

재조합 *Corynebacterium glutamicum* 으로부터 헴철 생산에 미치는 프로모터의 효과

양형모, 김 필*

가톨릭대학교 생명공학과

Received: July 2, 2018 / Revised: August 20, 2018 / Accepted: September 15, 2018

Effect of Promoters on the Heme Production in a Recombinant *Corynebacterium glutamicum*

Hyungmo Yang and Pil Kim*

Department of Biotechnology, The Catholic University of Korea, Bucheon 14662, Republic of Korea

We published that bacterial heme was over-produced in a recombinant *Corynebacterium glutamicum* expressing 5-aminolevulinic acid synthase (*hemA*⁺) under control of a constitutive promoter (P_{180}) and the heme-producing *C. glutamicum* had commercial potentials; as an iron feed additive for swine and as a preservative for lactic acid bacteria. To enhance the heme production, the *hemA*⁺ gene was expressed under controls of various promoters in the recombinant *C. glutamicum*. The *hemA*⁺ expression by P_{gapA} (a constitutive glycolytic promoter of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) led 75% increase of heme production while the expression by P_{H36} (a constitutive, very strong synthetic promoter) resulted in 50% decrease compared with the control (*hemA*⁺ expression by P_{180} constitutive promoter). The *hemA*⁺ expression by a late log-phase activating P_{sod} (an oxidative-stress responding promoter of superoxide dismutase) led 50% greater heme production than the control. The *hemA*⁺ expression led by a heat-shock responding chaperone promoter (P_{dnaK}) resulted in 121% increase of heme production at the optimized heat-shock conditions. The promoter strength and induction phase are discussed based on the results for the heme production at an industrial scale.

Keywords: Heme, P_{180} , P_{gapA} , P_{H36} , P_{sod} , P_{dnaK}

서론

헴철(heme-iron)은 포르피린(porphyrin) 구조에 철(iron) 이온이 배위결합으로 결합되어 있는 분자로 많은 생명체에 서 폭 넓게 발견된다. 동물에서는 적혈구 내의 헴철이 산소 분자를 운반하고, 진핵세포 내 미토콘드리아나 원핵세균의 전자전달계에서는 전자전달 역할을 하며, 여러 효소의 산화 환원 반응이나 신호전달의 기능을 담당하는 단백질들의 보결분자단(prosthetic group)으로 작용한다[1]. 헴철의 생합성은 생명체에서 매우 정밀하게 조절된다. 세포 내 헴철이 필요량보다 부족하면 전자전달에 의한 생물에너지 생산이나

활성산소(ROS: reactive oxygen species)에 대한 방어가 부족하게 되어 점진적으로 세포의 사멸까지 이르게 된다. 반면에 필요량보다 잉여로 생합성되면 지나친 전자전달과 산화 환원 반응에 의해 과잉의 활성산소가 발생하게 되어 역시 사멸까지 이르게 된다[2]. 세포내 헴철의 생합성 조절의 첫 단계는 포르피린의 전구물질인 5-aminolevulinic acid (ALA)의 합성이다. 세균, 고세균, 식물 또는 조류에서 발견되는 C5 경로(C5 pathway)에서는 glutamate를 기본으로, NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)와 ATP (Adenosine Tri-Phosphate)를 사용하여 glutamyl-tRNA, glutamate-1-semialdehyde를 거쳐 ALA가 생합성되며, 경로의 첫 단계를 촉매하는 효소인 glutamyl-tRNA reductase (*hemA*)가 세포 내 헴철 농도에 따라 전사수준(transcription level) 단계와 Heme 단백질의 분해단계에서 엄격하게 통제 된다[3]. 대장균(*Escherichia coli*)내 *hemA* 전사는 2개의 σ^{70}

*Corresponding author

Tel: +82-2-2164-4922, Fax: +82-2-2164-4865

E-mail: kimp@catholic.ac.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

프로모터 지역에 의해 조절되며 1번 프로모터 서열이 85–90%, 2번 프로모터 서열이 10–15%의 전사를 담당하는데 [4], 1번 프로모터 서열은 과량 생합성된 자유 헴철(free heme-iron)-감지단백질 복합체에 의해 전사단계를 감소시킨다 [5]. 또한, 단백질 분해단계에서는 과량 생합성된 자유 헴철이 세포 내에 존재하여 HemA 단백질(glutamyl-tRNA reductase)과 결합하게 되면 N-말단이 노출되어 Lon/ClpAP 단백질분해효소를 활성화시킴에 의해 분해가 촉진된다 [6].

저자들은 헴철을 과량으로 생합성하도록 재조합된 세균이 상업적으로 가축의 사료첨가제(생체이용률이 높은 형태의 철 원소 공급)나 유산균(lactic acid bacteria)의 보존제나 생장 촉진제(활성산소 제거효소의 보결분자단 제공) 등의 다양한 활용 가능성을 제시한 바 있다 [7]. 이때 저자들은 세균에서 발견되는 C5 경로의 조절기작을 회피하기 위하여, 효모나 포유류에서 발견되는 C4 경로(C4 pathway)의 첫 반응(succinyl-CoA와 glycine의 축합반응에 의한 ALA 생합성)을 촉매하는 ALA synthase (*hemA*⁺) [3]를 세균에 도입하여 헴철 과생산을 유도하였다 [7, 8]. 그런데, 과량 생합성된 헴철은 활성산소의 발생도 비례적으로 증가시켜 재조합된 세균의 생장이 억제되기 때문에 산업적 규모의 헴철 발효생산에서 장애로 지적되기도 하였다 [9]. 산업적 규모에서 많이 사용되고 있는 *Corynebacterium glutamicum*은 재조합 단백

질을 발현하는 호스트로 사용될 수 있으며 [10], 세포 독성을 갖는 헴철이 대규모 발효를 통해 생산되기 위해서는 저자들의 선행연구에서 사용하였던 상시발현 프로모터 [7]보다 적절한 전사강도 및 전사시기를 통한 헴철 생산전략이 요구되었다. 선행연구에서 사용된 프로모터 서열인 P₁₈₀은 *C. glutamicum*의 유전체에서 선별된 hypothetical membrane protein의 상류지역(upstream) 서열로 상시발현 성능으로 보고되었다 [11]. 따라서 본 연구에서는 선행연구보다 증진된 헴철 발효생산을 위해 *hemA*⁺ 전사조절 프로모터로 P₁₈₀ 이외의 다른 전사특성을 보이는 4 종류(P_{H36}, P_{gapA}, P_{sod}, P_{dnaK})를 선정하여 *hemA*⁺ 유전자를 전사하였을 때 헴철 생산량을 비교하였다. 또한 본 헴철 생산량 및 전사량 결과를 바탕으로 대규모 헴철 발효생산에 적합한 프로모터와 그 이유를 토론한다.

재료 및 방법

균주와 플라스미드

이번 실험에서 사용된 균주들과 플라스미드들은 Table 1에 정리하였다. PCR 증폭에 사용된 올리고뉴클레오타이드 서열은 보충자료에 표시하였다 (Table S1). 사용된 *hemA*⁺ 유전 서열은 이전 연구에서 사용된 pSL360 (P₁₈₀-*hemA*⁺) [2]을 주형

Table 1. Strains, plasmids, and promoters.

| | Description | Reference |
|--|---|---------------|
| Strains | | |
| <i>Escherichia coli</i> DH10B | <i>E. coli</i> F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL nupG</i> λ- | Invitrogen |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 | <i>C. glutamicum</i> wild-type, Biotin auxotroph | ATCC |
| Plasmids | | |
| pSK1Cat | <i>E. coli</i> and <i>C. glutamicum</i> shuttle vector Km ^R , Cm ^R (promoterless) | [11] |
| pSL360- <i>hemA</i> ⁺ | pSK1Cat with P180 promoter- <i>hemA</i> ⁺ | [11] |
| pSK1Cat P _{H36} - <i>hemA</i> ⁺ | pSK1Cat with synthetic H36(high expression) promoter- <i>hemA</i> ⁺ | In this study |
| pSK1Cat P _{gapA} - <i>hemA</i> ⁺ | pSK1Cat with <i>gapA</i> (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A) promoter- <i>hemA</i> ⁺ | In this study |
| pSK1Cat P _{sod} - <i>hemA</i> ⁺ | pSK1Cat with <i>sod</i> (superoxide dismutase) promoter- <i>hemA</i> ⁺ | In this study |
| pSK1Cat P _{dnaK} - <i>hemA</i> ⁺ | pSK1Cat with <i>dnaK</i> (Hsp70, heat-shock protein) promoter- <i>hemA</i> ⁺ | In this study |
| Promoters | | |
| P ₁₈₀ | A constitutive promoter, upstream of a hypothetical membrane protein | [11] |
| P _{H36} | A constitutive, very strong synthetic promoter, screened from the random 70-nt library | [14] |
| P _{gapA} | A constitutive promoter under glycolytic conditions, upstream of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A(<i>gapA</i>) | [15] |
| P _{sod} | An inducible promoter under oxidative-stress conditions, upstream of superoxide dismutase(<i>sod</i>) | [19] |
| P _{dnaK} | An inducible promoter under heat-shock conditions, upstream of Hsp70(<i>dnaK</i>) | [20] |

으로 하여 PCR 증폭하였다. 프로모터인 P_{H36} 은 pCES-H36 [17] 주형으로부터 PCR 증폭(121 bp)되었고, *C. glutamicum* ATCC 13032의 유전체 DNA (gDNA) 주형으로부터 P_{gapA} (253 bp), P_{dnaK} (266 bp), P_{sod} (182 bp)가 증폭되었다. 증폭된 프로모터 서열의 PCR 산물들은 각각 $hemA^+$ 증폭 DNA 조각(1735 bp)과 Gibson assembly 방법(Gibson assembly® master mix, New England Biolab, USA)으로 연결한 후, 각각 연결된 DNA 조각들은 TA vector (T-blunt PCR Cloning Kit, SolGent Co., Korea)에 subcloning시킨 후 DNA 서열을 확인하였다. 각 프로모터- $hemA^+$ 조각을 포함하는 TA vector들은 *Pst*I로 절단한 후 gel extraction kit (Biofact, Korea)로 추출하였다. 추출된 DNA 조각들은 *Pst*I로 처리된 pSK1Cat 벡터[11]에 연결하였다. 제작된 pSK1Cat-프로모터- $hemA^+$ 벡터들은 *C. glutamicum* 호스트에 전기충격법으로 형질전환하였다.

배양조건, 배지, 시료준비

DNA 조합을 위한 *E. coli* 배양은 Luria-Bertani (LB) 배지, 37°C, 220 ×g에서 배양되었다. 헴철을 생산하기 위한 *C. glutamicum*의 배양은 YS 배지(Glucose 40 g/l, Yeast extract 10 g/l, Soytone 10 g/l, MgSO₄ 1 g/l, (NH₄)₂SO₄ 5 g/l, K₂HPO₄ 1.5 g/l, NaH₂PO₄ 0.5 g/l, CaCl₂ 0.4 g/l, FeSO₄ 0.02 g/l)에 25 mg/ml의 Kanamycin을 첨가하고, 30°C, 220 ×g에서 96시간동안 배양되었다. P_{dnaK} 를 포함하는 벡터를 함유한 *C. glutamicum* 균주에서의 열충격 유도는 접종 후 24 h, 48 h, 72 h에 배양온도를 30°C에서 37°C로 증가시킨 후 온도를 계속 유지하면서 수행되었다. 모든 배양 실험은 3회 이상 반복하였다.

분석

*C. glutamicum*의 균체량은 600 nm 파장에서 분광광도계

의 흡광도를 측정된 후 전환상수(1 OD_{600nm} = 0.25 mg/ml 균체중량)를 사용하여 환산하였다[12].

생산된 헴철의 정량은 Pranawidjaja 등의 방법을 따랐다 [13]. 간단히는 요약하면 배양액을 1 ml씩 채취한 후 원심분리(12000 ×g, 10 min, 4°C)로 세포만을 수득하였다. 상층액을 제거한 후 잔여 펠릿(pellet)은 1 N NaOH 수용액 1 ml에 재현탁 한 뒤, 0.2 g의 glass bead (A Glass bead, acid washed, 212–300 μm, Sigmaaldrich, USA)를 포함한 1.5 ml-튜브에 넣고 bead-beater (Minibeadbeater-16, biospec products, USA)를 이용해 1분간 5번 파쇄하였다. 파쇄 후 원심분리(12000 ×g, 10 min, 4°C)된 sample의 상층액 200 μl를 400 μl의 acetonitrile : dimethylsulfoxide (DMSO) (4:1, v/v)과 섞었다. Vortexing 후 시료를 원심분리(12000 ×g, 10 min, 4°C)하여 하층액을 polytetrafluoroethylene (PTFE) filter를 사용해 filtering 하였다. 이렇게 준비된 시료는 HPLC를 통한 헴철 정량에 사용되었다. HPLC분석은 동일 속도(1 ml/min)로 컬럼(Waters xbridge C18 column, USA)에 이동상(1 M ammonium acetate buffer [pH 5.16] : Methanol = 14:86 [v/v])을 흘려 헴철을 분리하고, UV/Visible detector (400 nm)로 검출하였다. 표준곡선 작성을 위한 표준물질은 hemin (Sigma Aldrich, USA)을 사용하였다.

결과 및 고찰

상시발현 프로모터에 의한 헴철 생산

5-아미노르브린산(5-aminolevulinic acid, ALA)은 헴철 생합성 경로의 첫 번째 전구물질이므로, 세포 내 ALA의 농도가 높아지는 시기와 정도에 따라 최종 산물인 헴철 생산에 영향이 미칠 것으로 예상하여 여러 가지 프로모터에 대한 문헌을 조사하였다. P_{H36} 서열은 인공적으로 70개의 무작위 서열로 합성된 서열들 가운데 선별된 매우 강한 전사량을 보

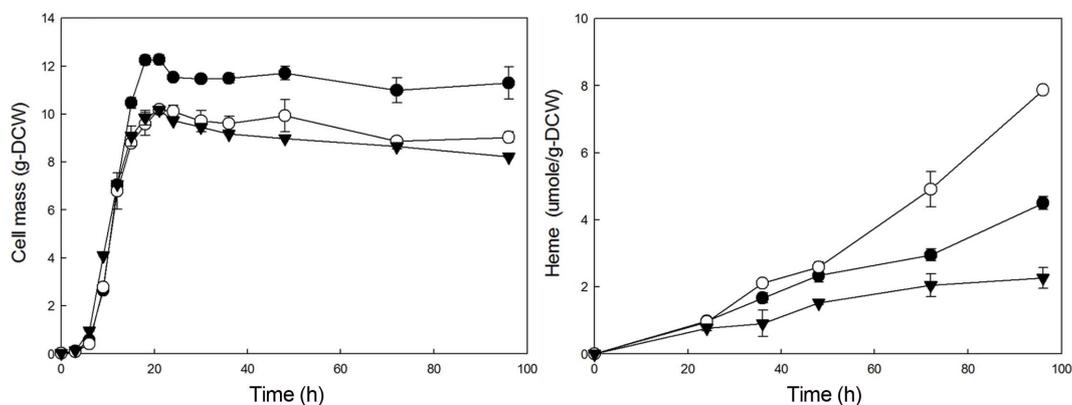


Fig. 1. Effect of constitutive promoters for $hemA^+$ expression on growth and heme production. Closed circle: the P_{180} ; open circle: P_{gapA} ; reverse triangle: P_{H36} .

이는 상시발현 프로모터이며, 재조합된 endoxylanase의 과량 발현이 보고된 바 있다[14]. P_{gapA} 서열은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A (*gapA*)의 프로모터 서열로, 해당과정 시기에 상시발현되며 전사량이 비교적 높은 것으로 보고되었다[15].

선행 연구에서 사용된 상시발현 프로모터인 P_{180} 에 의한 *hemA*⁺와 다른 발현량을 가지는 것으로 조사된 상시발현 프로모터를 사용하였을 때의 세포 성장과 헴철의 생합성 효과를 알아보았다(Fig. 1). P_{H36} 서열을 사용한 경우 P_{180} 서열을 사용한 대조군 대비 균체량이 27% 감소했고, 헴철 생산량도 50% 감소하였다. P_{gapA} 서열을 사용한 경우에는 균체량은 비해 20% 감소하였음에도 불구하고 헴철 생산량은 75% 증가하였다.

P_{H36} 은 3가지 상시발현 프로모터인 P_{180} , P_{H36} , P_{gapA} 중 가장 높은 발현수준을 보이는 프로모터로 보고되었으며, 그에 의한 HemA의 산물인 ALA의 양이 다른 균주들보다 초기에 더 높은 농도로 검출되었다(data not shown). 그러나 가장 높은 발현수준과 높은 세포내 전구물질 농도를 보인 반면 산물인 헴철의 생산량은 오히려 P_{180} 에 비해 50% 감소하였다. 이런 결과는 헴철 생합성 경로가 생명체 내에서 매우 엄격하게 조절되는 사실[16]로 미루어 전구물질인 *hemA*⁺ 유전자의 과발현에 따른 과량의 ALA는 중간체인 porphobilinogen (PBG)이나 산물인 헴철이 나타내는 세포 독성 지나치게 유도하여 성장과 대사가 과도하게 저해받은 것으로 추정된다. Fig. 1에서 가장 높은 상시발현 전사수준으로 알려진 P_{H36} 에서 가장 낮은 균체량을 보인 결과는 이러한 추정과 일치한다. 한편, 해당과정중 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase를 상시발현하는 P_{gapA} 를 사용한 *hemA*⁺ 발현 결과 헴철 생산량은 75% 상승하는 결과를 보였다. 이는 배지 내 포함된 포도당이 존재하는 초기 발효에서는 높은 상

시발현으로 독성 헴철이 생산되거나 포도당이 점차 소진됨에 따라 헴철 생합성이 적당한 수준으로 낮아지기 때문에 균체의 손상이 적은 상태로 전구물질인 ALA가 공급된 것으로 생각된다.

유도발현 프로모터에 의한 헴철 생산

세포 내에서 헴철이 과량으로 생산되면, 헴철 내의 철 이온이 산소와 반응하여 활성산소인 자유 라디칼을 생성하는 펜톤 반응[17]에 의해 세포에 독성이 발생하는 것으로 알려져 있다. 세포 성장을 저해하는 산물의 생산하는 경우에는 유도발현 프로모터를 사용하는 발효 전략들이 보고되어 있으므로[18], 본 연구에서는 특정 조건에 의해 헴철 생합성을 유도시킬 수 있는 다음 두 가지 프로모터의 효과를 조사하였다; 첫 번째로, P_{sod} 는 superoxide dismutase (*sod*)의 프로모터 서열은 활성산소가 높아지는 발효 후반기에 전사량을 증가시키는 것으로 보고되었다[19]. 두 번째로, P_{dnaK} 는 열충격(heat-shock stress)이 주어지는 조건에서 광역조절자(global transcription regulator)인 SigH에 반응하여 전사가 유도되는 Hsp70 (a heat-shock protein; *dnaK*)의 프로모터 서열로 보고되었다[20].

두 가지 유도발현 프로모터를 사용하였을 때 P_{180} 서열을 사용한 대조군과 비교한 헴철 생산을 유도한 결과이다(Fig. 2). 대조군과 비교하면, P_{sod} 서열의 경우에 균체량은 25% 감소하였지만 헴철 생산량은 50% 증가하였다. P_{dnaK} 서열을 사용한 경우에는 균체량은 18% 감소하였지만, 헴철 생산량은 121% 증가하였다.

P_{sod} 는 활성산소 수준에 비례해 발현량이 높아지는 프로모터이므로 발효 초기에는 낮은 수준으로 발현하다가 헴철은 생성될수록 활성산소의 양이 많아지기 때문에 P_{sod} 의 발현량도 비례하여 높아질 것으로 가정하였고, 최종적인 헴철 생산

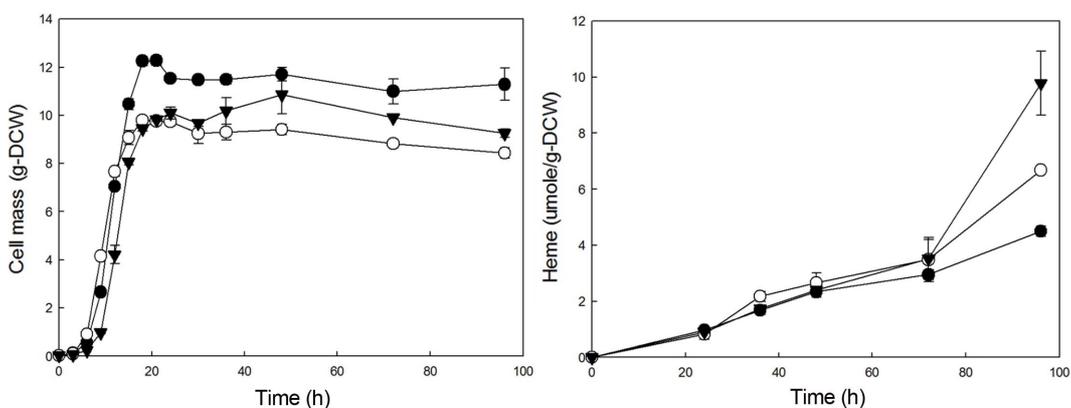


Fig. 2. Effect of inducible promoters for *hemA*⁺ expression on growth and heme production. Closed circle: the P_{180} ; open circle: P_{sod} ; reverse triangle: P_{dnaK} . The P_{sod} was induced by autonomous oxidative stress and the P_{dnaK} was induced by changing culture temperature (30 °C to 37 °C) at 72 h.

Table 2. Effect of induction time for *hemA*⁺ expression on heme production.

| Induction time | Heme-iron concentration (μmole/g-DCW) |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Constitutive P₁₈₀</i> | |
| Control | 4.50 ± 0.19 |
| <i>Inducible P_{dnaK}</i> | |
| Not induced | 7.66 ± 0.47 |
| 24 h | 8.00 ± 0.01 |
| 48 h | 8.31 ± 0.53 |
| 72 h | 9.95 ± 0.52 |

Control represents the heme production from the constitutive *P₁₈₀* for *hemA*⁺ expression. Heme concentration was measured at 96 h.

Inducible *P_{dnaK}* indicates the heme productions from the heat-shock inducible *P_{dnaK}* by changing culture temperature (30 °C to 37 °C) at the given times. Heme concentrations were measured at 96 h.

량은 *P₁₈₀*에 비해 50% 증가하는 결과로 나타났다. *P_{dnaK}* 서열에 의한 유도발현에서는 열충격이 후 헴철 생산량 증가폭이 열충격 이전의 헴철 생산량 증가폭에 비하여 크게 높아진 것을 볼 수 있었다.

헴철 생산의 최적 열충격 유도발현 시기

P_{dnaK} 서열에 의한 열충격 온도와 시기가 헴철 생산에 미치는 영향을 결정하였다. *C. glutamicum*은 30–40°C의 온도 범위 내에서 생장할 수 있는데, 30°C에서 주로 발효 배양되므로[21], 본 연구에서는 생장 범위 내이지만, 주로 배양되는 온도보다 높은 37°C을 열충격의 온도로 임의 결정하였다. 열충격 이후 배양온도를 30°C로 다시 복귀시키는 것과 37°C를 유지하는 조건은 예비실험 결과 균체량과 헴철 생산량에 차이가 없었으므로(data not shown), 본 연구에서는 열충격 이후에 온도는 발효 종료시점까지 37°C를 유지하는 조건을 결정하였다.

P_{dnaK} 서열에 의한 열충격 유도발현의 최적 시기를 결정하기 위해 총 배양시간 96시간 중 24시간 간격으로 30°C에서 37°C로 열충격을 주었을 때 헴철 생산량을 비교하였다(Table 2). 발효 후반인 72시간에 열충격 유도발현이 된 경우가 가장 높은 헴철 생산량(온도변화 없는 조건의 *P₁₈₀*에 의한 대조군 헴철 생산량보다 121% 증가)을 보였다. 또한 발효 초반인 24시간에 열충격 유도발현이 된 경우가 가장 낮은 헴철 생산량(온도변화 없는 조건의 *P₁₈₀*에 의한 대조군 헴철 생산량보다 70% 증가)을 나타냈다. 온도 변화에 의한 유도발현은 세포 독성을 나타내는 산물인 헴철 생산과정에 공정상 편리함을 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 대규모 공정 중 배양 온도의 증가는 에너지 소비가 더 필요

하기 때문에 비용적 측면에서는 단점으로 지적될 수 있다.

이번 연구에서 5개의 프로모터를 비교한 결과로 헴철 생산에는 *dnaK*의 프로모터를 사용하여 *hemA*⁺를 과발현하고, 96시간 배양 시 72시간에 heat-shock을 통해 발현을 유도하였을 때 가장 많은 헴철 생산량을 얻을 수 있다는 것을 확인하였다. 이 이외에도 헴철 생산량을 더 증진시키는 방안으로는 헴철 생합성 경로에 존재하는 여러 유전자들의 발현 조절이나 전구물질인 ALA의 적정 농도, 헴철에 의한 산화스트레스 정도 등에 대해 더 많은 연구가 필요하다.

Acknowledgment

This work was supported by a funding from NRF of Korea (2016R1E1A1A01943552). The authors extend their appreciation to A3 Foresight Program (2016K2A9A2A10005545) for supporting research network.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Becker J, Klopprogge C, Herold A, Zelder O, Bolten CJ, Wittmann C. 2007. Metabolic flux engineering of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*—over expression and modification of G6P dehydrogenase. *J. Biotechnol.* **132**: 99-109.
2. Kim HJ, Kwon YD, Lee SY, Kim P. 2012. An engineered *Escherichia coli* having a high intracellular level of ATP and enhanced recombinant protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 1079-1086.
3. Schobert M, Jahn D. 2002. Regulation of heme biosynthesis in non-phototrophic bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 287-294.
4. Verkamp E, Chelm B. 1989. Isolation, nucleotide sequence, and preliminary characterization of the *Escherichia coli* K-12 *hemA* gene. *J. Bacteriol.* **171**: 4728-4735.
5. McNicholas PM, Javor G, Darie S, Gunsalus RP. 1997. Expression of the heme biosynthetic pathway genes *hemCD*, *hemH*, *hemM* and *hemA* of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **146**: 143-148.
6. Wang L, Elliott M, Elliott T. 1999. Conditional stability of the HemA protein (glutamyl-tRNA reductase) regulates heme biosynthesis in *Salmonella* Typhimurium. *J. Bacteriol.* **181**: 1211-1219.
7. Choi S-I, Park J, Kim P. 2017. Heme derived from *Corynebacterium glutamicum*: A potential iron additive for swine and an electron carrier additive for lactic acid bacterial culture. *J. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 500-506.
8. Lee MJ, Kim HJ, Lee JY, Kwon AS, Jun SY, Kang SH, et al. 2013. Effect of gene amplifications in porphyrin pathway on heme

- biosynthesis in a recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 668-673.
9. Na YA, Lee JY, Bang WJ, Lee HJ, Choi SI, Kwon SK, et al. 2015. Growth retardation of *Escherichia coli* by artificial increase of intracellular ATP. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 915-924.
 10. Lee MJ, Kim P. 2018. Recombinant protein expression system in *Corynebacterium glutamicum* and its application. *Front. Microbiol.* **9**: 2523.
 11. Park S-D, Lee S-N, Park I-H, Choi J-S, Jeong W-K, Kim Y-H, et al. 2004. Isolation and characterization of transcriptional elements from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 789-795.
 12. Lee J-Y, Lee HJ, Seo J, Kim E-S, Lee H-S, Kim P. 2014. Artificial oxidative stress-tolerant *Corynebacterium glutamicum*. *AMB Express.* **4**: 15.
 13. Pranawidjaja S, Choi S-I, Lay BW, Kim P. 2015. Analysis of heme biosynthetic pathways in a recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 880-886.
 14. Yim SS, An SJ, Kang M, Lee J, Jeong KJ. 2013. Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Bioeng.* **110**: 2959-2969.
 15. Toyoda K, Teramoto H, Inui M, Yukawa H. 2008. Expression of the gapA gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum* is regulated by the global regulator SugR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 291-301.
 16. Zhang J, Kang Z, Chen J, Du G. 2015. Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **5**: 8584.
 17. Sadrzadeh S, Graf E, Panter SS, Hallaway P, Eaton J. 1984. Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *J. Biol. Chem.* **259**: 14354-14356.
 18. Pátek M, Holátko J, Busche T, Kalinowski J, Nešvera J. 2013. *Corynebacterium glutamicum* promoters: a practical approach. *Microb. Biotechnol.* **6**: 103-117.
 19. Hassett DJ, Woodruff W, Wozniak D, Vasil M, Cohen M, Ohman D. 1993. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* sodA and sodB genes encoding manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. *J. Bacteriol.* **175**: 7658-7665.
 20. Ehira S, Teramoto H, Inui M, Yukawa H. 2009. Regulation of *Corynebacterium glutamicum* heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA. *J. Bacteriol.* **191**: 2964-2972.
 21. Ohnishi J, Hayashi M, Mitsuhashi S, Ikeda M. 2003. Efficient 40 C fermentation of L-lysine by a new *Corynebacterium glutamicum* mutant developed by genome breeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**: 69-75.