



杨宗灿,常彩萍,赵森森,等. 基于转录组和 RT-qPCR 技术挖掘烟草果胶水解酶基因[J]. 轻工学报,2026, 41(3):132-142.  
YANG Z C, CHANG C P, ZHAO S S, et al. Mining of tobacco pectin hydrolase genes based on transcriptomics and RT-qPCR[J]. Journal of Light Industry, 2026, 41(3):132-142 DOI:10.12187/2026.03.013

# 基于转录组和 RT-qPCR 技术挖掘烟草果胶水解酶基因

杨宗灿<sup>1</sup>, 常彩萍<sup>2</sup>, 赵森森<sup>1</sup>, 杨金初<sup>1</sup>, 王秋领<sup>1</sup>, 王欢欢<sup>3</sup>, 黄申<sup>2</sup>, 毛多斌<sup>2</sup>

1. 河南中烟工业有限责任公司 技术中心, 河南 郑州 450000;
2. 郑州轻工业大学 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001;
3. 河南农业大学 烟草学院, 河南 郑州 450046

**摘要:**【目的】筛选产果胶酶菌株, 挖掘烟草果胶降解关键酶基因。【方法】采用 3,5-二硝基水杨酸比色(DNS)法, 以烟草果胶为唯一碳源筛选烟草果胶降解菌株, 利用转录组技术分析烟草果胶降解过程中相关酶的差异表达, 通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)技术验证并确定烟草果胶降解关键酶基因。【结果】筛选得到一株烟草果胶降解菌株 GB3, 在发酵液降解烟草果胶中酶活力值为 32.95 U/mL, 通过形态学和 16S rDNA 序列分析, 初步鉴定为变栖克雷伯杆菌(*Klebsiella variicola*); GB3 在降解普通果胶过程中有 1076 个基因上调, 而降解烟草果胶过程中有 1100 个基因上调; 与烟草果胶降解相关差异表达基因主要富集于半乳糖代谢、糖酵解/糖异生和其他聚糖降解途径, 共筛选到 9 个可能与烟草果胶降解相关的酶基因, 经 RT-qPCR 分析, *rlpA*、*lacZ*、*ogl*、*rhaA* 和 *P48843* 为烟草果胶降解关键酶基因。【结论】验证了烟草果胶降解关键酶基因为 gene1209, gene1526, gene2083, gene310 和 gene4941, 为研究果胶酶基因, 降低烟叶果胶含量, 提升烟叶品质提供参考。

**关键词:**烟草果胶; 差异表达基因; 烟草果胶水解酶; 转录组; RT-qPCR

**中图分类号:**TS49 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2026)03-0132-11

## 0 引言

果胶作为烟草细胞壁的组分之一, 是由 D-半乳糖醛酸及其甲酯通过  $\alpha$ -1,4-糖苷键聚合形成的酸性复杂多糖, 其侧链通常由 L-阿拉伯糖、L-鼠李糖、D-半乳糖等多元糖基组成<sup>[1-2]</sup>。烟草果胶与普通果胶在来源、成分、结构及特性上差异显著<sup>[3-4]</sup>。

烟草果胶多采用微波法和超声法从烟草细胞壁提取, 其侧链修饰和乙酰化程度因烟草品种而异, 含微量烟草次生代谢物。果胶含量对烟叶品质影响显著, 适量果胶可维持烟叶结构稳定性, 并能通过渗透作用增强其吸湿性和弹性; 果胶含量过高则会显著降低烟叶结构稳定性与燃烧特性, 增加烟气刺激性, 促进甲醇、焦油等有害物质生成, 导致香气品

收稿日期:2025-04-09; 修回日期:2025-09-26; 出版日期:2026-06-15

基金项目:中国烟草总公司重点研发项目(110202202006); 河南中烟工业有限责任公司技术研究开发项目(AW2022018)

作者简介:杨宗灿(1985—), 男, 河南省郑州市人, 河南中烟工业有限责任公司高级工程师, 主要研究方向为烟草生物技术。

E-mail: yangzongcan666@163.com

通信作者:毛多斌(1962—), 男, 河南省南阳市人, 郑州轻工业大学教授, 博士, 主要研究方向为烟草化学和香精香料、生物催化与转化。E-mail: duobinmao@126.com

质下降<sup>[5-7]</sup>。因此,降低烟叶中过高的果胶含量可有效改善其燃烧特性,提升烟气品质,减少有害物质生成,进而改善烟叶整体品质。

果胶酶和微生物均可有效降解烟叶中的果胶组分,改善烟叶理化特性<sup>[8-9]</sup>。果胶酶是一类能够分解果胶的多酶体系,主要包括果胶(甲)酯酶、果胶裂解酶、多聚半乳糖醛酸酶等,这些酶协同作用于果胶降解<sup>[10]</sup>。芽孢杆菌、假单胞菌、曲霉等微生物能通过分泌果胶酶,有效分解果胶多糖<sup>[11]</sup>。张耀广等<sup>[12]</sup>从复烤烟叶中筛选获得 1 株枯草芽孢杆菌 SMXP 58(*Bacillus subtilis* SMXP 58),该菌株在优化发酵条件下对复烤烟叶进行发酵,果胶含量降低至 7.45%。S. N. Weng 等<sup>[13]</sup>从云南复烤烟叶表面筛出解淀粉芽孢杆菌 W6-2(*B. amyloliquefaciens* W6-2),其发酵产生的果胶酶制剂可增强烤烟香气和甜味,减少杂质并提升光滑度,改善烤烟品质。郑辰等<sup>[14]</sup>成功构建了来源于烟曲霉 HBFH5 (*Aspergillus fumigatus* HBFH5) 的多聚半乳糖醛酸酶 AfPGA 异源表达系统,该酶具有高温耐热性,可有效将果胶降解为果胶低聚糖。尽管微生物及生物酶降解果胶具有显著优势,但微生物存在菌株遗传稳定性差、酶活性低、效果不稳定等局限,生物酶则受限于作用条件、底物特异性强、稳定性不足、生产成本低等问题<sup>[15-16]</sup>,因此,提高果胶底物特异性,挖掘高适应性的酶基因是当前面临的重要问题。

由烟草相关研究可知,烟草果胶更利于筛选烟草内生菌及适应烟草环境的功能菌株,可加速烟草发酵降解,诱导微生物分泌特异性果胶酶<sup>[17]</sup>。但烟草果胶结构比较特殊,其在烟叶采收、初烤、复烤和醇化等过程中都会发生结构变化,已有果胶酶对烟草果胶的底物特异性不足且催化效率较低。目前,关于烟草果胶降解菌和烟草果胶酶制剂的开发报道较少。鉴于此,本文以烟草果胶为唯一碳源,利用透明圈和 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法筛选烟草果胶特异性降解菌株,并利用 RT-qPCR 技术验证基因的相对表达情况,通过分析该菌株在烟草果胶和果胶环境中的转录组数据,初步探索烟草果胶降解机制,挖掘烟草果胶降解的关键水解酶基因,以期研究烟草果胶酶基因、降低烟叶果胶含量,提升

烟叶品质提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要材料与试剂

供试菌株,原始编号为 GA1、GB2、GB3、GA5-2 和 GA6,选自郑州轻工业大学烟草工业生物技术重点实验室,均分离自 10 种 2023 年不同产区、不同等级的云烟 87 初烤烟叶。

试剂:普通果胶(半乳糖醛酸含量 $\geq 74\%$ ,酯化度 $< 50\%$ ),北京伊诺凯科技有限公司;刚果红,天津科密欧化学试剂有限公司;D-(+)半乳糖醛酸,上海生工生物工程有限公司;DNS 试剂,上海源叶生物科技有限公司;烟草果胶(半乳糖醛酸含量 $\geq 46\%$ ),由郑州轻工业大学烟草工业生物技术重点实验室通过微波法从云烟 87 烟叶中分离提取。

### 1.2 主要培养基

LB 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,NaCl 10 g/L。

果胶无机盐(PM)培养基:无机盐培养基,果胶 2 g/L。

烟草果胶无机盐培养基(TPM):无机盐培养基,烟草果胶 3 g/L。

葡萄糖无机盐培养基:无机盐培养基,葡萄糖 2 g/L。

发酵培养基:蛋白胨 10 g/L,葡萄糖 5 g/L,酵母粉 3 g/L, KCl 0.5 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L。

无机盐培养基:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/L, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.03 g/L, NaCl 1.0 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.02 g/L, 微量元素(CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.25 g/L, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 4 g/L, MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 4.3 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.37 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 5.7 g/L, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 4.3 g/L) 1 mL/L。

以上培养基均在 121 ℃ 条件下灭菌 20 min。

### 1.3 主要仪器与设备

UV-1500 型紫外-可见分光光度计,尤尼克仪器有限公司;FE-SEM 型高分辨率场发射扫描电镜(SEM),日立科学仪器有限公司;SW-CJ-IF 型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;IS-RSDA 型

恒温振荡培养箱,美国精骐有限公司;5810R 型冷冻离心机,德国艾本德有限公司;Leica DMT50 型数码生物显微镜,德国徕卡显微系统公司。

## 1.4 实验方法

**1.4.1 烟草果胶降解菌株筛选** 以果胶为唯一碳源,活化5种菌株,稀释后涂布于TPM 固体培养基和PM 固体培养基上,观察生长情况。选择能在2种培养基上生长的菌株进行分离纯化。将纯化后的单菌接种于LB 培养基中,于30℃、150 r/min 摇床培养至 $OD_{600}$  约0.6,制得种子液。接种1%(体积分数,下同)种子液于发酵培养基中,同等条件摇床培养24 h,于4℃、8000 r/min 离心15 min,上清液作为粗酶液,采用DNS 法<sup>[18-19]</sup>测定菌株酶活,以质量浓度为10 g/L 的烟草果胶为标准底物溶液。1 mL 粗酶液在50℃、30 min 生成1 mg 半乳糖醛酸定义为1个酶活力单位,记为U/mL。

采用透明圈法<sup>[20-21]</sup>验证烟草果胶酶降解能力。选择果胶酶活力最高的菌株,点种至TPM 固体培养基上,培养48 h,用0.2%刚果红水溶液染色4 h,生理盐水清洗培养基表面,观察红色水解圈。测量透明圈直径( $D/mm$ )和菌落直径( $d/mm$ ),其比值记为 $D/d$ 。以上实验均设置3组生物学重复。

**1.4.2 菌种鉴定** 将1.4.1 筛选到的降解菌株划至LB 培养基平板,30℃培养24 h后,观察菌落形态。在无菌条件下,革兰氏染色后用SEM 观察菌株形态特征。菌株16S rDNA 鉴定委托派森诺基因有限公司完成,采用BLAST 算法在NCBI(Genebank) 数据库中进行同源性分析,使用MEGA 11 构建系统发育树。

**1.4.3 菌株生长曲线及产果胶酶曲线绘制** 分别接种1%GB3 种子液于TPM 培养基和PM 培养基中,于30℃、150 r/min 摇床培养24 h,每2 h 用紫外-可见分光光度计测 $OD_{600}$ 。此外,分别监测菌株GB3 以1%烟草果胶和普通果胶溶液为标准底物时的酶活力,同等条件下,接种GB3 种子液于LB 培养基中,每4 h 取样,8000 r/min 离心15 min,上清液作为粗酶液,按1.4.1 的方法测酶活力,以上实验均设置3组生物学重复。整理数据并采用Excel 2016 绘制菌株生长曲线及产果胶酶曲线。

**1.4.4 样品制备及转录组测序** 基于菌株GB3 生长曲线与产酶情况确定采样时间点,分别接种1% GB3 种子液于TPM 培养基、PM 培养基和葡萄糖培养基中,于30℃、150 r/min 条件下根据所选时间点取样。4℃预冷离心(10 000 r/min, 10 min)收集菌体,于液氮冷冻15 min 后,-80℃低温存储,加干冰运送至南京派森诺基因有限公司进行转录组测序及基本数据分析。以上实验均设置3组生物学重复,并以葡萄糖培养基中 $OD_{600}$  为0.8~1.0 的样品作为对照组。

样品经RNA 处理后,利用Illumina 平台进行双末端测序。测序时,每个样本选择 $3 \times 10^7$  Reads,最终有效深度约600X~900X(5 Mb 基因组)。使用DESeq 软件分析2个组合间的差异表达基因(DEGs)。为控制假阳性率<5%和排除RNA-seq 技术误差,根据转录组学和DESeq2 标准将筛选阈值设为 $|\log_2(\text{差异倍数})| > 1$ 且 $P < 0.05$ <sup>[22]</sup>,以解析菌株GB3 在不同果胶培养体系中的转录调控差异。

**1.4.5 RT-qPCR 检测** 引物合成和分析由南京派森诺基因有限公司完成,为验证转录组测序结果的可靠性,随机选择5个关键基因进行RT-qPCR 验证,通过Premier 5.0 设计RT-qPCR 的特异性引物。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟草果胶降解菌株筛选结果分析

5株菌株均能在以烟草果胶或普通果胶为唯一碳源的无机盐培养基中生长,筛选结果如图1所示。由图1a)可知,菌株GB3 对烟草果胶的酶活力最高,平均酶活力为32.95 U/mL。由图1b)可知,经0.2%刚果红水溶液染色后,菌株GB3 显现明显透明圈,透明圈 $D/d$  平均值为13.6,表明菌株GB3 可降解烟草果胶。

### 2.2 菌株GB3 鉴定结果分析

菌株GB3 的形态如图2所示。由图2可知,菌株GB3 在LB 培养基平板上形成表面光滑、边缘整齐透明的乳白色圆形菌落。SEM 显示该菌株呈杆状,革兰氏染色显示阴性。菌株GB3 系统进化树如图3所示。由图3可知,菌株GB3 与变栖克雷伯杆菌

(*Klebsiella variicola*) 的同源性高达 97%。基于形态学观察结果,初步鉴定菌株 GB3 为变栖克雷伯杆菌。

### 2.3 菌株 GB3 生长及产果胶酶曲线分析

菌株 GB3 的生长曲线和产酶曲线如图 4 所示。由图 4a) 可知,菌株 GB3 在 TPM 培养基和 PM 培养基中的生长趋势具有相似性,但生长速度存在显著差异。菌株 GB3 在 2 h 后进入对数生长期,随后进

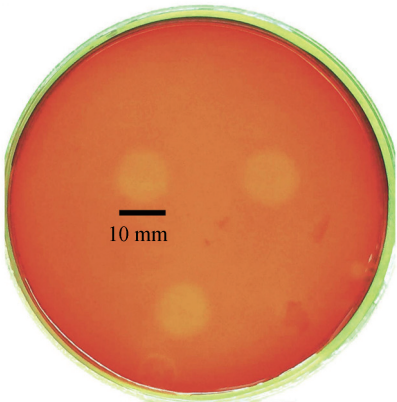
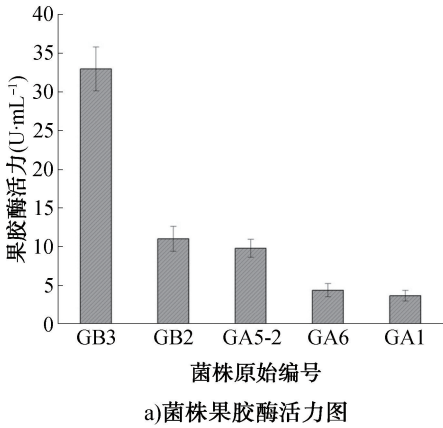
入快速繁殖阶段,8 h 后增殖速率降低并趋于稳定,12 h 时  $OD_{600}$  值达到稳定期。此外,菌株 GB3 在 TPM 培养基中的生物量累积速率显著高于 PM 培养基。由图 4b) 可知,酶活力表现出先增加后减少的趋势,分别在 8 h 和 12 h 时达到峰值。因此,分别在 2 h、6 h、12 h 采集 TPM 培养基和 PM 培养基样本,烟草果胶系列样本记为 TP2、TP6 和 TP12,普通果胶系列样本记为 P2、P6 和 P12,总计 21 个样本 (TP2、TP6、TP12、P2、P6、P12、CK 及其平行) 用于 RNA-seq 分析。

### 2.4 菌株 GB3 转录组结果分析

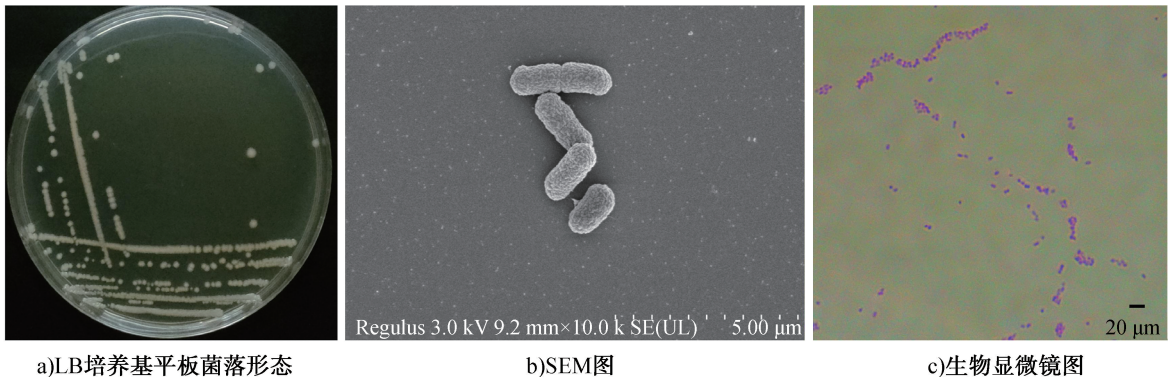
**2.4.1 表达量分析** 21 个样本的 Q30 碱基占比均高于 93.20%,GC 含量占比 51.29% 以上,采用 Fastp 进行质控,去除 3' 端接头及 Q20 以下 Reads 后,共获得 5861 条转录本,过滤后各样本高质量序列占比 98% 以上,高质量碱基占比高于 97.90%。

对 21 个样本基因进行统计分析,结果如图 5 所示。由图 5 可知,基于基因表达的相关性分析和主成分分析,各组生物学重复样本间呈相对一致性,组间具有显著差异,表明实验重复性良好,符合后续研究标准的要求。

**2.4.2 基因差异表达分析** 采用差异表达分析 ( $|\log_2(\text{差异倍数})| \geq 1, P < 0.05$ ) 比较样本间的转录组表达差异,通过韦恩图(图 6a) — c) 分析 DEGs 共有及特有分布,结果发现,所有样本组共有 DEGs 315 个;烟草果胶培养样本组共有 460 个,而普通果胶培养样本组共有 567 个。TP2/CK 和 P2/CK 基因差异性表达火山图如图 7 所示,其中红色表示上调基因,蓝色表示下调基因,灰色表示无差异基因。



a) 菌株果胶酶活力图  
b) GB3 菌株在 TPM 培养基上的透明圈  
图 1 烟草果胶降解菌株筛选结果  
Fig. 1 Screening of pectin-degrading strains from tobacco



a) LB 培养基平板菌落形态  
b) SEM 图  
c) 生物显微镜图  
图 2 菌株 GB3 的形态  
Fig. 2 Morphology of strain GB3

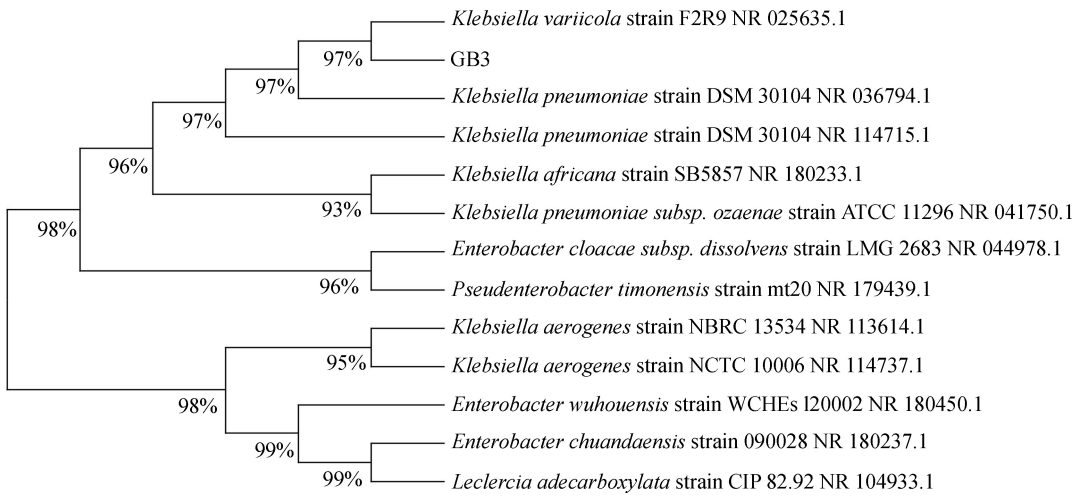
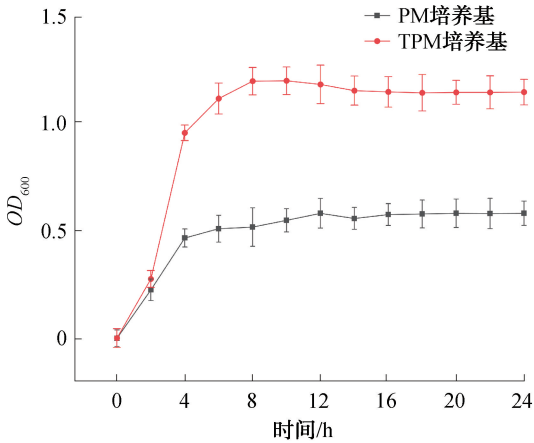
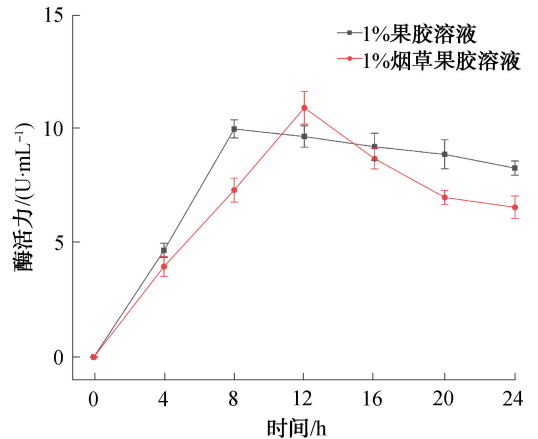


图3 菌株GB3系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain GB3



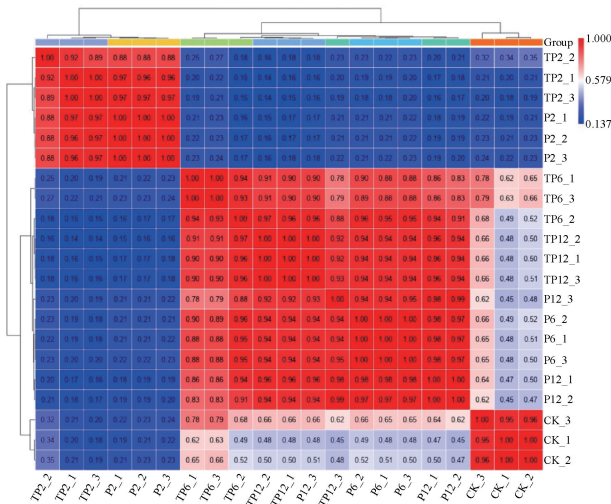
a) 生长曲线



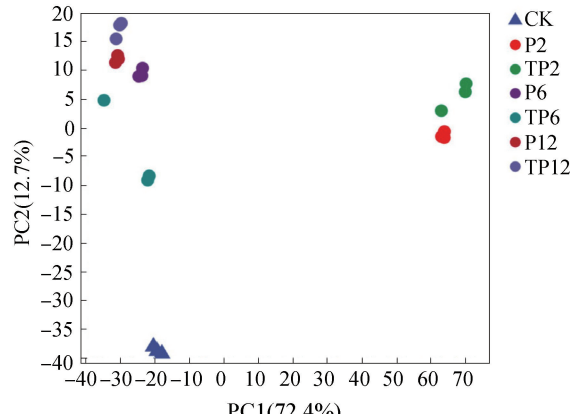
b) 产果胶酶曲线

图4 菌株GB3的生长曲线和产果胶酶曲线

Fig. 4 Growth curve and enzyme production curve of strain GB3



a) 相关性热图



b) 主成分分析

图5 样本基因统计分析结果

Fig. 5 Statistical summary of gene expression in samples

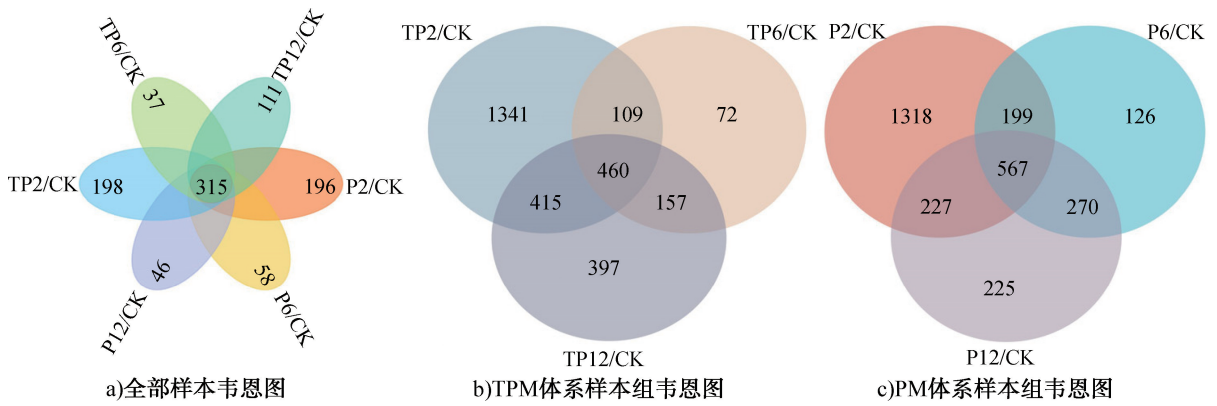


图 6 样本韦恩图

Fig. 6 Venn diagram of sample groups

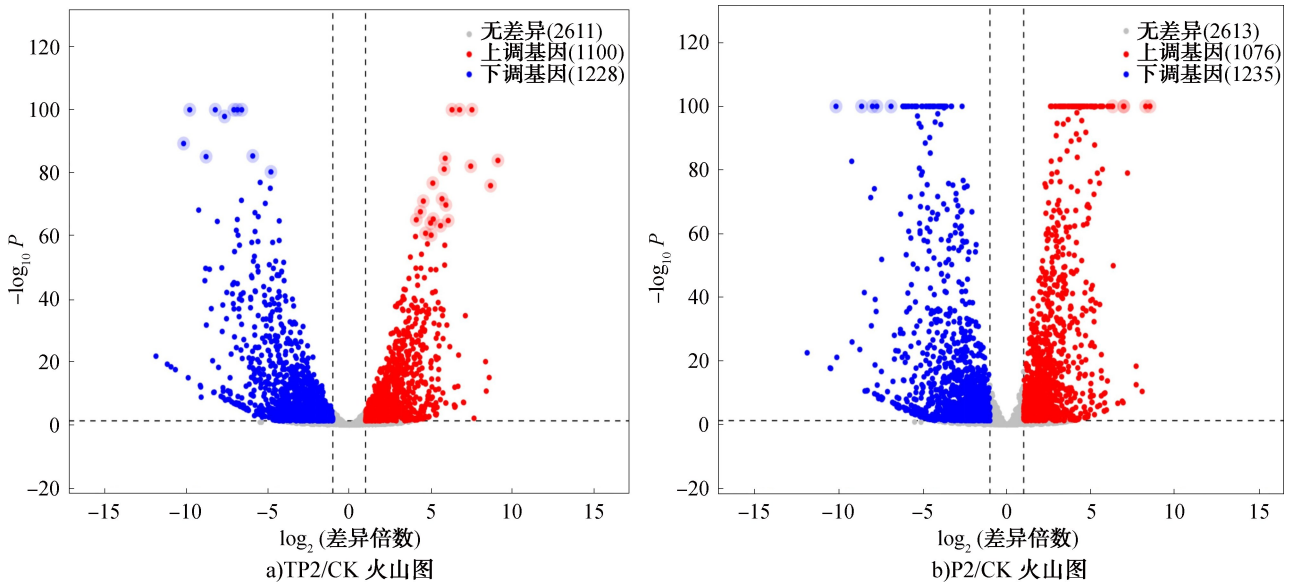


图 7 TP2/CK 和 P2/CK 基因差异性表达火山图

Fig. 7 Volcano plots of differentially expressed genes TP2/CK and P2/CK

由图 7 可知,TP2/CK 和 P2/CK 分别检测到 2328 个和 2311 个 DEGs,且各对比组中上调基因数量均略低于下调基因。此外,以葡萄糖培养样本为对照,菌株 GB3 在降解普通果胶过程中有 1076 个基因上调,而降解烟草果胶过程中有 1100 个基因上调。因此,菌株 GB3 通过差异表达特定基因来适应不同果胶环境,维持细胞正常生长。

**2.4.3 功能分析** 1) DEGs 的 GO 富集分析。对 6 个样本的 DEGs 进行 GO 富集分析(CK 为对照),基于 GO 数据库按生物学过程 (Biological Process, BP)、细胞组分 (Cellular Component, CC)、分子功能 (Molecular Function, MF) 进行归类统计。P6/CK 和 TP6/CK GO 富集图如图 8 所示。由图 8 可知,在

P6/CK 的基因 GO 注释中,变化较大的 GO term 主要集中于生物过程中的有机酸代谢过程 (GO: 0006082,共 53 个基因上调,113 个基因下调)、碳水化合物代谢过程 (GO:0005975,共 35 个基因上调,74 个基因下调),以及分子功能中的氧化还原酶活性 (GO:0016491,共 88 个基因上调,119 个基因下调)等。在 TP6/CK 的基因 GO 注释中,显著变化的 GO term 主要集中在生物过程类别下的碳水化合物运输、小分子代谢过程、有机酸代谢过程、含氧酸代谢过程、单糖代谢过程、鼠李糖代谢过程等,其中富集到最多 DEGs 的 GO term 为小分子代谢过程 (GO: 0044281,共 71 个基因上调,159 个基因下调),以及分子功能类别中的碳水化合物跨膜转运蛋白活性、



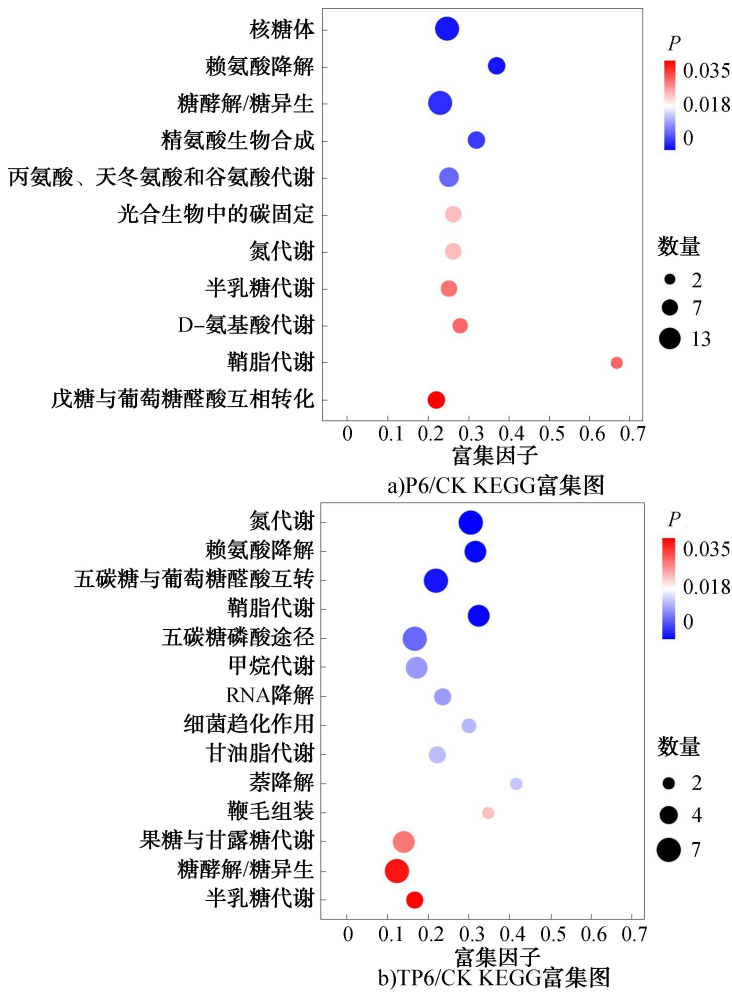


图 9 P6/CK 和 TP6/CK KEGG 富集图  
Fig. 9 KEGG enrichment plots of P6/CK and TP6/CK

糖苷酶、寡半乳糖醛酸裂解酶家族蛋白、内切肽聚糖转糖苷酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和 L-鼠李糖异构酶是菌株 GB3 水解烟草果胶的关键酶, *rlpA*、*lacZ*、*P48843*、*ogl* 和 *rhaA* 基因是调控其降解的关键基因。

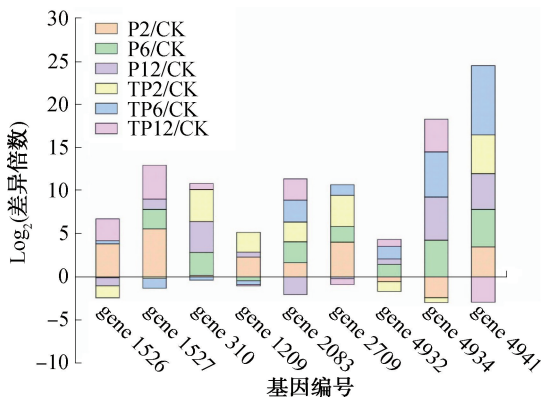


图 10 关键基因差异表达图

Fig. 10 Differential expression plot of key genes

## 2.5 RT-pPCR 分析

利用 RT-qPCR 技术,分析 5 个关键基因在不同样本的相对表达量情况,以 *recA* 为内参基因,验证上文所筛关键功能基因的准确性,引物信息见表 1。

表 1 关键基因 RT-qPCR 所用引物

Table 1 Primers used for RT-qPCR of key genes		
基因编号	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')
gene 1209	CCGAATCAGGAT-TATGAG	TCAGGTTACTGT-TAGGTT
gene 1526	GGTGGTTTGAT-GAGATTGAT	GCCATTCCAG-TAGGTGTA
gene 2083	CATCGCAACTACT-TCTAT	CGATATTCAGCAGA-TAGTA
gene 310	GAACTCTGCAACC-GCTAC	GATTTCATCGGCACC-ATCC
gene 4941	GCTTATTTTGCGG-AACAG	CGGTCAACGGTAA-TATCTT
<i>recA</i>	CATCAACTTCTTC-GGCGAGC	CGCGAACTTTCT-TCTCAATTTCT

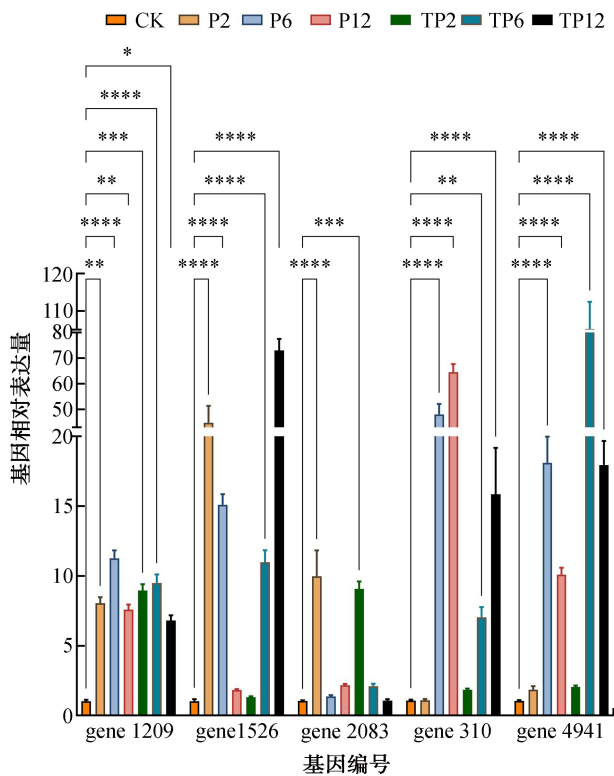


图 11 关键基因相对表达量

Fig. 11 Relative expression of key genes

关键基因在 2 种果胶环境中的相对表达量如图 11 所示,均以 CK 为对照,无标记表示无差异; \* ( $P < 0.05$ ) 表示显著差异, \*\* ( $P < 0.01$ )、\*\*\* ( $P < 0.001$ )、\*\*\*\* ( $P < 0.0001$ ) 均表示极显著差异。由图 11 可知,5 个关键基因中, gene1209、gene1526 和 gene4941 在所有样本中均显著上调。这与 RNA-seq 分析的表达式变化趋势基本一致,进一步确认了转录组数据的可靠性。

### 3 结论

本文以烟草果胶为唯一碳源,筛选出一株分离自云烟 87 初烤烟叶的果胶降解菌株 GB3,鉴定为变栖克雷伯杆菌。相较于普通果胶,菌株 GB3 在降解烟草果胶过程中有 1100 个基因上调,差异基因变化较大的 GO 条目主要集中于碳水化合物代谢、单糖代谢过程等;半乳糖代谢、其他聚糖降解、糖酵解/糖苷生等途径显著富集,相关基因表达上调。共挖掘到 9 个在烟草果胶降解过程中发挥关键作用的酶基因,如 gene1527 (*bglY*)、gene1526 (*P48843*)、gene2083 (*ogl*)、gene310 (*lacZ*) 等,并经 RT-qPCR 验证确定 5 个关键酶基因,有助于从分子水平上解析烟草果胶的生物降

解途径,为降解低次烟叶果胶、加速烟叶醇化及研究果胶降解酶基因的功能提供参考。

### 参考文献:

- [1] SHRESTHA S, RAHMAN M S, QIN W S. New insights in pectinase production development and industrial applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(24): 9069–9087.
- [2] RAPIN M N, BOTHWELL J H, FRY S C. Pectin-like heteroxylans in the early-diverging charophyte *Klebsormidium fluitans* [J]. Annals of Botany, 2024, 134(7): 1191–1206.
- [3] 唐徐禹. 烟草中果胶及黄酮类物质的提取 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2022.  
TANG X Y. Extraction of pectin and flavonoids from tobacco [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2022.
- [4] 聂立璇, 陈善义, 陈千思, 等. 烟叶果胶研究进展 [J]. 中南农业科技, 2023, 44(4): 240–242, 251.  
NIE L X, CHEN S Y, CHEN Q S, et al. Research progress of pectin in tobacco leaves [J]. South-Central Agricultural Science and Technology, 2023, 44(4): 240–242, 251.
- [5] AMIN F, BHATTI H N, BILAL M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases: A review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 122: 1017–1026.
- [6] RANI R, GUPTA A, KAUR S. Studies on pectinase production using microorganisms isolated from different fields [J]. Advances in Applied Research, 2018, 10(2): 110.
- [7] SU Y B, CUI Y H, FU K J, et al. Contribution of pectin-degrading bacteria to the quality of cigar fermentation: An analysis based on microbial communities and physicochemical components [J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1481158.
- [8] 郝捷, 季婧, 李力群, 等. 生物酶和微生物技术改善烟叶香气的研究进展 [J]. 生物技术进展, 2022, 12(6): 817–824.  
HAO J, JI Q, LI L Q, et al. Research progress on improving aroma of tobacco leaves by biological enzyme and microbial technology [J]. Current Biotechnology, 2022, 12(6): 817–824.
- [9] 黄申, 芦尧, 刘强, 等. 生物酶在烟草工业中的应用研究进展 [J]. 轻工学报, 2023, 38(5): 112–118.  
HUANG S, LU Y, LIU Q, et al. Research progress on application of biological enzyme in tobacco industry [J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(5): 112–118.
- [10] 谷艺明. 果胶酶高产菌株的筛选、发酵优化及酶学性质的研究 [D]. 常州: 常州大学, 2021.

- GU Y M. Screening of high-yielding pectinase strains, optimization of fermentation and study of enzymatic properties [D]. Changzhou: Changzhou University, 2021.
- [11] HAILE S, AYELE A. Pectinase from microorganisms and its industrial applications [J]. *The Scientific World Journal*, 2022, 2022: 1881305.
- [12] 张耀广, 杨宗灿, 刘向真, 等. 陈化烟叶中 1 株果胶酶高产菌的分离、筛选与鉴定 [J]. *河南农业科学*, 2017, 46(2): 143-147.
- ZHANG Y G, YANG Z C, LIU X Z, et al. Isolation, screening and identification of a pectinase-producing strain from aged tobacco leaves [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2017, 46(2): 143-147.
- [13] WENG S N, DENG M Z, CHEN S Y, et al. Application of pectin hydrolyzing bacteria in tobacco to improve flue-cured tobacco quality [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 12: 1340160.
- [14] 郑辰, 寇田田, 谷新晰, 等. 嗜热多聚半乳糖醛酸酶 AIPGA 性质表征及其在果胶低聚糖制备中的应用 [J]. *食品科学*, 2025, 46(9): 130-138.
- ZHENG C, KOU T T, GU X X, et al. Characterization of thermophilic polygalacturonase AfPGA and its application in the preparation of pectin oligosaccharides [J]. *Food Science*, 2025, 46(9): 130-138.
- [15] JOHN J, SURENDRANATHAN KAIMAL K K, SMITH M L, et al. Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 1086-1099.
- [16] 鹿有朋, 王刚, 段旺军, 等. 利用生物技术对烤烟发酵的研究 [J]. *食品与发酵科技*, 2020, 56(2): 69-75.
- TUO Y P, WANG G, DUAN W J, et al. Study on fermentation of flue-cured tobacco by biotechnology [J]. *Sichuan Food and Fermentation*, 2020, 56(2): 69-75.
- [17] 牛凡超. 烟草果胶的定量分析方法研究 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2021.
- NIU F C. Study on quantitative analysis method of pectin in tobacco [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2021.
- [18] 罗雯, 徐珂盼, 王怡, 等. 果胶酶生产菌株的筛选、发酵优化及其酶学性质研究 [J]. *食品科技*, 2022, 47(4): 6-13.
- LUO W, XU K P, WANG Y, et al. Screening, fermentation optimization and enzymatic properties of pectinase producing strain [J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(4): 6-13.
- [19] 张小丹. 产果胶酶菌株的筛选、酶学性质的研究及应用 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.
- ZHANG X D. Screening, enzymatic properties and application of pectinase-producing strains [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023.
- [20] 杨同香, 吴孔阳, 白云飞, 等. 微生物果胶酶的研究进展 [J]. *食品与机械*, 2020, 36(8): 201-209.
- YANG T X, WU K Y, BAI Y F, et al. Recent advances in microbial pectinase [J]. *Food and Machinery*, 2020, 36(8): 201-209.
- [21] 陈杰, 李豆南, 刘茂强, 等. 产耐高温果胶酶菌株筛选鉴定、产酶条件优化及酶学性质研究 [J]. *中国酿造*, 2023, 42(5): 176-183.
- CHEN J, LI D N, LIU M Q, et al. Screening and identification of strain producing high temperature resistant pectinase, optimization of enzymatic conditions and study on enzymatic properties [J]. *China Brewing*, 2023, 42(5): 176-183.
- [22] ZHAO J G, OUYANG S F, QI H R, et al. Metabolomics and transcriptomics uncover the pectin hydrolysis during tobacco stem fermentation by *Aspergillus niger* [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2024, 442: 141005.
- [23] HUANG W J, CHEN M Y, ZHAO T T, et al. Genome-wide identification and expression analysis of polygalacturonase gene family in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) during fruit softening [J]. *Plants*, 2020, 9(3): 327.
- [24] XU M, ZHOU W Q, GENG W J, et al. Transcriptome analysis insight into ethylene metabolism and pectinase activity of apricot (*Prunus armeniaca* L.) development and ripening [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 13569.
- [25] 李同欣. 果胶降解相关  $\beta$ -GAL/Pg/PE 在苹果采后软化中的作用机制 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2021.
- LI T X. The mechanism of  $\beta$ -GAL/Pg/PE in postharvest ripening of apple fruit [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2021.
- [26] WU K Y, WU J Q, LI X, et al. Comparative transcriptome analysis of wild type and a pectate lyase mutant strain of *Bacillus subtilis* [J]. *The New Microbiologica*, 2023, 46(1): 52-55.
- [27] 张元薇, 辛颖, 陈复生. 果实软化过程中果胶降解酶及相关基因研究进展 [J]. *保鲜与加工*, 2019, 19(2): 147-153.
- ZHANG Y W, XIN Y, CHEN F S. Research progress of pectin degrading enzymes and related genes during fruit softening [J]. *Storage and Process*, 2019, 19(2): 147-153.

## Mining of tobacco pectin hydrolase genes based on transcriptomics and RT-qPCR

YANG Zongcan<sup>1</sup>, CHANG Caiping<sup>2</sup>, ZHAO Sensen<sup>1</sup>, YANG Jinchu<sup>1</sup>, WANG Qiuling<sup>1</sup>,  
WANG Huanhuan<sup>3</sup>, HUANG Shen<sup>2</sup>, MAO Duobin<sup>2</sup>

1. Technology Centre, Henan China Tobacco Industry Corporation, Zhengzhou 450000, China;

2. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

3. College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China

**Abstract: [ Objective ]** This study aimed to screen pectinase-producing strains and mine the key genes involved in tobacco pectin degradation. **[ Methods ]** Pectinase-producing strains were screened using the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) method with tobacco pectin as the sole carbon source. Transcriptomic analysis was performed to examine differential gene expression during tobacco pectin degradation, and key genes were verified and identified by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). **[ Results ]** A tobacco pectin-degrading strain designated GB3 was obtained, and its enzyme activity against tobacco pectin in the fermentation broth reached 32.95 U/mL. The strain was preliminarily identified as *Klebsiella variicola* based on morphological characteristics and 16S rDNA sequence analysis. During the degradation of common pectin, 1076 genes were upregulated in strain GB3, whereas 1100 genes were upregulated during tobacco pectin degradation. Differentially expressed genes (DEGs) related to tobacco pectin degradation were mainly enriched in galactose metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, and other glycan degradation pathways. A total of nine candidate enzyme genes potentially associated with tobacco pectin degradation were screened. RT-qPCR analysis further revealed that *rlpA*, *lacZ*, *ogl*, *rhaA*, and *P48843* were the key genes involved in tobacco pectin degradation. **[ Conclusion ]** This study confirmed that gene1209, gene1526, gene310, and gene4941 are the key tobacco pectin hydrolase genes, providing a reference for investigating pectinase genes, regulating pectin content in tobacco leaves, and improving tobacco leaf quality.

**Key words:** tobacco pectin; DEGs; tobacco pectin hydrolase; transcriptome; RT-qPCR

[ 责任编辑: 王晓波 刘春奎 ]

(上接第 87 页)

microcapsules can inhibit the growth and proliferation of molds. For harm reduction, porous adsorbent microcapsules are predominantly adopted to reduce the contents of carbon monoxide (CO) and nitrosamine carcinogens in mainstream cigarette smoke. In terms of temperature control and heat conduction, preliminary research on temperature-responsive microcapsules offers a promising approach to optimizing the heat transfer efficiency of heat-not-burn (HNB) cigarettes. For dyeing and color fixation, via the dual mechanisms of physical isolation and chemical protection, microcapsule technology remarkably improves the oxidation resistance and color stability of natural pigments in cigarette paper. For mainstream smoke pH adjustment, encapsulating organic acids via microcapsule technology and incorporating the encapsulated products into cigarette paper enables effective control of smoke pH. Novel microcapsule preparation technologies, with the merits of precise controlled-release design and low-temperature green processes, offer novel solutions to the inherent drawbacks of conventional methods, including unstable encapsulation efficiency, wide particle size distribution, and susceptibility to damage of heat-sensitive components. Nevertheless, their large-scale application in the cigarette industry is still hindered by challenges such as low throughput, high production cost, and difficulties in process scale-up. Future research should integrate the merits of novel preparation technologies, focusing on intelligent regulation of release behavior, optimized design of core-wall materials, and multifunctional integration, so as to accelerate the development of cigarette microcapsule technology toward precision, intelligence and greenization.

**Key words:** cigarette; microencapsulation technology; multifunctionalization; aroma sustained-release; cigarette moisture retention; antifungal and harm reduction

[ 责任编辑: 王晓波 贾学伟 ]