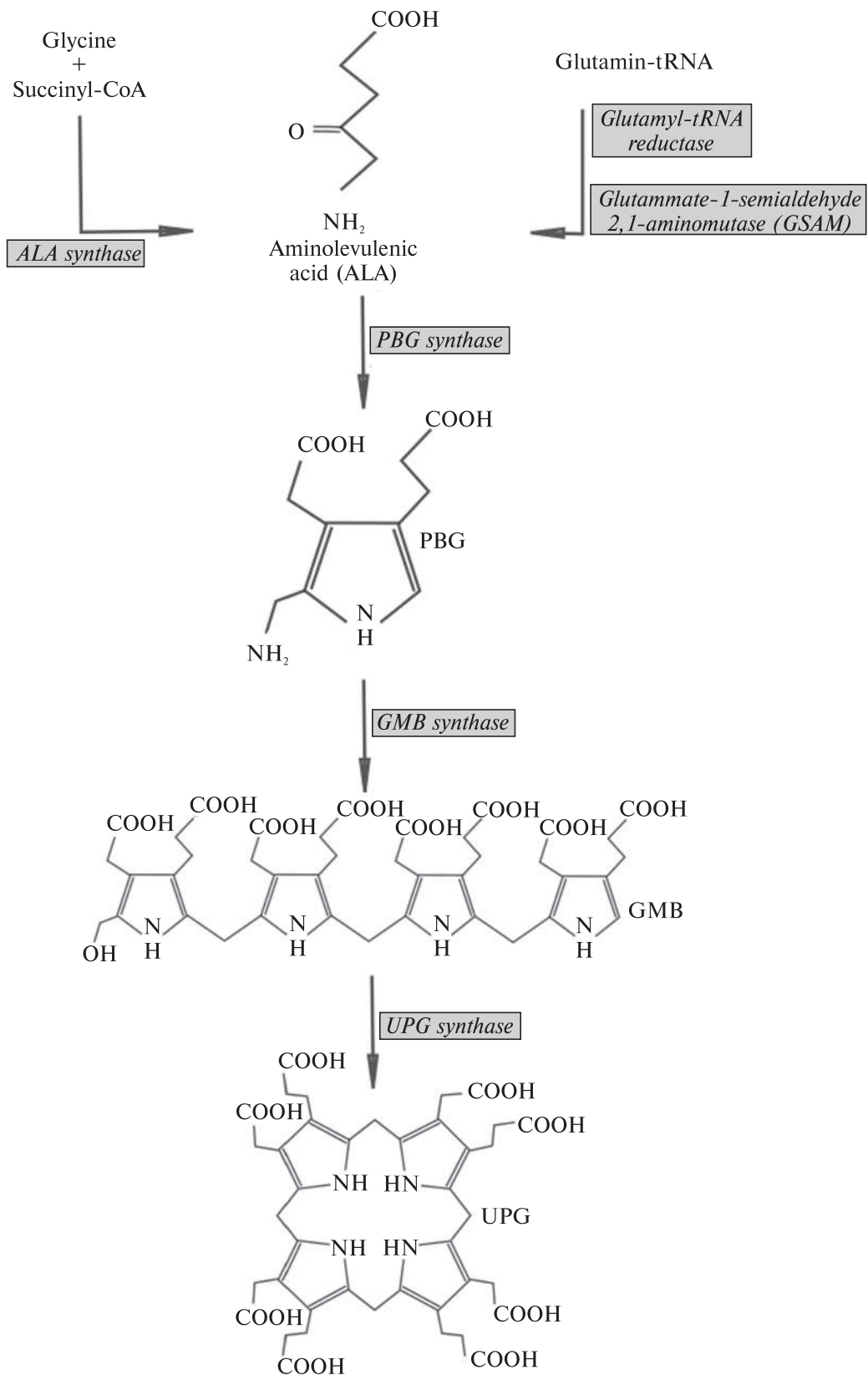


Рис. 1. Схема синтезу молекули уропорфіриногену III

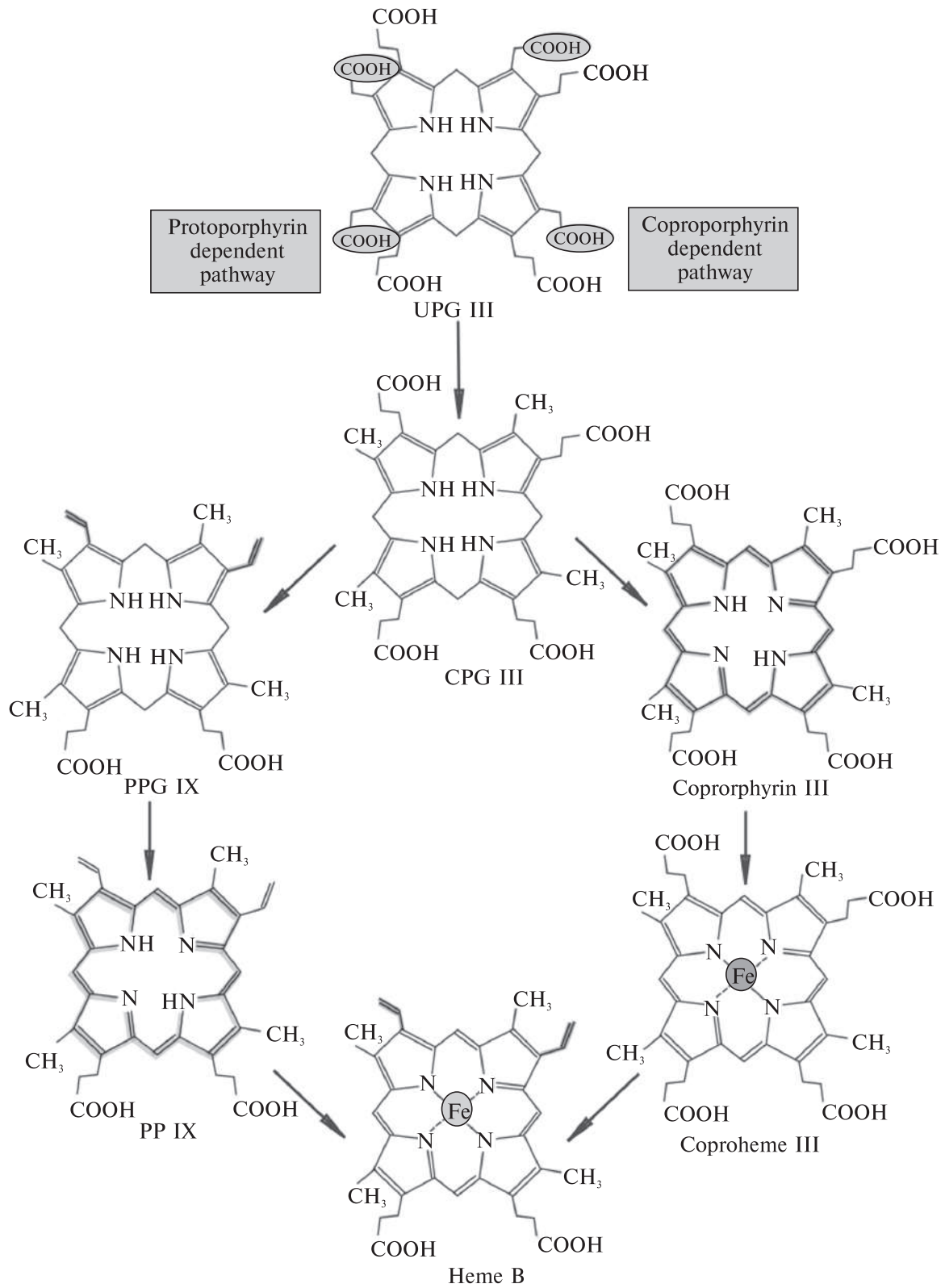


Рис. 2. Схема синтезу молекули гема канонічним протопорфірин-залежним і неканонічним копропорфірин-залежним шляхами

нями, і не зустрічається у еукаріот, архей та грам-негативних бактерій (Dailey et al, 2015).

Продуценти вільного гема та підвищення секреторного виробництва гему

Модифікація метаболічних шляхів Escherichia coli. Оскільки ALA є ключовим попередником в метаболізмі гему, важливо визначити оптимальний шлях її синтезу. Як правило, для підвищеного накопичення ALA в клітинах *E. coli* обирається C4-шлях (Kwon et al, 2009; Lee et al, 2013; Pranawidjaja et al, 2015). Концентрація ALA (7,3 г/л) була отримана за культивування з додаванням в поживне середовище гліцину та бурштинової кислоти. Без додавання цих речовин титр ALA значно зменшувався (Chung et al, 2005; Lin et al, 2009). Біосинтез ALA C5-шляхом на середовищі без додавання попередників виявився більше ефективним. Модифікований штам *E. coli* C4, з плазмідом pRSF-C4 і кодон-оптимізованим геном ALA синтази з *R. sphaeroides* (*hemA_{Rsp}*) та генами пантотенаткінази (*coaA*) та малатдегідрогенази (*maeB*) з *E. coli* продукував майже в 5 разів менше ALA ніж штам *E. coli* C5, з плазмідом pRSF-C5 і генами глутаміл-тРНК синтази (*gltX*), глутаміл-тРНК редуктази (*hemA*) та глутамат-1-семіальдегід 2,1-аміномутази (*hemL*) – 0,31 г/л та 1,74 г/л, відповідно.

Наступне перетворення ALA до гему в клітинах *E. coli* відбувається канонічним шляхом через протопорфірин і налічує сім послідовних реакцій. Надекспресія одночасно всіх семи генів дала найбільше наакопичення гему (Zhao et al, 2018). Відбувалось клонування генів ферментів в кілька плазмід з сумісними точками початку реплікації та різними селективними маркерами. Використовували дві плазмиди: плазміда pRSF-hemBCD, з генами ферментів PBG синтази, PBG деамінази та UPG синтази і плазміда pET-hemEFGH, з генами ферментів UPG декарбоксилази, CPG оксидази, PPG оксидази та ферохелатази.

Не лише надекспресія, але і нокаут деяких генів виявився ефективним підходом до збільшення біосинтезу гему. Фермент лактатдегідрогеназа конвертує піруват в лактат, а фермент фосфатацетилтрансфераза відповідає за перетворення ацетил-КоА в ацетат. Нокаут

генів цих ферментів відсікає альтернативні метаболічні шляхи і підвищує рівень синтезу глутамату і, як наслідок, гему. Крім того, ген *ufeX* кодує фермент, пов'язаний з деградацією гему і його нокаут також позитивно впливає на накопичення гему (Zhao et al, 2018).

Модифікація складу поживного середовища значним чином впливає на продуктивність штаму-продуценту. Для біосинтезу гему важливими є наявність достатньої кількості заліза та легкодоступного джерела нітрогену. Додавання FeSO₄ та (NH₄)₂SO₄ в середовище дозволило збільшити продукцію гему майже в 7 разів, з 15,1 мг/л до 103,9 мг/л, а додавання глутамату натрію замість (NH₄)₂SO₄ збільшило накопичення до 225,9 мг/л (Zhao et al, 2018).

Збільшення концентрації вільного гему в клітини збільшує і відсоток гему, що секретується в позаклітинне середовище. За ферментації з періодичним підживленням секретувались назовні 7,9 % гему з 15,1 мг/л; за ферментації в середовищі з FeSO₄ та (NH₄)₂SO₄ – 51,0 % з 103,9 мг/л; за ферментації з додаванням глутамату натрію – 58,4 % (132,0 мг/л з 225,9 мг/л) (Zhao et al, 2018). Підвищена концентрація гему в клітині викликає токсичний ефект, який можна зменшити вдосконаленням механізмів транспорту і секреції. Для цього гени білків-транспортерів *ccmABC* клонували в низькокопійну плазмиду pACYC-*ccmABC*. Як результат, вдалося отримати максимальне накопичення гему за періодичного культивування з додаванням FeSO₄ та глутамату натрію в кількості 239,2 мг/л, з яких 151,4 мг/л (63,3 %) секреторно (Zhao et al, 2018).

Модифікація метаболічних шляхів *Corynebacterium glutamicum*

C. glutamicum відомий мікроорганізм, який досить ефективно використовують в біотехнологічному виробництві амінокислот і привабливий об'єкт для розробки технологій рекомбінантних білків. Для збільшення продукції глутамінової та амінолевуленової кислоти було реалізовано декілька схем. За результатами термодинамічного аналізу (Seok et al, 2019) показано, що C4-шлях синтезу ALA та реакція відновлення глутаміл-тРНК до глутамат-1-семіальдегіду в C5-шляху є енергетично затратними і не вигідними. Було сконструйовано

три штама з надекспресією генів C4- та C5- шляхів, а також обох шляхів одночасно. Штам, який синтезував ALA двома метаболічними шляхами одночасно продукував гем в більшому об'ємі (22,95 мг/л) ніж інші два штама окремо C4- або C5-шляхами (10,74 мг/л і 18,11 мг/мл), відповідно (Ko et al, 2021). На відміну від *E. coli*, грампозитивна *C. glutamicum* синтезував гем неканонічним шляхом, через копрогем. Для досягнення підвищеного накопичення гемму було клоновано саме гени ферментів копрогем-залежного метаболічного шляху.

Підвищення рівня синтезу гемму мали штами з додатковими копіями генів ферментів трьох реакцій неканонічного шляху, через копрогем – *HemY* (CPG III оксидаза), *HemH* (ферохелатаза) та *HemQ* (копрогем декарбоксілаза). Надекспресія генів CPG оксидази, яка продукує H_2O_2 , та копропорфірин ферохелатази, що активно використовує залізо, негативно вплинула на швидкість росту біомаси і продукування гемму. Аналіз штаму з надекспресією гену ферохелатази показав суттєве зменшення рівнів mRNA всіх генів задіяних в біосинтезі гемму (крім ферохелатази, рівень якої навпаки збільшився в 200-разів) та збільшення рівня mRNA генів деяких білків, задіяних в дихальному ланцюгу та метаболізмі заліза (Ko et al, 2021).

Блок-репресор дифтерійного токсину (DTXR) залізо-зв'язуючий репресор генів дифтерійного токсину може виступати також як загальний регулятор рівня експресії генів (Ko et al, 2018). Його надекспресія в попередньо згаданих штамах дозволила відновити швидкість росту біомаси та поліпшила загальний рівень продукції гемму. Помічено накопичення уропорфіриногену III, що може свідчити щодо лімітуючу реакцію його декарбоксілування. Зняти це обмеження можна додатковою копією гену *hemE*.

Вивчено вплив білків-транспортів на рівень секреції гемму. В штамах з додатковими копіями генів *HrtA* та *HrtB* (гем-регульовані транспортери) не тільки зріс віссоток секретованого гемму, але й його загальне накопичення. Хоча штам з надекспресією гену *csaA* (експортер цитохрому C) мав більший відсоток секреції, але загальна кількість гемму була знижена (Ko et al, 2021).

Деякі трансмембранні білки здатні зв'язувати гем, зменшуючи таким чином його кількість в середовищі. Нокаут генів таких білків мав позитивний ефект на секрецію гемму. Три гени, *HrrS*, *HtaA* та *HmuT*, які кодують мембранні ABC-транспортери, було нокаutowано шляхом внесення нонсенс мутацій системою CRISPR-Cas12a. Відомо, що гем може зв'язуватись з залишками жирних кислот мембрани. Для зменшення цього ефекту клітини було оброблено етамбутолом, який знижує синтез міколових жирних кислот. За таких умов спостерігалось зниження загальної продукції гемму і швидкості росту бактерій. Штам *C. glutamicum* з найвищою продуктивністю мав нокаutowані гени *HrrS*, *HtaA* та *HmuT*, а також ніс дві плазмиди – плазмиду pX2-ALSdtE (з генами ALA синтази, глутаміл-tRNA редуктази, глутамат-1-семіальдегід амінотрансферази, уропорфіриноген III декарбоксілази та репресора дифтерійного токсину) та плазмиду pMTZ-YHQVA (з генами *HemY*, *HemH*, *HemQ*, *HrtA* та *HrtB*). За культивування з підживленням впродовж 48 годин було отримано 177,79 мг/л гемму, з яких 129,81 мг/л – секреторно (73 %) (Ko et al, 2021).

Мікроорганізми *E. coli* та *C. glutamicum* використовують як модельні організми для синтезу рекомбінантного гемму. Однак, створення штамів продуцентів гемму можливо і з використанням інших бактерій. Так, *Bacillus subtilis*, типовий модельний мікроорганізм у біотехнологічних дослідженнях та промислового виробництва, був використаний для вдосконалення синтезу гемму шляхом метаболічної інженерії в умовах періодичної культивування (Yang et al, 2023). Шлях біосинтезу гема був сконструйований як чотири модулі: ендогенний шлях C5, гетерологічний шлях C4, шлях синтезу уропорфіриногену III і подальший синтез. Штам продуцент утворював $248,26 \pm 6,97$ мг/л загального гема з $221,83 \pm 4,71$ мг/л позаклітинного гемму під час періодичної культивування в біореакторі об'ємом 10 л.

Продуценти гемоглобінів на основі клітин дріжджів

Використовуючи методи генетичної інженерії було отримано продуценти рекомбінантного гемоглобіну із використанням клітин бактерій,

дріжджів та рослин. Перші моделі бактеріального продуцента гемоглобіну (α - та β -субодиниць) було створено на основі клітин *E. coli* (Shen et al, 1993). Бактеріальні клітини промислового продуцента рекомбінантного гемоглобіну мали низку недоліків – не ефективні механізми з'єднання апофермента з гемом, відсутність механізмів процесингу N-кінця білку, обмежену доступність гему і необхідність додатково додавати гем, гемін або ALA до культурального середовища для підвищення накопичення гему. Дріжджі, мають довгу історію промислового використання і є більш привабливими мікроорганізмами для виробництва складних рекомбінантних білків, таких як гемоглобіни. Механізми утворення та транспорту гема в клітинах дріжджів ідентичні до механізмів в клітинах тварин, де синтез відбувається частково в мітохондріальному матриксі та частково в цитозолі. Для отримання рекомбінантного гемоглобіну в клітинах дріжджів відсутня необхідність додаткового підживлення геміном та ALA. В більшості випадків дріжджі забезпечують правильний фолдинг та посттрансляційну модифікацію еукаріотичних білків. Їх геном добре досліджено, розроблено та комерційно доступно різноманітні плазмиди, що полегшує генетичні модифікації.

Модифікація метаболічних шляхів в дріжджах *Saccharomyces cerevisiae*

Продуценти людського гемоглобіну на основі *S. cerevisiae* почали створювати в кінці 80-х років (Adachi et al, 1992; Coghlan et al, 1992). Для одночасного синтезу α - та β -субодиниць створено вектор рGS389 на основі 2 μ плазмиди дріжджів та відомої плазмиди рBR322, з генами α - та β -субодиниць під контролем гібридного промотора рGGAP. Експресію обох генів індукували додаванням галактози, після повного використання глюкози середовища. Не зважаючи на відповідний контроль, дріжджі змогли використовувати власний ендогенний гем для успішного формування молекули гемоглобіну в кількості 3–5 % від всіх білків клітини (Wagenbach et al, 1991). Рекомбінантний гемоглобін дріжджів структурно ідентичний до гемоглобіну людини, зберігає повністю свої

функціональні властивості і має відповідні рівні зв'язування і дисоціації з киснем.

Ферменти, що приймають участь в синтезі гему добре відомі і вивчено, а їх гени визначено. Аналізування кінетичних показників кожної реакції дозволило виявити показники, що потенційно могли бути лімітуючими в синтезі гема. Встановлено, що активність ферментів PBG синтази, PBG деамінази та UPG декарбоксилази *in vivo* близька до їх максимальної активності *in vitro* (Hoffman et al, 2003).

Для визначення впливу надспресії потенційно лімітуючих ферментів було використано штами *S. cerevisiae* S150-2B (дикий тип) та *S. cerevisiae* S150-2B hem4 Δ (з нокаутованим геном UPG синтази, для накопичення уропорфіринів), які трансформували плазмідами рPBGS1, рPBGD1 та Yер351-HEM12 (з клонуваними генами PBG синтази, PBG деамінази та UPG декарбоксилази, відповідно). Найбільше порфіринів накопичували штами трансформовані комбінацією плазмід рPBGS1 та рPBGD1. На середовищі з додаванням 250 мг/мл ALA концентрація порфіринів в цих клітинах збільшувалась 20-кратно в порівнянні з нетрансформованими (Hoffman et al, 2003).

В роботі (Liu et al, 2014) було встановлено, що надекспресія лише HEM3 (PBG деамінази) одночасно з оптимізацією експресії α - та β -субодиниць призвело до найвищого рівня активного гемоглобіну (4 % від всіх розчинних білків клітини). Рівень активного гемоглобіну був в 1,3 рази більше в порівнянні зі штамом з лише оптимізованими субодиницями. Штами-продуценти створили за допомогою експресуючих плазмід рIYC04 та рSP-GM1. Подальші модифікації дозволили підвищити накопичення гемоглобіну. Фактор транскрипції Rox1 регулював транскрипцію гена *HEM13*, а видалення гена *ROX1* викликало збільшення внутрішньоклітинного рівня гема (Zhang et al, 2017).

Гетерологічні білки активно руйнуються в клітинах дріжджів, але делеція низки генів пов'язаних з деградацією білків дозволила сповільнити цей процес. Було вирізано гени *VPS10* (кодує рецептор для вакуолярних протеаз), *PEP4* (кодує протеїназу А) та *HMX1* (кодує гемоксигеназу) (Ishchuk et al, 2021). Штам з

такими делеціями накопичував гемоглобін на рівні 8 % від загальної кількості білка. Було також отримано штам з найвищою продуктивністю гемоглобіну (18 %), завдяки додатковій надекспресії гену *AHSP* (Alpha-Haemoglobin Stabilizing Protein).

Модифікація метаболічних шляхів в метилотрофних дріжджах *Pichia pastoris*

Привабливою альтернативою *S. cerevisiae* є метилотрофні дріжджі *P. pastoris*, переважно завдяки розвиненій системі везикулярного транспорту і секреції. *P. pastoris* має високі показники внутрішньоклітинного виробництва рекомбінантних білків і здатна здійснювати всі посттрансляційні модифікації, невибаглива до умов культивування, росте на недорогому мінімальному середовищі. На основі *P. pastoris* було створено продуценти легемоглобіну сої (Shankar and Hoyt, 2018).

Легемоглобін належить до групи рослинних симбіотичних гемоглобінів, які вперше були виявлені в корневих бульбочках сої і основна функція яких, полягає в стимуляції засвоєння та транспортування кисню. Легемоглобін складається з гемової частини і одного поліпептиду (глобіну), причому гемовий компонент, на відміну від амінокислотної послідовності глобіну, залишається сталим і не залежить від виду бобової рослини та штаму бактерій (Singh and Varma, 2017). Останнім часом легемоглобін сої привертає увагу завдяки участі у широкому спектрі процесів. Легемоглобін є клітинним транспортером кисню, забезпечує біодоступність заліза, слугує заміником тваринних білків із збереженням органолептичних властивостей м'яса. Легемоглобін використовують як харчовий барвник і ароматизатор (Ahmad et al, 2023).

Ген легемоглобіну сої C2, під контролем метанол-індуцибельного промотора AOX1 та додаткових копій власних восьми генів ферментів, задіяних в синтезі гему, також під контролем AOX1, було інтегровано в геном *P. pastoris* Bg11 за допомогою плазмід pGAZ та pGAN (Shankar and Hoyt, 2018).

Надекспресія лише одного гена *HEM3* для *S. cerevisiae* виглядає ефективною стратегією для підвищення продукції гемовмісних білків, але для *P. pastoris* цей підхід результатів не дав.

За індивідуальної надекспресії восьми генів ферментів, задіяних в синтезі гему, продукція рекомбінантного легемоглобіну зростала (Shao et al, 2022). Найбільша концентрація легемоглобіну зафіксована для штаму з копією *HEM1*, що свідчить про різні механізми регуляції цього метаболічного шляху у *S. cerevisiae* та *P. pastoris*. Суттєве підвищення синтезу легемоглобіну було досягнуто одночасною надекспресією всіх восьми генів (під контролем pAOX1), інтегрованих в геном за допомогою плазмиди pAO815. Ген легемоглобіну сої в цьому випадку був інтегрований в геном багатокопійно, під змішаним контролем індукційного (pAOX1) та конститутивного (pTEF1) промоторів. Багатокопійність було досягнуто за рахунок кількох серій пост-трансформаційної ампліфікації вектора (PTVA) (Shao et al, 2022). В результаті, за культивування з періодичним підживленням було досягнуто продуктивність штаму 3,5 г/л.

Використовували також і безпечні для харчових продуктів дріжджі (safe-food yeast) *Kluyveromyces marxianus* як продуцент легемоглобіну. Модулі синтезу гему, які містили до 8 генів попередників гему та подальшого синтезу, було перенесено у дріжджі з використанням дріжджової штучної хромосоми, а гени, що інгібували синтез легемоглобіну було видалено (Tian et al, 2024). Шляхом генно-інженерних маніпуляцій та модифікації умов культивування (оптимізація вмісту глюкози у середовищі, гліцину та $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) сконструйований штам накопичував 6,32 мг/л гему у біореакторі об'ємом 5 л, а внутрішньоклітинний титр легемоглобіну становив 7,27 г/л.

Мікроорганізми-продуценти та особливості синтезу гему

Гем, як основний структурний елемент гемопротейнів, відіграє важливу роль у прокариотичних та еукаріотичних клітинах, що є підґрунтям для створення генетичних конструкцій на основі мікроорганізмів для синтезу цього кофактору. Для створення продуцентів використовують як прокариотичні, так і еукаріотичні організми (рис. 3).

Для підвищення внутрішньоклітинного рівня гему з метою синтезу його похідних та гемопротейнів у мікроорганізмах використовують різні методи і підходи, зокрема системну

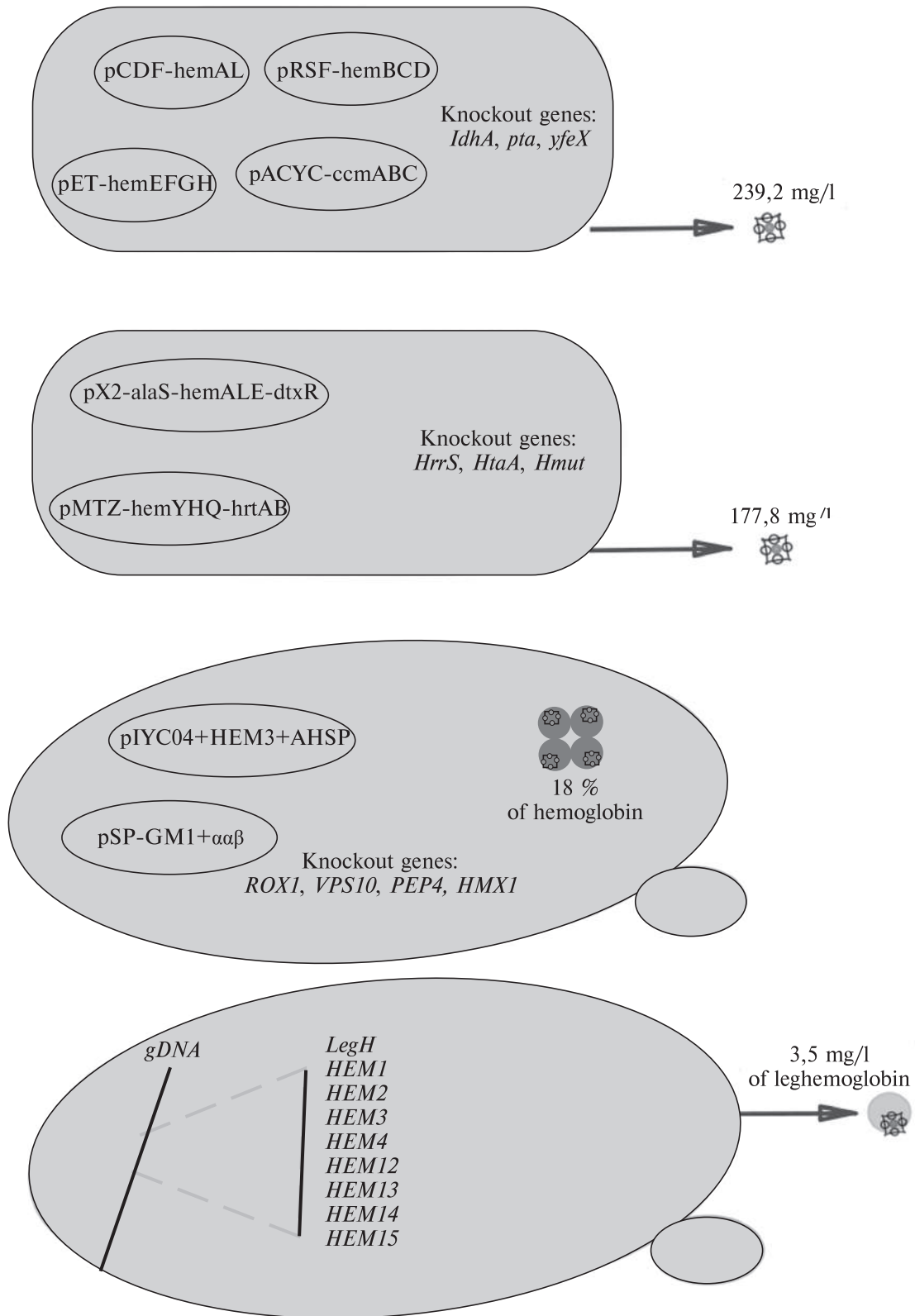


Рис. 3. Гени та генетичні конструкції штамів-продуцентів гему та гемоглобінів: а. *E. coli* (Choi et al, 2022; Zhao et al, 2018), б. *C. glutamicum* (Ko et al, 2021), в. *S. cerevisiae* (Ishchuk et al, 2021), д. *P. pastoris* (Shao et al, 2022)

метаболомну інженерію, моделювання метаболізму на рівні геному та реконструкцію метаболічних шляхів. Відомо дві стратегії створення штамів продуцентів: перша передбачає маніпуляції з генами синтезу гему, а друга направлена на вдосконалення механізмів регуляції цього процесу. У першому випадку більшість модифікацій пов'язано з акумуляцією амінолевуленової кислоти, як ключового попередника гему, шляхом посилення одного з двох можливих шляхів синтезу. Увагу дослідники зосередили на C4-шляху синтезу, оскільки такий шлях короткий і відносно простий, а джерелом вуглецю слугував гліцерол. Наразі, *E.coli* продукував найвищий титр амінолевуленової кислоти (30,7 г/л) і містив модифікований варіант ALA синтази *Rhodospseudomonas palustris* (Pu et al, 2023). Створення конструкцій з модифікацією C5 шляху пов'язано з використанням глюкози як джерела вуглецю та маніпуляцій з ферментами синтезу амінолевуленової кислоти, такими як глутаміл-tRNA-синтетаза та глутаміл-tRNA-редуктаза, що призвело до збільшення титру амінолевуленової кислоти до 11,4 г/л (Luo et al, 2022). Інші напрямки збільшення рівня гем у клітинах пов'язані з вдосконаленням шляхів мембранного та трансмембранного транспорту гем у (Yu et al, 2024). Серед шляхів вдосконалення механізмів регуляції синтезу гем розрізняють інгібування експресії або видалення генів, що кодують гем-зв'язуючі білки, надекспресію експортерів гем та зменшення накопичення проміжних продуктів синтезу (Zhao et al, 2018).

Однак, незважаючи на перспективи використання рекомбінантних штамів, наразі існують певні ускладнення і проблеми, які потребують вирішення або удосконалення (Yu et al, 2024).

Висновки

Створення ефективних продуцентів гем у та гемоглобіну ґрунтується на зміні генетичного матеріалу мікроорганізмів. Кожна з представлених моделей має як переваги, так і недоліки. Створення продуцентів на основі прокаріотичних організмів передбачає використання плазмідних конструкцій для надекспресії цільових генів. З одного боку, це означає просту і швидку процедуру трансформації, з ін-

шого – необхідність додавати селективні антибіотики в поживне середовище. Оскільки використовуються одночасно кілька плазмід з сумісними точками початку реплікації, необхідно додавати декілька відповідних антибіотиків. Вільний гем, що накопичується в середовищі вимагає подальшої очистки. За використання продуцентів на основі еукаріотичних організмів існує можливість модифікувати їх геномну DNA і створити стабільні штами, що не вимагатимуть селективних компонентів в культуральному середовищі. Для *P. pastoris* цільова інтеграція генів в геномну DNA ускладнена. Це пов'язано з тим, що основним механізмом репарації розривів геномної DNA є негомологічне з'єднання кінців (non-homologous end-joining – NHEJ), а гомологічна рекомбінація пригнічена. Для підвищення інтеграції використовують штами з нокаутованим геном *ku70* (Naatsaari et al, 2012; Shao et al, 2022), після чого ген відновлюють для подальшого культивування штаму. Завдяки домінуючому механізму гомологічної рекомбінації, цільова інтеграція генів у дріжджів *S. cerevisiae* більш ефективна.

Автори проаналізували і провели порівняння методів та різних стратегій отримання мікроорганізмів-продуцентів гем у, легемоглобіну і гемоглобіну. для визначення ефективного, на нашу думку, методу створення штамів-продуцентів рекомбінантного гемоглобіну. Для подальшого дослідження обрали як базовий штам-продуцент дріжджів *S. cerevisiae* ATCC-18824. Кодон-оптимізований ген соєвого легемоглобіну *LBC2* та копії генів ферментів, задіяних в синтезі гем у, *HEM1*, *HEM2*, *HEM3*, *HEM4*, *HEM12*, *HEM13*, *HEM14*, *HEM15*, під контролем індукційного промотора pGAL1, необхідно вставити за допомогою CRISPR-Cas9. Робоча плазміда, що експресує Cas9 ендонуклеазу та sgRNA зібрана з елементів набору Mo-Clo YTK (Lee et al, 2015). Необхідні функціональні елементи були спочатку зібрані в три проміжні конструкції: в першій – послідовність початку реплікації з дріжджової багатокопійної 2μ-плазміди та ген стійкості до канаміцину, для селекції в клітинах дріжджів, а також оріджин та селективний маркер (ген стійкості до ампіциліну) для селекції в клітинах *E. coli*; в другій – кодуюча послідовність

Cas9 ендонуклеази під контролем конститутивного промотора рPGK1 та термінатора tPGK1; в третій – елемент для експресії єдиної зли-тої sgRNA. Конструкції містили конектори, які дозволили об'єднати всі елементи в одну плазмиду. Остаточна конструкція є човником багатокопійним вектором для редагування геному дріжджів за допомогою CRISPR-Cas9, і потребує перед використанням лише вставки відповідної гайдерної послідовності в 20 пар нуклеотидів.

На жаль, у випадку дріжджів, досі ще не встановлено всі лімітуючі фактори, що впливають на рівень синтезу та транспорту гему і його попередників (Yien and Perfetto, 2022). Подальша оптимізація метаболізму продуцентів на генетичному рівні та умов їх культивування необхідна для збільшення виробництва кінцевих продуктів і розроблення відповідної промислової технології.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить досліджень за участю людей або тварин у виконанні будь-якого з авторів

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту.

Фінансування. Дослідження було профінансовано НАН України за рахунок відомчої тематики «Створення рекомбінантних мікробних надпродуцентів харчових добавок легемоглобіну та рибофлавіну». Державний реєстраційний номер 0124U002606.

ELABORATION OF HEME AND HEMOGLOBINS PRODUCERS USING MICROORGANISMS

O.H. Pidkurhanna, L.B. Zelena, S.M. Shulha

Institute of Food Biotechnology and Genomics, the NAS of Ukraine, Kyiv, 04214, Ukraine

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, the NAS of Ukraine, Kyiv, 03143, Ukraine

E-mail: pidkurhanna@gmail.com, zelenalyubov@hotmail.com, shulga5@i.ua

The production of hemoglobins using microorganisms is a current urgent problem which should be solved to meet the needs of medicine and food industry. One of the steps in obtaining this protein is its microbiological synthesis, using the predecessor – a heme. We analyzed the results of the studies in obtaining heme and heme-containing proteins from prokaryotic (*Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*), and eukaryotic (*Saccharomyces*

cerevisiae, *Pichia pastoris*) microorganisms. It was shown that the producers, created using *E. coli* and *C. glutamicum*, synthesized a free heme in the exogenous way, while yeast *P. pastoris* and *S. cerevisiae* were the most effective producers for the synthesis of both endo- and exogenously complex heme-containing proteins – hemoglobin and leghemoglobin. It was demonstrated that the elaboration of effective producers of heme and hemoglobin was based on changing the genetic material of microorganisms; the stages of heme synthesis and the points of possible modifications of this process were determined. The genetically modified models of yeast – producers of heme-containing proteins were characterized. Based on the summary of the analyzed data, it was determined that the most promising producers for further improvement and oversynthesis of heme-containing proteins are yeast cells.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Adachi K, Konitzer P, Lai CH, Kim J, Surrey S (1992) Oxygen binding and other physical properties of human hemoglobin made in yeast. *Protein Eng* 5(8):807–810. <https://doi.org/10.1093/protein/5.8.807>
- Ahmad MI, Farooq S, Alhamoud Y, Li C, Zhang H (2023) Soy Leghemoglobin: A review of its structure, production, safety aspects, and food applications. *Trends Food Sci Technol*, 104199 p. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104199>
- Baureder M, Hederstedt L (2012) Genes important for catalase activity in *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* 7:e36725. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036725>
- Beale SI, Castelfranco PA (1973) 14C incorporation from exogenous compounds into δ -aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons. *Biochem Biophys Res Commun* 52(1):143–149. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(73\)90966-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)90966-2)
- Choi KR, Yu HE, Lee H, Lee SY (2022) Improved production of heme using metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 119(11):3178–3193. <https://doi.org/10.1002/bit.28194>
- Chung SY, Seo KH, Rhee JI (2005) Influence of culture conditions on the production of extra-cellular 5-aminolevulinic acid (ALA) by recombinant *E. coli*. *Process Biochem* 40:385–394. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.024>
- Coghlan D, Jones G, Denton KA, Wilson MT, Chan B, Harris R, Woodrow JR, Ogden JE (1992) Structural and functional characterization of recombinant human haemoglobin A expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 207(3):931–936. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17126.x>
- Dailey HA, Gerdes S, Dailey TA, Burch JS, Phillips

- JD (2015) Noncanonical coproporphyrin-dependent bacterial heme biosynthesis pathway that does not use protoporphyrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(7):2210–2215. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416285112>
- Dailey HA, Dailey TA, Gerdes S, Jahn D, Jahn M, O'Brian M R, Warren MJ (2017) Prokaryotic heme biosynthesis: multiple pathways to a common essential product. *Microbiol Mol Biol Rev* 81(1):e00048–16. <https://doi.org/10.1128/membr.00048-16>
- Gell DA (2018) Structure and function of haemoglobins. *Blood Cell Mol Dis* 70:13–42. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.10.006>
- Gupta AS (2019) Hemoglobin-based oxygen carriers: current state-of-the-art and novel molecules. *Shock* 52(1):70–83. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001009>
- Hoffman M, Gora M, Rytka J (2003) Identification of rate-limiting steps in yeast heme biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 310(4):1247–1253. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.151>
- Ishchuk O, Frost A, Muniz F et al (2021) Improved production of human hemoglobin in yeast by engineering hemoglobin degradation. *Metab Eng* 66: 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.05.002>
- Jia Y, Xu X, Ou J, Liu X (2017) Solid-phase extraction of hemoglobin from human whole blood with a coordination-polymer-derived composite material based on ZnO and mesoporous carbon. *Chemistry* 23:16026–16033. <https://doi.org/10.1002/chem.201703232>
- Ko YJ, Joo YC, Hyeon JE, Lee E, Lee ME, Seok J, Kim SW, Park C, Han SO (2018) Biosynthesis of organic photosensitizer Zn-porphyrin by diphtheria toxin repressor (DtxR)-mediated global upregulation of engineered heme biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Sci Rep* 8:14460. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32854-9>
- Ko YJ, Kim M, You SK, Shin SK, Chang J, Choi HJ, Jeong WY, Lee ME, Hwang DH, Han SO (2021) Animal-free heme production for artificial meat in *Corynebacterium glutamicum* via systems metabolic and membrane engineering. *Metab Eng* 66:217–228. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.04.013>
- Kresge N, Simoni RD, Hill RL (2006) A pathway for heme biosynthesis: the work of David Shemin. *J Biol Chem* 281(34):e28. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)95190-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)95190-2)
- Kwon OH, Kim S, Hahm DH, Lee SY, Kim P (2009) Potential application of the recombinant *Escherichia coli*-synthesizes heme as a bioavailable iron source. *J Microbiol Biotechnol* 19(6):604–609. <https://doi.org/10.4014/jmb.0810.565>
- Layer G, Reichelt J, Jahn D, Heinz DW (2010) Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Sci* 19(6):1137–1161. <https://doi.org/10.1002/pro.405>
- Laye, G (2021) Heme biosynthesis in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1868(1):118861. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118861>
- Lee MJ, Kim HJ, Lee JY, Kwon AS, Jun SY, Kang SH, Kim P (2013) Effect of gene amplifications in porphyrin pathway on heme biosynthesis in a recombinant *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol* 23(5):668–673. <https://doi.org/10.4014/jmb.1302.02022>
- Lee ME, DeLoache WC, Cervantes B, Dueber JE (2015) A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synth Biol* 4(9):975–986. <https://doi.org/10.1021/sb500366v>
- Lin JP, Fu WQ, Cen PL (2009) Characterization of 5-aminolevulinate synthase from *Agrobacterium radiobacter*, screening new inhibitors for 5-aminolevulinate dehydratase from *Escherichia coli* and their potential use for high 5-aminolevulinate production. *Bioreour Technol* 100:2293–2297. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.008>
- Liu L, Martinez JL, Liu Z, Petranovic D, Nielsen J (2014) Balanced globin protein expression and heme biosynthesis improve production of human hemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* 21:9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.10.010>
- Luo Z, Pan F, Zhu Y (2022) Synergistic improvement of 5-aminolevulinic acid production with synthetic scaffolds and system pathway engineering. *ACS Synth Biol* 11:2766–2778. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00157>
- Naatsaari L, Mistlberger B, Ruth C, Hajek T, Hartner FS, Glieder A (2012) Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. *PLoS One*. 7(6):e39720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039720>
- Piskin E, Cianciosi D, Gulec S, Tomas M, Capanoglu E (2022) Iron absorption: factors, limitations, and improvement methods. *ACS Omega* 7(24):20441–0456. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01833>
- Pranawidjaja S, Choi SI, Lay BW, Kim P (2015) Analysis of heme biosynthetic pathways in a recombinant *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol* 25(6):880–886. <https://doi.org/10.4014/jmb.1411.11050>
- Pu W, Chen J, Zhou Y (2023) Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for hyper-production of 5-aminolevulinic acid. *Biotechnol Biofuels Bioprod* 16:31. <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02280-9>
- Seok J, Ko YJ, Lee ME (2019) Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for the bioproduction of biliverdin via protoporphyrin

- independent pathway. *J Biol Eng* 13:28. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0156-5>
- Shankar S, Hoyt MA (2018) Impossible Foods Inc., assignee. Expression Constructs and Methods of Genetically Engineering Methylophilic Yeast. United States Patent 009938327B2. Apr 10.
- Shao Y, Xue C, Liu W, Zuo S, Wei P, Huang L et al (2022) High-level secretory production of leg-hemoglobin in *Pichia pastoris* through enhanced globin expression and heme biosynthesis. *Bioresour Technol* 363:127884. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127884>
- Shen TJ, Ho NT, Simplaceanu V, Zou M, Green BN, Tam MF, Ho C (1993) Production of unmodified human adult hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(17):8108–8112. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.8108>
- Singh S, Varma A (2017) Structure, Function, and Estimation of Leghemoglobin. In: Hansen A, Choudhary D, Agrawal P, Varma A (eds) *Rhizobium Biology and Biotechnology*. Soil Biol 50. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-64982-5_15
- Sun F, Cheng Y, Chen C (2015) Regulation of heme biosynthesis and transport in metazoa. *Sci China Life Sci* 58:757–764. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4885-5>
- Swenson SA, Moore CM, Marcero JR, Medlock AE, Reddi AR, Khalimonchuk O (2020) From synthesis to utilization: The ins and outs of mitochondrial heme. *Cells* 9(3):579. <https://doi.org/10.3390/cells9030579>
- Tian T, Wu X, Wu P, Lu X, Wang Q, Lin Y, Liu C, Zhou J, Yu Y, Lu H (2024) High-level expression of leghemoglobin in *Kluyveromyces marxianus* by remodeling the heme metabolism pathway. *Front Bioengin Biotechnol* 11:1329016. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1329016>
- Wagenbach M, O'Rourke K, Vitez L, Wieczorek A, Hoffman S, Durfee S, Tedesco J, Stetler G (1991) Synthesis of wild type and mutant human hemoglobins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology (NY)* 9(1):57–61. <https://doi.org/10.1038/nbt0191-57>
- Zhang T, Bu P, Zeng J, Vancura A (2017) Increased heme synthesis in yeast induces a metabolic switch from fermentation to respiration even under conditions of glucose repression. *Gene regulation* 292(41):16942–16954. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.790923>
- Zhao XR, Choi KR, Lee SY (2018) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for secretory production of free haem. *Nature Catalysis* 1:720–728. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0126-1>
- Zhao X, Zhou J, Du G, Chen J (2021) Recent advances in the microbial synthesis of hemoglobin. *Trends in Biotechnology* 39(3):286–297. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.08.004>
- Yang S, Wang A, Li J, Shao Y, Sun F, Li S, Gao Z (2023) Improved biosynthesis of heme in *Bacillus subtilis* through metabolic engineering assisted fed-batch fermentation. *Microbial Cell Factories* 22(1):102. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02077-3>
- Yien YY, Perfetto M (2022) Regulation of heme synthesis by mitochondrial homeostasis proteins. *Front Cell Dev Biol* 10:895521. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.895521>
- Yu F, Wang Z, Zhang Z, Zhou J, Li J, Chen J, Zhao X (2024) Biosynthesis, acquisition, regulation, and upcycling of heme: recent advances. *Critical Rev Biotechnol* 1–17. <https://doi.org/10.1080/07388551.2023.2291339>

Надійшла в редакцію 01.04.2024
Після доопрацювання 10.04.2024
Прийнята до друку 18.07.2024