

库德里阿兹威氏毕赤酵母木糖代谢沉默机制解析

袁子童¹, 王一², 张日鹏², 曹利民^{1*}, 于波², 王丽敏^{2*}

1 首都师范大学 生命科学学院, 北京

2 中国科学院微生物研究所, 微生物多样性与资源创新利用全国重点实验室, 北京

袁子童, 王一, 张日鹏, 曹利民, 于波, 王丽敏. 库德里阿兹威氏毕赤酵母木糖代谢沉默机制解析[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 4226-4241.

YUAN Zitong, WANG Yi, ZHANG Ripeng, CAO Limin, YU Bo, WANG Limin. Mechanism underlying the silencing of xylose metabolism in *Pichia kudriavzevii*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(8): 4226-4241.

摘要: 木质纤维素的高效转化是生物精炼实现经济可行性的核心, 其中木糖的充分利用是提升转化效率的关键。库德里阿兹威氏毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)凭借其出色的耐酸、耐高温及强抗逆性, 在工业生物制造领域展现出巨大潜力, 但其天然木糖利用能力的缺陷严重限制了其在生物质转化中的应用。【目的】解析 *P. kudriavzevii* E1 木糖代谢沉默的分子生物学机制, 为木质纤维素原料的生物利用提供理论支持。【方法】评估 *P. kudriavzevii* E1 菌株的木糖利用能力, 分析其基因组中木糖代谢相关基因, 确定木糖代谢限制因素; 采用比较转录组学方法分析木糖转运蛋白导入前后木糖代谢基因的表达差异; 通过异源表达高效木糖代谢相关基因验证木糖代谢的抑制性限速环节。【结果】生物信息学分析结合异源表达转运蛋白恢复 *P. kudriavzevii* E1 木糖摄取能力的试验证实, 缺乏对木糖具有亲和力的跨膜转运蛋白是该菌株无法摄取木糖的关键限制因素。*P. kudriavzevii* E1 基因组中天然存在编码木糖氧化还原代谢途径核心酶的 3 个基因 *PkXYL1*、*PkXYL2* 和 *PkXKS1*。体外相对酶活性测定表明, *P. kudriavzevii* E1 的内源木糖还原酶 PkXR 较低的相对活性是底物积累和木糖代谢缓慢的关键原因。针对恢复木糖利用能力的菌株 *P. kudriavzevii* E1-Xpg4562 的比较转录组学分析表明, 木糖环境中酵母细胞的代谢应答发生深刻重编程, 细胞优先激活核糖体生物发生和氧化磷酸化, 但因 *TAL1* 显著下调且磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)相关基因转录响应不足, 导致木糖环境中细胞 PPP 通量低下, 碳流无法有效回流至糖酵解, 阻碍了木糖下游代谢途径的畅通。对转录组分析涉及的关键木糖代谢基因进行表达水平检测, 进一步表明关键下游基因的转录调控不协同阻碍了木糖的代谢效率。【结论】*P. kudriavzevii* E1 的木糖代谢受阻是底物转运缺失、内源酶催化活性低下和转录调控不协同共同作用的结果。本研究为非模式酵母木糖代谢途径的精准改造提供了重要理论依据。

关键词: 库德里阿兹威氏毕赤酵母; 木糖代谢; 木糖转运蛋白; 转录组学

*Corresponding authors. E-mail: CAO Limin, caolimin@cnu.edu.cn; WANG Limin, wanglimin@im.ac.cn

Received: 2026-02-28; Accepted: 2026-03-30; Published online: 2026-04-30

Mechanism underlying the silencing of xylose metabolism in *Pichia kudriavzevii*

YUAN Zitong¹, WANG Yi², ZHANG Ripeng², CAO Limin^{1*}, YU Bo², WANG Limin^{2*}

¹ College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing, China

² State Key Laboratory of Microbial Diversity and Innovative Utilization, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Abstract: The efficient conversion of lignocellulosic biomass is at the core of ensuring the economic feasibility of biorefineries, where the comprehensive utilization of xylose serves as a determinant of overall conversion efficiency. *Pichia kudriavzevii* has demonstrated significant potential in industrial bioprocessing owing to its tolerance to low pH, high temperatures, and environmental stressors. However, its innate deficiency in xylose assimilation severely restricts its application in biomass valorization. **[Objective]** To elucidate the molecular mechanisms underlying the silencing of xylose metabolism in *P. kudriavzevii* E1, thereby providing a theoretical basis for the bioconversion of lignocellulosic feedstocks. **[Methods]** The xylose assimilation capacity of *P. kudriavzevii* E1 was evaluated, and its genome was analyzed to identify the genes and metabolic bottlenecks associated with xylose assimilation. Comparative transcriptomics was employed to characterize the differential expression of metabolic genes before and after the introduction of a xylose transporter. Furthermore, the heterologous expression of genes involved in efficient xylose metabolism was performed to verify specific rate-limiting steps within the pathway. **[Results]** Bioinformatics analysis, coupled with the functional restoration of xylose uptake *via* heterologous transporter expression, confirmed that the lack of high-affinity xylose transporters was the primary limiting factor for xylose assimilation in *P. kudriavzevii* E1. Although three genes—*PkXYL1*, *PkXYL2*, and *PkXKS1*—encoding core enzymes of the xylose redox pathway were natively present in the *P. kudriavzevii* E1 genome, *in vitro* enzymatic assays revealed that the low relative activity of PkXR was a critical cause of substrate accumulation and slow xylose metabolism. Comparative transcriptomics of the engineered strain *P. kudriavzevii* E1-Xpg4562 indicated that yeast cells underwent profound metabolic reprogramming in xylose-containing media, preferentially activating ribosome biogenesis and oxidative phosphorylation. However, the significant downregulation of *TAL1* and the insufficient transcriptional response of genes in the pentose phosphate pathway (PPP) resulted in inefficient PPP flux. This prevented the effective redirection of carbon flux into glycolysis, thereby obstructing downstream xylose metabolism. Finally, quantification of the expression of key xylose metabolism genes identified by transcriptomics further demonstrated that the uncoordinated transcriptional regulation of essential downstream genes hindered overall metabolic efficiency. **[Conclusion]** The silencing of xylose metabolism in *P. kudriavzevii* E1 results from the combined effects of deficient substrate transport, low endogenous catalytic activity, and uncoordinated transcriptional regulation. This study provides a crucial theoretical foundation for the precision engineering of xylose metabolic pathways in non-

conventional industrial yeasts.

Keywords: *Pichia kudriavzevii*; xylose metabolism; xylose transporter; transcriptomics

随着全球能源需求的持续增长与环境问题日益凸显,利用工程微生物将可再生生物质转化为生物燃料和高附加值化学品的需求愈发迫切。木质纤维素作为来源丰富、环境友好的生物质资源受到研究者广泛关注^[1],而木糖作为自然界中第二丰富的糖类,占木质纤维素水解糖总量的18%–30%^[2–3]。木糖的生物可利用性是影响木质纤维素生物加工经济可行性的关键因素。然而,许多工程微生物缺乏天然的木糖转运蛋白或代谢途径,且木糖代谢常与中心碳代谢相互干扰,导致利用木糖进行生物合成的产物种类有限、转化效率低下^[4–5]。

木糖代谢的首要障碍是木糖转运入细胞的效率较低。在天然酵母中,木糖的转运主要依赖非特异性己糖转运蛋白,这些转运蛋白对木糖的亲和力远低于葡萄糖等己糖,生化动力学分析表明,己糖转运蛋白对木糖的米氏常数(K_m)通常比葡萄糖高出10–100倍,这意味着在混合糖发酵环境中葡萄糖会通过竞争性结合优先占据转运位点,从而阻断木糖的转运。此外,尽管部分酵母中确实存在专一性木糖转运蛋白,但其天然表达水平与动力学特性不足以支持快速的木糖同化^[6–7]。在不能天然利用木糖的酵母中恢复木糖摄取能力的常规策略集中于转运蛋白的引入与改造^[8]。例如,在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中异源表达来自树干毕赤酵母(*Scheffersomyces stipitis*)的XUT和来自依哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)的GXS1^[9];对于具有木糖亲和性的转运蛋白,可通过理性设计(如基于结构与功能关系的定点突变)或非理性改造(如易错PCR或定向进化)获得转运效率更高的突变体,以减弱葡萄糖抑制效应并改善木糖转运动力学特性^[6]。

天然具备木糖利用能力的酵母,如*S. stipitis*、*C. shehatae*和*Spathaspora passalidarum*

通过由木糖还原酶(xylose reductase, XR)和木糖醇脱氢酶(xylitol dehydrogenase, XDH)构成的氧化还原途径(xylose reductase-xylitol dehydrogenase pathway, XR-XDH途径)将木糖转化为木酮糖,随后木酮糖经木酮糖激酶(xylulokinase, XK)磷酸化生成木酮糖-5-磷酸,并进入磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)完成进一步代谢^[10–11]。此外,木糖异构酶(xylose isomerase, XI)可在无需氧化还原辅因子的条件下催化木糖直接转化为木酮糖。然而, XI仅存在于细菌、植物及少数丝状真菌中,如硫色软霉变种(*Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*)和梨囊鞭菌(*Piromyces* sp.),该途径在天然酵母中尚未被发现^[12–14]。为克服木糖代谢受限、提升工程酵母的木糖利用效率,已有研究将外源XI和XR-XDH途径引入工程菌株^[4,15]。

库德里阿兹威氏毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)是一种非常规酵母,常被用于生产多种传统发酵饮料、食品及生化制品^[16–17]。同时,作为一种具有重要工业应用潜力的候选益生菌^[18],*P. kudriavzevii*在生物技术领域的地位日益提升。工程酵母菌株*P. kudriavzevii* E1分离自酒糟,前期研究表明该菌株具备优异的耐酸(pH 2.0–4.0)、耐高温(45 °C)及耐受糠醛等发酵抑制物的能力,能够在不添加中和剂的条件下生产光学纯度100%的L-乳酸,产量达74.45 g/L^[19]。然而,由于无法利用木糖,*P. kudriavzevii* E1在木质纤维素水解液生物炼制中的应用受到限制。此外,尽管在*S. cerevisiae*中木糖代谢调控网络已较为明确,且已有研究提出克服碳代谢阻遏、优化利用效率的工程策略^[20],但在*P. kudriavzevii*等非常规酵母中对木糖利用沉默的复杂机制解析仍显不足。

在木糖诱导条件下,*P. kudriavzevii* E1的全局转录响应尚未得到表征,其胞内潜在代谢节

点也缺乏系统研究。研究表明, 即便部分非常规酵母基因组中存在木糖代谢的关键酶, 但由于缺乏受诱导的转录激活机制, 这些酶长期处于低活性水平^[21]。因此, 单纯异源表达基因通常难以实现木糖碳流的高效传递, 亟需通过多维度的系统生物学手段对 *P. kudriavzevii* E1 的木糖代谢进行深度解析, 从而识别制约其木糖同化的核心因素。本研究通过整合比较基因组学、异源基因表达及生理特性分析系统探讨了 *P. kudriavzevii* E1 木糖代谢缺陷的分子基础, 旨在为开发具有木糖利用能力的非模式酵母菌株提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究涉及的菌株及质粒如表 1 所示。菌株 *P. kudriavzevii* E1 由本课题组前期从酒糟中分离并保存^[19]。感受态大肠杆菌(*Escherichia coli*) Trelief 5 α 用于质粒的克隆与扩增。

1.1.2 主要试剂和仪器

E.Z.N.A. 酵母 DNA 提取试剂盒, Bio-Rad 公司; Phusion Plus 高保真 DNA 聚合酶、NEBuilder HiFi DNA 组装试剂盒, New England Biolabs 公司; E.Z.N.A. 质粒提取及凝胶回收试剂盒, Omega Bio-tek 公司; PrimeScript RT 反转录试剂盒、TB Green Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒, TaKaRa 公司; D-葡萄糖、D-木糖、无氨基酸酵母氮源、琼脂粉及其他常用生化试剂, 麦克林生化科技股份有限公司及酷来博科技有限公司。

梯度 PCR 仪、凝胶成像的全自动凝胶成像系统、HPLC 的 HPX-87H 柱(7.8 mm $\times$ 300 mm), Bio-Rad 公司; DNA 浓度测定的超微量分光光度计, ThermoFisher Scientific 公司; 菌株培养的恒温振荡培养箱, 智城分析仪器有限公司; 高效液相色谱仪, Agilent 公司; 超纯水系统,

Merck Millipore 公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0; 配制固体培养基时需加入 15 g/L 琼脂粉, 抗生素根据质粒抗性标记添加。YPD 培养基(g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0; 其中蛋白胨和酵母提取物经 115 $^{\circ}$ C 蒸汽灭菌 15 min, 葡萄糖配制成 200.0 g/L 母液并经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 两者于培养基冷却至约 55 $^{\circ}$ C 后混合, 培养基最终 pH 6.5; 配制固体培养基时需加入 20.0 g/L 琼脂粉。YNBX₁₀ 培养基(g/L): YNB 6.7, D-木糖 10.0, 尿嘧啶 0.060。YNBD_{0.5} 培养基(g/L): YNB 6.7, D-木糖 0.5, 尿嘧啶 0.060。YNBD₁₀ 培养基(g/L): YNB 6.7, 葡萄糖 0.5, 尿嘧啶 0.060。

1.2 基因组 DNA 模板的提取方法

将培养过夜的菌液收集于 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 2 min, 弃上清; 加入 500 μ L buffer SE 和 5 μ L lyticase, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 以裂解细胞壁; 10 000 r/min 离心 2 min 收集原生质体, 加入 200 μ L buffer YL 和 20 μ L 蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 水浴 2 h; 加入 220 μ L buffer YB, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min; 加入 220 μ L 无水乙醇, 混匀后转移至吸附柱; 按照试剂盒说明书进行洗涤和洗脱, 最终用 50 μ L 预热至 65 $^{\circ}$ C 的 elution buffer 洗脱 DNA。提取的基因组 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性, 并使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定浓度和纯度, 确认 OD_{260}/OD_{280} 为 1.8–2.0, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 PCR 反应体系和方法

PCR 反应体系 (50.0 μ L): 2 $\times$ Phanta Max Master Mix 25.0 μ L, 上、下游引物(10.0 μ mol/L) 各 1.0 μ L, DNA 模板(100.0 ng) 1.0 μ L, ddH₂O 补足至 50.0 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5.0 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15.0 s, 于低于引物 T_m 值 2 $^{\circ}$ C 的温度下退火 15.0 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸(20.0 s/kb), 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10.0 min; 4 $^{\circ}$ C 保温。

表1 本研究涉及的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids in this work

Strains and plasmids	Characteristics	Sources
Strains		
<i>E. coli</i>		
Trelief 5a	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>) <i>U169 phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15, gyrA96, recA1, relA1, endA1, thi-1, hsdR17</i>	Tsingke Biotechnology Co., Ltd.
<i>P. kudriavzevii</i>		
E1-01	E1, Δ <i>URA3</i>	[19]
E1-03	E1-01, Δ <i>PDC, ldh</i>	This study
E1-05	E1-03, Δ <i>dld, BtLDHA</i>	This study
E1-07	E1-05, Δ <i>dld</i> upstream, P_{TDH3}	This study
E1-X01	E1-03, Δ <i>dld</i> , $P_{TDH3-xyIT-T_{TEF1}}$	This study
E1-X04	E1-05, Δ <i>PkXYL1</i> upstream, $P_{TDH3-XUT5-IGG6}$	This study
E1-X05	E1-01, Δ <i>PkXYL1</i> upstream, $P_{TDH3-SsXYL1-IGG6-SsXYL2-T_{TEF1}}$	This study
E1-X06	E1-07, Δ <i>PkXYL1</i> upstream, $P_{GDP-PkXUT1-IGG6}$	This study
E1-X07	E1-01, Δ <i>ADH1</i> , $P_{TDH3-SsXKS1-T_{TEF1}}$	This study
E1-X08	E1-01, Δ <i>URA3</i> upstream, $P_{TDH3-Mgt05196^{N360F}-T_{TEF1}}$	This study
E1-X09	E1-01, Δ <i>URA3</i> upstream, $P_{TDH3-RGT2-T_{TEF1}}$	This study
E1-X10	E1-01, Δ <i>PkXYL1</i> upstream, $P_{TDH3-XUT6-IGG6}$	This study
E1-Xpg1140	E1-01, Δ <i>URA3</i> upstream, $P_{TDH3-Xpg1140-T_{TEF1}}$	This study
E1-Xpg1151	E1-01, Δ <i>URA3</i> upstream, $P_{TDH3-Xpg1151-T_{TEF1}}$	This study
E1-Xpg2942	E1-01, Δ <i>URA3</i> upstream, $P_{TDH3-Xpg2942-T_{TEF1}}$	This study
E1-Xpg3423	E1-01, Δ <i>URA3</i> upstream, $P_{TDH3-Xpg3423-T_{TEF1}}$	This study
E1-Xpg4178	E1-01, Δ <i>URA3</i> upstream, $P_{TDH3-Xpg4178-T_{TEF1}}$	This study
E1-Xpg4562	E1-01, Δ <i>URA3</i> upstream, $P_{TDH3-Xpg4562-T_{TEF1}}$	This study
E1-Xpg4764	E1-01, Δ <i>URA3</i> upstream, $P_{TDH3-Xpg4764-T_{TEF1}}$	This study
E1-Xpg1758	E1-01, Δ EG17, $P_{TDH3-Xpg1758-T_{TEF1}}$	This study
E1-Xpg1807	E1-01, Δ EG17, $P_{TDH3-Xpg1807-T_{TEF1}}$	This study
E1-Xpg3179	E1-01, Δ EG17, $P_{TDH3-Xpg3179-T_{TEF1}}$	This study
E1-X13	E1-Xpg4562, Δ EG4, $P_{TDH3-SsXYL1-T_{TEF1}}$	This study
E1-X14	E1-Xpg4562, Δ EG4, $P_{TDH3-SsXYL2-T_{TEF1}}$	This study
E1-X15	E1-Xpg4562, Δ EG4, $P_{TDH3-SsXKS1-T_{TEF1}}$	This study
Plasmids		
pCas- <i>dld</i> N20	<i>Amp^r</i> ; <i>Cas9</i> ; specific sgRNA targeting <i>dld</i>	This study
pCas- <i>PkXYL1</i> upN20	<i>Amp^r</i> ; <i>Cas9</i> ; specific sgRNA targeting <i>PkXYL1</i>	This study
pCas- <i>URA3</i> upN20	<i>Amp^r</i> ; <i>Cas9</i> ; specific sgRNA targeting <i>URA3</i> upstream	This study
pCas- <i>ADH1</i> N20	<i>Amp^r</i> ; <i>Cas9</i> ; specific sgRNA targeting <i>ADH1</i>	This study
pCas-EG17N20	<i>Amp^r</i> ; <i>Cas9</i> ; specific sgRNA targeting neutral site EG17	This study
pCas-EG4N20	<i>Amp^r</i> ; <i>Cas9</i> ; specific sgRNA targeting neutral site EG4	This study

1.4 目的基因的克隆

以 E1 基因组 DNA 为模板, *XUT1/5/6-F* 和 *XUT1/5/6-R* 为引物 PCR 扩增获得内源转运体基因 *XUT1/5/6* 片段; 以合成基因为模板, 使用引物 *P_{TDH3}-Mgt05196^{N360F}-F* 和 *Ter-Mgt05196^{N360F}-R* 扩增高特异性木糖转运体编码基因 *Mgt05196^{N360F}* 片段; 以成对引物 *Xpgxxxx-F* 和 *Xpgxxxx-R* (“xxxx”为预测转运蛋白基因编号) PCR 扩增预测的木糖转运体编码基因; 以 *S. stipitis* 基因组 DNA 为模板, 使用引物 *P_{TDH3}-SsXYL1/SsXYL2/SsXKS1-F* 和 *Ter-SsXYL1/SsXYL2/SsXKS1-R* 分别扩增获得 *SsXYL1*、*SsXYL2* 和 *SsXKS1*。PCR 所用引物信息如表 2 所示。

1.5 功能质粒与打靶片段构建

采用 Gibson Assembly 策略构建重组质粒及打靶片段。对核心片段和质粒骨架分别进行 PCR 扩增, 回收纯化后的片段按比例混合, 于 50 °C 条件下进行同源重组连接。连接产物采用热激法转化至 *E. coli* Trelief 5α 中, 通过含相应氨苄青霉素的 LB 平板筛选阳性克隆。利用质粒提取试剂盒提取质粒, 并进行酶切及测序验证。

1.6 木糖转运蛋白的预测

使用 Funannotate (v1.8.17) 对木糖代谢阳性的毕赤酵母菌株与木糖代谢阴性的 *Pichia kudriavzevii* E1 菌株的基因组进行基因预测, 并使用 InterProScan 软件进行功能注释, 提取含有糖类转运蛋白结构域的蛋白序列作为各菌株的候选木糖转运蛋白。

对毕赤酵母菌株木糖转运蛋白的进一步预测通过 2 种方式进行。(1) 基于蛋白结构特征进行预测。使用 AlphaFold3 预测候选蛋白结构, 并使用 Foldseek 软件将其与 UniProt 数据库中真菌糖类转运蛋白的结构进行比对, 计算 TM-Score 值与 RMSD 值, 根据最佳比对结果识别不同糖类的转运蛋白; (2) 利用木糖培养条件下的特征性转录组数据。比较菌株在不同葡萄糖或

木糖条件下生长的转录组数据, 选取木糖培养条件下转录水平较葡萄糖条件上调≥1.5 倍的糖转运蛋白编码基因作为木糖转运蛋白的候选基因。

1.7 *P. kudriavzevii* E1 基因组木糖转运蛋白插入

菌株 *P. kudriavzevii* E1 的遗传改造采用课题组前期构建的 CRISPR-Cas9 编辑系统^[19]。将设计好的针对目标位点的 gRNA 表达质粒与含有 Xpg4562 表达框及同源臂的打靶片段共同转化进 *P. kudriavzevii* E1。酵母转化采用电转化法: 取对数生长期的 *P. kudriavzevii* E1 种子液, 按 1% 比例转接至 20 mL YPD 液体培养基中, 待 *OD*₆₀₀ 达到 0.6–0.8, 6 000×g 离心 10 min 收集菌体。用酵母电转化预处理悬浮液重悬收集的菌体, 置于摇床中 30 °C、200 r/min 振荡 30 min 以制备酵母感受态细胞。用预冷的 1 mol/L 山梨醇洗涤酵母菌体 3 次, 加入 500 μL 1 mol/L 山梨醇重悬菌体。将 1 μg 质粒与 200–500 ng 打靶片段混合后加入预冷的 0.2 cm 电转杯中, 利用电穿孔仪设置放电参数为 5.0 kV、3 ms。电击完成后, 立即向杯中加入 700 μL 预冷的 YPDS 复苏培养基, 轻轻晃动电转杯以悬浮菌体。将悬浮液转移至 1.5 mL EP 管中, 于 30 °C 恒温条件下静置复苏 1 h, 随后移至 30 °C、200 r/min 继续恢复生长 1 h。复苏后的菌液经离心浓缩, 涂布于含博来霉素的 SD 培养基平板上。待平板于 30 °C 培养 48–72 h 生长出单菌落后, 随机挑取转化子进行 PCR, 通过琼脂糖凝胶电泳观察条带大小进行初步验证。对于条带长度符合插入片段预期长度的转化子, 委托北京天一辉远生物科技有限公司进行单分子实时测序验证, 经传代 3 次后获得一系列遗传稳定的重组酵母菌株。

1.8 木糖代谢能力测试与培养策略

细胞内木糖含量检测: 挑取酵母单克隆在 200 mL YPD 培养基中培养至 *OD*₆₀₀ 为 0.6, 收集菌体。将酵母菌体转至等量 YNBX₁₀ 中 30 °C、

表2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
<i>XUT1</i> -F	ATGCACGGAGGTTTCAGACGGTAATGACG
<i>XUT1</i> -R	GGCCGCTGATGCTGATGCTGACAGTGCTTAA
<i>XUT5</i> -F	ATGACGGAAAGAAGCATTGGACC
<i>XUT5</i> -R	TTACTTCTTTGTATTAACAACAAAACCTTG
<i>XUT6</i> -F	ATGTCCAGTGTTGAAAAAAGTGC
<i>XUT6</i> -R	TTAGCTGATGTTTTTCGACATGCTC
P _{TDH3} - <i>Mgt05196</i> ^{N360F} -F	CACAAACAAACACAATTACAAAAAATGTCGTCGAATGAGCAGGTTACTCC
Ter- <i>Mgt05196</i> ^{N360F} -R	AAGAAGAACTATCAGCTCACTCAAACCCCTTCGGCTTCGTCCACCTCAG
P _{TDH3} - <i>SsXYL1</i> -F	CACACAAACAAACACAATTACAAAAAATGCCCTCCATTAAGTTGAAC
Ter- <i>SsXYL1</i> -R	AGAAGAACTATCAGCTCACTTAAACGAAGATTGGAATCTTATCCC
P _{TDH3} - <i>SsXYL2</i> -F	CACAAACAAACACAATTACAAAAAATGACTGCTAACCCATCTTTGGTCTTG
Ter- <i>SsXYL2</i> -R	AGAAGAACTATCAGCTCACTCATTCTGGACCATCAATCAAACAC
P _{TDH3} - <i>SsXKS1</i> -F	CACACAAACAAACACAATTACAAAAAATGACTACTACTCCATTTGATG
Ter- <i>SsXKS1</i> -R	GGTAAAAGAAGAACTATCAGCTCACGTGCTTCAATTCAGATTCCATCTTAG
<i>Xpg1140</i> -F	CACAAACAAACACAATTACAAAAAATGCCTTCAGATAAGCATTGGCACTACG
<i>Xpg1140</i> -R	AAGAAGAACTATCAGCTCACTTAAGCATTTCATAGCCTTGAAC
<i>Xpg1151</i> -F	CACAAACAAACACAATTACAAAAAATGCCACAAAATACACCCACTGC
<i>Xpg1151</i> -R	AGAAGAACTATCAGCTCACTTATTCAAGCTTTTCTTGAGG
<i>Xpg2942</i> -F	CACAAACAAACACAATTACAAAAAATGCTCAAGTTTACAAGAAGACTAGTGG
<i>Xpg2942</i> -R	AAGAAGAACTATCAGCTCACTTAAGTATTTGTCAATTGAAC
<i>Xpg3423</i> -F	CACAAACAAACACAATTACAAAAAATGCCTATCACAGTTTTCCGATC
<i>Xpg3423</i> -R	AAGAAGAACTATCAGCTCACTTAAAGTAACCAACCACGCTTTTCAAC
<i>Xpg4178</i> -F	CACAAACAAACACAATTACAAAAAATGTTTAAACAAACACTTAGG
<i>Xpg4562</i> -R	AAGAAGAACTATCAGCTCACTTATTTTTTCATATTTTGCATG
<i>Xpg4764</i> -F	CACAAACAAACACAATTACAAAAAATGGGTGTTCCAGCACTTTTCCG
<i>Xpg4764</i> -R	GAAGAACTATCAGCTCACTTAATATCTGTTACCGTTGTTGTAG
<i>Xpg1758</i> -F	CACACAAACAAACACAATTACAAAAAATGAGCGTTCAAATTGATCAAAAAG
<i>Xpg1758</i> -R	GTAAAAGAAGAACTATCAGCTCACTCAATTAATGTGAGCAACTTCTGG
<i>Xpg1807</i> -F	CACACAAACAAACACAATTACAAAAAATGTTAGACTTATTAAATAAAAAGG
<i>Xpg1807</i> -R	GGTAAAAGAAGAACTATCAGCTCACTCAAATTCAGAAGAATTGTTAATTC
<i>Xpg3179</i> -F	CACACAAACAAACACAATTACAAAAAATGTCTTCAAGTTCTATTTTCAG
<i>Xpg3179</i> -R	GTAAAAGAAGAACTATCAGCTCACTTAAACGTTTGTATCGTTGACTAG
<i>RGT2</i> -F	CACAAACAAACACAATTACAAAAAATGGGTTTAGAAGACAGTGCTCTC
<i>RGT2</i> -R	GTAAAAGAAGAACTATCAGCTCACCTATACAGAAGCTTCTCAACTTCAG

The restriction site and the homology arm are underlined.

200 r/min 培养, 初始 OD_{600} 为 0.73。48 h 后 6 000×g 离心 10 min 收集细胞, 烘干称取干重, 用生理盐水洗涤 3 次, 超声破碎(380 W, 30 min,

4 °C), 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 经氮吹干燥后重溶, 使其浓缩 10 倍。

培养环境中木糖消耗检测: 挑取酵母单克

隆在 YPD 培养基中进行种子培养, 在 30 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6。按 1% 接种量转接至 250 mL 三角瓶的 YNBX₁₀ 培养基中。诱导分析: 为进行转录组采样, 菌株在 30 °C 下诱导培养 6 h 后收集细胞, 立即用液氮冷冻。发酵性能测试: 连续培养 72 h 并定时取样, 记录 OD_{600} 数值, 并收集离心上清液样品用于 HPLC 代谢产物分析。

1.9 样品处理与 HPLC 检测

培养液样品以 9 000×g 离心 2 min, 取发酵液上清, 经 0.22 μm 滤膜过滤。木糖浓度通过高效液相色谱进行测定。色谱柱温度为 35 °C, 流速为 0.5 mL/min, 以 6 mmol/L 硫酸溶液为流动相。每个测定实验设置 3 个平行样品。所有定量数据均采用 *t* 检验或单因素方差分析进行统计分析, 实验数据以平均值±标准差表示。

1.10 XR、XDH 及 XK 酶活性检测方法

将待测菌株接种于 YPD 培养基, 于 30 °C、200 r/min 振荡 10 h, 6 000×g 离心 10 min 收集菌体并用无菌水洗涤 2 次, 随后转接至以木糖为唯一碳源的 YNBX 诱导培养基中诱导培养 12 h。诱导结束后, 离心收集菌体, 采用离心管加玻璃珠机械破碎法或超声破碎法处理细胞, 于 4 °C、12 000×g 离心 10 min, 取上清液作为粗酶液用于后续检测。PkXR 活性测定体系 (1 mL) 包含 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 6.0)、0.2 mmol/L NAD(P)H 及 200 mmol/L D-木糖; PkXDH 活性测定体系包含 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 9.0)、2 mmol/L NAD(P)⁺ 和 50 mmol/L 木糖醇; PkXK 活性采用偶联酶法测定, 体系包含 100 mmol/L Gly-Gly 缓冲液 (pH 7.4)、5 mmol/L ATP、0.2 mmol/L NADH、10 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L 磷酸烯醇式丙酮酸以及过量的丙酮酸激酶与乳酸脱氢酶。通过酶标仪监测 340 nm 处 NADH 或 NADPH 氧化还原引起的吸光度变化。酶活单位 (U) 定义为: 在实验条件下, 每分钟转化 1 pmol NAD(P)H 或 NAD(P)⁺ 所需的 OD_{600} 为

1 的菌液体积对应的酶量。

1.11 转录组测序与生物信息学分析方法

本研究各样本的转录组测序及基础数据分析由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。首先采用 TRIzol 法提取各样本总 RNA, 经 NanoDrop 2000 和 Agilent 2100 系统评估 RNA 的浓度、纯度及完整性, 确保检测合格后进入文库构建。利用 Oligo (dT) 磁珠富集带有聚腺苷酸尾巴的 mRNA, 经随机片段化、cDNA 合成、末端修复及接头连接等步骤完成测序文库的构建。文库检验合格后, 利用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行双端 150 bp 测序。原始数据经 fastp 软件过滤接头及低质量序列获得干净数据 (clean data), 使用 HISAT2 软件将干净数据比对至 *Pichia kudriavzevii* CBS573 参考基因组。基因表达量通过 FeatureCounts 进行定量, 并利用 DESeq2 软件进行组间差异表达分析。差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 的筛选标准设定为 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ 且校正后的 *P* 值 (P_{adj}) ≤ 0.05 。最后, 利用 clusterProfiler 软件对 DEG 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 代谢通路富集分析。

1.12 RT-qPCR 实验方法

采用 TRIzol 法提取不同培养条件下各样本的总 RNA, 经 DNase I 处理去除基因组 DNA 污染后, 利用反转录试剂盒将其合成 cDNA 模板。根据 NCBI 数据库中目标基因序列, 利用 Primer Premier 5 软件设计特异性定量引物。以 18S rRNA 作为内参基因, 采用 TB Green Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒, 在实时荧光定量 PCR 仪上设置 3 个平行重复进行扩增。反应体系及程序参照试剂盒说明书进行, 通过熔解曲线评估扩增产物的特异性。基因相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。

2 结果与分析

2.1 表达系列木糖转运蛋白的工程化 *P. kudriavzevii* E1 菌株的构建与验证

为解析木糖利用障碍的遗传基础,本研究对 *P. kudriavzevii* E1 的基因组序列进行了生物信息学分析。首先,以来自 *S. stipitis* 的典型 XR、XDH 和 XK,以及木糖转运蛋白序列作为比对基础,通过 BLASTp 进行同源基因筛选。结合 Pfam 结构域分析,最终鉴定了一套完整的内源 XR-XDH 途径基因,即编码木糖还原酶 PkXR 的 *PkXYL1*、编码木糖醇脱氢酶 PkXDH 的 *PkXYL2* 和编码木酮糖激酶 PkXK 的 *PkXKS1*。为进一步证明上述 3 种酶在胞内表达并具有活性,使用细胞粗提物测定了其体外相对酶活性(表 3)。结果表明,即使木糖代谢通量较低,测试的 3 种木糖代谢核心酶在胞内仍具备一定的活性,其中 PkXR 表现出最低的相对活性。这说明 E1 中天然的木糖代谢途径存在动力学失衡,PkXR 固有的低催化效率是 *P. kudriavzevii* E1 木糖同化的重要限速步骤,但并非该菌株木糖代谢沉默的机制根源。因此,本研究重点转向 *P. kudriavzevii* E1 木糖摄取能力的缺失。生物信息学分析显示,*P. kudriavzevii* E1 缺乏高亲和力的木糖转运蛋白编码基因。为从生理水平验证上述预测,本研究检测了木糖培养条件下细胞内

表3 *Pichia kudriavzevii* E1 XR-XDH途径关键酶相对活性

Table 3 Key enzyme activities in the XR/XDH pathway of *Pichia kudriavzevii* E1

Enzyme	Cofactor	Relative activity/U ⁻¹	Standard deviation
PkXR	NADPH	7.83×10^{-4}	4.88×10^{-5}
	NADH	0	0
PkXDH	NADP ⁺	7.92×10^{-4}	9.06×10^{-5}
	NAD ⁺	6.43×10^{-3}	9.58×10^{-4}
PkXK	NADPH	7.28×10^{-4}	2.14×10^{-5}
	NADH	1.56×10^{-3}	6.07×10^{-4}

的游离木糖含量。结果显示,浓缩后的胞质提取液中未检测到木糖(低于检测限 0.1 g/L)。该结果与生物信息学分析一致,证实野生型 *P. kudriavzevii* E1 菌株缺乏有效的木糖跨膜转运蛋白,木糖无法被摄入胞内,这构成了木糖代谢途径的首要瓶颈。

为突破转运限制,本研究首先导入异源转运蛋白编码基因 *XUT5*、*XUT6* 和 *XylT*,但并未发现重组菌株在以木糖为唯一碳源的培养基中恢复生长,同时浓缩后的胞质提取液中仍未检测到木糖,推测这 3 种转运蛋白可能无法在 *P. kudriavzevii* E1 膜上正确定位或形成正确构象。为解决这一问题,基于对近缘毕赤酵母基因组的分析,通过功能结构域比对,预测了 10 个可能与糖转运相关的编码基因;同时,克隆了来自高效木糖利用菌株 *S. stipitis* 的高亲和力木糖转运蛋白基因 *RGT2*;将这些基因分别构建于强启动子 P_{TDH3} 控制下的表达载体中,并分别导入 *P. kudriavzevii* E1-01。在以木糖为唯一碳源的培养条件下,评估了各工程菌株的木糖消耗(图 1)。结果表明,10 种预测转运蛋白导入后,菌株表现出不同程度的木糖消耗,尽管 72 h 木糖消耗量均低于 0.5 g/L,但异源表达转运蛋白仍可恢复 *P. kudriavzevii* E1 菌株的木糖摄取功能。其中 *P. kudriavzevii* E1-Xpg4562、E1-Xpg4764 和 E1-X09 的木糖消耗能力较强,72 h 木糖消耗量分别为 0.38、0.29、0.11 g/L。然而,所有工程菌株的木糖消耗速率仍远低于理论水平,且生物量积累未见显著改善,表明在克服转运障碍后,细胞内木糖代谢途径自身仍存在其他关键限制环节,有待进一步解析。此部分研究为后续深入剖析菌株的木糖代谢沉默机制提供了重要的工程菌株基础与表型依据。

2.2 木糖与葡萄糖条件下重组菌株的比较转录组分析

2.2.1 转录组文库构建和质量控制

为全面了解恢复木糖利用能力的重组菌株

在木糖环境中的转录响应, 对以葡萄糖或木糖为单一碳源培养的 *P. kudriavzevii* E1-Xpg4562 进行了 RNA-seq 分析, 并比较了其基因表达谱。在 Illumina NovaSeq 6000 平台上对在 2 种不同碳源条件下培养的 E1-Xpg4562 总 RNA 所构建的 6 个 cDNA 文库进行了双端测序。在过滤掉重复、低复杂性和低质量读段后, 将高质量读段比对至 *P. kudriavzevii* CBS573 参考基因组。6 个文库(YNBX10-1、YNBX10-2、YNBX10-3、YNBD10-1、YNBD10-2、YNBD10-3)的测序结果如表 4 所示。主成分分析显示生物学重复样本聚类清晰, 且唯一比对率(uniquely mapped)均在 95.6% 以上, 确保了后续表达量定量及差异分析的可靠性。

2.2.2 木糖环境中 *P. kudriavzevii* E1-Xpg4562 表达差异基因分析

通过对全基因组表达水平的初步对比, 发现 *P. kudriavzevii* E1-Xpg4562 从葡萄糖切换至木糖环境后转录谱发生了剧烈重塑。共鉴定出 2 126 个 DEG, 其中 1 190 个基因显著上调, 936 个基因显著下调。这一显著的转录响应表明, 尽管表型上木糖消耗量较低, 但细胞在转录水平上已出现复杂应答。*P. kudriavzevii* E1-Xpg4562 响应不同碳源诱导的 DEG 总体分布如图 2A 所示。

本研究通过比较转录组学分析与 RT-qPCR 验证(图 2B), 系统解析了 *P. kudriavzevii* E1-

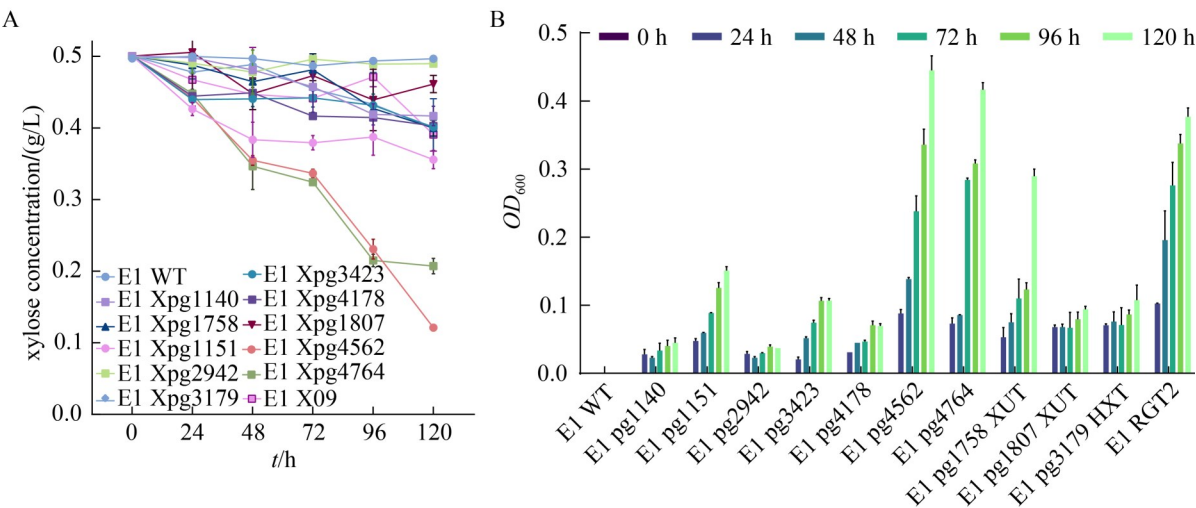


图1 异源表达木糖转运体的*Pichia kudriavzevii* E1木糖消耗和生长情况
Figure 1 Xylose consumption and growth profiles of *Pichia kudriavzevii* E1 heterologously expressing xylose transporters. A: Residual xylose concentration in the culture medium (YNBX_{0.5}) of the indicated yeast strains; B: Biomass (OD₆₀₀) of the indicated strains cultured in YNBX_{0.5} medium.

表4 六个文库的读段比对统计

Table 4 Read-mapping statistics for the six libraries

Sample name	YNBX10-1	YNBX10-2	YNBX10-3	YNBD10-1	YNBD10-2	YNBD10-3
Total reads	43 875 248	47 610 284	47 610 284	43 393 264	46 227 090	43 471 870
Total mapped	42 885 172	46 528 186	44 312 658	42 745 235	45 265 452	42 836 789
	(97.74%)	(97.73%)	(97.93%)	(98.51%)	(97.92%)	(98.54%)
Uniquely mapped	42 117 293	45 714 092	43 671 882	41 578 857	44 217 482	41 604 691
	(95.99%)	(96.02%)	(96.51%)	(95.82%)	(95.65%)	(95.7%)

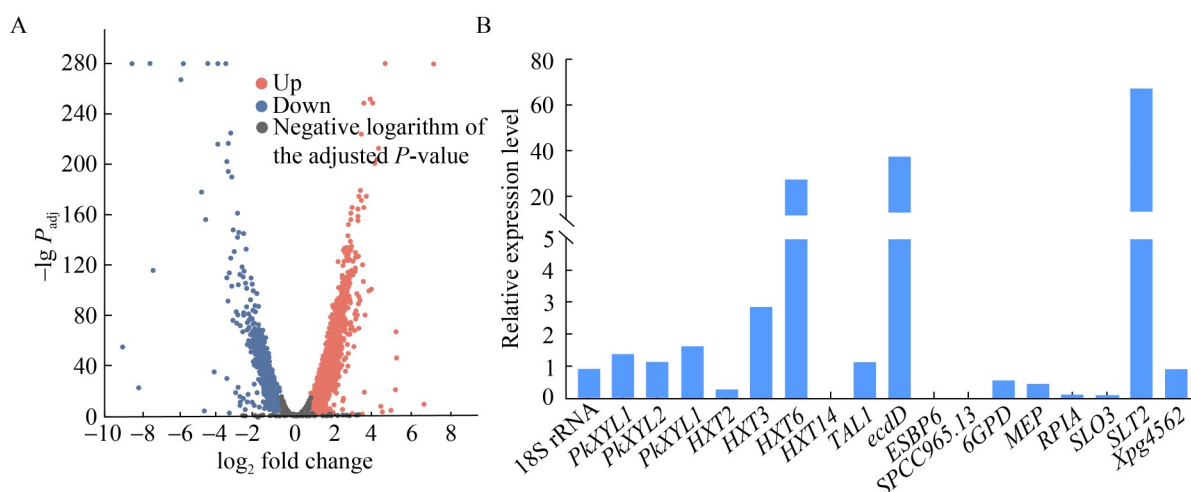


图2 转录组差异表达基因与关键差异基因转录水平验证

Figure 2 Differentially expressed genes and RT-qPCR validation of key genes. A: Volcano plot of differentially expressed genes; B: Relative transcriptional levels of key genes in xylose-containing medium.

Xpg4562 在木糖诱导下的转录响应。结果显示, 2 种检测手段所得的基因表达趋势高度吻合。*PkXYL1* 和 *PkXKS1* 表达水平分别为葡萄糖条件下的 1.40 倍和 1.70 倍, 同时 *PkXYL2* 稳定表达 (1.18 倍), 表明木糖同化途径已被激活; *HXT6* 表现出 18.18 倍的显著上调, 而 *HXT14* 和 *HXT2* 则受到显著抑制, 反映了细胞对跨膜转运蛋白的差异性调度。在 PPP 方面, 转录组数据显示编码 6-磷酸葡萄糖脱氢酶的 *ZWF1* 上调 3.22 倍以补偿木糖还原过程对 NADPH 的消耗, 但下游 *SOL3* 下调及 *GND* 转录水平较低导致氧化分支内部出现严重的转录不协同, 这一现象在 RT-qPCR 验证中表现为 *RPIA*、*SOL3* 和 *6GPD* 表达水平平均下调至 0.14–0.56 倍。此外, 转录组分析显示 *RKII* 微弱上调 (1.09 倍) 且衔接糖酵解的关键基因 *TAL1* 显著下调至 0.54 倍, 直接阻断了木糖碳骨架回流至中心代谢的路径, 引发了胁迫响应基因 *SLT2* (64.00 倍) 和 *ecdD* (34.60 倍) 的显著上调, 单羧酸转运蛋白基因 *ESBP6* 表达量锐减 (0.04 倍)。综上所述, *P. kudriavzevii* E1 在感知木糖信号后, 由于中心代谢路径尤其是非氧化 PPP 的转录响应不足或不协同, 导致碳流回

流受阻并诱发强烈的生理应激, 这是制约该菌株木糖代谢效率的重要因素。

2.2.3 GO 功能显著性富集分析

为进一步解析差异基因的功能特征, 对 DEG 进行了 GO 富集分析。根据显著性水平 ($-\lg P_{adj}$) 最高的 10 类富集 DEG (图 3A), 核糖体生物发生 (ribosome biogenesis) 和前核糖体 (preribosome) 在生物过程 (biological process, BP) 和细胞组分 (cellular component, CC) 分类中占据首位, $-\lg P_{adj}$ 分别为 5.42 和 1.70。这表明 *P. kudriavzevii* E1-Xpg4562 经木糖处理后发生广泛的物质重组并提升翻译能力, 以支持碳源的同化与利用, 这也与转运蛋白相关基因的显著富集相一致。85 个跨膜转运蛋白 ($-\lg P_{adj} \approx 2.45$) 和 34 个无机阳离子跨膜转运蛋白 ($-\lg P_{adj} \approx 2.40$) 相关基因的富集显示出较高的显著性。GO 富集分析结果表明, 在诱导初期, 细胞大规模上调蛋白合成相关基因并重塑膜转运系统, 以适应木糖作为碳源的生长环境。这种高能量投入与极低的实际木糖利用率形成鲜明对比, 表明细胞感应到新碳源的存在, 但细胞内部代谢流未能顺畅切换。

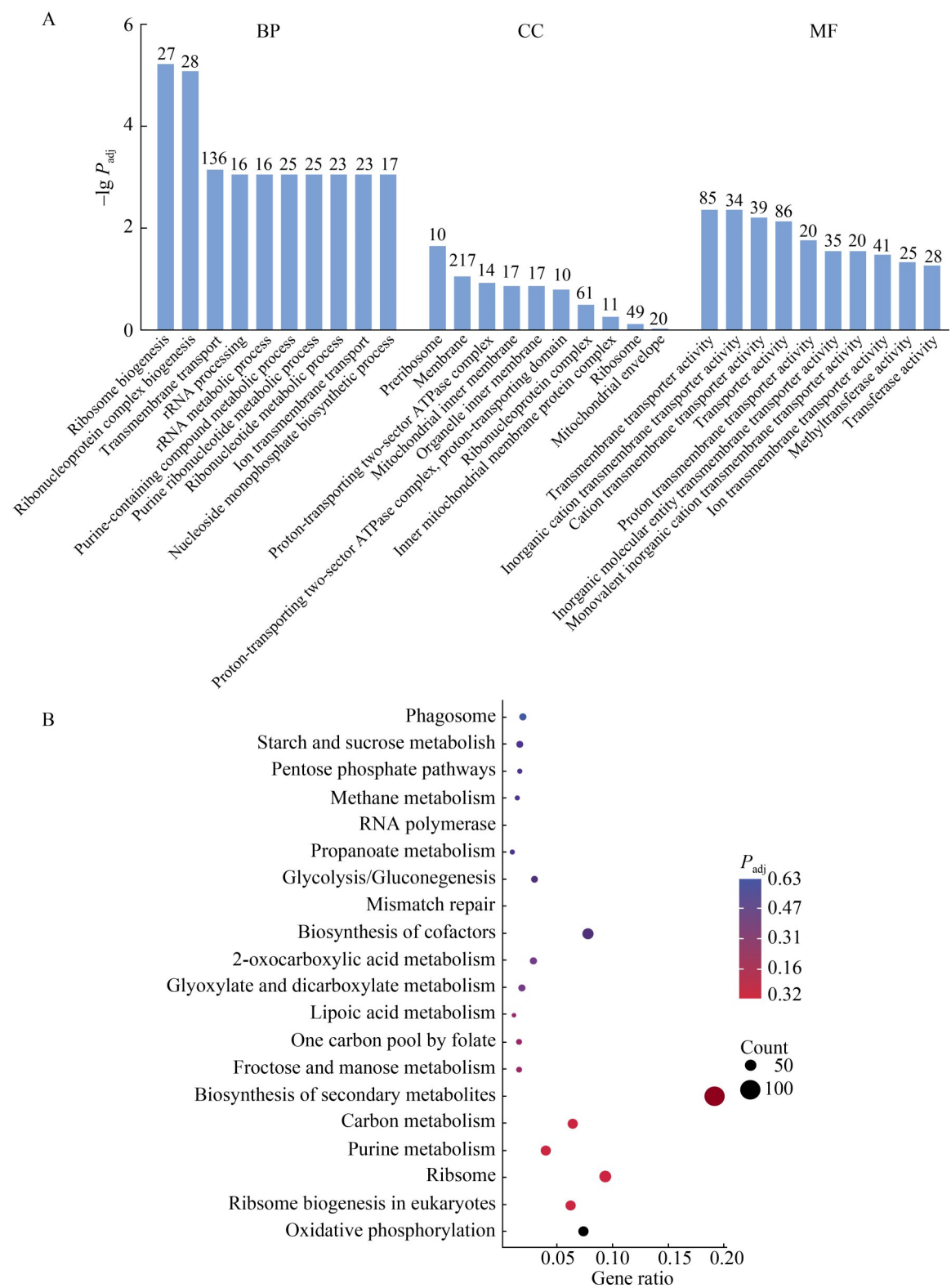


图3 差异表达基因富集分析

Figure 3 Enrichment analysis of DEGs. A: GO enrichment analysis of differentially expressed genes; B: KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes.

2.2.4 KEGG 代谢通路富集分析

为阐明潜在的系统性代谢调整, 对 *P. kudriavzevii* E1-Xpg4562 在木糖或葡萄糖环境中生长的差异表达基因进行了 KEGG 通路富集分析(图 3B)。分析表明, 氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)是显著性最强且涉及基因数量最多的通路, 共涉及 47 个基因, 说明菌株的代谢重点在于蛋白质合成和能量产生, 这与初始的 GO 富集分析一致。同时, 碳代谢(carbon metabolism)上调显著, 其涵盖了主要的六碳糖利用途径, 如糖酵解、糖异生, 说明在摄入碳源量较低、生物合成加快的情况下细胞对碳代谢的需求增加。值得注意的是, PPP 相关基因也呈现富集, 凸显了 PPP 在处理木糖来源的少量碳流、将生成的五碳中间体导入中心代谢中的作用。此外, 嘌呤代谢、辅因子生物合成以及叶酸介导的一碳池的激活说明细胞需要加快合成必需的前体物和辅因子以维持快速的核酸合成和整体合成代谢。氧化磷酸化的高度显著富集说明细胞在快速产生 ATP 以支持跨膜转运和核糖体合成。PPP 基因的富集程度不足是限制木糖通量的重要因素, 意味着即便木糖通过转运蛋白 Xpg4562 进入细胞, 其向下游酵解途径转化的效率依然受限。KEGG 富集分析揭示了一种碳流受限而能量消耗升高的细胞应激状态, 表明细胞可能通过上调其他供能物质的代谢途径满足翻译和物质合成的需求, 而木糖的下游代谢则被持续抑制。

2.3 XR-XDH 限制环节分析和优化

将来自 *S. stipitis* 的高效 XR-XDH 途径关键基因 *SsXYL1*、*SsXYL2* 和 *SsXKS1* 与相同表达元件构成组成型表达框, 并分别靶向整合到 *P. kudriavzevii* E1-Xpg4562 的同一中性位点以完成异源表达。RT-qPCR 证实了 3 个基因在改造菌株中实现了稳定表达, 且表达水平相近。对重组菌株 *P. kudriavzevii* E1-X13、E1-X14 和 E1-X15 在 YNBX_{0.5} 培养基上的木糖代谢和生物量积累进行了表征(图 4B、4C)。与 *P. kudriavzevii*

E1-Xpg4562 相比, 重组菌株 72 h 累积生物量均有所提升, 同时木糖消耗速率也有相应提高。该结果说明, 在引入预测转运蛋白 Xpg4562 缓解摄取限制之后, 由内源性木糖还原酶催化的木糖向木糖醇转化的初始步骤是天然氧化途径中的核心限制因素。这一限制体现为中间工程菌株 E1-Xpg4562 较低的比生长速率和木糖醇的适度积累。这一结果提供了直接的功能证据, 表明克服 PkXR 固有的低活性对于实现较高的木糖代谢通量至关重要。这种功能互补证明了 PkXR 的动力学特性不足以维持由 Xpg4562 所实现的木糖输入通量, 从而限制了进入中心 PPP 的总体碳流。综上所述, 这一逐步工程策略有效解析了 *P. kudriavzevii* E1 中的代谢瓶颈: 木糖转运体的缺失虽是初始障碍, 但内源性木糖还原酶的低催化效率是其木糖同化速率的关键限制因素。

3 讨论与结论

本研究通过生物信息学分析、酶动力学表征及比较转录组学手段, 系统解析了工业酵母 *P. kudriavzevii* E1 木糖利用障碍的分子机制。实验结果证实, 该菌株的木糖代谢沉默是由底物转运缺失、酶促动力学失衡及转录调控不协同共同作用的结果。

首先, 跨膜转运限制被证实是 *P. kudriavzevii* E1 利用木糖的首要阻碍。生物信息学预测结果与胞内游离木糖含量检测结果一致, 均表明 *P. kudriavzevii* E1 缺乏高效的木糖特异性转运蛋白。尽管通过异源表达转运蛋白 Xpg4562 部分恢复了 *P. kudriavzevii* E1 的木糖摄取功能, 但重组菌株的木糖消耗速率及生物量积累仍远低于理想水平。此结果表明, 相较于已被广泛研究的模式酵母 *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii* E1 在木糖利用上存在天然的多级限制, 胞内代谢路径的受限程度高于 *S. cerevisiae*^[5], 因此仅解除转运限制不足以驱动较高的木糖代谢通量, 胞内存在更为复杂的限制

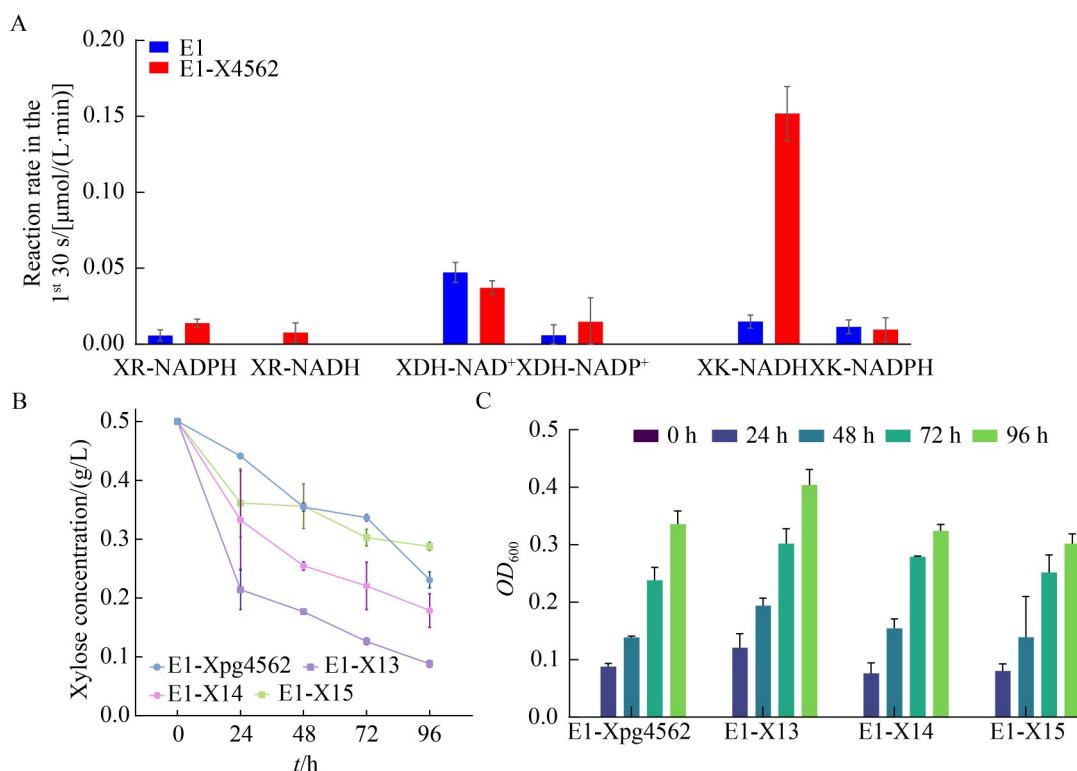


图4 异源表达来自*Scheffersomyces stipitis*木糖代谢途径基因对*Pichia kudriavzevii* E1生理特性的影响

Figure 4 Effects of heterologous expression of *Scheffersomyces stipitis* xylose metabolic genes on the physiological characteristics of *Pichia kudriavzevii* E1. A: Comparison of the initial reaction rates (first 30 s) of XR, XDH, and XK using two different cofactors in *P. kudriavzevii* E1 and E1-Xpg4562; B: Residual xylose concentration in the culture medium (YNBX_{0.5}) for strains following the integration of heterologous metabolic modules; C: Biomass (OD_{600}) of strains integrating heterologous metabolic modules *SsXYL1/2* and *SsXKS1* cultured in YNBX_{0.5} medium.

环节。其次，内源代谢途径的动力学失衡是限制木糖同化的核心胞内因素。酶活性检测显示，尽管 *P. kudriavzevii* E1 基因组存在完整的 XR-XDH 途径基因，且在胞内具备基础活性，但 PkXR 的相对活性显著低于下游酶。这种酶促反应速率的不匹配导致初始同化步骤的动力学受阻。GO 与 KEGG 富集分析共同表明，细胞在感知木糖信号后优先将胞内物质和能量投入核糖体生物发生和氧化磷酸化等过程。由于缺乏与之匹配的中心代谢通量支持，这种以最大化生物量合成为导向的代谢策略导致了严重的代谢失调。转录水平的非协同性进一步表明 PPP

是关键限制节点。转录组与 RT-qPCR 数据均证实，虽然 *ZWF1* 的上调反映了细胞对 NADPH 消耗的应激补偿，但下游 *SOL3* 和 *GND* 的下调限制了氧化分支的通量；在非氧化分支中，衔接糖酵解的关键基因 *TAL1* 出现显著转录抑制，直接阻断了木糖来源碳流向中心代谢回流的路径。这种木糖诱导下的转录响应弱化现象在 *S. cerevisiae* 的相关转录组研究中较少见，通常 *S. cerevisiae* 经木糖适应性进化后能较快建立协同的 PPP 通量^[20]。*P. kudriavzevii* E1 木糖代谢通量受阻不仅限制了生物量积累，更诱发了胁迫响应基因 *SLT2* 和 *ecdD* 的高水平表达，反映了细

胞在木糖环境下处于强烈的代谢应激状态。

综上所述, *P. kudriavzevii* E1 的木糖代谢受阻是一个多级限制过程: 转运缺失构成初始障碍, 而进入胞内的碳流因 PkXR 催化效率低下及 PPP 转录响应不足无法有效导入糖酵解途径。这一发现表明, 针对非模式酵母的木糖代谢改造, 必须在建立高效转运体系的基础上同步提高内源限速酶的催化效率并重塑 PPP 途径的转录协同性。

作者贡献声明

袁子童: 开展实验、数据收集与处理、论文撰写; 王一: 开展实验、数据收集与处理; 张日鹏: 数据收集与处理、论文撰写; 曹利民: 论文修改; 于波: 论文修改; 王丽敏: 研究构思、设计、论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Beegle JR, Borole AP. Energy production from waste: evaluation of anaerobic digestion and bioelectrochemical systems based on energy efficiency and economic factors[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018, 96: 343-351.
- [2] Van Dyk JS, Pletschke BI. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes: factors affecting enzymes, conversion and synergy[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1458-1480.
- [3] Zhong YT, Shang CY, Gu JH, Tao HL, Lu XM, Hou J, Cui ZY, Qi QS. Xylose metabolism perturbation in *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid bioproduction from lignocellulosic biomass[J]. *Advanced Science*, 2025, 12(42): e07999.
- [4] Zhao Z, Xian M, Liu M, Zhao G. Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13: 21.
- [5] Li XW, Wang YY, Li G, Liu QL, Pereira R, Chen Y, Nielsen J. Metabolic network remodelling enhances yeast's fitness on xylose using aerobic glycolysis[J]. *Nature Catalysis*, 2021, 4(9): 783-796.
- [6] Vasylyshyn R, Kurylenko O, Ruchala J, Shevchuk N, Kuliesiene N, Khroustalyova G, Rapoport A, Daugelavicius R, Dmytruk K, Sibirny A. Engineering of sugar transporters for improvement of xylose utilization during high-temperature alcoholic fermentation in *Ogataea polymorpha* yeast[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19: 96.
- [7] Qiu YJ, Qiu ZY, Xia J, Liu XY, Zhang HW, Yang YX, Hou WY, Li XQ, He JL. Co-expression of xylose transporter and fructose-bisphosphate aldolase enhances the utilization of xylose by *Lactococcus lactis* IO-1[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2023, 195(2): 816-831.
- [8] Sharma S, Arora A. Tracking strategic developments for conferring xylose utilization/fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Annals of Microbiology*, 2020, 70: 50.
- [9] De Sales BB, Scheid B, Gonçalves DL, Knychala MM, Matsushika A, Bon EPS, Stambuk BU. Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing D-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(10): 1973-1982.
- [10] Kwak S, Jo JH, Yun EJ, Jin YS, Seo JH. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(2): 271-283.
- [11] Banerjee S, Archana A, Satyanarayana T. Xylose metabolism in a thermophilic mould *Malbranchea Pulchella* var. *sulfurea* TMD-8[J]. *Current Microbiology*, 1994, 29(6): 349-352.
- [12] Harhangi HR, Akhmanova AS, Emmens R, van der Drift C, de Laat WTAM, van Dijken JP, Jetten MSM, Pronk JT, Op den Camp HJM. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway[J]. *Archives of Microbiology*, 2003, 180(2): 134-141.
- [13] Madhavan A, Tamalampudi S, Ushida K, Kanai D, Katahira S, Srivastava A, Fukuda H, Bisaria VS, Kondo A. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(6): 1067-1078.
- [14] Tan YS, Wang L, Wang YY, He QE, Liu ZH, Zhu Z, Song K, Li BZ, Yuan YJ. Protein acetylation regulates xylose metabolism during adaptation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14: 241.
- [15] James SA, Som N, Turner A, Baker DJ, Narbad A. Draft genome sequence of a kombucha isolate of *Pichia kudriavzevii*[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2025, 14(9): e00478-25.
- [16] Chu YF, Li MM, Jin JH, Dong XM, Xu K, Jin LB, Qiao YM, Ji H. Advances in the application of the non-

- conventional yeast *Pichia kudriavzevii* in food and biotechnology industries[J]. Journal of Fungi, 2023, 9(2): 170.
- [17] Chelliah R, Ramakrishnan SR, Prabhu PR, Antony U. Evaluation of antimicrobial activity and probiotic properties of wild-strain *Pichia kudriavzevii* isolated from frozen *idli* batter[J]. Yeast, 2016, 33(8): 385-401.
- [18] Acedos MG, de la Torre I, Barriuso J, García JL. Unsilencing a cryptic xylose metabolic pathway in *Rhodococcus jostii* RHA1 for efficient lipid production from lignocellulosic biomass[J]. Journal of Biological Engineering, 2025, 19: 32.
- [19] Zhang B, Li R, Yu L, Wu C, Liu Z, Bai F, Yu B, Wang L. Co-utilization of glucose and xylose by an engineered *Pichia kudriavzevii* strain for efficient ethanol production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(29): 11131-11140.
- [20] Qiu YL, Wu ML, Bao HD, Liu WF, Shen Y. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for co-fermentation of glucose and xylose: current state and perspectives[J]. Engineering Microbiology, 2023, 3(3): 100084.
- [21] Young E, Poucher A, Comer A, Bailey A, Alper H. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(10): 3311-3319.