食品工业科技
SCIENCE AND TECHNOLOGY OF FOOD INDUSTRY
• 荷兰《文摘与引文数据库》（Scopus）
• 瑞典开放存取期刊目录 DOAJ
• 美国《化学文摘》CA
• 英国《食品科技文摘》FSTA
• 日本科学技术振兴机构数据库JST
• 世界期刊影响力指数（WJCI）报告
• 食品科学与工程领域高质量科技期刊分级目录第一方阵T1
• 北大核心期刊
• 中国精品科技期刊
• 中国科技核心期刊CSTPCD
• 中国核心学术期刊RCCSE
• 中国农林核心期刊A
• 中国生物医学Sino Med
半月刊 ISSN 1002-0306 CN 11-1759/TS 邮发代号：2-399

长茎葡萄蕨藻中 β-1,3-木聚糖的提取工艺优化及单糖组成分析

刘 倩，晋文慧，矫浩田，谢全灵，张怡评，洪 专，赵元晖

Optimization of Extraction Process and Analysis of Monosaccharide Composition of *β*-1,3-xylan from *Caulerpa lentillifera*

LIU Qian, JIN Wenhui, JIAO Haotian, XIE Quanling, ZHANG Yiping, HONG Zhuan, and ZHAO Yuanhui

在线阅读 View online: https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022100086

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

β-1,3-葡聚糖酶的结构与催化性质研究进展

Progress in the structure and catalytic mechanism of β-1, 3-glucanases

食品工业科技. 2017(14): 314-320 https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.14.062

响应面法优化龟甲蛋白提取工艺及其对MC3T3-E1细胞增殖活性

Optimization of Extraction Process from Tortoise Shell Protein by Response Surface Methodology and Its Proliferation Activity on MC3T3-E1 Cells

食品工业科技. 2021, 42(2): 302-309 https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020030281

响应面法优化长裂苦苣菜总生物碱提取工艺

Optimization of Extracting Process of Total Alkaloids from *Sonchus brachyotus* DC.by Response Surface Method

食品工业科技. 2018, 39(19): 194-199,205 https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.19.034

复合酶法提取长白木根总黄酮工艺优化及抗氧化活性研究

Optimization of Enzyme Extraction Method for Total Flavonoids from Root of *Aralia continentalis* Kitagwa and Its Antioxidant Activity

食品工业科技. 2020, 41(12): 174-180,206 https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.12.028

蒲公英多糖酶解辅助提取工艺优化及其单糖组成分析

Optimization of Enzymolysis Assisted Extraction Process of Dandelion Polysaccharide and Its Monosaccharide Composition Analysis

食品工业科技. 2021, 42(16): 199-206 https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020120051

鳕鱼卵中磷脂提取工艺的优化

Optimization of extraction process for phospholipids from codfish roe

食品工业科技. 2018, 39(3): 179-182,186 https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.03.035

关注微信公众号，获得更多资讯信息

刘倩, 晋文慧, 矫浩田, 等. 长茎葡萄蕨藻中 β-1,3-木聚糖的提取工艺优化及单糖组成分析 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(16): 210−217. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100086

LIU Qian, JIN Wenhui, JIAO Haotian, et al. Optimization of Extraction Process and Analysis of Monosaccharide Composition of β-1,3-xylan from *Caulerpa lentillifera*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(16): 210−217. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100086

· 工艺技术 ·

长茎葡萄蕨藻中 β-1,3-木聚糖的提取工艺优化及单糖组成分析

刘　倩[1,2], 晋文慧[1,3,*], 矫浩田[1,2], 谢全灵[1,3], 张怡评[1,3], 洪　专[1,3], 赵元晖[2,*]

（1.自然资源部第三海洋研究所, 海洋生物资源开发利用工程技术创新中心, 福建厦门 361005;
2.中国海洋大学三亚海洋研究院, 海南三亚 572024;
3.厦门海洋职业技术学院, 福建厦门 361000）

摘　要: 为了优化 β-1,3-木聚糖的提取工艺并分析其单糖组成，试验对常见经济藻类进行筛选，以长茎葡萄蕨藻为主要原料，采用碱提方法，以提取时间、料液比和 NaOH 浓度为考察因素，在单因素优化的基础上设计三因素三水平正交试验，研究粗木聚糖的最优提取条件，并采用特异性酶解方法分析粗木聚糖的单糖组成成分。结果表明，各因素对粗木聚糖提取率影响顺序依次为：提取时间>料液比>NaOH 浓度。最佳提取工艺为：提取时间 3 h、NaOH 浓度为 2.5 mol·L^{-1}、料液比 1∶100 g·mL^{-1}，粗木聚糖得率为 28.1%±0.6%。采用薄层色谱法对酶解产物进行测定，表明从长茎葡萄蕨藻中提取的粗木聚糖为 β-1,3-木聚糖，并明确其单糖组分为 β-1,3-木糖。

关键词: 海藻, 长茎葡萄蕨藻, β-1,3-木聚糖, 碱提取, 提取工艺, β-1,3-木聚糖酶（Xyl3088）
中图分类号: TS201.1　　**文献标识码:** B　　**文章编号:** 1002−0306(2023)16−0210−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100086
本文网刊:

Optimization of Extraction Process and Analysis of Monosaccharide Composition of β-1,3-xylan from *Caulerpa lentillifera*

LIU Qian[1,2], JIN Wenhui[1,3,*], JIAO Haotian[1,2], XIE Quanling[1,3], ZHANG Yiping[1,3], HONG Zhuan[1,3], ZHAO Yuanhui[2,*]

（1.Technical Innovation Center for Utilization of Marine Biological Resources, Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China;
2.Sanya Institute of Oceanography, Ocean University of China, Sanya 572024, China;
3.Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361002, China）

Abstract: This study screened several common economic algae to optimize the extraction process of β-1,3-xylan and analyze its monosaccharide composition. The extraction process of crude xylan was optimized by alkaline extraction method, and the monosaccharide composition of crude xylan was identified by a specific enzymatic method using *Caulerpa lentillifera* as the main raw material. The effect of extraction time, solid-liquid ratio and NaOH concentration on the yield of crude xylan was optimized with a single factor tests followed by three-three level orthogonal experiment to study the optimal extraction conditions of crude xylan. The results showed that the extraction rate of crude xylan was influenced by the following factors: Extraction time>material-to-liquid ratio>NaOH concentration. The optimum extraction process was: Extraction time of 3 h, NaOH concentration of 2.5 mol·L^{-1}, feed-to-liquid ratio of 1∶100 g·mL^{-1}, and the yield of crude

收稿日期: 2022−10−12
基金项目: 福建省科技计划项目（2020N0027）; 自然资源部第三海洋研究所基本科研业务费专项资金项目（2022006, 2023001）; 厦门市科技计划项目（3502Z20221036）; 厦门海洋研究开发院共建项目（K230101）。

作者简介: 刘倩（1998−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物与医药, E-mail: liuqian1998ouc@163.com。
*** 通信作者:** 晋文慧 (1985−）, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 海洋天然产物, E-mail: whjin@tio.org.cn。
赵元晖（1979−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品高值化利用, E-mail: zhaoyuanhui@ouc.edu.cn。

xylan was 28.1%±0.6%. The enzymatic products were determined by thin-layer chromatography, which showed that the crude xylan extracted from *Caulerpa lentillifera* was β-1,3-xylan and the monosaccharide fraction was β-1,3-xylose.

Key words: algael; *Caulerpa lentillifera*; β-1,3-xylan; alkali extraction; extraction process; β-1,3-xylanase (Xyl3088)

自然界植物藻类中半纤维素是第二大丰富的多聚糖，仅次于纤维素，含量约占 20%~30%，其主要成分是木聚糖[1−2]。木聚糖可分为 β-1,4-木聚糖和 β-1,3-木聚糖[3]。β-1,4-木聚糖主要发现在陆生植物细胞壁的半纤维素中，而 β-1,3-木聚糖主要存在于海藻的细胞壁多糖中[4−5]。一些红藻和绿藻细胞壁中完全不含纤维素，取而代之的是 β-1,3-木聚糖[6−8]。功能性海藻如红藻和绿藻的细胞壁含有较多的 β-1,3-木聚糖[9−10]，如红藻中的紫菜属（*porphyra*）[11]、红皮藻属红皮藻属（*Rhodymenia*）[12]，绿藻中的石莼属（*Ulva*）[13]、蕨藻属（*Caulerpa*）[14]、松藻属（*Codium*）[15]。其中有两种蕨藻较为常见，一种是目前已经人工养殖的可食用长茎葡萄蕨藻（*Caulerpa lentillifera*）[16]，另一种是高度入侵物种杉叶蕨藻（*Caulerpa taxifolia*）[17−18]。长茎葡萄蕨藻又名海葡萄，含有多糖、粗纤维、多种氨基酸与维生素，呈味氨基酸含量较高[19]，总脂肪含量较低，不含胆固醇，还富多种微量元素，与其他海藻相比，是潜在的高营养价值保健食品[20−22]。多糖作为长茎葡萄蕨藻主要的活性成分，近十年来成为学者们首要研究的重点[23]，目前一些报道揭示了 β-1,3-木聚糖具有抗氧化、抗炎、抗病毒和抗癌等活性[24]。

海藻多糖的提取方法主要有醇提法[25−26]、热水提取法[27]、微波辅助提取法[28−29]、超声波辅助提取法[30−31] 等，β-1,3-木聚糖在长茎葡萄蕨藻中的提取得率明显高于其他藻类[32]，又因其营养价值较高，被广泛应用于药品、食品与保健品中，故多糖的成分组成分析对其应用有重要意义，因此对其单糖组分进行研究分析可对后续 β-1,3-木聚糖的应用提供参考。单糖组成分析的方法有很多，多数分析方法需要先对多糖进行降解，本研究采用碱提法来提取 β-1,3-木聚糖并采用特异性酶解法对其进行鉴定，β-1,3-木聚糖酶 Xyl3088 从太平洋火色杆菌 *Flammeovirga pacifica* 菌株 WPAGA1 的编码基因中翻译而来，它是降解 β-1,3-木聚糖以得到短链 β-1,3-低聚木糖和木糖的水解酶，可确定其单糖组成成分[33]。本研究通过对常见经济藻类进行筛选，并利用单因素实验和正交试验优选 β-1,3-木聚糖的最佳提取工艺，以期为 β-1,3-木聚糖功效物质的制备及后续应用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

长茎葡萄蕨藻　杭州牧海食品经营有限公司；紫菜（*Porphyra*）、南极冰笋（*Durvillaea antarctica*）、红皮藻（*Palmaria palmata*）、海带（*Laminaria japonica*）、石莼（*Ulva lactuca*）、浒苔（*Enteromorpha prolifera* Muller J. Agardh）、羊栖菜（*Sargassum fusiforme*）　自然资源部第三海洋研究所藻类保藏库；极品肉汤、氨苄青霉素钠、甘油、异丙基硫代-β-D-半乳糖苷（IPTG）　北京索莱宝科技有限公司；蛋白胨、酵母粉　OXIOD 公司；琼脂粉　广东环凯微生物科技公司；SDS-PAGE 凝胶试剂盒　上海碧云天生物技术有限公司；4×Laemmli Sample Buffer、10×Tris-Glycine-SDS 电泳缓冲液　BIO-RAD 公司；Fast Blue 蛋白快速染色液　Biosharp 公司；磷酸缓冲液　西陇科学股份有限公司；三氟乙酸　上海阿拉丁生化科技股份有限公司；硫酸、盐酸、氢氧化钠、乙酸、氯化钠、无水乙醇、高氯酸钠、Tris　分析纯，国药集团化学试剂有限公司；β-1,4-D-(+)-木糖　标准品，上海源叶生物科技有限公司；所有菌株和质粒均由自然资源部第三海洋研究所构建保存；菌株：宿主菌为大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21（DE3）　生工生物工程（上海）股份有限公司提供；质粒：pET-22b(+)　氨苄抗性，由苏州金唯智生物科技有限公司提供。

DFT-200A 200g 手提式高速粉碎机　温岭市林大机械有限公司；RXH-8 热风循环烘箱　南京銮豪机械设备有限公司；FNLY-2 冷冻干燥机　上海翡诺医药设备有限公司；DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器　巩义市予华仪器有限责任公司；ZD-9950 转移摇床　其林贝尔公司；JY92-IIN 超声波细胞粉碎机　宁波新芝生物科技股份有限公司；ZQTY-90S 振荡培养箱　上海知楚仪器有限公司；SW-CJ-1FD 洁净工作台　苏净基团苏州安泰空气技术有限公司；Ni NTA Beads 6FF 重力柱　常州天地人和生物科技有限公司；GIS-2008 成像系统　上海天能科技有限公司；DB-I 不锈钢电热板　上海梅香仪器有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　木糖标准曲线的制备

1.2.1.1　苯酚-硫酸法测多糖含量标准曲线　分别吸取 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mL 现配的 0.1 mg·mL^{-1} 的 D-木糖溶液，每一管用去离子水补加至 1 mL，在冰浴条件下加入 0.5 mL 5% 的苯酚溶液，混匀后缓慢加入 3 mL 浓硫酸，待其处于不放热状态时，冷却后于 490 nm 处测吸光度[33]。以吸光度 Y 为纵坐标，D-木糖浓度 X（mg·mL^{-1}）为横坐标，绘制木糖标准曲线。线性方程为 y=2.3806x−0.0145，R^2=0.9993。

1.2.1.2　DNS 法测还原糖含量标准曲线　分别吸取 0、0.04、0.08、0.12、0.16、0.2、0.24、0.28、0.32 和 0.4 mL 现配的 1 mg·mL^{-1} 的 D-木糖溶液，每一管用去离子水补加至为 1 mL，再加入 0.4 mL DNS 试剂，沸水浴 5 min，冷却后加入 2.6 mL 蒸馏水，于 540 nm 处测吸光度[34]。以吸光度 Y 为纵坐标，D-木糖浓度

X(mg·mL^{-1})为横坐标,绘制木糖标准曲线。线性方程为 y=1.1484x−0.0051, R^2=0.9992。

1.2.2 不同海藻中粗木聚糖的提取 由于 β-1,3-木聚糖没有商业销售,参考 Iriki 等[11] 的方法通过以下步骤获得纯度较高的粗木聚糖。

如图 1 所示,将长茎葡萄蕨藻、海带、紫菜、红皮藻、石莼、南极冰笋、浒苔和羊栖菜分别进行清洗干净,于 60 ℃ 烘箱内烘干后用研磨机碾成粉末,待用。

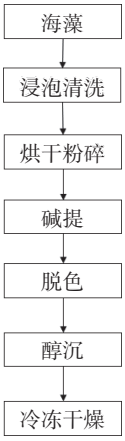

图 1 提取工艺流程图

Fig.1 Extraction process flow chart

分别称取 20 g 长茎葡萄蕨藻、红皮藻、石莼、浒苔、南极冰笋、羊栖菜粉末,依次加入 1000 mL 0.3 mol·L^{-1} 的 NaOH 溶液,加热煮沸 30 min,待其冷却至室温,6 ℃ 条件下离心(10000 r·min^{-1})20 min,弃上清液,并用去离子水洗涤沉淀两遍;将沉淀转入 1000 mL 0.25 mol·L^{-1} 硫酸溶液中重复上一步操作;向沉淀中加入 1600 mL 2% $NaClO_4$ 溶液,于 25 ℃ 下搅拌脱色 2 h 除去杂质,再用去离子水洗涤离心沉淀 3 次;向脱色后的沉淀中加入 800 mL 2.5 mol·L^{-1} NaOH 溶液,冰浴搅拌 1.5h 后于 6 ℃ 离心(10000r·min^{-1})20 min,弃沉淀,收集上清;在烧杯中加入 4 倍体积无水乙醇,再沿壁缓缓倒入上清,静置冷藏库 4 ℃ 过夜;取醇沉后得到的沉淀,6 ℃ 离心(10000 r·min^{-1})20 min 收集沉淀,于 1200 mL 的 5.7 mol·L^{-1} 无水乙酸溶液中和洗涤,再用去离子水洗涤离心三遍去除残留乙酸;将上述沉淀即粗木聚糖转移至冻干机真空干燥,取出并碾成粉末,待用。

$$粗木聚糖得率(\%)=\frac{粗木聚糖质量}{海藻干重}\times 100$$

1.2.3 长茎葡萄蕨藻粗木聚糖提取单因素条件优化

1.2.3.1 NaOH 浓度对粗木聚糖得率的影响 步骤同 1.2.2 除去酸碱杂质后,料液比 1∶40 g·mL^{-1},选取 1.0、2.0、2.5、3.0 和 4.0 mol·L^{-1} 不同浓度 NaOH 作为提取剂,在冰浴条件下提取 1.5 h,再经 $NaClO_4$ 脱色,醇沉后冻干,计算粗木聚糖得率。

1.2.3.2 提取时间对粗木聚糖得率的影响 步骤同 1.2.2 除去酸碱杂质后,料液比 1∶40 g·mL^{-1},以浓度为 2.5 mol·L^{-1} NaOH 水溶液为提取剂,在冰浴条件下分别提取 1、1.5、2、3 和 5 h,再经 $NaClO_4$ 脱色,醇沉后冻干,计算粗木聚糖得率。

1.2.3.3 料液比对粗木聚糖产量的影响 步骤同 1.2.2 除去酸碱杂质后,以浓度为 2.5 mol·L^{-1} NaOH 水溶液为提取剂,选取 1∶20、1∶40、1∶60、1∶80、1∶100 和 1∶120 g·mL^{-1} 不同料液比条件,在冰浴条件下提取 1.5 h,再经 $NaClO_4$ 脱色,醇沉后冻干,计算粗木聚糖得率。

1.2.4 正交试验 根据单因素实验的结果,选择合适的 NaOH 浓度(A)、提取时间(B)和料液比(C)为参考因素,以粗木聚糖得率为指标,选择单因素试验影响较大的碱量、提取时间和料液比 3 个因素,进行三因素三水平正交试验,确定粗木聚糖提取工艺条件的最优组合。

表 1 长茎葡萄蕨藻粗多糖提取正交试验

Table 1 Orthogonal experiment of crude xylan extraction from *Caulerpa lentillifera*

水平	A NaOH浓度(mol·L^{-1})	B 提取时间(h)	C 料液比(g·mL^{-1})
1	2	2	1∶60
2	2.5	3	1∶80
3	3	5	1∶100

1.2.5 特异性 β-1,3-木聚糖酶(Xyl3088)制备与纯化 由苏州金唯智公司合成并验证了 Xyl3088 的基因序列,构建了 pET-His-Xyl3088-SpyTag 表达载体,并将上述质粒成功地导入宿主菌 *E.coli* BL21(DE3)中进行表达[33]。于 200 mL LB 培养基内依次加入 0.2 mL 0.1 g·mL^{-1} 氨苄青霉素钠溶液和 250 μL 甘油菌,于摇床 37 ℃,200 r·min^{-1} 培养 12 h 活化;在 400 mL TB 培养基内依次加入 0.2 mL 0.1 g·mL^{-1} 氨苄青霉素钠溶和 2 mL 活化后的菌液,于摇床 37 ℃,200 r·min^{-1} 培养 3~4 h,待菌体处于对数生长期时,加入 1 mL 0.1 mol·L^{-1} IPTG 溶液,于摇床 20 ℃,180 r·min^{-1} 培养 24 h 进行诱导表达;将诱导表达后的菌液于 4 ℃,10000 r·min^{-1} 条件下离心 20 min 后弃掉上清,将菌体细胞与 PBS 缓冲液(pH=7.0)混合(1∶20,v/v),重复上述离心操作;菌体细胞于冰浴条件下进行细胞破碎,超声功率 300 W(50%),超声开时间 2 s,超声关时间 4 s,工作时间 20 min;细胞经超声破碎后于 4 ℃,11000 r·min^{-1} 条件下离心 20 min,上清液经 0.45 μm 的滤膜过滤后即为酶液粗提物。经镍柱进行分离纯化,使用浓度从低到高的咪唑缓冲液洗脱目标蛋白以确定最佳的咪唑洗脱浓度,联合 SDS-PAGE 分析镍柱吸附目的蛋白质的情况,最后收集各流出液通过 SDS-PAGE 电泳鉴定目的蛋白。

1.2.6 粗木聚糖单糖组成成分的鉴定

1.2.6.1 不同海藻粗木聚糖的制备、酶解及酶解前后还原糖含量测定 分别将长茎葡萄蕨藻、红皮藻、石莼、浒苔、羊栖菜、南极冰笋、海带和紫菜在提取时

间 3 h、NaOH 浓度 2.5 mol·L^{-1}、料液比 1∶100 g·mL^{-1} 的条件下制得粗木聚糖，精密称取 0.1 g 溶于 Tris-HCl 溶液（pH=7.0）配制成 1% 粗木聚糖溶液。取 400 μL 的 1% 的粗木聚糖溶液于离心管中，加入 50 μL Xyl3088（酶活为 49 U/mg），37 ℃ 的水浴锅中反应 24 h，再于 100 ℃ 煮沸 5 min 使酶灭活，离心收集上清即为 1% β-1,3-木寡糖溶液，为酶解实验组。将 Xyl3088 替换为去离子水，重复上述操作，为空白对照组。通过 DNS 法测定了空白对照组与酶解实验组的还原糖含量，在 540 nm 处测定吸光度，并根据标准曲线计算还原糖含量。

1.2.6.2　长茎葡萄蕨藻粗木聚糖的酶解产物的薄层鉴别　称取粗木聚糖 1.0 g，加入 20 mL 浓度为 1 mol·L^{-1} 的三氟乙酸，利用三氟乙酸的强酸性，对 β-1,3-木聚糖充分水解，在 70 ℃ 孵育 2 h 和 12 h 后分别取少量木寡糖溶液离心，上清液用 1 mol·L^{-1} 的 NaOH 进行中和至 pH=7.0，便可作为薄层层析色谱标准品使用[35]。将上述溶液分别在薄层板上点样展开，由于极性的不同，各成分随着展开剂不断上升，当距离硅胶顶端 5 cm 处，取出，均匀喷洒显色剂，放置 250 ℃ 电炉加热 10 min 显色拍照。

展开剂：正丁醇∶冰醋酸∶去离子水=10∶5∶3。

显色剂：2.0 g 二苯胺、2 mL 苯胺、10 mL 磷酸、100 mL 丙酮配制而成。

1.3　数据处理

每组数据重复进行 3 次，结果以平均值±标准偏差来表示。实验数据整理采用 Excel 2019；数据统计分析采用 SPSS 24.0 软件，并进行显著性分析；绘图采用 Origin Pro 2021 软件。

2　结果与分析

2.1　海藻中粗木聚糖提取结果对比

通过碱提法对长茎葡萄蕨藻、紫菜、南极冰笋、红皮藻、海带、石莼、浒苔和羊栖菜进行初步筛选，计算粗木聚糖得率（见图 2），长茎葡萄蕨藻粗木聚糖得率最高，可达到 13.67%±0.25%，其他几种藻类的得率较低，均在 5% 以下。研究表明，董喆[36] 采用水提醇沉法，以超纯水为溶剂，在提取时间 3 h，提取温度 80 ℃，料液比为 1∶30 g·mL^{-1} 的条件下对长茎葡萄蕨藻多糖进行提取，最终得率约为 5.04%。与水提醇沉法和超声波辅助法的结果[36−37] 相比，碱提法的粗木聚糖得率最高，且长茎葡萄蕨藻的粗木聚糖得率远高于其它经济藻类，故选取长茎葡萄蕨藻作为对象，进行下一步研究。

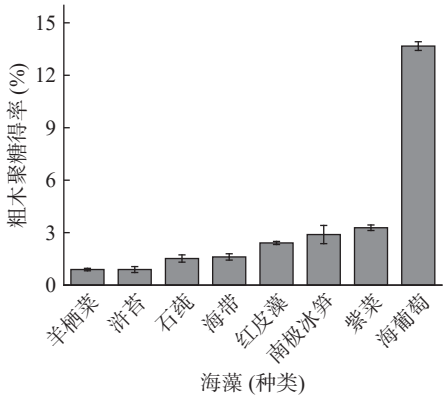

图 2　不同海藻中粗木聚糖得率

Fig.2　Yield of crude xylan in different algae

2.2　单因素实验结果

2.2.1　NaOH 浓度对粗木聚糖得率的影响　在料液比 1∶40 g·mL^{-1}，提取时间为 1.5 h 的条件下，以粗木聚糖得率为考察指标，考察 NaOH 浓度对粗木聚糖产量的影响。由于木聚糖难溶于水，易溶于碱溶液，所以碱液浓度是提取的重要参数。木聚糖作为细胞壁中的一类结构性多糖，它与纤维素、木质素、蛋白质和多糖等形成较为复杂的共价键，有非常复杂的物理交缠关系，在水提法和稀碱条件下，提取困难[38]。由图 3 可知，当 NaOH 浓度为 1 mol·L^{-1} 时，粗木聚糖得率较低，仅为 3.6%±0.1%，表明较低 NaOH 浓度的处理作用较弱，不能完全透过长茎葡萄蕨藻细胞壁，从而导致提取率低，只能溶解出与木质素、纤维素等其他木聚糖成分结合程度较低的部分，而不足以完全破坏长茎葡萄蕨藻的结构，以溶解出较多的木聚糖[39]。当 NaOH 浓度到 2.5 mol·L^{-1} 时，得率趋于平缓，达到 21.4%±0.2%；随着 NaOH 溶液浓度增加，NaOH 溶液浓度为 4 mol·L^{-1} 时，可能导致糖的降解，故引起木聚糖得率略有降低至 20.0%±0.2%。因此，在兼顾得率和经济性的同时，选择浓度为 2.5 mol·L^{-1} NaOH 溶液作为最佳提取液条件。

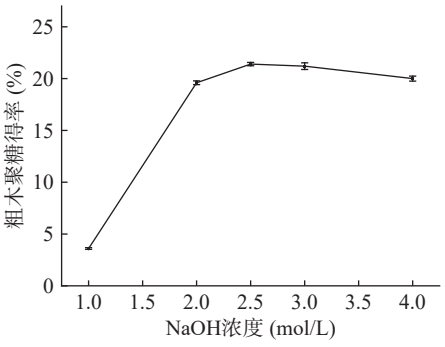

图 3　NaOH 浓度对长茎葡萄蕨藻粗木聚糖得率的影响

Fig.3　Effect of NaOH concentration on yield of crude xylan from *Caulerpa lentillifera*

2.2.2　提取时间对粗木聚糖得率的影响　在料液比 1∶40 g·mL^{-1}，以浓度为 2.5 mol·L^{-1} NaOH 水溶液为提取剂的条件下，以粗木聚糖得率为考察指标，考察不同提取时间对粗木聚糖产量的影响。由图 4 可知，当提取时间从 1 h 增大到 3 h 时，粗木聚糖得率随着水解时间的增大而逐渐升高，由 18.6%±0.1% 提高至 24.1%±0.2%，结果表明适当延长水解时间有助于提高粗木聚糖的得率。在提取时间较短的情况下，提取液和多糖的接触不完全，混合不彻底，长茎葡萄

蕨藻组织原料的多糖组分随着时间增加逐渐降低，多糖物质的浓度梯度继续降低，不断溶解并扩散到提取液中使得溶剂中多糖含量逐渐增加[40]。当提取时间为大于 3 h 时，粗木聚糖得率增加变得缓慢，趋于稳定。由增加提取时间带来的收益并不显著，过度增加提取时间并没有太大的意义，出于节约时间及能源的考虑，选择提取时间为 3 h 最佳预处理条件。

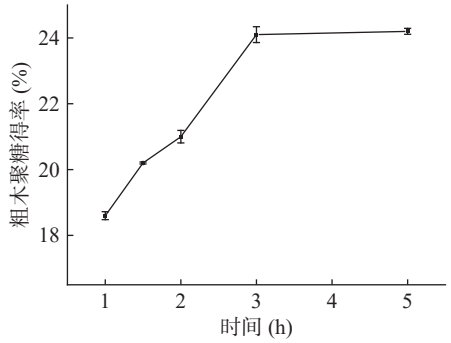

图 4 提取时间对长茎葡萄蕨藻粗木聚糖得率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on yield of crude xylan from *Caulerpa lentillifera*

2.2.3 料液比对粗木聚糖得率的影响 以浓度为 2.5 mol·L^{-1} NaOH 水溶液为提取剂，提取时间为 1.5 h 条件下，以粗木聚糖得率为考察指标，考察不同料液比对粗木聚糖得率的影响。由图 5 可知，当料液比为 1∶20 g·mL^{-1} 时，粗木聚糖得率较低，仅为 8.2%±0.1%，可能是由于样品浓度过高，溶剂的量较少，物质的溶解扩散缓慢，不利于细胞壁中木聚糖的溶解溶出，从而得率较低。随着料液比的降低，提取物和提取剂的接触面积也在不断增大，传递速率也随之增高，粗木聚糖得率也随之迅速升高，可达 21.1%±0.3%。当料液比小于 1∶100 g·mL^{-1} 时，粗木聚糖得率有所减少，降至 19.7±0.4%，这是因为在提取物有限的表面积的基础上，溶剂量增大导致多糖浓度降低，有利于多糖的传质。当溶剂量大于一定程度后，在制备及收集过程中，原料的损耗也随之增加，后续浓缩过程耗能和时间会随之增加[27]。于是随着料液比的减少，长茎葡萄蕨藻粗木聚糖得率会出现小幅降低的趋势。因此，选择料液比 1∶100 g·mL^{-1} 为最佳预处理条件。

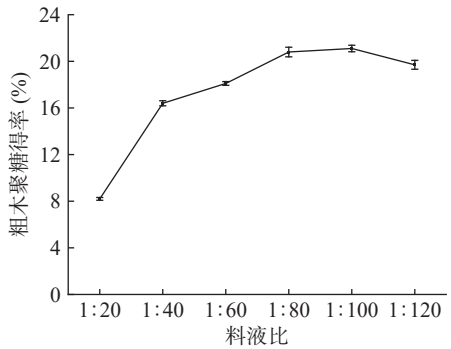

图 5 料液比对长茎葡萄蕨藻粗木聚糖得率的影响

Fig.5 Effect of feed-liquid ratio on yield of crude xylan from *Caulerpa lentillifera*

2.3 正交试验结果

2.3.1 正交试验设计结果及验证 在单因素实验基础上，选择 NaOH 浓度(A)、提取时间(B)和料液比(C)三个因素，进行三因素三水平正交试验。各因素水平见表 1，提取粗木聚糖的正交试验结果见表 2。

表 2 长茎葡萄蕨藻粗木聚糖提取正交试验结果

Table 2 Results of the orthogonal test for crude xylan extraction from *Caulerpa lentillifera*

编号	A NaOH浓度	B提取时间	C料液比	粗木聚糖得率(%)
1	1	1	1	16.8
2	1	2	3	22.3
3	1	3	2	21.4
4	2	1	2	20.2
5	2	2	3	27.2
6	2	3	1	22.6
7	3	1	3	20.3
8	3	2	2	25.9
9	3	3	1	21.0
K_1	60.5	57.3	60.4	
K_2	70.0	75.4	67.5	
K_3	67.2	65.0	69.8	
k_1	20.2	19.1	20.1	
k_2	23.3	25.1	22.5	
k_3	22.4	21.7	23.3	
R	3.1	6.0	3.2	

由表 2 可知，试验号 5 号的粗木聚糖得率最高，为 27.2%。不同提取条件对长茎葡萄蕨藻粗木聚糖的影响程度不同，R 值越大，表明该因素对粗木聚糖得率的影响越大[41]，因此影响提取因素顺序为提取时间(B)>料液比(C)>NaOH 浓度(A)，即提取时间对粗木聚糖得率影响最大，其次是料液比和 NaOH 浓度。通过比较 K 值可知，3 个因素的最佳水平为 $A_2B_2C_3$，即提取时间 3 h、NaOH 浓度 2.5 mol·L^{-1}、料液比 1∶100 g·mL^{-1}。

2.3.2 方差分析及验证最优工艺试验 正交试验方差分析结果见表 3，由表可知，三个因素对长茎葡萄蕨藻粗木聚糖得率的影响顺序为提取时间(B)>料液比(C)>NaOH 浓度(A)，与极差分析结果一致。由 *P* 值可知，三个因素中提取时间对粗木聚糖得率有显著影响。为进一步验证最优工艺可靠性，在最佳提取

表 3 长茎葡萄蕨藻粗木聚糖得率回归模型方差分析

Table 3 Regression model ANOVA for crude xylan yield of *Caulerpa lentillifera*

方差来源	III类平方和	自由度	均方	*F*	*P*
A NaOH浓度	3.105	2	1.553	0.964	0.109
B 提取时间	42.105	2	21.053	13.071	0.031*
C 料液比	15.887	2	7.943	4.932	0.067
误差	3.221	2	1.611		
总计	4420.03	9			

注：*P<0.05表示差异显著，**P<0.01表示差异极显著。

条件下，重复三次，测得长茎葡萄蕨藻粗木聚糖得率为 28.1%±0.6%，高于正交试验结果，表明该条件稳定可行。

2.4　β-1,3-木聚糖酶的表达与鉴定结果

SDS-PAGE 分析如图 6 所示，在第 1 泳道可看见在分子量 40~55 kDa 中间有明显的条带，分子量与由 ProtParam（http://web.expasy.org/protparam/）计算出的相应理论值 48.2 kDa 相吻合，说明含有重组蛋白 Xyl3088[33]，用 Image J 软件进行灰度分析得到目标蛋白的纯度，结果表明纯度可达 90% 以上，说明已经成功地将 Xyl3088 的基因在大肠杆菌中表达，可用于后续木聚糖的酶解。

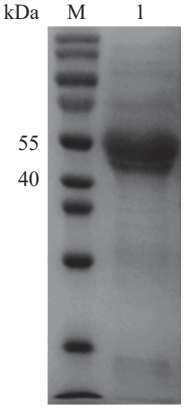

图 6　Xyl3088 镍柱纯化后电泳图

Fig.6　SDS-PAGE of Xyl3088

注：M：marker；lane 1：Xyl3088。

2.5　不同海藻中 β-1,3-木聚糖的鉴定结果

到目前为止，根据碳水化合物活性酶（CAZy）数据库可知，所有发现的 β-1,3-木聚糖酶都属于糖苷水解酶（GH）家族 26。特异性水解酶 β-1,3-木聚糖酶（Xyl3088）可以酶解 β-1,3-木聚糖中的 β-1,3-木糖基，以得到短链 β-1,3-木寡糖，产物主要以 β-1,3-木二糖和 β-1,3-木三糖为主[8]。由图 7 说明，长茎葡萄蕨藻中粗木聚糖溶液酶解后产生大量还原糖，说明该粗木聚糖为 β-1,3-木聚糖，且其酶解产物中还原糖含量为 12.23%±0.41%，而海带、紫菜、南极冰笋、红皮藻、羊栖菜、浒苔和石莼等酶解结果表明，其 β-1,3-木聚糖含量相对较低，并没有明显的显色反应，说明这几种经济藻类中并不含 β-1,3-木聚糖或含量很低。

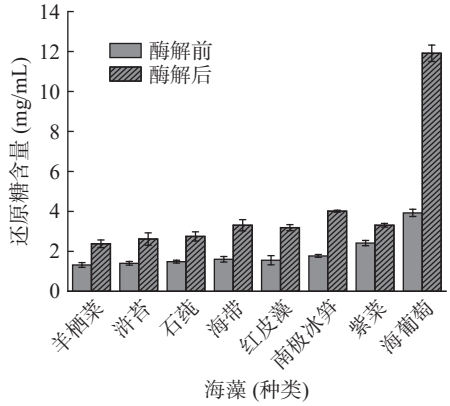

图 7　不同海藻粗木聚糖酶解前后还原糖含量

Fig.7　Content of reducing sugars before and after enzymatic hydrolysis of crude xylan from different algae

2.6　长茎葡萄蕨藻粗木聚糖单糖组成成分的鉴定

β-1,3-木聚糖酶（EC 3.2.1.32）能特异性水解 β-1,3-木聚糖中 1,3-糖苷键，产物为具还原性的 β-1,3-D-木糖，三氟乙酸同样可以通过其强酸性将 β-1,3-木聚糖断裂成不同程度的寡糖或单糖成分，但 β-1,3-木聚糖酶为特异性裂解酶可以更准确识别酶切位点，以获得所需的目的产物，从而特异性地鉴定粗木聚糖单糖组成成分。利用自制的 Xyl3088 酶解粗木聚糖得到寡糖溶液，对其进行薄层层析分析（见图 8）以确定酶解产物。因市面无 β-1,3-木聚糖和 β-1,3-木寡糖标准品[42]，故利用三氟乙酸的强酸性，对 β-1,3-木聚糖充分水解，将 1 mol·L^{-1} 的 TFA 于 70 ℃ 下降解 β-1,3-木聚糖，在 2 h 和 12 h 分别取少量寡糖溶液离心，上清液用 1 mol·L^{-1} 的 NaOH 进行中和后进行薄层层析。在水解 2 h 时，β-1,3-木聚糖并未完全降解，所得产物与 Xyl3088 的酶解产物类型一致；在水解 12 h 时，β-1,3-木聚糖几乎完全被酸解，得到单一组分，推测与 β-1,4-D-木糖标准品同属于单糖成分[42]。Xyl3088 显示出一定的酶解活性，产生一系列包括木糖、木二糖、木三糖和木四糖在内的 β-1,3-木寡糖，水解产物主要为二糖，初步证明从长茎葡萄蕨藻中提取的粗木聚糖为 β-1,3-木聚糖。本研究仅采用薄层色谱法对 β-1,3-木聚糖的单糖组成进行了定性分析，而未进行定量分析，后续可通过进一步的检测分析确定单糖组分及酶解产物种各寡糖含量。

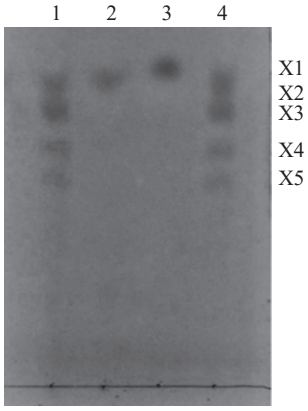

图 8　水解木聚糖产物的薄层色谱图

Fig.8　TLC of hydrolysis products of xylan

注：1：TFA 水解 2 h；2：TFA 水解 12 h；3：β-1,4-D-木糖标准品；4：Xyl3088 的酶解产物；X1~X5 为 Marker，X1 为木糖，X2 为木二糖，X3 为木三糖，X4 为木四糖，X5 为木五糖。

3　结论

本研究通过对常见经济藻类进行筛选，发现长茎葡萄蕨藻中 β-1,3-木聚糖含量远远高于其他经济藻类，故确定了将长茎葡萄蕨藻作为提取 β-1,3-木聚糖主要原料。采用碱提方法，在提取时间 3 h、NaOH

浓度为 2.5 mol·L^{-1}、料液比 1∶100 g·mL^{-1} 的条件下，粗木聚糖的得率可达 28.1%±0.6%，优于其他传统提取方法。同时，经 β-1,3-木聚糖酶特异性酶 Xyl3088 酶解，结合薄层色谱鉴定酶解产物，表明该碱溶性粗多糖为 β-1,3-木聚糖。综上所述，本研究优化了 β-1,3-木聚糖的提取工艺并明确了 β-1,3-木聚糖的单糖组成，为进一步开展 β-1,3-木聚糖的纯化、结构解析与寡糖功能研究奠定了基础，对 β-1,3-木聚糖的深入研究具有指导意义。

参考文献

[1] KONISHI T, NAKATA I, MIYAGI Y, et al. Extraction of β-1, 3 xylan from green algae, *Caulerpa lentillifera*[J]. Journal of Applied Glycoscience, 2012, 59(4): 161−163.

[2] MENDEZ-LITER J A, DE EUGENIO L I, NIETO-DOMÍNGUEZ M, et al. Hemicellulases from *Penicillium* and *Talaromyces* for lignocellulosic biomass valorization: A review[J]. Bioresource Technology, 2021, 324: 124623.

[3] SAMANTA A K, JAYAPAL N, JAYARAM C, et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2015, 5(1): 62−71.

[4] 赵芳. 海洋细菌 *Polaribacter* sp. Q13 对 1, 3/1, 4-木聚糖的降解作用及新型海洋木聚糖酶 AlCMCase 和 XynB 的表征[D]. 济南: 山东大学, 2020. [ZHAO F. Degradation of 1, 3/1, 4-xylan by marine bacteria *Polaribacter* sp. Q13 and characterization of novel marine xylanase AlCMCase and XynB[D]. Jinan: Shandong University, 2020.]

[5] SYAKILLA N, GEORGE R, CHYE F Y, et al. A review on nutrients, phytochemicals, and health benefits of green seaweed, *Caulerpa lentillifera*[J]. Foods, 2022, 11(18): 2832.

[6] SUN H N, YU C M, FU H H, et al. Diversity of marine 1, 3-Xylan-Utilizing bacteria and characters of their extracellular 1, 3-Xylanases[J]. Front Microbiol, 2021, 12: 721422.

[7] KOBAYASHI K, KIMURA S, HEUX L, et al. Crystal transition between hydrate and anhydrous β-1, 3-D-xylan from *Penicillus dumetosus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 97(1): 105−110.

[8] CAI Z W, GE H H, YI Z W, et al. Characterization of a novel psychrophilic and halophilic β-1, 3-xylanase from deep-sea bacterium, *Flammeovirga pacifica* strain WPAGA1[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118: 2176−2184.

[9] CAI L, CHU Y, LIU X, et al. A novel all-in-one strategy for purification and immobilization of β-1, 3-xylanase directly from cell lysate as active and recyclable nanobiocatalyst[J]. Microb Cell Fact, 2021, 20(1): 37.

[10] 童艳梅, 马华威, 胡庭俊, 等. 长茎葡萄蕨藻的组成成分及功能特性研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 400−406. [TONG Y M, MA H W, HU T J, et al. Research progress on components and functional characteristics of *Caulerpa lentillifera*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(7): 400−406.]

[11] IRIKI Y, SUZUKI T, NISIZAWA K, et al. Xylan of siphonaceous green algae[J]. Nature, 1960, 187(4731): 82−83.

[12] OKAZAKI F, NAKASHIMA N, OGINO C, et al. Biochemical characterization of a thermostable β-1, 3-xylanase from the hyperthermophilic eubacterium, *Thermotoga neapolitana* strain DSM 4359[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(15): 6749−6757.

[13] YAICH H, AMIRA A B, ABBES F, et al. Effect of extraction procedures on structural, thermal and antioxidant properties of ulvan from *Ulva lactuca* collected in Monastir coast[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 105: 1430−1439.

[14] SUN Y, LIU Z, SONG S, et al. Anti-inflammatory activity and structural identification of a sulfated polysaccharide CLGP4 from *Caulerpa lentillifera*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 146: 931−938.

[15] TABARSA M, KARNJANAPRATUM S, CHO M L, et al. Molecular characteristics and biological activities of anionic macromolecules from *Codium fragile*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 59: 1−12.

[16] 方再光. 海葡萄: 海南海水养殖产业发展的新引擎与助推器[J]. 中国农村科技, 2020: 25−27. [FANG Z G. *Caulerpa lentillifera*: a new engine and booster for the development of mariculture industry in Hainan[J]. China Rural Science and Technology, 2020: 25−27.]

[17] HUANG H, MO K, LI S, et al. *Alteromonas portus* sp. nov., an alginate lyase-excreting marine bacterium[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020, 70(3): 1516−1521.

[18] 龙海珊, 谭彩军, 冯献真, 等. 海葡萄主要营养成分的比较分析[J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(17): 124−127. [LONG H S, TAN C J, FENG X Z, et al. Comparative analysis of main nutritional components of *Caulerpa lentillifera*[J]. Modern Distance Education of Chinese Traditional Medicine, 2020, 18(17): 124−127.]

[19] YAP W F, TAY V, TAN S H, et al. Decoding antioxidant and antibacterial potentials of Malaysian green seaweeds: *Caulerpa racemosa* and *Caulerpa lentillifera*[J]. Antibiotics, 2019, 8(3): 152.

[20] 张媚健, 马钰荣, 车馨怡, 等. 海南长茎葡萄蕨藻营养成分分析及其免疫刺激活性研究[J]. 食品科技, 2019, 44(5): 90−96. [ZHANG M J, MA Y R, CHE X Y, et al. Study on nutrient composition and immunostimulative activity of *Pteropteris longstem* in Hainan[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(5): 90−96.]

[21] ZHANG M J, MA Y R, CHE X Y, et al. Comparative analysis of nutrient composition of *Caulerpa lentillifera* from different regions[J]. Journal of Ocean University of China, 2020, 19(2): 439−445.

[22] LE B, DO D T, NGUYEN H M, et al. Preparation, characterization, and anti-adhesive activity of sulfate polysaccharide from *Caulerpa lentillifera* against *Helicobacter pylori*[J]. Polymers, 2022, 14(22): 4993.

[23] KIYOHARA M, HAMA Y, YAMAGUCHI K, et al. Structure of β-1,3-xylooligosaccharides generated from *Caulerpa racemosa* var. *laete-virens* β-1,3-xylan by the action of β-1,3-xylanase[J]. J Biochem, 2006, 140(3): 369−373.

[24] YOU Y, SONG H, WANG L, et al. Structural characterization and SARS-CoV-2 inhibitory activity of a sulfated polysaccharide from *Caulerpa lentillifera*[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 280: 119006.

[25] 张顺琦, 陈文, 王湘君, 等. 醇提海菖蒲粗多糖工艺研究[J]. 内江科技, 2020, 41(2): 96−97. [ZHANG S Q, CHEN W, WANG X J, et al. Study on extraction of crude polysaccharide from Acorus calamus by alcohol[J]. Neijiang Science and Technology, 2020, 41(2): 96−97.]

[26] 田淑雨. 灵芝活性成分的提取分离纯化及抗氧化活性研究[D]. 聊城: 聊城大学, 2019. [TIAN S Y. Study on extraction, purification and antioxidant activity of active components of Ganoderma lucidum[D]. Liaocheng: Liaocheng University, 2019.]

[27] 叶春苗, 李莉峰, 韩艳秋. 水浸提法提取紫菜多糖生产工艺

优化[J]. 农产品加工，2022(20)：33−35,38. [YE C M, LI L F, HAN Y Q. Optimization of production process of polysaccharide from laver by water extraction[J]. Agricultural Products Processing, 2022(20): 33−35,38.]
[28] 钱玺丞, 张新卓, 马瑞, 等. 微波辅助提取黔产党参多糖及其含量分析[J]. 云南化工，2022，49(9)：40−42. [QIAN X C, ZHANG X Z, MA R, et al. Microwave-assisted extraction of polysaccharides from Ginseng of Guizhou Province and its content analysis[J]. Yunnan Chemical Industry, 2022, 49(9): 40−42.]
[29] 罗光宏, 王海蓉, 崔晶, 等. 微波辅助低共熔溶剂提取、部分纯化螺旋藻多糖及其体外生物学活性研究[J]. 食品与发酵工业，2022，48(11)：107−113. [LUO G H, WANG H R, CUI J, et al. Microwave assisted extraction and partial purification of polysaccharide from *Spirulina* sp. and its biological activity *in vitro*[J]. Food and Fermentation Industry, 2022, 48(11): 107−113.]
[30] 姚瑞祺, 胡家栋, 王锋, 等. 多频超声波辅助提取山茱萸多糖工艺研究[J]. 湖北农业科学，2022，61(16)：155−158,163. [YAO R Q, HU J D, WANG F, et al. Study on multi-frequency ultrasonic assisted extraction of polysaccharide from Fructus officinalis[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2022, 61(16): 155−158,163.]
[31] 葛智超. 裸藻多糖的分离纯化及活性研究[D]. 上海：上海海洋大学, 2020. [GE Z C. Separation, purification and activity of polysaccharides from *Psilaceous algae*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.]
[32] LIANG W S, LIU T C, CHANG C J, et al. Bioactivity of β-1,3-xylan extracted from *Caulerpa lentillifera* by using *Escherichia coli* clear coli BL21 (DE3)-β-1,3-xylanase XYLII[J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2015, 3: 437−444.
[33] 刘婷. 新型木聚糖酶及其 Ca^{2+}依赖型碳水化合物结合模块的结构与功能[D]. 厦门：华侨大学, 2020. [LIU T. Structure and function of novel xylanase and its Ca^{2+}-dependent carbohydrate binding module[D]. Xiamen: Huaqiao University, 2020.]
[34] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426−428.
[35] BAILEY R, BOURNE E. Colour reactions given by sugars and diphenylamine-aniline spray reagents on paper chromatograms[J]. Journal of Chromatography A, 1960, 4: 206−213.
[36] 董喆. 海葡萄（*Caulerpa lentillifera*）多糖的结构和生物活性的研究[D]. 舟山：浙江海洋大学, 2020. [DONG Z. Study on structure and biological activity of *Caulerpa lentillifera* polysaccharide[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2020.]
[37] ZHANG M, ZHAO M, QING Y, et al. Study on immunostimulatory activity and extraction process optimization of polysaccharides from *Caulerpa lentillifera*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 677−684.
[38] 颜茜, 汪超凡, 朱康伟, 等. 醋糟阿拉伯木聚糖的提取工艺优化及其对馒头品质的影响[J]. 食品工业科技，2023，44(10)：211−218. [YAN Q, WANG C F, ZHU K W, et al. Optimization of the extraction process of arabinoxylan from vinegar grains and its effect on the quality of steamed bread[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(10): 211−218.]
[39] 鲁振杰, 李娟, 陈正行, 等. 碱提条件对麸皮阿拉伯木聚糖组成、理化性质、流变学特性的影响[J]. 食品科学，2020，41(12)：22−27. [LU Z J, LI J, CHEN Z X, et al. Effect of alkaline extraction conditions on the composition, physicochemical properties and rheological characteristics of bran arabinoxylan[J]. Food Science, 2020, 41(12): 22−27.]
[40] 贾志飞. 决明子低聚糖的制备及其对双歧杆菌的增殖作用[D]. 马鞍山：安徽工程大学, 2020. [JIA Z F. Preparation of cassia oligosaccharides and their proliferative effect on bifidobacteria[D]. Maanshan: Anhui University of Technology, 2020.]
[41] 杨静, 李博, 张延妮. 拐枣多糖的反复冻融回流工艺优化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技，2022，43(19)：273−279. [YANG J, LI B, ZHANG Y N. Optimization of repeated freeze-thaw reflux process and antioxidant activity of jujube polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(19): 273−279.]
[42] ZENG B, ZHOU Y, YI Z, et al. Highly thermostable and promiscuous β-1,3-xylanasen designed by optimized ancestral sequence reconstruction[J]. Bioresource Technology, 2021, 340: 125732.