生物技术通报
· 研究报告 · BIOTECHNOLOGY BULLETIN 2026, 42(10):305-316

动态调控小热休克蛋白表达以提升大肠杆菌耐热性并高效生产L-乳酸

梁浩[1] 黄恩园[1] 朱丽雯[1] 赵锦芳[1,2] 刘晓楠[1,2,3,4] 王永泽[1,2*]
（1.湖北工业大学生命科学与健康工程学院,武汉 430068; 2.湖北工业大学发酵工程教育部重点实验室,武汉 430068; 3.广西科学院,南宁 530007; 4.非粮生物质能技术全国重点实验室,南宁 530007）

摘 要： 【目的】增强工业微生物的耐热性可一定程度缩短发酵时间、减少杂菌污染及促进产物的溶解，拟通过小热休克蛋白的筛选及动态表达提高大肠杆菌的耐热性。【方法】对不同种属的小热休克蛋白在大肠杆菌BL21(DE3)中进行表达和筛选，筛选得到的小热休克蛋白进一步使用不同强度的组成型启动子及温敏启动子P_L驱动表达，研究小热休克蛋白表达对大肠杆菌耐热性的影响。【结果】来自腾冲热厌氧杆菌*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4的小热休克蛋白（sHsp）能提高大肠杆菌在高温环境下的耐热性，蛋白质序列比对进一步验证了蛋白β3片层序列Pro-Gly片段的重要作用。不同强度组成型启动子驱动小热休克蛋白来提高宿主在45 ℃发酵性能，结果表明强启动子P_{M193}条件下L-乳酸的产量最高但生物量较低。温敏性启动子P_L被进一步选用驱动sHsp的动态表达，通过种子阶段低温培养减少sHsp的表达，减少种子阶段的生长负荷以期提高生物量。最终L-乳酸产量可达到30±0.58 g/L，最大生物量（OD_{600}）达到8.1±0.32，比P_{M193}组成型启动子表达的乳酸产量和生物量（OD_{600}）分别提高6%和17%。【结论】动态调控小热休克蛋白表达可以提高大肠杆菌在高温条件下L-乳酸发酵效果，可作为一种提高工业微生物耐热性的有效手段。

关键词： 大肠杆菌；小热休克蛋白；动态调控；L-乳酸；高温发酵
DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2026-0179

Enhancing *E. coli* Thermotolerance via Dynamic Control of Small Heat Shock Protein Expression for Efficient L-lactate Production

LIANG Hao[1] HUANG En-yuan[1] ZHU Li-wen[1] ZHAO Jin-Fang[1,2] LIU Xiao-nan[1,2,3,4] WANG Yong-ze[1,2*]
（1. *School of Life and Health Sciences, Hubei University of Technology, Wuhan* 430068; 2. *Key Laboratory of Fermentation Engineering, Ministry of Education, Hubei University of Technology, Wuhan* 430068; 3. *Guangxi Academy of Sciences, Nanning* 530007; 4. *State Key Laboratory of Non-food Biomass Energy, Nanning* 530007）

Abstract: 【Objective】 Enhanced thermotolerance of industrial microorganisms shortens fermentation time, reduces microbial contamination, and promotes product solubility. This study aimed to enhance thermotolerance of *Escherichia coli* (*E. coli*) by screening and dynamic expression of small heat shock proteins (sHsps). 【Method】 Small heat shock proteins from diverse species were expressed and screened in *E. coli* BL21(DE3). The selected sHsp was further expressed under the control of constitutive promoters with different strengths and the thermosensitive promoter P_L, and the effect of sHsp expression on *E. coli* thermotolerance was examined. 【Result】 The sHsp from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 enhanced thermotolerance of *E. coli* under high-temperature conditions. Protein sequence alignment verified that the Pro-Gly segment in the β3 sheet of this protein played an important role. Constitutive promoters with different strengths were used to drive sHsp expression to improve host fermentation performance at 45 ℃. The results showed that the strong promoter P_{M193} gave the highest L-lactic acid titer but relatively low biomass. The thermosensitive promoter P_L was further used to drive dynamic sHsp expression. Low-temperature seed culture reduced sHsp expression and relieved growth burden in the seed stage, thereby increasing biomass. The final L-lactic

收稿日期：2026-02-05
基金项目：“尖锋”行动计划（广西重大专项计划）（桂科JF2504850012），教育部工业发酵省部共建协同创新中心2023年开放基金（4303-00149）
*通信作者：王永泽 wangyongze@hbut.edu.cn

acid titer reached 30±0.58 g/L, and the maximum biomass (OD_{600}) reached 8.1±0.32, which were 6% and 17% higher than those under the P_{M193} constitutive promoter, respectively. 【Conclusion】 Dynamically regulated expression of heat shock proteins (sHsp) can enhance the L-lactic acid fermentation performance of *E. coli* under high-temperature conditions, and this approach can serve as an effective strategy to improve the thermal tolerance of industrial microorganisms.

Keywords: *Escherichia coli*; small heat shock protein; dynamic regulation; L-lactic acid; high-temperature fermentation

提升发酵菌株的耐热性，将为工业发酵带来诸多优势[1]：（1）高温发酵适合全年发酵，而低温发酵时温控成本大幅攀升；（2）在适宜高温区间内，耐热菌株的细胞代谢速率与酶促反应效率提升，能够有效缩短发酵周期，提高单位时间内目标产物的合成量，直接提升生产效率；（3）较高的发酵温度可减少中、低温环境下杂菌污染的概率，显著提升发酵过程的稳定性与产品合格率。（4）提升发酵温度通常有助于增加溶解度，防止产物在胞内结晶，从而提高产量。

虽然高温发酵有诸多优点，但是许多微生物并不耐受高温，除部分嗜热芽胞杆菌之外，如大肠杆菌和酵母等工业微生物生长温度都是37 ℃或更低的温度[2]，导致这些微生物不能在高温下进行发酵。如何提高工业微生物的耐热性已成为高温发酵的瓶颈问题，通过高温驯化技术[3]或者通过基因工程的方法对胞外多糖[4]、细胞膜[5]及小热休克蛋白[6]的筛选或改造都大大提高了微生物的耐热性。

作为热休克蛋白家族的独特亚家族，小热休克蛋白（small heat shock proteins, sHsps）是唯一完全不依赖ATP即可发挥分子伴侣功能的小热休克蛋白，具有超快速应激响应特性，还能高效抵御多种非生物胁迫，覆盖范围远超其他热休克家族[7]。小热休克蛋白表达能有效提高大肠杆菌的耐热性能，目前已有很多种类的小热休克蛋白被筛选用来提高大肠杆菌的热稳定性，但小热休克蛋白的筛选还存在诸多问题，一方面一些小热休克蛋白的表达仅仅限于大肠杆菌常见的表达宿主BL21(DE3)中[8]，对常见的大肠杆菌工程菌株，如大肠杆菌W、MG1655和C等菌株的耐热性提升报道较少。另外一方面，一些小热休克蛋白，如嗜热栖热菌（*Thermus thermophilus*）的热休克蛋白因高疏水结构在中温宿主中易形成包涵体，在大肠杆菌中可溶性表达比例不足10%[9]，其表达条件也可能影响大肠杆菌耐热性或抗逆性；此外，对于工业微生物来说，要尽量减少诱导剂的使用，但组成型启动热休克蛋白往往会对大肠杆菌生长带来一定影响，如组成型表达极端嗜盐菌的小热休克蛋白发现，小热休克蛋白表达会对大肠杆菌细胞施加显著的代谢负担[10]。

本文基于前人对小热休克蛋白的筛选研究[1, 8, 11-12]，进一步对小热休克蛋白进行筛选，探讨这些热休克蛋白表达水平对大肠杆菌耐热性的影响，此外为解决小热休克蛋白表达和细胞生长之间的矛盾，采用热诱导启动子介导小热休克蛋白动态表达的方式来平衡大肠杆菌生长和小热休克蛋白表达。本研究旨在获得一株高耐热性的工程菌株，并为提高工业微生物的耐热性提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 菌株 *Escherichia coli* HBUT-LL（*E. coli*W Δ*frd*BC Δ*adh*E Δ*pta* Δ*pfl*B Δ*ald*A Δ*csc*R Δ*ldh*A::*ldh*L）为实验室构建并保存[13]、Trelief® 5α超级感受态细胞（DLC114）购自北京擎科生物科技股份有限公司；蛋白表达宿主*E. coli* BL21(DE3)为实验室保存；深海海洋栖热菌（*Oceanithermus profundus*，简写为OP）[8]、腾冲热厌氧杆菌MB4（*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4，简写为TT）[12]、葡萄酒酒球菌（*Oenococcus oeni*，简写为OO）[1]、烈火球菌（*Pyrococcus furiosus*，简写为PF）[11]的小热休克蛋白（sHsp）对应核酸序列均于九天基因科技（天津）有限公司合成，通过*Nco* I和*Hin*d III双酶切后连接在载体pET28a中，合成载体分别命名为pET-28a-OP、pET-28a-TT、pET-28a-OO和pET-28a-PF。人工组成型启动子P_{M193}、P_{M146}及P_{M137}均化学合成于九天生物科技（天津）有限公司并构建在载体pET-28a-P_{M193}-*tkt*和pET-28a-*kan*^{r}-P_{M146}-*idi*-P_{M137}上。无缝克隆基因编辑所有质粒（见文献[14]），pSIM6质粒提供P_L启动子[15]，pEcgRNA质粒提供*ccd*B基因[16]，

pET-30a-GFP-6×His质粒提供*GFP*报告基因，均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.2　引物　所用引物序列见表1。

表1　本文所用引物及序列

Table 1　Primers and sequences used in this article

Primers	Sequences (5′–3′)
TTsHsp-F	ATGGCAAATGAATTAATGGA
TTsHsp-R	TTATTGGATTTCAATATGAT
P_{M137}-F	CTCCTGAATCTATCTATCCTTTATCTCTGGCGGTGTTGAC
P_{M137}-R	TCCATTAATTCATTTGCCATAGCTGTTTCCTGGTTTAAAC
P_{M146}-F	AGAATTACATGTGAGAAATTTTATCTCTGGCGGTGTTGAC
P_{M146}-R	TCCATTAATTCATTTGCCATAGCTGTTTCCTGGTTTAAACGT
P_{M193}-F	GTAACGAAAGAGGATAAACCTTATCTCTGGCGGTGTTGAC
P_{M193}-R	TCCATTAATTCATTTGCCATCTTGTCTCTCCTGGTTTAAAC GT
P_{L}-F	GGAAGGAGCTGACTGGGTTGCTCAATTGTTATCAGCTATG CGC
P_{L}-R	TCCATTAATTCATTTGCCATGGTGGTCAGTGCGTCCTGCT
pET-F	TGCCACCGCTGAGCAATAAC
pET-R	GGTTTATCCTCTTTCGTTAC
GFP-F	CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACT
GFP-R	CGAGTTTGTATAGTTCATCC
ccdB-F	AGCAGGACGCACTGACCACCATGCAGTTTAAGGTTTACA CCTATA
ccdB-R	CTAGATCCTTTACGCGTTCGTTATATTCCCCAGAACATCA GGTTA

1.1.3　试剂　2×Rapid *Taq* Master Mix，购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；PrimeSTAR MaxDNA Polymerase，购自北京宝日医生物技术有限公司；琼脂糖凝胶回收试剂盒，购自广州飞扬生物工程有限公司；*Dpn* I酶，购自上海碧云天生物技术股份有限公司；Minerva Super Fusion Cloning Kit，购自苏州宇恒生物科技有限公司；考马斯亮蓝蛋白胶快速染色液（免脱色），货号HW-PS001，购自天津华蔚科技有限公司；6×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液，购自上海碧云天生物技术股份有限公司；质粒小提试剂盒，购自北京天根生化科技有限公司；酵母粉、胰蛋白胨、氯化钠、琼脂粉、葡萄糖和丁二酸均为分析纯（AR），购自国药集团化学试剂有限公司；碳酸钙，购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.1.4　培养基　LB培养基：10 g/L蛋白胨，5 g/L酵母粉，5 g/L氯化钠。NBS固体培养基：NBS[17]，20 g/L葡萄糖，2 g/L酵母粉，18 g/L琼脂粉。NBS种子培养基：NBS[17]，20 g/L葡萄糖，2 g/L酵母粉。NBS发酵培养基：NBS[17]，40 g/L葡萄糖，2 g/L酵母粉，40 g/L碳酸钙，4–8颗玻璃珠。

1.1.5　设备　SBA-40D生物传感仪，山东省科学院生物研究所；Waters e2695型高效液相色谱仪，美国Waters公司；Xtimate® Sugar-H色谱柱，上海月旭科技股份有限公司，Varioskan LUX多功能酶标仪，赛默飞世尔科技公司。

1.2　*方法*

1.2.1　小热休克蛋白的筛选

1.2.1.1　SDS-PAGE评价不同小热休克蛋白表达量　将含有表达不同小热休克蛋白的重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞，转化子于含50 μg/mL卡那霉素的新鲜培养基，37 ℃、180 r/min振荡培养，待菌液OD_{600}达0.2–0.4时，加入终浓度1 mmol/L的IPTG诱导5 h，随后12 000 r/min离心10 min收集细胞，所收集的细胞用50 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）洗涤2次并重悬于相同缓冲液，冰浴条件下超声破碎。粗裂解物于4 ℃、12 000 r/min离心30 min，分离上清（可溶性组分）与沉淀（不溶性组分）。上清直接取5 μL样品，而沉淀重悬后取5 μL样品，与6×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液混合，100 ℃加热10 min后进行SDS-PAGE分析（12% 聚丙烯酰胺凝胶），SDS-PAGE电泳条带染色采用考马斯亮蓝快速染色液，相关操作步骤参照产品说明书进行，通过染色条带的深浅判断产物的表达量。

1.2.1.2　小热休克蛋白表达对宿主耐热性的影响

（1）不同小热休克蛋白对宿主热应激的影响。以含有pET-28a(+)质粒的*E. coli* BL21(DE3)作为对照，将含有不同热休克蛋白的载体的*E. coli* BL21(DE3)菌株分别接种入50 mL含有50 μg/mL卡那霉素的LB培养基中，30 ℃培养4 h培养OD_{600}至0.6–0.8，按每管100 μL分装，置于52 ℃水浴热处理，分别在热处理0、5、30 min后各取一管，对菌液进行10倍系列梯度稀释，取10 μL梯度稀释液点滴接种于固体LB培养基上，37 ℃培养过夜，进行菌落计数。以0 min菌落数作为总菌数，分别计算5 min及30 min热激处理后菌落的存活率[8]。

（2）不同小热休克蛋白对宿主高温培养的影响。将含有不同小热休克蛋白的载体的*E. coli* BL21(DE3)

菌株30 ℃培养至OD_{600}为0.6左右，置于45 ℃、200 r/min培养，每隔4 h取一次样并测OD_{600}值，以含pET-28a(+)质粒的*E. coli* BL21(DE3)作为对照（CK），通过OD_{600}值比较不同小热休克蛋白对宿主高温培养的影响[1]。

1.2.1.3 小热休克蛋白序列比对 通过NCBI（www.ncbi.nlm.nih.gov）获取不同来源小热休克蛋白（sHsp）及大肠杆菌w系菌株自身的小热休克蛋白IbpA和IbpB的氨基酸序列，使用MEGA5.1.0软件进行序列比对。选用硫化叶菌（*Sulfolobus solfataricus*）的SsHsp20.1 ACD（4-RZK）晶体结构作为结构域模板[18]，通过（https://www.rcsb.org/）找到该模板PDB文件，用（https://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi）将比对后的氨基酸序列文件（FAS格式）和结构PDB文件导入，对比各种热休克蛋白在该结构域的氨基酸序列。

1.2.2 启动子强度对热休克蛋白表达的影响

（1）不同启动强度小热休克蛋白表达载体的构建。以pET-28a-TT质粒为模板，以TTsHsp-F/R为引物扩增小热休克蛋白的核酸序列；以pET-28a-P_{M193}-*tkt*为模板，引物P_{M193}-F/R扩增P_{M193}启动子；以pET-28a-*kan*^{r}-P_{M146}-*idi*-P_{M137}为模板，再分别以引物P_{M146}-F/R和引物P_{M137}-F/R扩增启动子P_{M146}片段和启动子P_{M137}；以pET-28a(+)载体为模板，pET-F/R为引物通过反向PCR对载体进行线性化，去除原有T7启动子只保留质粒骨架。所有PCR均遵循PrimeSTAR Max DNA Polymerase说明书设定反应条件，按照*Dpn* I酶说明书对PCR产物进行处理，处理产物依照琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书进行切胶回收。

借助无缝克隆连接载体和基因片段，将pET-28a(+)线性化片段分别与启动子（P_{M137}、P_{M193}、P_{M146}）和TT的*sHsp*基因片段进行Gibson无缝克隆操作，上述克隆操作均按照Minerva Super Fusion Cloning Kit的说明书进行，克隆子均使用菌落PCR进行鉴定并进一步送擎科公司Sanger测序验证。

（2）不同启动强度小热休克蛋白表达对宿主耐热性的影响。成功构建的质粒分别电转化到*E. coli* HBUT-LL菌株中，将得到的工程菌株分别命名为P_{M146}-sHsp、P_{M137}-sHsp和P_{M193}-sHsp，参照1.2.1.2评价热休克蛋白表达对宿主耐热性的影响。

（3）不同启动强度小热休克蛋白对宿主产酸的影响。种子培养：将P_{M146}-sHsp、P_{M137}-sHsp和P_{M193}-sHsp在LB平板划线1–2代活化后，接种到50 mL的NBS种子培养基，30 ℃，200 r/min过夜培养（约12–14 h）。

摇瓶发酵：按2%的接种量，将不同菌株的种子分别接入50 mL的NBS发酵培养基，在30 ℃培养4 h，随后将摇床温度提升至45 ℃，200 r/min发酵培养，培养过程定时取样测定发酵液的L-乳酸含量[1]。

L-乳酸含量采用高效液相色谱法（HPLC）测定：发酵取样样品用6%的硫酸水溶液按体积比1∶1混合，振荡混匀后静置数分钟，10 000 r/min离心10 min，收集上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤，使用Waters e2695高效液相色谱仪检测发酵液中有机酸含量。液相色谱配备Welch Xtimate® Sugar-H 7.8×300 mm色谱柱（7.8 mm×300 mm，9 μm），以5 mmol/L H_2SO_4为流动相，PDA检测器，柱温维持45 ℃，流速0.5 mL/min，进样量10 μL。

（4）不同强度启动子驱动小热休克蛋白表达对宿主极限高温耐热性的影响。将出发菌株（CK）与3株工程菌株P_{M146}-sHsp、P_{M137}-sHsp和P_{M193}-sHsp在48、50和52 ℃下培养12 h，重复3次，评价不同强度启动子驱动小热休克蛋白表达对宿主极限高温耐热性的影响。

1.2.3 小热休克蛋白动态表达对大肠杆菌热稳定性的影响

1.2.3.1 用于动态表达的启动子P_L性能评估

（1）P_L启动子与报告基因连接。以pSIM6质粒为模板，引物P_L-F/R扩增P_L启动子；以pEcgRNA质粒为模板，引物ccdB-F/R扩增得到致死基因*ccdB*；以pET-30a-GFP-6×His质粒为模板，以GFP-F/R引物扩增*GFP*显色报告基因；以去除T7启动子的线性化pET-28a(+)载体做骨架，分别将P_L启动子连接到*ccdB*和*GFP*两个报告基因上，无缝克隆所用方法同上，所得载体分别命名为pET-28a-P_L-*ccdB*和pET-28a-P_L-*GFP*。

（2）P_L启动子通过致死基因评估其性能。将质粒pET-28a-P_L-*ccdB*转化到大肠杆菌*E. coli* HBUT-LL中，所得菌株取50 mL菌液，在含卡那霉素的LB培养基30、37、42和45 ℃分别培养，定时取样测定OD_{600}的值，通过OD_{600}值变化评估P_L启动子驱动

*ccdB*基因的表达强度。

（3）P_L启动子通过绿色荧光蛋白评估其性能。将质粒pET-28a-P_L-GFP转化到大肠杆菌*E. coli* HBUT-LL中，所得菌株取50 mL菌液，在含卡那霉素的LB培养基30、37、42和45 ℃分别培养到OD_{600}约为0.6时，通过Varioskan LUX多功能酶标仪测定其荧光强度，激发光为488 nm，发射光为505 nm，通过荧光强度与OD_{600}的比值来检测温敏性启动子P_L在不同温度下的启动强度。

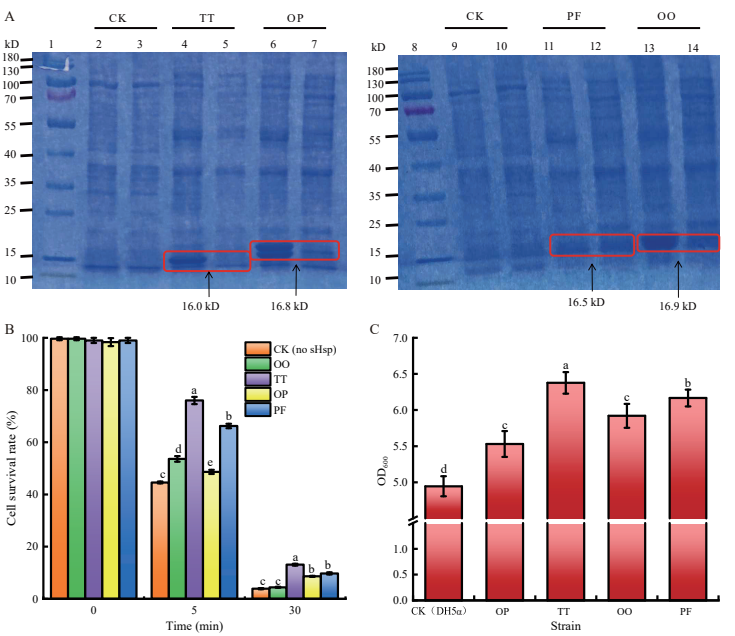
1.2.3.2　P_L启动子驱动小热休克蛋白的表达　以pET-28a-TT为模板，以TTsHsp-F/R为引物扩增小热休克蛋白的核酸片段；将上述除T7启动子的线性化pET-28a载体做骨架，将P_L启动子连接小热休克蛋白核酸片段，无缝克隆所用方法同上，所得载体命名为pET-28a-P_L-TT(sHsp)，评价pET-28a-P_L-TT(sHsp)载体对宿主热应激及小热休克蛋白对宿主产酸的影响。

2　结果

2.1　小热休克蛋白的筛选

本研究对4种菌株的小热休克蛋白进行了对比筛选。经过诱导表达后，所有小热休克蛋白均在*E. coli* BL21(DE3)中[8]实现了较好的可溶性表达，包涵体较少（图1-A）。

为进一步评估小热休克蛋白表达对大肠杆菌高温耐受性的影响，采用52 ℃热应激实验以及高温培养来进行验证。结果显示，4种小热休克蛋白热激下的存活率均显著高于对照菌株（P<0.05），其中来源于TT菌株的小热休克蛋白效果最佳，在该蛋白表达条件下，宿主菌株经52 ℃热激5 min和30 min后的存活率，分别较对照菌株提升72%和225%（图1-B），45 ℃高温培养实验中也得到类似结果，生长至20 h时，表达TT菌株小热休克蛋白的宿主菌株，其表征生物量的OD_{600}可达6.33±0.14，相较对照菌株提



A：不同小热休克蛋白在*E. coli* BL21(DE3)中的表达，1、8：180 kD蛋白Marker；2、4、6、9、11和13：细胞裂解后的上清；3、5、7、10、12和14：细胞裂解后的沉淀。B：小热休克蛋白表达对宿主在52 ℃热激下存活率的影响；C：小热休克蛋白的表达对宿主在45 ℃培养条件下生物量的影响。TT、OO、PF、OP：分别为*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4、*Oenococcus oeni*、*Pyrococcus furiosus*、*Oceanithermus profundus*的小热休克蛋白

A: Expression of different small heat shock proteins in *E. coli* BL21(DE3). Lanes 1 and 8: 180 kD protein marker; 2, 4, 6, 9, 11, 13: supernatant after cell lysis; 3, 5, 7, 10, 12, 14: pellet after cell lysis. B: Effect of small heat shock protein expression on host cell survival under heat shock at 52 ℃. C: Effect of small heat shock protein expression on host biomass under cultivation at 45 ℃. TT, OO, PF and OP refer to the small heat shock proteins derived from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4, *Oenococcus oeni*, *Pyrococcus furiosus* and *Oceanithermus profundus*, respectively

图1　小热休克蛋白的筛选

Fig. 1　Screening of small heat shock proteins

升了24.4%（图1-C）。

2.2 小热休克蛋白氨基酸多序列比对

为明确不同来源小热休克蛋白耐热性存在差异的分子基础，以及TT-sHsp发挥最优耐热功能的结构特征，以SsHsp20.1 ACD（4-RZK）晶体结构为模板，对4种外源sHsp（TT、OO、OP、PF）及大肠杆菌内源小热休克蛋白IbpA、IbpB进行氨基酸序列多序列比对（图2），分析主要聚焦小热休克蛋白核心功能域α-晶体结构域（ACD）。结果发现4种外源sHsp的β3片层序列中均存在保守的Pro-Gly（PG）柔性片段，而大肠杆菌内源IbpA、IbpB的β3片层对应位置无PG片段，分别被Val-Ala（IbpA）、Ile-Leu（IbpB）刚性氨基酸组合替代，这可能是外源sHsp与大肠杆菌内源sHsp耐热功能存在显著差异的结构基础。TT-sHsp的PG片段侧翼氨基酸组成具有一定独特性，β2片层序列所有小热休克蛋白有一个共有氨基酸P（脯氨酸），但TT-sHsp这个位置为M（甲硫氨酸）；β6片层序列其他外源小热休克蛋白有一个共有序列LP（亮氨酸–脯氨酸），TT-sHsp为VP（缬氨酸–脯氨酸），与之对应两种大肠杆菌来源的小热休克蛋白对应位置为LA（亮氨酸–丙氨酸），上述差异尚未见文献报道，可能是TT-sHsp实现高效耐热功能的重要结构特征。

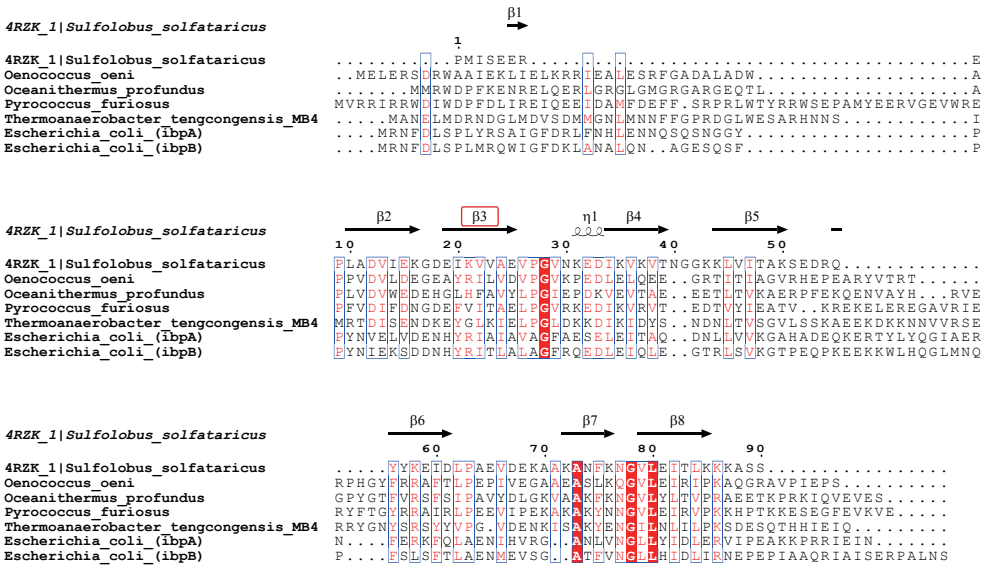


图2 小热休克蛋白氨基酸多序列比对

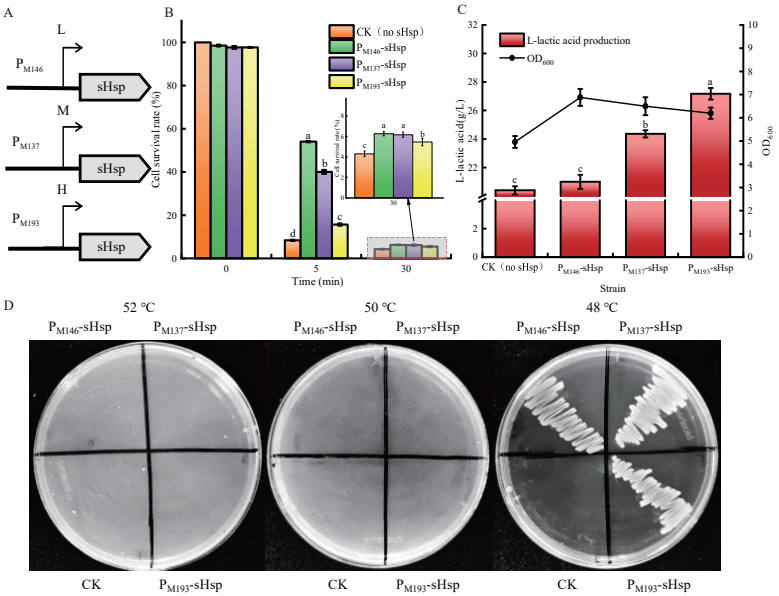
Fig. 2 Multiple sequence alignment of amino acid for small heat shock proteins

2.3 不同启动强度小热休克蛋白表达对宿主耐热性的影响

选用3种不同启动强度的组成型启动子P_{M146}、P_{M137}、P_{M193}来驱动小热休克蛋白的表达（图3-A），其启动强度分别为大肠杆菌 *lacZ* 基因启动子的1.7倍、2.5倍、5倍[19]，不同启动强度的组成型启动子驱动TT来源小热休克蛋白，其宿主在高温胁迫下的存活率显著高于未表达小热休克蛋白的对照。其中，以弱启动子P_{M146}驱动表达的小热休克蛋白的工程菌在52 ℃热激5 min时，其存活率相较于出发菌株提升90%；52 ℃热激30 min时，存活率相较于出发菌株仍提升30%（图3-B）。

在45 ℃发酵20 h条件下，所有组成型启动子表达小热休克蛋白的工程菌均提高了宿主的生物量，提高幅度为25%–38.1%，表明即使弱启动子驱动小热休克蛋白表达也具有提高细胞耐热性的能力，且使用最低强度的启动子P_{M146}获得了最大的菌体量（图3-C），相对于出发菌株其生物量（OD_{600}）提升了38.1%，但最高强度的启动子P_{M193}驱动小热休克蛋白表达时，L-乳酸产量最高，达到28.4±0.25 g/L，相较于出发菌株提升了44.1%。

进一步测试了组成型启动子在更高温度下的耐



A：不同强度的启动子表达小热休克蛋白sHsp的示意图；B：在52 ℃热应激条件下不同强度启动子驱动小热休克蛋白表达对宿主存活率影响；C：不同组成型启动子驱动小热休克蛋白表达对乳酸45 ℃发酵的影响；D：不同强度启动子驱动小热休克蛋白表达对宿主最高温度耐受度的影响

A: Schematic diagram of small heat shock protein (sHsp) expression driven by promoters of different strengths. B: Effects of the expression of small heat shock proteins driven by promoters of different strengths on host cell survival rate under 52 ℃ heat stress. C: Effects of the expression of small heat shock proteins driven by different constitutive promoters on lactic acid fermentation at 45 ℃. D: Effect of different strength promoters driving the expression of small heat shock proteins on the host maximum temperature tolerance

图3　不同启动子表达小热休克蛋白对宿主耐热性影响

Fig. 3　Effects of heat shock protein expression driven by different promoters on host thermotolerance

热性能及高温生长极限。结果显示，异源表达sHsp的3株大肠杆菌工程菌株（P_{M137}-sHsp、P_{M146}-sHsp、P_{M193}-sHsp）可在48 ℃条件下正常生长，而在50 ℃及52 ℃条件下均无法生长；对照组（CK）在所有测试温度下均未见生长（图3-D）。

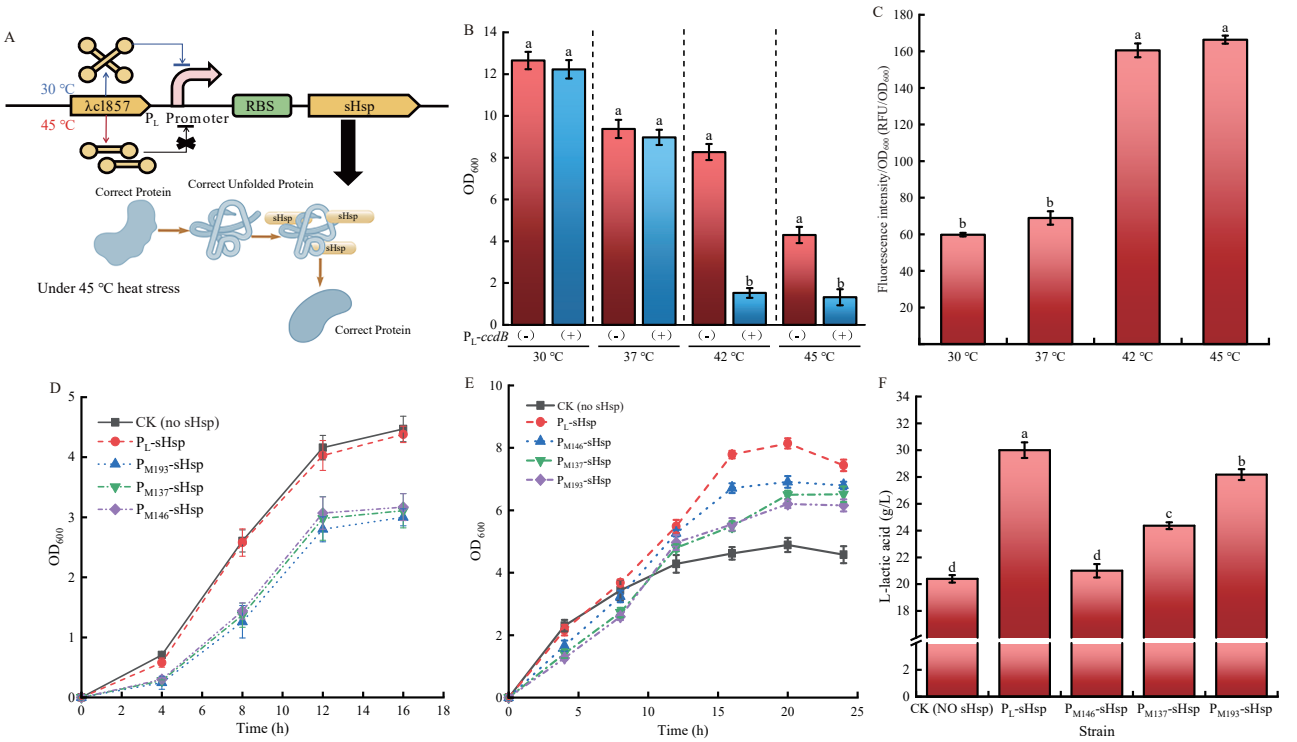
2.4　温敏性启动子驱动小热休克蛋白表达宿主耐热性的影响

温敏启动子具有良好的动态表达能力，在30 ℃较低的温度下，P_L启动子的阻遏蛋白CI857具有活性，RNA聚合酶转录较少；高于42 ℃条件下CI857失活不再阻遏P_L启动子，目标蛋白转录水平高（图4-A）。尽管P_L启动子已有较广泛的应用，但其在30–45 ℃的启动性能仍未作系统评估。本文分别采用致死基因（*ccdB*）和绿色荧光蛋白（*GFP*）作为报告基因，评估了温敏性P_L启动子的温度依赖性。

当用致死基因*ccdB*作报告基因时，重组菌株的生物量会随着温度的升高而下降（图4-B）。在30 ℃时，含*ccdB*基因的重组菌株最大OD_{600}值为12.13±0.44，原始出发菌株则为12.5±0.41，此时重组菌株的致死率仅为3%，表明30 ℃下P_L启动子虽被普遍认为处于“关闭”状态，但仍存在少量渗漏表达；升高温度到37 ℃时，重组菌株最大OD_{600}值为7.87±0.36，其致死率提升到37.0%。在42 ℃与45 ℃时，含*ccdB*基因的重组菌株最大OD_{600}值分别为1.5±0.23和1.32±0.32，致死率为88.0%和89.4%。

而荧光蛋白作为报告基因时，重组菌株的比荧光强度会随着温度的升高而升高。在30、37、42和45 ℃时的比荧光强度分别为60.74±0.92（RFU/OD_{600}）、72.8±3.67（RFU/OD_{600}）、160±3.7（RFU/OD_{600}）和163±1.64（RFU/OD_{600}），30 ℃与37 ℃之间，42 ℃与45 ℃之间的比荧光强度无明显差异（P>0.05）（图4-C）。从报告基因的研究结果可知，该P_L启动子在30–45 ℃条件下，动态范围为2.68。P_L启动子在42 ℃和45 ℃下启动能力强，调控温度变化范围广，适合动态表达需要高温才响应的小热休克蛋白，因此本文将前期筛选到TT的小热休克蛋白置于P_L启动子进行动态表达。

为了研究在启动子“关闭”阶段是否影响到生



A:温敏性启动子P_L动态调控示意图[20];B–C:致死基因*ccdB*(B)和绿色荧光蛋白GFP(C)分别作为报告基因测试P_L启动子的温控性能;D:P_L启动子相对于组成型启动子在种子阶段30 ℃培养对宿主生物量的影响;E:P_L启动子相对于组成型启动子在发酵阶段45 ℃下培养对宿主生物量的影响;F:P_L启动子相对于组成型启动子对L-乳酸产量的影响

A: Schematic diagram of dynamic regulation of thermosensitive promoter P_L [20]. B-C: Evaluation of the temperature-controlled performance of the P_L promoter using the lethal gene *ccdB* (B) and green fluorescent protein GFP (C) as reporter genes. D: Effect of the P_L promoter on host biomass in comparison with a constitutive promoter during seed culture at 30 ℃. E: Effect of the P_L promoter on host biomass in comparison with a constitutive promoter during fermentation at 45 ℃; F: Effect of the P_L promoter on L-lactic acid production in comparison with a constitutive promoter

图4 温敏性启动子P_L对小热休克蛋白表达耐受发酵产酸情况

Fig. 4 Effects of thermosensitive promoter P_L mediated heat shock protein expression on acid production during stress-tolerant fermentation

长，采用30 ℃培养种子，以不表达小热休克蛋白的宿主及组成型表达小热休克蛋白的宿主作为对照，观察种子培养阶段不同宿主的生物量，结果显示，30 ℃条件下，以P_L启动子驱动小热休克蛋白表达的重组大肠杆菌，其生物量与未携带小热休克蛋白的出发菌株无显著性差异（P>0.05）（图4-D）；但显著优于组成型启动子介导小热休克蛋白表达的重组菌株，这表明组成型表达确实对宿主生长造成了负担。

随后这些种子转入发酵培养基，选用45 ℃下发酵来评估小热休克蛋白诱导表达对L-乳酸的生物量（图4-E）和产量（图4-F）的影响。P_L对小热休克蛋白的动态表达显著地提高菌体的生物量（P<0.05），宿主L-乳酸产量达30±0.58 g/L，最大生物量（OD_{600}）达8.1±0.32，相较于组成型启动子，生物量和L-乳酸产量分别提升了17%–30%和6%–30%；对比不含小热休克蛋白的出发菌株，生物量和L-乳酸产量分别提升了62%和32%，这表明，P_L启动子在30 ℃种子培养阶段不表达小热休克蛋白，可避免组成型表达带来的生长负担；而在45 ℃发酵阶段诱导表达后，能显著提高菌体生物量与L-乳酸产量，效果优于组成型表达菌株及作为对照的出发菌株。

3 讨论

小热休克蛋白的筛选对提高大肠杆菌耐热性有着十分重要的意义，有研究筛选12种不同的小热休克蛋白后发现，源自深海海洋栖热菌*Oceanithermus*

profundus（缩写为OP）的小热休克蛋白在*E. coli* BL21(DE3)宿主中表达效果良好，且能显著提高大肠杆菌的耐热性[8]，此外，来自*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4[12]（缩写为TT）、*Oenococcus oeni*[1]（缩写为OO）和*Pyrococcus furiosus*[11]（缩写为PF）的小热休克蛋白也表现出较好的耐热性能。结合本研究筛选结果，TT来源的小热休克蛋白对大肠杆菌耐热性的提升效果最为显著，为探究小热休克蛋白提升大肠杆菌耐热性的分子基础，进一步对小热休克蛋白的结构域进行了同源序列比对，并对影响小热休克蛋白功能的α-晶体结构域（α-crystallin domain，ACD）进行了重点分析。小热休克蛋白具有8个β片层[21]，在β3片层序列中，PG序列（Pro-Gly片段）在所有的外源小热休克蛋白中都存在。Pro-Gly片段被认为能提高小热休克蛋白（sHsp）分子柔性，使“sHsp-底物复合物”结构更松散[22]，进而使“sHsp-底物复合物”结构更易被大肠杆菌的*DnaK*识别，蛋白聚集体因而拆解为小的可溶性片段，并从“sHsp-底物复合物”上解离，使后续*ClpB*的解聚效率更高[23]，这一机制可能是外源小热休克蛋白增强大肠杆菌耐热性的核心路径之一。由此可见，PG序列是提升大肠杆菌耐热性的关键结构片段，但大肠杆菌自有的小热休克蛋白（IbpA和IbpB）并没有PG序列，对应位置被Val-Ala（IbpA）或Ile-Leu（IbpB）等刚性氨基酸组合替代，也从一个角度解释了一些耐热菌株比大肠杆菌更耐热的原因[24]，这为后续通过分子改造增强大肠杆菌耐热性提供了重要的靶点参考。尽管本文中筛选到的最优的小热休克蛋白（来自TT菌）在β2和β6片层序列与其他菌属的小热休克蛋白存在部分氨基酸的差异，但是目前尚无法据此推断TT-sHsp显著提升宿主大肠杆菌耐热性的分子机制，通过人工智能及机器学习的方法已有不少尝试探究该机制，但受限于小热休克蛋白序列–功能数据集规模较小，仍需通过其他方式进一步挖掘性能更优异的小热休克蛋白。

筛选获得适宜的小热休克蛋白后，选择合适的启动子驱动其表达成为亟待解决的关键问题。常见的小热休克蛋白启动子如表2所示。

表2　常见的小热休克蛋白启动子

Table 2　Common promoters for small heat shock proteins

启动子 Promoter	热休克蛋白 Heat shock protein	来源 Source	特点 Characteristics	参考文献 References
T7	Hsp20	*Tepidimonas sediminis*（沉积物暖单胞菌）	强表达；泄漏表达、IPTG依赖、代谢负担重、菌株限制	[8]
P_{Lac}	IbpA/IbpB	*Escherichia coli*	适应菌株范围广；IPTG依赖	[25]
P_{IbpA}	IbpA/IbpB	*Escherichia coli*	σ32调控，在受到胁迫时才表达，生长负荷小；诱导温度严格、表达时间窗口窄	[26]
P_{gapA}	Hsp20	*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4	适用菌株范围广，组成型强表达，σ32/σ70双调控	[12]
P_{L}	Hsp20	*Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4	无需诱导剂，通过温度控制，使小热休克蛋白在生长阶段和发酵阶段处于不同开关状态，减少生长期间负荷；生长阶段必须控制在较低温度30 ℃，会一定程度影响生长	本研究

目前，多数小热休克蛋白的异源表达常选用T7启动子。该启动子可使小热休克蛋白在适配T7聚合酶的BL21(DE3)宿主中实现高效表达，蛋白表达量可达总蛋白量的40%–50%，在热应激实验和高温发酵测试中均能有效提升宿主耐热性能。然而，该启动子存在明显局限性，其仅适用于含T7聚合酶的宿主，对于工业微生物常用的大肠杆菌W、MG1655及C菌株，无法直接应用，尽管可通过在这些大肠杆菌基因组中插入T7聚合酶基因片段解决这一问题[27]，但极高的蛋白表达量仅适用于蛋白表达分析及检测，对于工业微生物而言，反而会过度消耗菌株胞内资源，进而影响相关产物的发酵与合成[28]。除此之外，诱导型启动子如P_{lac}启动子也是一种可选方案，P_{lac}启动子虽然启动能力不如T7启动子，但作为一种诱导型启动子在平衡生长和蛋白表达比组成型启动子仍然具有一定优势[25]，但由于P_{lac}启动子还是需要IPTG诱导，从工业生产成本角度考虑，其并不适用于工业微生物的大规模应用。

相比之下，P_{IbpA}作为热应激诱导的启动子，无需IPTG作为诱导剂。但该启动子存在诱导温度要求严格、表达时间窗口窄的缺陷，限制了其实际应用[29]。另外，组成型启动子表达无需诱导物，P_{gapA}启动子驱动小热休克蛋白表达时，拓宽了工程菌最适生长温度的范围（37–43 ℃），较大程度提高了大肠杆菌的耐热性[12]，但该启动子启动能力较强，可能对微生物生长产生一定不利影响。

相较于上述诱导型及热应激诱导型启动子，组成型启动子因无需诱导物的优势更具工业应用潜力。为此，本文选用了3种组成型启动子（P_{M146}、P_{M137}、P_{M193}）来启动小热休克蛋白的表达，这3种组成型启动子启动强度分别相对于大肠杆菌*lacZ*基因启动子的1.7倍、2.5倍、5倍[19]，组成表达无需诱导剂，且通过这种不同启动强度的启动子，可评估小热休克蛋白表达水平是否满足热应激环境的需求。通过本文结果数据来看，启动强度最低的P_{M146}启动子获得了最大的菌体量，相对于对照菌株，提升了38.1%，这可能与低强度启动子驱动外源基因表达会带来较低的生长负荷有关[30]，从图1中小热休克蛋白表达情况和宿主生物量之间的关系也印证了这点，OO和OP小热休克蛋白表达条带较浓，但对应宿主生物量却最低，不过，非小热休克蛋白表达量越低，宿主生物量就越高；TT-sHsp的表达量并非最低，却能使宿主获得较高的生物量，这可能与不同小热休克蛋白表达对细胞负荷差异有关，不同小热休克蛋白本身性质不同，即使表达量相似，对细胞压力/保护效果也不一样。值得注意的是，即使表达时宿主生物量小，但最高强度的启动子P_{M193}驱动小热休克蛋白表达时，L-乳酸产量也达到28.4±0.25 g/L，相较于出发菌株提升了44.1%。尽管有机酸发酵产量往往与生物量相关联，但更高的热休克蛋白表达水平，可能使微生物在高温发酵时细胞状态更稳定，进而实现低生物量下的高乳酸产量。

组成型表达极端嗜盐菌的小热休克蛋白时发现会导致大肠杆菌生长缓慢[31]，因此动态表达小热休克蛋白是一种较佳策略，在生长期不表达小热休克蛋白，而在发酵阶段表达小热休克蛋白，这样可大大降低小热休克蛋白表达带来的生长负荷。

相较于前文提及的组成型启动子，温敏启动子具有独特优势，源自噬菌体的P_L启动子不仅启动强度高，还具有动态表达特性，兼具类似“诱导型”启动子的特性，且无需添加诱导剂，更适合小热休克蛋白这类抗逆基因的动态表达。本文首先以致死基因（*ccdB*）和绿色荧光蛋白（GFP）作为报告基因，评估了30–45 ℃ P_L启动子的温度依赖性，一般认为，30 ℃ P_L启动子处于“关闭”状态，42 ℃启动子处于开放状态[32]，两个报告基因的实验结果基本验证了这一特性，但对比30 ℃和37 ℃两个温度，荧光蛋白报告基因表达无显著差异，在一些文献中37 ℃作为启动子“开放”温度去驱动一些基因表达[33]，考虑到启动子的表达强度还与培养基种类、培养基pH范围、溶氧量等因素相关[34]，这可能是导致学界对37 ℃时P_L启动子状态存在分歧的原因，而42 ℃和45 ℃，恰好是多种微生物的热应激阈值温度[35]，因此更适合驱动小热休克蛋白表达，从而帮助宿主快速适应热激环境、提升耐热性能。

本文设计的发酵策略：30 ℃培养微生物，45 ℃高温发酵，结果表明，温敏启动子P_L驱动下的宿主生物量和L-乳酸产量比组成型启动子分别提升了17%–30%和6%–30%。通过温度的变化实现动态发酵，可使种子生长阶段小热休克蛋白不表达或低表达，高温发酵阶段高效表达，从而实现宿主生长与产酸的平衡。相较于组成型启动子驱动的小热休克蛋白表达，温敏启动子对高温发酵具有更好的适配性。

4 结论

本研究通过构建PL启动子驱动的TT-sHsp动态表达系统，显著提升了大肠杆菌的高温发酵性能。45 ℃发酵条件下，工程菌L-乳酸产量达30±0.58 g/L，最大生物量（OD_{600}）达8.1±0.32，与强组成型启动子PM193调控相比分别提升6%和17%。该动态调控策略可在提升宿主耐热性的同时兼顾生长与合成性能，为工业微生物的耐热性改造提供了高效、可行的技术思路。

参考文献

[1] Li Y, Xu XG, Qu R, et al. Heterologous expression of *Oenococcus oeni* sHSP20 confers temperature stress tolerance in *Escherichia coli* [J]. Cell Stress Chaperones, 2018, 23(4): 653-662.

[2] Sánchez-Adriá IE, Sanmartín G, Prieto JA, et al. Sourdough yeast strains exhibit thermal tolerance, high fermentative performance, and a distinctive aromatic profile in beer wort [J]. Foods, 2024, 13(7): 1059.

[3] Zhang B, Geberekidan M, Yan Z, et al. Very high thermotolerance of an adaptive evolved *Saccharomyces cerevisiae* in cellulosic ethanol fermentation [J]. Fermentation, 2023, 9(4): 393.

[4] Pan RZ, Yuan YC, Xu AM, et al. Biofilm engineering to improve succinic acid production in *Escherichia coli* by enhancing extracellular polysaccharide synthesis [J]. Bioresour Technol, 2025, 431: 132627.

[5] Sun WJ, Chen Y, Li MK, et al. Integration of (S)-2,3-oxidosqualene enables *E. coli* to become Iron Man *E. coli* with improved overall tolerance [J]. Biotechnol Biofuels, 2023, 16: 191.

[6] Kurokawa N, Ogawa M, Midorikawa R, et al. A study on the temperature-dependent behavior of small heat shock proteins from methanogens [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(12): 5748.

[7] Ahn YJ, Im E. Heterologous expression of heat shock proteins confers stress tolerance in *Escherichia coli*, an industrial cell factory: a short review [J]. Biocatal Agric Biotechnol, 2020, 29: 101833.

[8] Sato Y, Okano K, Honda K. Effects of small heat shock proteins from thermotolerant bacteria on the stress resistance of *Escherichia coli* to temperature, pH, and hyperosmolarity [J]. Extremophiles, 2024, 28: 12.

[9] Kruglikov A, Wei YL, Xia XH. Proteins from thermophilic *Thermus thermophilus* often do not fold correctly in a mesophilic expression system such as *Escherichia coli* [J]. ACS Omega, 2022, 7(42): 37797-37806.

[10] Blum P, Ory J, Bauernfeind J, et al. Physiological consequences of DnaK and DnaJ overproduction in *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1992, 174(22): 7436-7444.

[11] Laksanalamai P, Maeder DL, Robb FT. Regulation and mechanism of action of the small heat shock protein from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* [J]. J Bacteriol, 2001, 183(17): 5198-5202.

[12] 孙翔英, 刘月芹, 孙欢, 等. 大肠杆菌耐热元器件的构建及其应用 [J]. 化工学报, 2014, 65(8): 3128-3135.
Sun XY, Liu YQ, Sun H, et al. Construction of heat resistance devices for *Escherichia coli* and their application [J]. CIESC J, 2014, 65(8): 3128-3135.

[13] 王金华, 王永泽, 赵筱, 等. 高效利用蔗糖生产L-乳酸的大肠杆菌及应用: CN115873773A [P]. 2023-03-31.

[14] Zou SY, Chen WQ, Cao Y, et al. Lethal endotoxin (ccdB) based counterselection improved the efficiency of sequential gene editing in *Escherichia coli* [J]. Biotechnol Lett, 2025, 47(5): 118.

[15] Datta S, Costantino N, Court DL. A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria [J]. Gene, 2006, 379: 109-115.

[16] Jiang Y, Qian FH, Yang JJ, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum* [J]. Nat Commun, 2017, 8: 15179.

[17] 刘利, 陈炜琪, 邹诗瑶, 等. 亚磷酸脱氢酶表达对大肠杆菌琥珀酸发酵的影响 [J]. 中国调味品, 2025, 50(1): 210-215.
Liu L, Chen WQ, Zou SY, et al. Effect of phosphite dehydrogenase expression on succinic acid fermentation in *Escherichia coli* [J]. China Condiment, 2025, 50(1): 210-215.

[18] Roy M, Bhakta K, Ghosh A. Minimal yet powerful: the role of archaeal small heat shock proteins in maintaining protein homeostasis [J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 832160.

[19] Zhao J, Li QY, Sun T, et al. Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β-carotene production [J]. Metab Eng, 2013, 17: 42-50.

[20] Jiang S, Li HQ, Zhang L, et al. Generic Diagramming Platform (GDP): a comprehensive database of high-quality biomedical graphics [J]. Nucleic Acids Res, 2025, 53(D1): D1670-D1676.

[21] Boelens WC. Structural aspects of the human small heat shock proteins related to their functional activities [J]. Cell Stress Chaperones, 2020, 25(4): 581-591.

[22] Gil-Durán C, Ravanal MC, Ubilla P, et al. Heterologous expression, purification and characterization of a highly thermolabile endoxylanase from the Antarctic fungus *Cladosporium* sp. [J]. Fungal Biol, 2018, 122(9): 875-882.

[23] Konieczny I, Liberek K. Cooperative action of *Escherichia coli* ClpB protein and DnaK chaperone in the activation of a replication initiation protein [J]. J Biol Chem, 2002, 277(21): 18483-18488.

[24] Fu XM, Chang ZY. Identification of a highly conserved pro-gly doublet in non-animal small heat shock proteins and characterization of its structural and functional roles in *Mycobacterium tuberculosis* Hsp 16.3 [J]. Biochem Mosc, 2006, 71(S1): S83-S90.

[25] 周帮顺, 王茜, 李海燕, 等. Hsp提高细菌的逆境生存能力和乙醇产量 [J]. 生物技术, 2008, 18(4): 26-29.
Zhou BS, Wang X, Li HY, et al. Effect of heat shock treatment to increase the resistance to adversity and production of ethanol of *E. coli* [J]. Biotechnology, 2008, 18(4): 26-29.

[26] Miwa T, Taguchi H. *Escherichia coli*small heat shock protein IbpA plays a role in regulating the heat shock response by controlling the translation of σ^{32} [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2023, 120(32): e2304841120.

[27] Ting WW, Tan SI, Ng IS. Development of chromosome-based T7 RNA polymerase and orthogonal T7 promoter circuit in *Escherichia coli* W3110 as a cell factory [J]. Bioresour Bioprocess, 2020, 7: 54.

[28] Suo YK, Luo S, Zhang YN, et al. Enhanced butyric acid tolerance and production by Class I heat shock protein-overproducing *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 [J]. J Ind Microbiol

Biotechnol, 2017, 44(8): 1145-1156.

[29] Saltepe B, Bozkurt EU, Hacıosmanoğlu N, et al. Genetic circuits to detect nanomaterial triggered toxicity through engineered heat shock response mechanism [J]. ACS Synth Biol, 2019, 8(10): 2404-2417.

[30] Li ZP, Rinas U. Recombinant protein production associated growth inhibition results mainly from transcription and not from translation [J]. Microb Cell Fact, 2020, 19: 83.

[31] Snoeck S, Guidi C, De Mey M. 'Metabolic burden' explained: stress symptoms and its related responses induced by (over) expression of (heterologous) proteins in *Escherichia coli* [J]. Microb Cell Fact, 2024, 23: 96.

[32] Xu WB, Li SC, Bock R, et al. A heat-inducible expression system for external control of gene expression in plastids [J]. Plant Biotechnol J, 2024, 22(4): 960-969.

[33] Lin TH, Cheng SY, Lin YF, et al. Development of the low-temperature inducible system for recombinant protein production in *Escherichia coli* nissle 1917 [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72 (13): 7318-7325.

[34] Reinikainen P, Sevella B, Suutari M, et al. Analysis and modelling of the lambda pL promoter controlled expression of a cloned thermostable α-amylase gene in *Escherichia coli* during batch cultivation [J]. J Biotechnol, 1989, 9(3): 221-234.

[35] Ezemaduka AN, Yu J, Shi X, et al. A small heat shock protein enables *Escherichia coli* to grow at a lethal temperature of 50 C conceivably by maintaining cell envelope integrity [J]. J Bacteriol, 2014, 196(11): 2004-2011.

(责任编辑 朱琳峰)