

荷叶多糖的提取工艺优化及其在面包中的应用研究

潘宗灿*, 范旻轩*, 李蝶妮#

浙江农林大学暨阳学院, 浙江 诸暨

收稿日期: 2025年5月7日; 录用日期: 2025年6月11日; 发布日期: 2025年6月23日

摘要

以多糖得率为指标, 采用响应面法优化酶法辅助热水提取荷叶多糖的工艺条件, 并测定荷叶多糖的抗氧化活性。在单因素实验中的最优条件为: pH 6.5, 提取温度50℃, 液料比30:1 (mL/g), 复合酶添加量0.6%, 提取时间80 min; 在响应面实验中, 确定最佳联合提取工艺为: pH 6.8、液料比24:1 (mL/g)、复合酶用量0.63%, 该条件下荷叶多糖得率最高, 为3.70%。同时考察了该多糖的自由基清除效能及其在面包中的抗氧化表现, 发现其DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) 自由基清除率达到了69.16%, 这表明荷叶多糖具有优异的抗氧化活性。研究结果为未来荷叶中有效组分的提取、抗氧化性能研究和产品开发提供了理论依据。

关键词

荷叶多糖, 复合酶辅助, 热水浸提法, 响应面法, 抗氧化活性

Optimization of Extraction Process and Bread Application of Lotus Leaves Polysaccharides

Zongcan Pan*, Minxuan Fan*, Diwei Li#

Jiyang College, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Zhuji Zhejiang

Received: May 7th, 2025; accepted: Jun. 11th, 2025; published: Jun. 23rd, 2025

Abstract

Using polysaccharide yield as the evaluation index, response surface methodology was employed to

*共同一作。

#通讯作者。

文章引用: 潘宗灿, 范旻轩, 李蝶妮. 荷叶多糖的提取工艺优化及其在面包中的应用研究[J]. 微生物前沿, 2025, 14(2): 104-116. DOI: 10.12677/amb.2025.142013

optimize the enzyme-assisted hot water extraction process of lotus leaf polysaccharides. The antioxidant activity of LLPs was subsequently determined. Considering factors such as time, energy consumption, and extraction yield, the single-factor experiments identified optimal conditions as follows: pH 6.5, extraction temperature 50°C, liquid-to-material ratio 30:1 (mL/g), complex enzyme dosage 0.6%, and extraction time 80 min. Through RSM optimization, the ideal combined extraction parameters were established as pH 6.8, liquid-to-material ratio 24:1 (mL/g), and complex enzyme dosage 0.63%. Under these conditions, the maximum theoretical LLP yield reached 3.70%. The study further investigated the free radical scavenging capacity and antioxidant performance of LLPs in bread. The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) scavenging rate reached 69.16%, demonstrating excellent antioxidant activity. These findings provide a theoretical foundation for future extraction of bioactive components from lotus leaves, research on their antioxidant properties, and product development.

Keywords

Lotus Leaf Polysaccharides, Compound Enzyme-Assisted Extraction, Hot Water Extraction, Response Surface Methodology, Antioxidant Activity

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

荷叶(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)作为一种药食两用资源,具有多种药理功能,近年来备受关注。《本草求真》指出:“升阳散瘀,荷叶虽味苦气平,实有长养生发之效。”依据传统医学理论,荷叶性质偏凉,主要作用于肝、脾和胃经,具备解暑消热、提升阳气、活血止血等多种功效[1]。现有研究表明,荷叶的药理活性与其所含的多种生物活性物质密切相关,其中富含荷叶多糖[2]、荷叶黄酮[3]、荷叶生物碱[4]及荷叶挥发油[5]等功效组分。这些活性物质通过多靶点、多途径发挥其生物效应,在免疫调节、心血管保护、代谢调控及氧化应激干预等方面均表现出显著功效[6]。

荷叶多糖(Lotus Leaf Polysaccharides, LLPs)作为荷叶中主要的生物活性物质之一,由半乳糖、半乳糖醛酸和阿拉伯糖构成,具备抗糖尿病、抗氧化、抗糖基化和免疫调节等多种功能[2] [7] [8]。大量研究指出,提取技术会对多糖的提取效率、化学成分、物理性质、结构特点以及生物活性产生显著的影响[9] [10]。目前多糖的主要提取方法有热水浸提法、酸碱提取法、深共晶溶剂提取法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法、酶辅助法、动态高压微流态化辅助法等[11]。上述方法均具有各自优缺点。因此,研究主要采用酶法辅助热水提取 LLPs 进行工艺优化,并测定了 LLPs 对 DPPH 自由基的清除效果,同时进行了 LLPs 在面包中的应用研究,为荷叶多糖的提取和产品研发提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 主要材料与试剂

荷叶:浙江省衢州市常山县众柚合作社;磷酸氢二钠、柠檬酸、纤维素酶:四川金地亚美科技有限公司;木瓜蛋白酶:南宁庞博生物工程有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH):天津市众联化学试剂有限公司;葡萄糖标准品:汕头市乐万家食品工业有限公司;无水乙醇、苯酚、浓硫酸:国产分析纯,天茂化学试剂有限公司;乙醚:华盛化学试剂有限公司;丙酮:森力新材料科技有限公司;小麦面粉、酵

母：五得利面粉集团；白砂糖：昆明康尔利食品有限公司；黄油：江门市文彬食品有限公司；盐：中国盐业股份有限公司。

2.2. 主要仪器与设备

JJ224BC 型电子分析天平：常熟市双杰测试仪器厂；GZX-9076MB 型电热鼓风干燥箱：上海博迅实业有限公司医疗设备厂；DK-S24 型电热恒温水浴锅：太仓精宏仪器设备有限公司；WFZ UV-2000 型紫外可见分光光度计：尤尼柯(上海)仪器有限公司；L800 型高速离心机：湖南湘仪试验室仪器开发有限公司；FDA 型高速超细粉碎机：上海乔枫实业有限公司；SHB-III 型循环水式多用真空泵：郑州长城科工贸有限公司；DZTW1000 mL 型恒温电加热套：力辰科技有限公司；UPWS-II-100T 型试验室超级纯水机：杭州永洁达净化科技有限公司；MG38CB-AA 型电烤箱：上海红联机械电器制造有限公司；BCD-410WM 型冰箱：青岛海尔股份有限公司。

2.3. 试验条件

2.3.1. 荷叶多糖提取工艺筛选

将干燥的荷叶粉末过 60 目筛，在特定的温度下进行酶解，100℃灭酶 5 min，随后在不同的 pH、提取温度、液料比、复合酶添加量和提取时间下进行热水浸提，最后进行抽滤和旋蒸浓缩，并用 80%的乙醇在 4℃下沉淀 24 h，离心取沉淀，无水乙醇、丙酮洗涤沉淀 3 次以去除残留溶剂，最后经冷冻干燥获得荷叶多糖提取物。

2.3.2. 标准曲线的绘制

采用苯酚 - 硫酸法测定多糖含量，参考余捷等[11]的方法绘制标准曲线，获得标准曲线方程： $y = 6.5686x + 0.0719$ ($R^2 = 0.9766$)。

2.3.3. 荷叶多糖含量的测定

取 2.0 mL 稀释后的样品，以 1.3.2 节中苯酚 - 硫酸法测定。平行测定 3 次，根据标准曲线计算提取率。

2.3.4. 单因素实验

(1) pH 对多糖提取率的影响测定方法如下：精准称量 5 份荷叶粉末(2.0000 g)，将每份荷叶粉末依次加入 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 的磷酸二氢钠 - 柠檬酸缓冲液中。处理方法见 1.3.1，测得荷叶多糖提取率。(2) 提取温度对多糖提取率的影响测定方法如下：精准称量 5 份荷叶粉末(2.0000 g)，将水浴锅温度设置为 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃活化 10 min 后加入 2.0 g 荷叶粉，继续放置在温度为 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃的水浴锅中水浴 100 min。处理方法见 1.3.1，测得荷叶多糖提取率。(3) 液料比对多糖提取率的影响测定方法如下：精准称量 5 份荷叶粉末(2.0000 g)，按液料比 10:1 mL/g、20:1 mL/g、30:1 mL/g、40:1 mL/g、50:1 mL/g 配制 pH=6.5 的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液 100 mL，处理方法见 1.3.1，测得荷叶多糖提取率。(4) 复合酶添加量对多糖提取率的影响测定方法如下：精准称量 5 份荷叶粉末(2.0000 g)，加入质量分数为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%的复合酶(纤维素酶:木瓜蛋白酶 = 1:1)。处理方法见 1.3.1，测得荷叶多糖提取率。(5) 提取时间对多糖提取率的影响测定方法如下：精准称量 5 份荷叶粉末(2.0000 g)，加入 2.0 g 荷叶粉后，在水浴锅温度为 50℃的条件下加热，提取时间为 60 min、70 min、80 min、90 min、100 min。处理方法见 1.3.1，测得荷叶多糖提取率。

2.3.5. 酶法辅助提取荷叶多糖工艺响应面优化实验

在单因素设计实验的基础上，运用 Design-Expert 12.0 对 pH、液料比以及复合酶添加量进行了 3 因

素 3 水平响应面优化实验。同时, 响应值为荷叶多糖提取得率, 以此进行优化, 实验设计因素与水平见表 1。

Table 1. Box-Behnken experimental design factors and levels for lotus leaf polysaccharide
表 1. 荷叶多糖提取率的 Box-Behnken 实验设计因素与水平

水平/因素	pH	液料比(mL/g)	复合酶添加量(%)
-1	6.0	20:1	0.4
0	6.5	30:1	0.6
1	7.0	40:1	0.8

本研究共进行 17 次相关实验, 根据响应面优化实验的变量值和相应的荷叶多糖提取得率, 得出 3 个提取变量和提取得率之间的关系。得出结果后, 对回归模型验证优化, 即根据回归方程算出的理论最佳数据(pH、液料比、复合酶添加量), 将实际获得的多糖平均提取得率与模型预测多糖提取得率进行对比, 验证回归方程的准确性[14]。

2.3.6. 荷叶多糖抗氧化活性研究

(1) DPPH 自由基清除能力

在比色管中分别加入 1 mL 的 1 mg/mL~5 mg/mL 荷叶多糖溶液, 再向每管中加入 2 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的 DPPH 工作液, 用无水乙醇定容至刻度线, 振荡混匀后, 在室温下避光反应 30 min, 以无水乙醇作为空白组, 对照组用蒸馏水代替荷叶多糖溶液, 采用紫外-可见光谱法, 于特征波长 517 nm 处测定样品溶液的吸光值。

(2) 荷叶多糖对面包抗氧化活性的影响

精确称量荷叶多糖与基础配料按 GB/T 14611-2008《小麦粉面包烘焙品质试验法直接发酵法》进行面包制作, 并根据实际原料和设备进行调整。对荷叶多糖面包进行感官评价。感官评价表 2 如下:

Table 2. Sensory evaluation form
表 2. 感官评价表

评分指标	评分标准	分值
口感(15)	咀嚼感柔软, 易于下咽	11~15 分
	软硬适中, 偏硬或偏软	6~10 分
	口感较硬且干, 难以下咽	0~5 分
香气(20)	香气浓郁吸引人	11~20 分
	香气较淡无异味	6~10 分
	香气无	0~5 分
组织状态(25)	形状完整饱满, 表面光滑, 不塌陷	16~25 分
	略有塌陷, 表面略有皱纹	9~16 分
	塌陷严重, 表面明显皱缩	0~8 分
滋味(40)	甜味适中, 苦味较少	25~40 分
	甜味较少, 苦味适中	10~25 分
	无甜味, 苦味较多	0~10 分

根据感官评价表得出的结果进行优化。将两组面包放置在干燥箱(温度 25℃, 湿度 60%的环境下)隔 1、3、5、7 天提取面包样品进行 DPPH 自由基清除测试, 测试方法如 2.3.4.1, 比较其抗氧化活性变化。

3. 结果与分析

3.1. 单因素实验结果

3.1.1. pH 对多糖提取率的影响

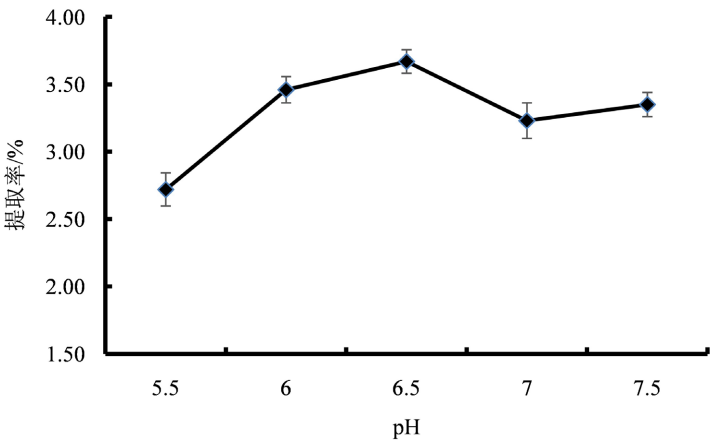


Figure 1. Effect of pH on polysaccharide extraction yield
图 1. pH 对多糖提取率的影响

由图 1 可知当 pH 值从 5.0 增至 6.5 时, 多糖得率呈上升趋势, 从 2.72% 到 3.67%, 因为在酸性条件下, 多糖分子中的糖苷键易受到氢离子的攻击, 导致分子链断裂, 分子量下降。在此期间不仅会改变多糖的分子结构, 还会影响其物理化学性质, 如溶解度的增加等。纤维素酶和木瓜蛋白酶在酸性环境下的活性会受到抑制, 影响多糖的提取效率[12]。在 pH 6.5 时取得最大值为 3.67%, 而当 pH 超过 6.5 后, 得率则开始显著降低至 3.35%。在 pH 过高环境下, 酶的活性中心可能受到影响导致结构发生变化, 从而降低催化能力。高 pH 值还可能引起酶的变性, 使其完全失去活性, 复合酶对荷叶细胞壁的降解能力会显著减弱, 导致荷叶多糖的释放量减少, 最终影响多糖的得率[13]。因此选择 pH 6.5 作为响应面设计的最适 pH。

3.1.2. 提取温度对多糖提取率的影响

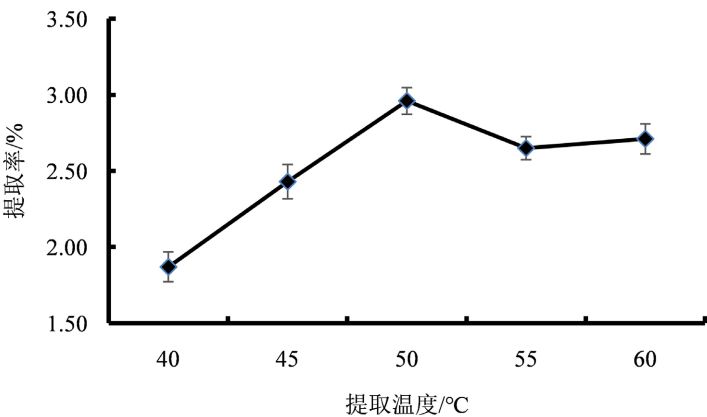


Figure 2. Effect of extraction temperature on polysaccharide yield
图 2. 提取温度对多糖提取率的影响

由图 2 可知 30~50℃ 范围内, 提取率随温度升高呈线性增长, 从 1.87% 到 2.96%, 在低温条件下, 多糖分子的运动能力较弱, 多糖分子间相互作用力较强, 导致多糖在水中的溶解度较低, 低温导致酶的活性降低, 无法有效降解荷叶细胞壁, 从而妨碍了多糖的释放[14]。50℃ 时达到峰值 2.96%, 之后随着温度继续上升, 提取率呈下降趋势, 下降到 2.71%。随着体系温度上升, 水分子动能增加导致溶剂化作用增强, 通过削弱多糖分子间的氢键和范德华力相互作用, 显著提升其溶出效率。适当的温度可以活化纤维素酶和木瓜蛋白酶, 促进荷叶细胞壁的降解, 释放更多的多糖。当温度超过复合酶最适范围时, 酶蛋白会发生变性, 导致活性中心的结构破坏, 催化能力下降甚至完全丧失。高温会破坏多糖的糖苷键, 导致分子链断裂, 分子量下降, 甚至形成单糖或寡糖等小分子物质。这不仅影响多糖的结构和功能, 还会降低其得率[15]。

3.1.3. 液料比对多糖提取率的影响

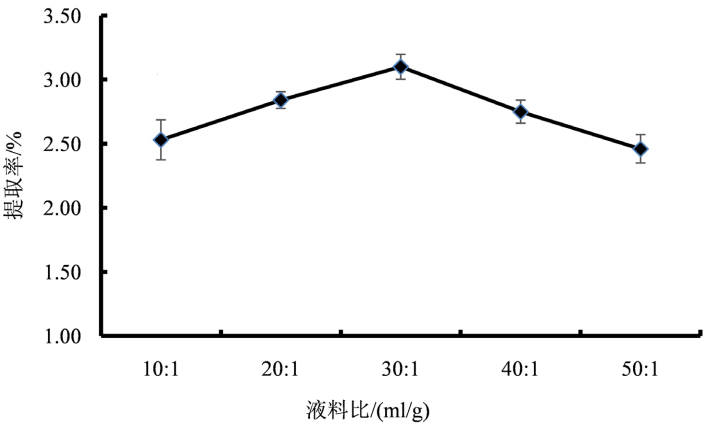


Figure 3. Effect of liquid-to-solid ratio on polysaccharide extraction yield
图 3. 液料比对多糖提取率的影响

由图 3 可知荷叶多糖提取率随液料比的上升而呈现增加的趋势, 从 2.53% 到 3.10%, 在液料比较低的情况下, 溶剂的量难以充分渗透原料, 导致多糖无法充分溶解, 提取效率较低。当液料比达到 30:1 之时, 荷叶多糖的提取效率达到了最高水平 3.10%, 适中液料比时溶剂能够充分浸润原料, 使多糖有效溶出, 提取效率较高[15]。随后随着液料比进一步提升, 其提取率开始逐渐下降至 2.46%。随着溶剂用量的增加, 荷叶粉与复合酶的相互作用面积显著扩大。提高液料比例能够有效降低提取体系的粘度, 从而促进多糖分子向溶液中的扩散转移。增大的溶剂体积有助于提升多糖的溶出效率, 同时也造成了提取液中多糖含量的稀释。过高的液料比会导致复合酶浓度下降, 进而削弱其生物催化活性, 最终影响多糖的提取收率, 此现象解释了多糖得率随溶剂用量增加而降低的原因[16]。基于上述分析, 试验确定 30:1 mL/g 的液料比为响应面优化试验的最佳参数。

3.1.4. 复合酶添加量对多糖提取率的影响

由图 4 可知荷叶多糖的提取效率与酶添加量呈现先升后降的变化趋势, 上升为 2.45% 到 3.48%, 在酶用量较低时, 复合酶对荷叶细胞壁的接触面积, 酶与底物的结合位点少, 降解作用有限, 未能充分破坏其结构完整性, 导致细胞内多糖释放不完全, 提取效率较低[17]。当复合酶用量增至 0.6% 时, 提取率达到峰值 3.48%, 适度的酶浓度可有效瓦解细胞壁, 从而提升多糖的溶出率。继续增加酶量反而导致提取效率降低至 2.48%。当酶用量过高时, 过量的酶可能引发多糖分子链的降解, 产生单糖或寡糖等小分子物质。酶分子之间可能发生竞争性抑制, 降低催化效率[18]。因此选择复合酶添加量 0.6% 为响应面设计中的最适添加量。

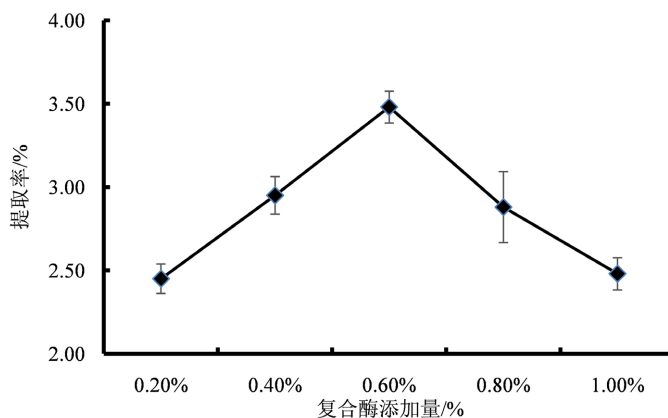


Figure 4. Effect of complex enzyme dosage on polysaccharide extraction yield

图 4. 复合酶添加量对多糖提取率的影响

3.1.5. 提取时间对多糖提取率的影响

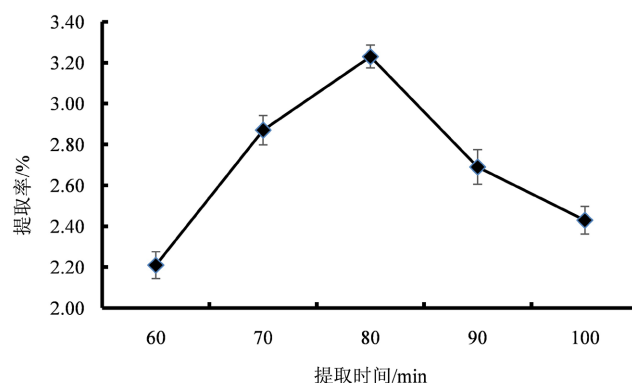


Figure 5. Effect of extraction time on polysaccharide yield

图 5. 提取时间对多糖提取率的影响

由图 5 可知在 60 min~70 min 区间内, 多糖提取率呈现快速上升趋势, 从 2.21%到 3.23%, 在提取时间较短时, 多糖的释放并未达到理想状态, 短暂的时间限制了复合酶与荷叶细胞壁的相互作用, 因此多糖的解放不够充分。于 80 min 时达到最大值 3.23%。适中时间提取时多糖逐渐溶出, 提取效率显著提高[19]。因为复合酶能够充分降解细胞壁, 促进多糖的溶出。当提取时间超过临界值(80 min)后, 多糖得率随反应时间延长呈显著下降趋势, 降低至 2.43%。提取时间超过临界值时提取效率可能达到峰值。因为长时间提取可能导致多糖分子链断裂, 产生单糖或寡糖等小分子物质以及杂质(如蛋白质、色素等)的溶出量增加[20]。

3.2. 响应面实验设计

3.2.1. 响应面分析因素水平和结果

本研究采用 Design Expert 13 软件构建了三因素三水平的 Box-Behnken 响应面设计方案。该试验设计共包含 17 组试验条件, 每组试验均按照标准提取流程进行三次平行测定。表 3 展示了中心组合试验设计矩阵及对应的荷叶多糖提取率实测结果。运用 Design Expert 13 软件对试验数据进行回归分析, 建立了提取率与 A: pH、B: 液料比(mL/g)、C: 复合酶添加量(%)之间的回归方程: $Y = 3.67 + 0.0738 A - 0.0447 B + 0.0453 C - 0.1559 AB + 0.1786 AC + 0.0488 BC - 0.1551 A^2 - 0.1186 B^2 - 0.3866 C^2$ 。

Table 3. Table of response surface optimization experimental design and result analysis
表 3. 响应面优化试验设计与结果分析表

试验号	A: pH	B: 液料比(mL/g)	C: 复合酶添加量/%	提取率/%
1	6	20	0.6	3.26
2	7	20	0.6	3.21
3	6	40	0.6	2.95
4	7	40	0.6	3.66
5	6	30	0.4	2.94
6	7	30	0.4	3.67
7	6	30	0.8	3.64
8	7	30	0.8	3.05
9	6.5	20	0.4	3.64
10	6.5	40	0.4	3.26
11	6.5	20	0.8	3.45
12	6.5	40	0.8	3.64
13	6.5	30	0.6	3.47
14	6.5	30	0.6	3.17
15	6.5	30	0.6	3.16
16	6.5	30	0.6	3.13
17	6.5	30	0.6	3.72

Table 4. Table of variance analysis results of response surface model
表 4. 响应面模型方差分析结果表

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	1.16	9	0.1293	51.48	0.0001	**
A: pH	0.0435	1	0.0435	17.34	0.0042	**
B: 液料比	0.0160	1	0.0160	6.36	0.0397	*
C: 复合酶添加量	0.0164	1	0.0164	6.53	0.0378	*
AB	0.0972	1	0.0972	38.72	0.0004	**
AC	0.1276	1	0.1276	50.82	0.0002	**
BC	0.0095	1	0.0095	3.80	0.0922	#
A ²	0.1012	1	0.1012	40.32	0.0004	**
B ²	0.0593	1	0.0593	23.60	0.0018	**
C ²	0.6294	1	0.6294	250.67	0.0001	**
残差	0.0176	7	0.0025			
失拟项	0.0138	3	0.0046	4.80	0.0819	#
纯误差	0.0038	4	0.0010			
总误差	1.18	16				

R² = 0.9851, AdjR² = 0.9660, Pred R² = 0.8086, Adeq Precision = 19.5004.

本实验荷叶多糖提取率回归模型的方差分析结果如表 4 所示, 该回归模型具有极高的统计显著性($p = 0.0001 < 0.01$), 而失拟项检验($p = 0.0819 > 0.05$)进一步证实了模型的合理性。模型评价指标显示, 决定系数 $R^2 = 0.9851$, 调整后 $R^2 = 0.9660$, 二者差值仅为 0.0191, 说明模型具有优异的拟合优度和预测能力, 可准确展示 pH、液料比和复合酶添加量对多糖提取效率的作用趋势。方差分析结果表明, 影响提取率的关键因素排序为: pH > 复合酶添加量 > 液料比。此外, 交互作用分析显示, pH 与液料比(AB)、pH 与复合酶添加量(AC)的交互影响均极显著, 而液料比与复合酶添加量(BC)的交互效应未达显著水平。

3.2.2. 响应面分析

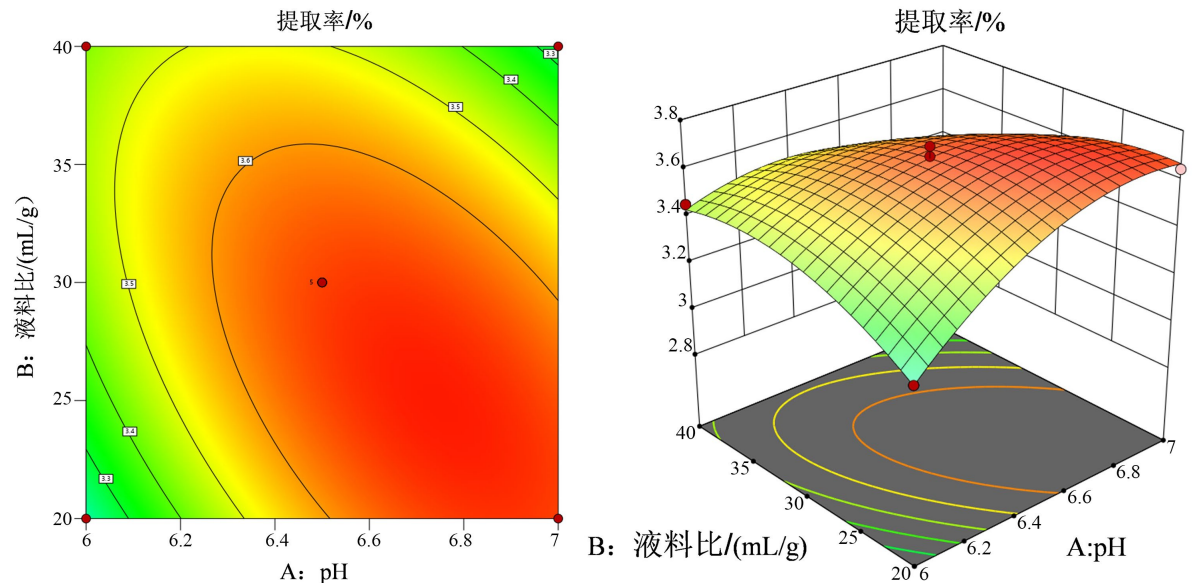


Figure 6. Effect of pH to liquid ratio on polysaccharide extraction rate
图 6. pH 与液料比对多糖提取率的影响

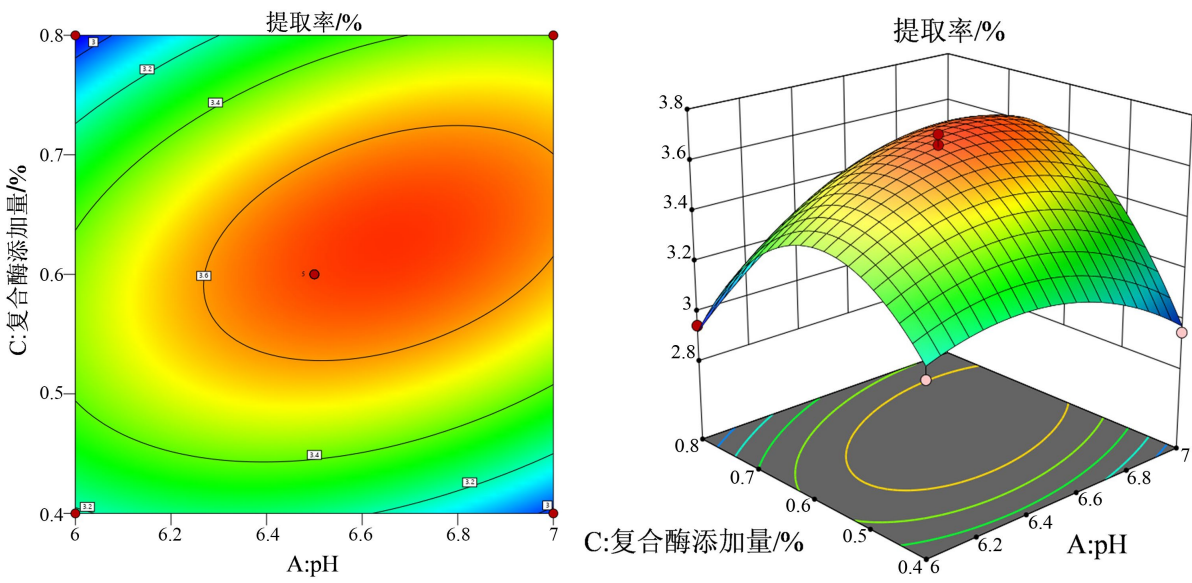


Figure 7. Effects of pH and compound enzyme addition on polysaccharide extraction
图 7. pH 与复合酶添加量对多糖提取率的影响

依据图 6 可看出，pH(A)和液料比(B)的交互影响对荷叶多糖得率的影响呈抛物面分布，曲面弯曲程度较陡，说明液料比(B)不变时，随着 pH(A)提高，荷叶多糖得率先上升后下降，且波动幅度较大。再者，pH(A)为固定值时，随着液料比(B)增加，荷叶多糖得率也是先逐渐升高而后降低。相比于固定 pH 而以液料比作为自变量对荷叶多糖提取率所产生的变化趋势，其 3D 图的变化幅度更加明显，因此，在这两个因素的交互作用下 pH(A)对于荷叶多糖提取率的影响显著性大于液料比。

依据图 7 可看出，pH(A)和复合酶添加量(C)的交互影响对荷叶多糖得率的影响呈抛物面分布，曲面弯曲程度较陡，说明复合酶添加量(C)不变时，随着 pH(A)提高，荷叶多糖得率先上升后下降，且波动幅度较大。再者，pH(A)为固定值时，复合酶添加量(C)增加，荷叶多糖得率也是先逐渐升高而后降低。相比于固定 pH 而以复合酶添加量作为自变量对荷叶多糖提取率所产生的变化趋势，其 3D 图的变化幅度不明显，因此，在这两个因素的交互作用下复合酶添加量(C)对于荷叶多糖提取率的影响显著性大于 pH。

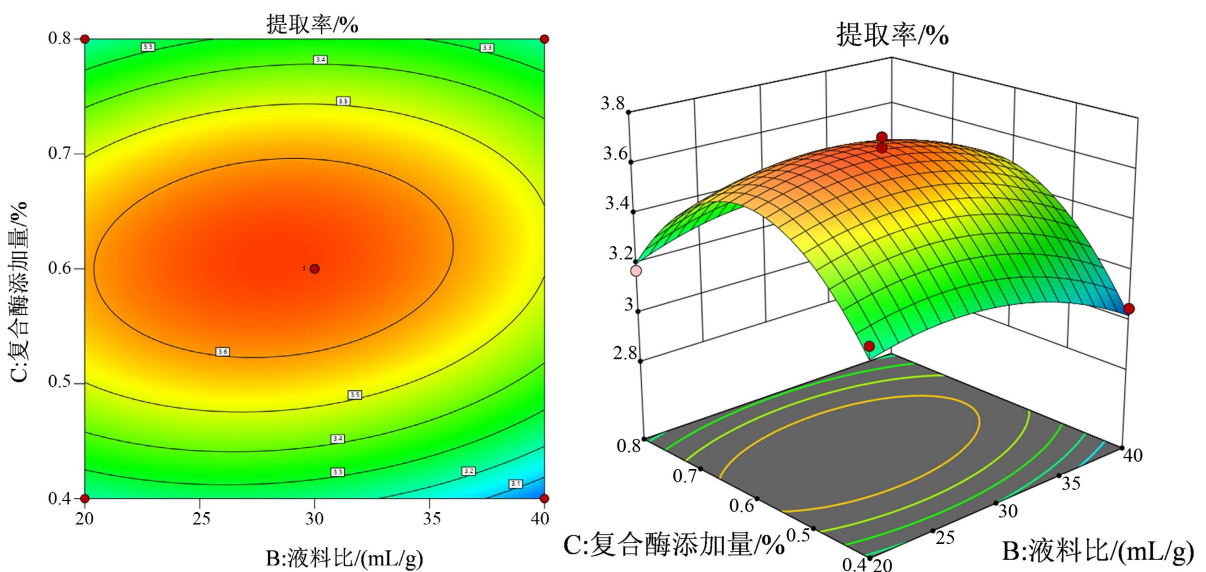


Figure 8. Effect of liquid-to-material ratio and compound enzyme addition on polysaccharide extraction rate
图 8. 液料比与复合酶添加量对多糖提取率的影响

依据图 8 可看出，液料比(B)和复合酶添加量(C)的交互影响对荷叶多糖得率的影响呈抛物面分布，曲面弯曲程度较陡，说明液料比(B)不变时，随着复合酶添加量(C)提高，荷叶多糖得率先上升后下降，且波动幅度较大。再者，复合酶添加量(C)为固定值时，随着液料比(B)增加，荷叶多糖得率也是先逐渐升高而后降低。相比于固定液料比而以复合酶添加量作为自变量对荷叶多糖提取率所产生的变化趋势，其 3D 图的变化幅度不明显，因此，在这两个因素的交互作用下复合酶添加量(C)对于荷叶多糖提取率的影响显著性大于液料比。

3.2.3. 模型验证

经 Design-Expert 13.0 优化后得到的最优条件为 pH6.8、液料比 24:1 (mL/g)、复合酶添加量 0.63%，在该条件下可得荷叶多糖得率的理论最高值为 3.70%，并在该条件下进行 3 次重复实验后测得多糖得率平均值为 3.73%，与理论值 3.70%接近，说明该工艺合理，与实际偏差不大，具有实际的参考价值。

3.3. 荷叶多糖抗氧化活性结果

3.3.1. DPPH 自由基清除结果

DPPH 作为一种稳定的含氮自由基化合物，在抗氧化活性评价中具有重要应用价值。该物质的乙醇

溶液呈现特征性紫色，其最大吸收峰位于 517 nm 波长处[21]。这种独特的光谱特性使其成为评估抗氧化能力的常用探针分子。抗氧化机理研究表明，DPPH 自由基在与抗氧化成分作用时会发生还原反应，生成 DPPH-H (二苯基苦基肼)，这一过程可通过特征吸收峰的衰减进行监测。图 9 展示了荷叶多糖的 DPPH 自由基清除效果。浓度效应分析显示，当多糖浓度由 1 mg/mL 增至 5 mg/mL 时，其清除率呈现明显的剂量依赖性增长，从初始的 22%显著升高至 69%，表明荷叶多糖具有显著的浓度依赖性抗氧化活性。

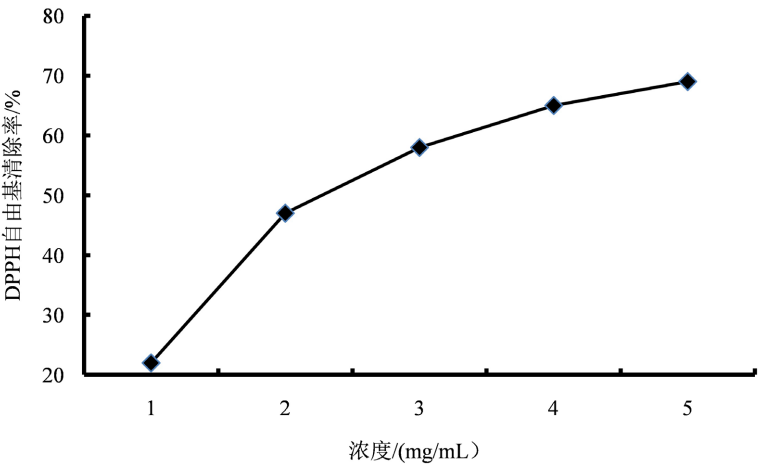


Figure 9. DPPH free radical scavenging rate
图 9. DPPH 自由基清除率

3.3.2. 荷叶多糖对面包感官品质及抗氧化活性影响结果

(1) 荷叶多糖面包感官评定

Table 5. Sensory evaluation results of lotus leaf polysaccharide bread
表 5. 荷叶多糖面包感官评价结果表

评价指标	评定员数					
	1	2	3	4	5	6
口感	7	8	6	6	7	8
香气	7	9	6	9	8	7
组织状态	20	21	18	23	19	22
滋味	20	23	28	26	30	33
总分	57	61	58	64	64	70

由表 5 可知，口感得分集中在 6~8 分，整体表现中等偏上，有部分评定员反映面包口感较硬，咀嚼感欠佳。可能的原因是酵母发酵不完全或白砂糖添加量不足，导致面包质地不够松软。香气分值在 6~9 分，总体评分较好，大部分评定员评价面包的香气四溢。但部分评定员认为香气较淡，可能与荷叶多糖的添加量或烘焙工艺有关。组织状态得分范围为 18~23 分，整体表现良好，面包内部结构较为均匀，有少量评定员指出面包外表皮较硬，可能与烤制时间和温度控制不当有关。滋味得分范围为 20~33 分，整体表现较好，部分评定员认为面包的滋味较好。部分评定员反映甜味较淡，可能与白砂糖添加量较少有关。

通过感官评定结果分析得出，荷叶多糖面包在口感、香气、组织状态和风味方面均表现出一定的优势，但仍需进一步完善。通过优化发酵时间、增加白砂糖添加量以及调整烤制工艺，可以有效提升面包

的整体品质和感官体验。产品改良后感官评定分数上升至 84 分。

(2) 荷叶多糖面包与普通面包抗氧化活性变化

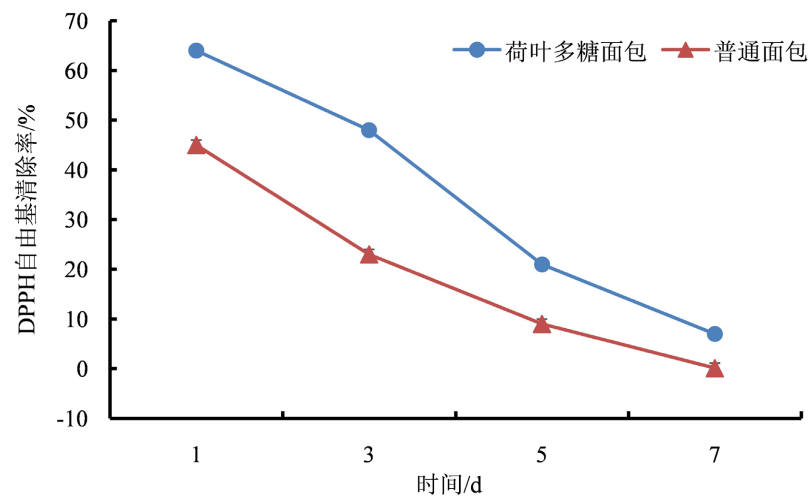


Figure 10. Changes in antioxidant activity of bread in two groups
图 10. 两组面包抗氧化活性变化

荷叶多糖面包及普通面包的 DPPH 自由基清除率如图 10 所示。可以得出荷叶多糖面包及普通面包 DPPH 自由基清除率随着时间的增加而下降, 荷叶多糖 DPPH 自由基清除率从 64%到 7%, 普通面包 DPPH 自由基清除率从 45%到 0.1%, 但是荷叶多糖 DPPH 自由基清除率下降幅度小于普通面包, 表明荷叶多糖对抗氧化效果显著。

4. 结论

本研究创新性地采用纤维素酶与木瓜蛋白酶(1:1)复合酶解结合热水浸提的协同提取策略, 系统优化了荷叶多糖的制备工艺, 并深入评价了其抗氧化性能。首先采用单因素试验探讨了 pH、提取温度、液料比、复合酶添加量及提取时间等参数对多糖得率的影响, 筛选出 pH、液固比和酶用量三个关键影响因素。运用 Design Expert 13 软件构建 Box-Behnken 响应面模型进行工艺优化。经模型预测与试验验证, 最优提取参数确定为: pH 6.8、液固比 24:1 (mL/g)、复合酶用量 0.63%。在此条件下, 多糖得率达 3.70%, 验证试验平均值为 3.73%, 与预测值高度吻合(相对误差 0.03%)。通过 DPPH 自由基清除试验评价了多糖的抗氧化能力。浓度梯度试验(1~5 mg/mL)显示, 荷叶多糖的 DPPH 清除率呈现显著的浓度依赖性, 由 22% (1 mg/mL)提升至 69% (5 mg/mL)。通过将荷叶多糖添加至面包中的试验, 进一步证实了其抗氧化功效。研究数据显示, 相较于普通面包, 添加荷叶多糖的面包在贮藏期间 DPPH 自由基清除能力的衰减速率明显减缓, 说明荷叶多糖能够有效延缓面包的氧化变质。感官评价结果显示, 添加荷叶多糖的面包在口感、香气、组织状态和滋味等方面均表现良好, 表明荷叶多糖不仅具有抗氧化功能, 还能提升食品的品质。

本研究为荷叶资源的深度开发和综合利用提供了科学依据, 也为荷叶多糖应用于功能性食品和营养保健品奠定了基础。后续的研究应着重于探讨荷叶多糖在其他生物活性方面的表现, 如抗炎、抗糖和免疫调节等, 为其在医药和食品领域的应用提供更多的理论支持。

基金项目

浙江省教育厅一般科研项目(Y202352649)。

参考文献

- [1] 高振华, 孙伶俐, 王豪, 等. 荷叶化学成分及其药理活性研究[J]. 广东化工, 2020, 47(5): 100-102.
- [2] Song, Y., Han, A., Lim, T., Lee, E. and Hong, H. (2019) Isolation, Purification, and Characterization of Novel Polysaccharides from Lotus (*Nelumbo nucifera*) Leaves and Their Immunostimulatory Effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, **128**, 546-555. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.131>
- [3] Yang, M., Chang, Y., Chan, K., Lee, Y. and Wang, C. (2011) Flavonoid-Enriched Extracts from *Nelumbo nucifera* Leaves Inhibits Proliferation of Breast Cancer *in Vitro* and *in Vivo*. *European Journal of Integrative Medicine*, **3**, e153-e163. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2011.08.008>
- [4] Do, T.C.M.V., Nguyen, T.D., Tran, H., Stuppner, H. and Ganzera, M. (2013) Analysis of Alkaloids in Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) Leaves by Non-Aqueous Capillary Electrophoresis Using Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection. *Journal of Chromatography A*, **1302**, 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.002>
- [5] 孙晔, 戴妙妙, 缪存铅, 等. 荷叶挥发油对肉类抑菌活性的影响因素研究[J]. 食品工业, 2009, 30(6): 12-14.
- [6] Zhang, L., Tu, Z., Wang, H., Kou, Y., Wen, Q., Fu, Z., et al. (2015) Response Surface Optimization and Physicochemical Properties of Polysaccharides from *Nelumbo nucifera* Leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, **74**, 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.020>
- [7] Zeng, Z., Xu, Y. and Zhang, B. (2016) Antidiabetic Activity of a Lotus Leaf Selenium (Se)-Polysaccharide in Rats with Gestational Diabetes Mellitus. *Biological Trace Element Research*, **176**, 321-327. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0829-6>
- [8] Wu, D., Feng, K., Huang, L., Gan, R., Hu, Y. and Zou, L. (2021) Deep Eutectic Solvent-Assisted Extraction, Partially Structural Characterization, and Bioactivities of Acidic Polysaccharides from Lotus Leaves. *Foods*, **10**, Article 2330. <https://doi.org/10.3390/foods10102330>
- [9] Li, M., Li, T., Hu, X., Ren, G., Zhang, H., Wang, Z., et al. (2021) Structural, Rheological Properties and Antioxidant Activities of Polysaccharides from Mulberry Fruits (*Morus alba* L.) Based on Different Extraction Techniques with Superfine Grinding Pretreatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, **183**, 1774-1783. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.108>
- [10] Abuduwaili, A., Rozi, P., Mutailifu, P., Gao, Y., Nuerxiat, R., Aisa, H.A., et al. (2019) Effects of Different Extraction Techniques on Physicochemical Properties and Biological Activities of Polysaccharides from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk. *Process Biochemistry*, **83**, 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.020>
- [11] 余捷. 荷叶多糖的提取优化、结构表征及其体外抗炎抗氧化活性研究[D]: [硕士学位论文]. 荆州: 长江大学, 2023.
- [12] Chen, S., Shang, H., Yang, J., Li, R. and Wu, H. (2018) Effects of Different Extraction Techniques on Physicochemical Properties and Activities of Polysaccharides from Comfrey (*Symphytum officinale* L.) Root. *Industrial Crops and Products*, **121**, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.063>
- [13] Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L. and Cheung, P.C.K. (2011) Advances in Lentinan: Isolation, Structure, Chain Conformation and Bioactivities. *Food Hydrocolloids*, **25**, 196-206. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.02.001>
- [14] Liu, Q., Li, P., Chen, J., Li, C., Jiang, L., Luo, M., et al. (2019) Optimization of Aqueous Enzymatic Extraction of Castor (*Ricinus communis*) Seeds Oil Using Response Surface Methodology. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, **13**, 114-122. <https://doi.org/10.1166/jbmb.2019.1812>
- [15] 夏蕴实, 刘畅, 王梓, 孙印石. 复合酶水酶法提取鹿油及其脂肪酸组成分析[J]. 食品工业, 2021, 42(12): 108-112.
- [16] Feng, K., Huang, L., Wu, D., Li, F., Gan, R., Qin, W., et al. (2022) Physicochemical Properties and *in Vitro* Bioactivities of Polysaccharides from Lotus Leaves Extracted by Different Techniques and Solvents. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **16**, 1583-1594. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01256-3>
- [17] 李美东, 黄秀芳, 罗凯. 壶瓶碎米茅多糖的提取、分离及抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2022, 22(4): 196-207.
- [18] Fournière, M., Bedoux, G., Lebonvallet, N., Leschiera, R., Le Goff-Pain, C., Bourgougnon, N., et al. (2021) Poly- and Oligosaccharide Ulva Sp. Fractions from Enzyme-Assisted Extraction Modulate the Metabolism of Extracellular Matrix in Human Skin Fibroblasts: Potential in Anti-Aging Dermo-Cosmetic Applications. *Marine Drugs*, **19**, Article 156. <https://doi.org/10.3390/md19030156>
- [19] Huang, C., Peng, X., Pang, D., Li, J., Paulsen, B.S., Rise, F., et al. (2021) Pectic Polysaccharide from *Nelumbo nucifera* Leaves Promotes Intestinal Antioxidant Defense *in vitro* and *in vivo*. *Food & Function*, **12**, 10828-10841. <https://doi.org/10.1039/d1fo02354c>
- [20] 宋永瑞, 韩爱玲, 林泰国, 等. 荷叶多糖的分离、纯化及其免疫刺激作用研究[J]. 国际生物大分子杂志, 2019(128): 546-555.
- [21] Zhang, Z., Kong, F., Ni, H., Mo, Z., Wan, J., Hua, D., et al. (2016) Structural Characterization, α -Glucosidase Inhibitory and DPPH Scavenging Activities of Polysaccharides from Guava. *Carbohydrate Polymers*, **144**, 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.030>