

Feasibility Study of Biostimulation Upon Dye Decolorization with Supplementation of Edible Flora-Based Chemicals

An-Wei Hsu, Pei-Lin Yueh, Chung-Chuan Hsueh, Bor-Yann Chen *

Department of Chemical and Materials Engineering, National I-Lan University, I-La, Taiwan

Email address:

kimk@kimo.com (An-Wei Hsu), cchsueh88@gmail.com (Chung-Chuan Hsueh), boryannchen@yahoo.com.tw (Bor-Yann Chen)

*Corresponding author

To cite this article:

An-Wei Hsu, Pei-Lin Yueh, Chung-Chuan Hsueh, Bor-Yann Chen. Feasibility Study of Biostimulation Upon Dye Decolorization with Supplementation of Edible Flora-Based Chemicals. *Science Discovery*. Vol. 4, No. 6, 2017, pp. 467-473. doi: 10.11648/j.sd.20160406.30

Received: June 12, 2016; **Accepted:** October 15, 2016; **Published:** April 7, 2017

Abstract: As known, naturally-occurring edible flora contained crucial compositions to human health (e.g., antioxidants). Prior studies revealed that decolorized metabolites (DM) of textile dyes might be used to enhance electron-transfer (ET) capabilities of dye decolorization and bioelectricity generation (DD&BG). Such ET stimulating phenomena were suspected to be associated with antioxidant characteristics. This study selected 6 edible flora to explore such relationship between antioxidant and dye-decolorizing characteristics. The finding indicated that DM of *Gynura bicolor* could show electron-shuttling capabilities to increase ET efficiency of DD&BG. Moreover, the dosage should exceed threshold level to trigger effective ET performance. Apparently, supplementation of sufficient DM of *G. bicolor* to azo dyes RBk5 significantly enhance efficiency of DD. Comparative assessment also suggested that chemical structure affected color removal efficiency, indicating optimal strategy for wastewater decolorization.

Keywords: *Gynura bicolor*, Edible Flora, Dye Decolorization, Electron Shuttles

以天然植物添加促進染料生物脫色之可行性研究

許安瑋, 岳沛林, 薛仲娟, 陳博彥*

化學工程與材料工程學系, 宜蘭大學, 宜蘭市, 台灣

邮箱

kimk@kimo.com (許安瑋), cchsueh88@gmail.com (薛仲娟), boryannchen@yahoo.com.tw (陳博彥)

摘要: 由於天然食用植物中可能含有益於人體健康之抗氧化物, 而先前研究發現染料脫色中間物可作為提升電子傳遞之電子數, 懷疑該性質可能與抗氧化性有關, 因此對六種天然食用植物進行抗氧化與脫色之相關研究, 目前發現紅鳳菜 (*Gynura bicolor*) 可能具有電子梭特性, 可提升電子轉移效率以應用於MFC對染料廢水處理並促進產電及脫色, 更發現在臨界濃度以上才可有電子中介作用, 並將此脫色代謝物添加於RBk5進行脫色試驗以量化比較促進之效果, 以利於後續之工程評估。

关键词: 紫背天葵, 食用植物, 染料脫色, 電子梭

1. 引言

先前研究[1]發現染料生物脫色代謝物具有促進脫色及生物產電之電子梭作用，但是化學染料可能具有生物毒性，因此基於環境生態友善性考量，採用天然物來篩選出具有類似電子梭特性之相關天然物，已是目前綠色環境生物技術上極重要之課題。由於天然植物中所含的色素可能是具電子轉移之發色基團，且具有人體需要的營養物質或可能有豐富的藥膳作用，像甜菜(*Beta vulgaris*)與滇紅(*Camelliaboreali-yunnanica*)是富含天然多酚化合物，被認為可能是促進健康的植物化學物質，更因其(1)具有優良的抗氧化活性，抗病毒，抗癌，抗發炎的特性，和(2)

優異之清除自由基能力。自由基清除活性，其機制主要為氫原子轉移機制和電子轉移機制[2, 3]，懷疑可用來同時提升微生物產電及脫色效率，所以亦考慮其運用於染料整廢水處理之可行性。本研究即針對天然染料進行相關脫色研究，並篩選可能具有抗氧化能力的天然有色植物進行後續應用分析。事實上，本研究之紅鳳菜(*Gynura bicolor*)及洛神花(*Hibiscus sabdariffa*)具有相當多之抗氧化成分(例如：花青素(anthocyanidins))。文獻指出具有極佳的抗氧化能力，其結構內的羥基和甲氧基的取代基位置，對抗氧化與電子轉移能力皆可能有助益之功能效果[4]。

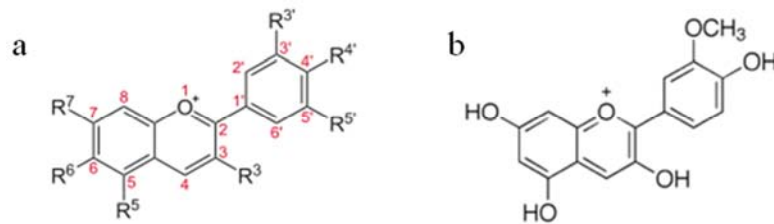


圖1 (a)花青素的基本結構 (b)紅鳳菜內含的花青素結構 (Peonidin)。

再者，一般藥用植物的功效作用多來自其抗氧化成分，藉以清除生物體內殘留的自由基來促進健康，其中成分(例如：多酚類化合物和抗氧化維生素，亦包括β胡蘿蔔素，類黃酮，花青素和其它多酚類組成的存在)，皆具有抗氧化的能力[5]。再者，中藥材中的薑黃(*Curcuma longa*)與黃蓮(*Coptidis Rhizoma*)，因其可能具有抗氧化能力，因此本研究挑選薑黃與黃蓮來進行可行性評估。針對薑黃、紅鳳菜、滇紅、甜菜、洛神花、黃蓮植物類為目標天然物，並針對其脫色代謝物來分析推論是否可作為電子梭之可行性研究，以作為後續相關之開發應用。

2. 材料與方法

2.1. 有色植物萃取液

首先取定紅鳳菜、甜菜、薑黃、滇紅、黃蓮、洛神花(分別為20g、20g、1g、1g、1g、1g，溶於100ml的蒸餾水中)，切碎後研磨成泥後，100℃下煮沸10min，再用高速離心機(13000rpm、25℃、10min)進行離心，取上層液，並將離心後的上層澄清液用0.24μm孔徑針頭過濾器進行過濾其固體粗顆粒殘留物。

2.2. 菌株前培養

取定脫色菌株 *Aeromonas hydrophila* YT11, *Exiguobacterium acetylicum* K2, *Aeromonas hydrophila* KB23, *Shewanella* sp WLP72, *Planococcus rifietoensis* 15, *Aeromonas* sp NIU01, *Psychrobacter* sp 16, *Aeromonas salmonicida* subsp MSU3，加入經滅菌之蒸餾水及LB培養基配成培養液(25g/L)，將所有菌株均分別加入培養液中，進行兩次活化培養十二小時後，完成菌株的前培養，以利後續實驗入菌時使用。

2.3. 試管脫色篩選

為篩選出較易脫色的植物與脫色能力較佳的菌株，因而將二次活化後的8株菌(YT11、K2、NIU01、KB23、WLP72、P. 15、P. 16、MSU3)，分別對6種有色植物萃取液(薑黃、紅鳳菜、滇紅、甜菜、洛神花、黃蓮)進行脫色在LB培養液中(菌液0.05 ml、有色植物萃取液0.5 ml、LB培養液5 ml)，來初步篩選出可脫色的有色植物萃取物(如表1所示)

2.4. 搖瓶脫色

為檢測其天然植物脫色代謝物可否能促進脫色之能力，將活化後的8株菌的菌液取0.5ml及篩選出的10%有色植物汁液5 ml，加入含50 ml LB之搖瓶培養，以30℃、125 rpm條件下搖瓶培養10小時後，開始靜置脫色20 hr，分別量測生物體及染料濃度，SDR及SGR之數據依[6]估算。

2.5. 循環伏安法

將有色植物汁液分別對其脫色前與不同菌株脫色後的菌液，進行高速離心(13000rpm、25℃、10min)取其上層液，進行循環伏安法掃描電位，來比較脫色前及脫色後的差異與利用不同菌株脫色的差異，並觀察是否有認氧化還原峰，以確認其脫色代謝物促進電子轉移以利產電。

3. 結果與討論

3.1. 天然植物萃取液之電化學評估

為評估有關各種待測物是否具有可逆電子轉移的特性，推論是否氧化可具有抗氧化及自由基清除的電子轉移效果，將6種天然物萃取汁液分別進行循環伏安法測試，

以觀察是否在脫色前具有促進電子轉移的氧化還原峰，結果可顯示出脫色前原液並不具有促進電子轉移之電子梭

特性。

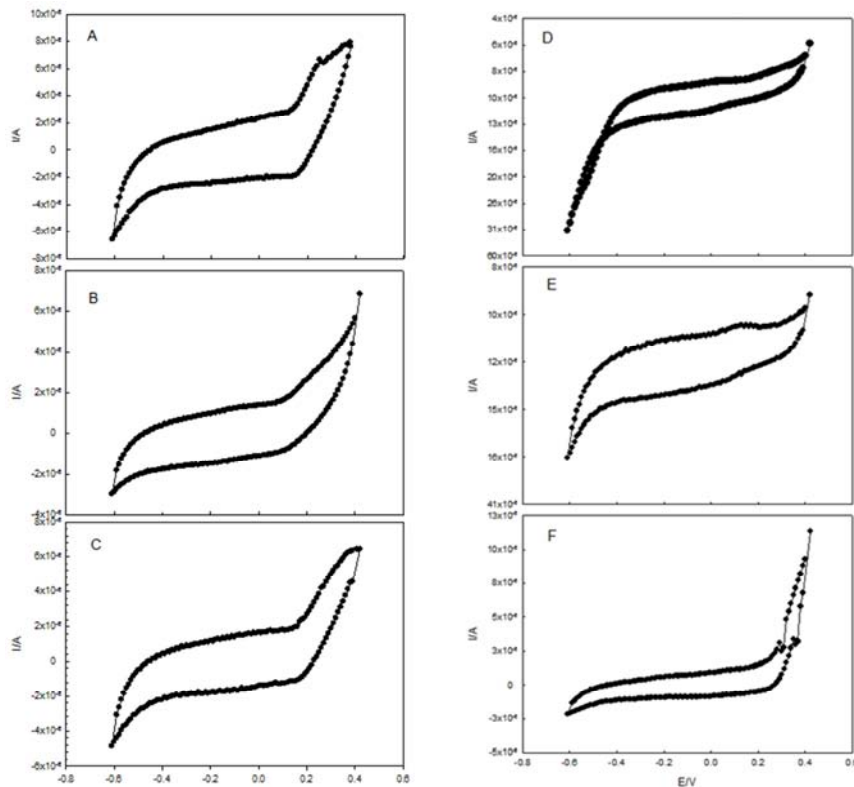


圖2 六種天然植物萃取液(A)Beta vulgaris (B)Camelliaboreali-yunnanica、(C)Gynura bicolor(D) Coptidis Rhizoma、(E) Curcuma longa、(F) Hibiscus sabdariffa 脫色前之循環伏安圖譜。

3. 2. 初步試管脫色篩選

為測定脫色代謝物之電化學特性，首先要進行脫色評估。就選擇較易脫色之待測物及比較在不同脫色菌株之脫色優劣，因此將8株脫色菌分別對6種待測植物萃取液進行脫色可行性評估，經搖瓶培養12 hr後，分別靜置脫色12、24、36 hr，再估算其脫色效果，來挑選較易脫色的可行食用植物與可選定出對該植物有較佳脫色能力的菌株。結果如表1中脫色次序評估(分別依脫色效果由優至劣分別給定1~6分，並總計各菌株的脫色分數愈低，表示總體越易脫色的植物種)，可得各物種分數排序得到：

由不同菌株對各種汁液脫色情況，可得到表1分別對處理效果依大小排列如下所列：

P. 16: 甜菜>紅鳳菜> 滇紅 >洛神花=薑黃=黃蓮

P. 15: 滇紅> 甜菜 > 紅鳳菜>洛神花>薑黃=黃蓮

MSU3: 滇紅>紅鳳菜> 甜菜 >洛神花>薑黃>黃蓮

K2: 紅鳳菜> 甜菜 > 滇紅 >洛神花=薑黃=黃蓮

KB23: 紅鳳菜> 甜菜 > 滇紅 >洛神花>黃蓮>薑黃

NIU01: 滇紅> 甜菜 > 紅鳳菜>洛神花>黃蓮>薑黃

YT11: 紅鳳菜= 甜菜 > 滇紅 >洛神花>黃蓮>薑黃

WLP72: 甜菜>紅鳳菜> 滇紅 >洛神花>薑黃>黃蓮

紅鳳菜(15) ≈ 甜菜(15) > 滇紅(18) >> 洛神花(32) > 黃蓮(42) > 薑黃(43)。

表1 8種不同脫色菌株分別對6種食用性植物萃取液之脫色效率評估比較表。

測試植物物種	P. 16	P. 15	MSU3	K2
紅鳳菜	30 ^d	30 ^c , 50 ^d	20 ^c , 70 ^d	90 ^b
洛神花	-	20 ^c , 50 ^d	10 ^c , 30 ^d	20 ^d
黃蓮	-	-	-	20 ^d
薑黃	-	-	10 ^d	20 ^d
甜菜	20 ^b , 80 ^c	30 ^b , 90 ^c	10 ^c , 40 ^d	60 ^c , 90 ^d
滇紅	10 ^d	30 ^b , 90 ^c	40 ^c , 80 ^d	20 ^c , 50 ^d

(續)表1 8種不同脫色菌株分別對6種食用性植物萃取液之脫色效率評估比較表。

測試植物物種	KB23	NIU01	YT11	WLP72
紅鳳菜	60 ^b , 90 ^c	30 ^c , 70 ^d	50 ^b , 90 ^c	40 ^b , 90 ^c
洛神花	20 ^d	40 ^d	10 ^c , 50 ^d	20 ^c , 70 ^d
黃蓮	10 ^d	10 ^d	10 ^d	20 ^d
薑黃	-	-	-	30 ^d
甜菜	20 ^c , 70 ^d	30 ^b , 80 ^c	50 ^b , 90 ^c	60 ^b , 90 ^c
滇紅	20 ^c , 60 ^d	50 ^b , 90 ^c	40 ^c , 70 ^d	20 ^b , 90 ^c

*數字表脫色率(%)

^a搖瓶12 hr

^b搖瓶12 hr後靜置12 hr

^c搖瓶12 hr後靜置24 hr

^d搖瓶12 hr後靜置36 hr

因此推斷6種植物萃取液中，以紅鳳菜、甜菜屬於較易脫色者。事實上，文獻亦提出紅鳳菜及洛神花色素成分含花青素[7]，甜菜則含甜菜紅成分[8]而且由脫色效果而論，發現菌株WLP72，YT11具有較佳的脫色效果。例如：WLP72與YT11在紅鳳菜及甜菜脫色時皆可於搖瓶後靜置24hr內脫除90%以上，後續取紅鳳菜及甜菜脫色效率較高的菌株來進行循環伏安法測試(圖3、4)及搖瓶脫色試驗(圖7)，以推論其組合方法是否具有促進電子轉移及提昇脫色的代謝物質。另者，洛神花雖其色素成分亦可能含有花青素，但是可能由於植物萃取液過酸(經測得pH 2.63~2.83)，因此不僅不利於菌體生長，而且花青素在酸性條件下，亦可能其化學結構較穩定[9]，更不利生物降解，

因此導致脫色效果不佳。文獻[10, 11]指出薑黃因結構含有官能基團 β 二酮基，以及黃連中含有小蘗鹼氯化物，使其本身亦具有抗菌成分而抑制菌體生長，亦同時影響生物降解脫色能力，造成大部分菌株均無法對其有效脫色。

3.3. 天然植物脫色前後特性分析

(a) 甜菜之循環伏安圖比較

前述說明對甜菜脫色較佳之WLP72、16、YT11、15分別對甜菜脫色前後進行循環伏安(CV)測試，由各種圖比較可知皆不具有氧化還原峰(圖3)。

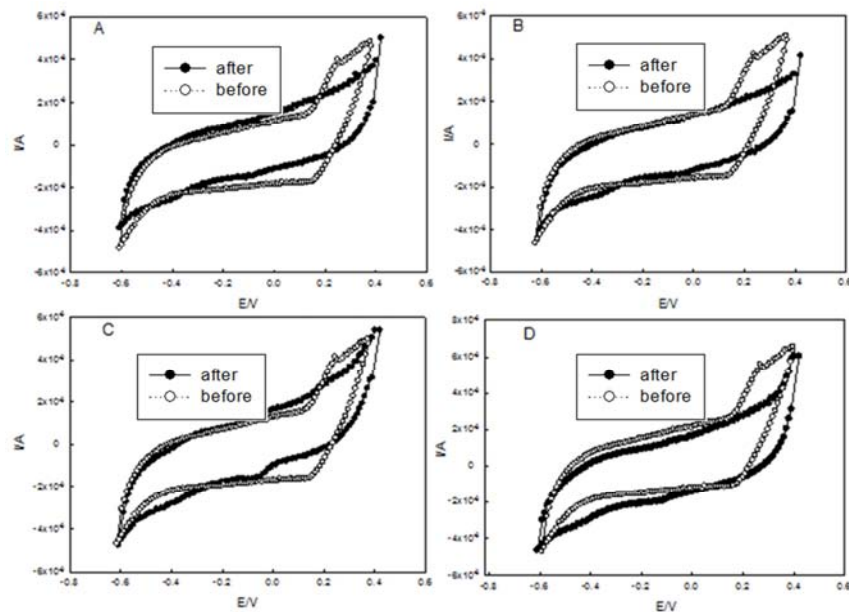


圖3 甜菜水萃取液分別以脫甜菜較佳菌株(A)WLP72、(B)16、(C)YT11、(D)15進行脫色前(before)後(after)之循環伏安圖譜比較(b)紅鳳菜之循環伏安圖比較。

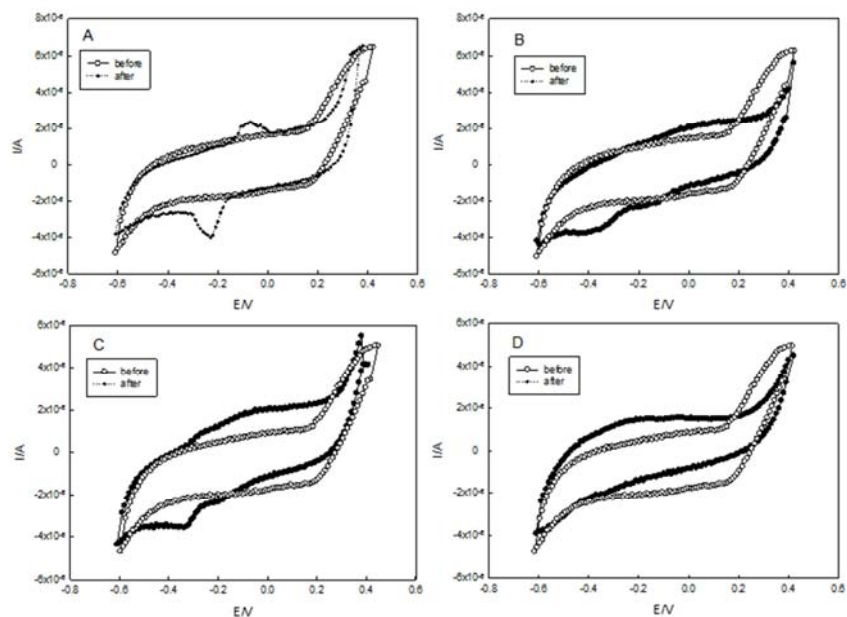


圖4 紅鳳菜水萃取液分別以脫紅鳳菜較佳之不同菌株(A)WLP72、(B)K2、(C)YT11、(D)KB23進行脫色前(before)及後(after)的循環伏安比較圖譜。

由(圖3)可知,甜菜萃取液在脫色前後,皆不具有顯著氧化還原峰,可推論即可進行脫色,亦不能具有促進電子轉移能力。由圖4就紅鳳菜脫色前後的循環伏安圖譜來看,則顯現出顯著差異。因此可知僅發現圖4A中 WLP72 菌株脫色後,才具有明顯的氧化還原峰,表示脫色代謝物確實可產生促進電子轉移的中間產物,反觀菌株K2, Y111 及KB23脫色後,皆不具有顯著之氧化還原峰,代表即便是同天然植物萃液在同樣脫色條件下,由於不同脫色菌株之代謝生理活性不同,其脫色產物亦有所不同,造成脫色產

物可能未必具有促進電子轉移的效果,因此可推論甜菜萃取脫色液,未必具有促進電子轉移的能力,這可能與脫色所產生之代謝物之化學物種差異有關(即是否有電子梭特性)。

總而言之,針對紅鳳菜脫色液具有氧化還原峰的特性(圖5)推測可能含有多酚鄰或對位雜原子可以產生醌或半醌自由基,然後形成 \dot{o} -或 \dot{p} 通過共振苯醌結構如下圖,因此可具有電子轉移中介體能力而提昇抗氧化及自由基的取代能力 [12]

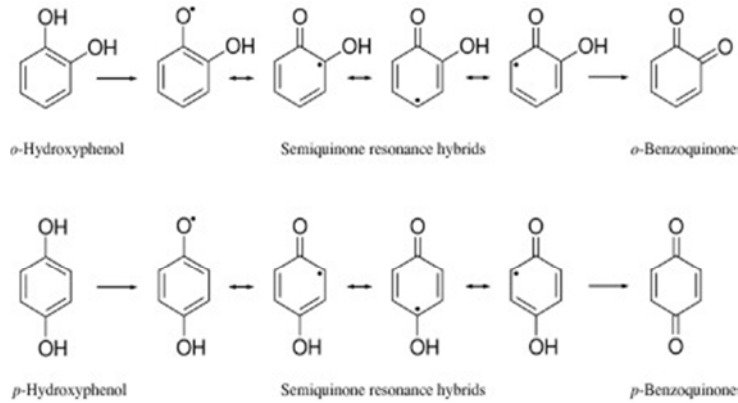


圖5. 鄰位與對位酚基形成醌類的機制可能是促使電子轉移的原因[13]。

3. 4. 劑量效應

即便具有氧化還原峰,就顯著電化學特性而論,亦有劑量之問題,一般在高於閾值下,方具有如此效能。因此進行劑量響應分析試驗,確實有其必要性。

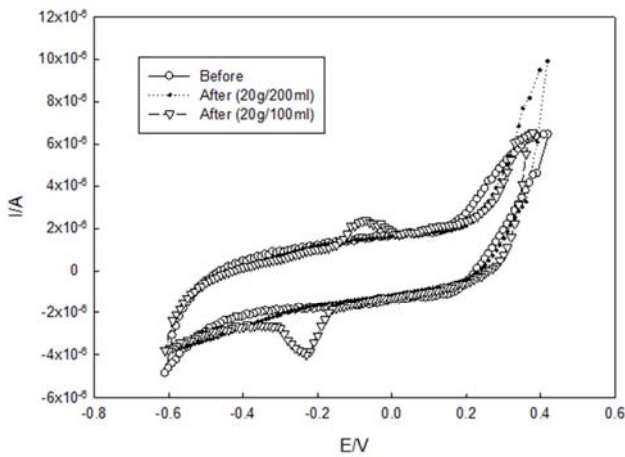


圖6 不同濃度紅鳳菜經WLP72脫色前Before及後After以(20g/100ml)及(20g/200ml)之劑量脫色CV圖譜比較。

由圖6中表示在不同劑量濃度 (20 g/200 ml、20 g/100 ml) 下分別對WLP72脫色紅鳳菜與未脫色之紅鳳菜 (20 g/100 ml) 進行循環伏安圖譜比較,可觀察到紅鳳菜的濃度與氧化還原特徵峰顯現程度間的關係,圖中更可發現氧化還原的特徵峰,只出現在較高濃度(20 g/100 ml)下,且需要脫色後,才具有氧化還原特性亦即紅鳳菜的濃

度必須高於一定臨界濃度(20 g/100 ml)以上,才會顯現出來明顯氧化還原峰特性。

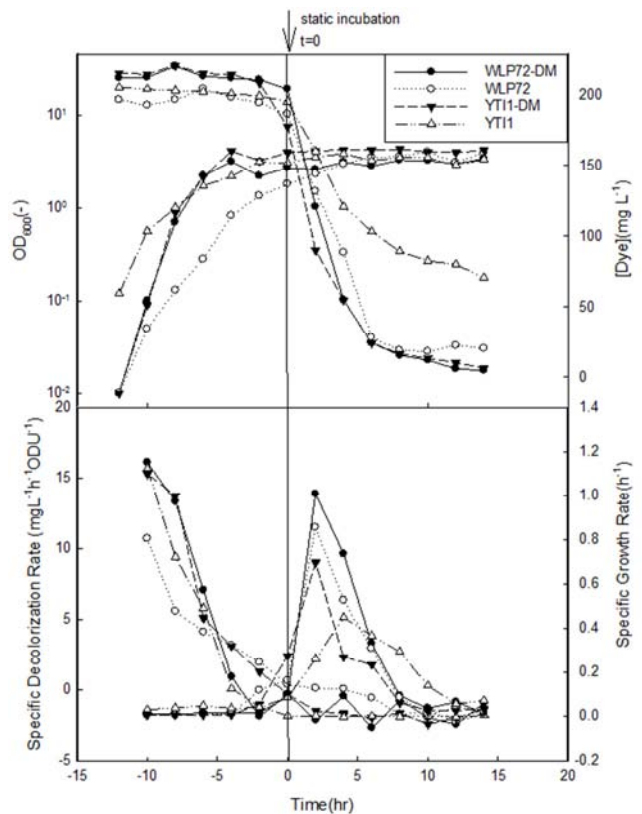


圖7 添加脫色後紅鳳菜DM於不同菌株WLP72及Y111對RBk5之脫色及菌體生長曲線圖。

針對具氧化還原峰特性之紅鳳菜脫色液，分別添加於染料RBk5進行脫色比較試驗，其中YT11對RBk5之脫色及菌體生長曲線比較由SDR ($\text{mgL}^{-1}\text{h}^{-1}\text{ODU}^{-1}$) 比較可看出WLP72-DM (13.85) > WLP72 (11.47) > YT11-DM(9.00) > YT11 (5.13)。可發現加入紅鳳菜的脫色代謝物(DM)可促進脫色，使WLP72菌株速率提升20.69%及YT11速率提升75.29%，而脫色機制與電子轉移有關，可證實紅鳳菜得脫色代謝物確實有提高電子轉移的能力，使其脫色效率提升。

3.5. 紅鳳菜脫色代謝物與抗氧化機制

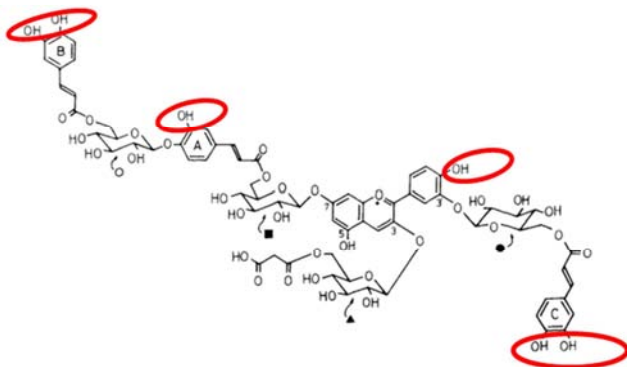


圖8 紅鳳菜內含花青素的分子結構[14]。

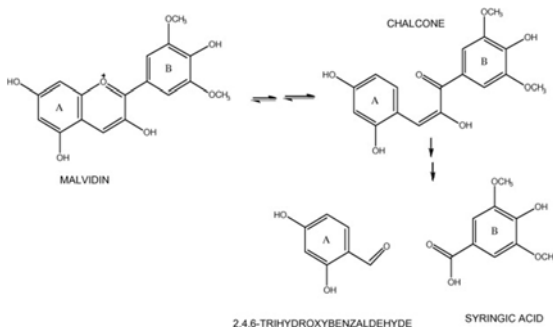


圖9 花青素的降解形成醛和酚酸[15]。

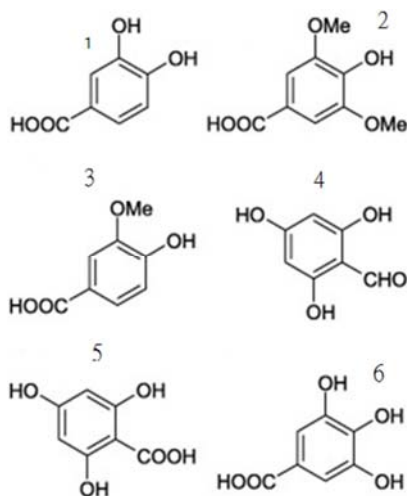


圖10 花青素經菌株生物降解後其代謝物的結構：(1)兒茶酸，(2)丁香酸，(3)香草酸，(4)間苯三酚醛，(5)間苯三酚酸，(6)沒食子酸[16]。

為解釋紅鳳菜脫色液為何具有氧化還原特性，可由文獻中來推測可能原因。紅鳳菜萃取液經菌株生物降解後，其成分可能為酚類化合物(圖9)，其該結構大多含有羥基或甲氧基取代基，故有較高的抗氧化力，另外文獻指出其代謝物中，苯環結構上的酚羥基有顯著的抗氧化貢獻，是由於其官能基易形成一個較高的穩定性的類黃酮-酚氧(aroxy)自由基[17]，而該結構也參與電子的轉移，這可能為紅鳳菜脫色代謝物具有氧化還原特性峰的原因。另外酚類化合物中(例：沒食子酸圖10-6)的分子結構中含連苯三酚，有較佳的抗氧化活性[18]。含有更低的O-H鍵解離焓(BDE)，便於氫轉移[19]而達到促進電子轉移，並提升脫色效率。而文獻 [16]指出蔬果中所含的花青素，在菌群生物降解後，不僅不會破壞其抗氧化能力，反而因降解而生成單體酚類分子與甲氧基衍生物，而提升其抗氧化能力，所以這可能是氧化還原的特徵峰，只出現於紅鳳菜脫色代謝物(WLP72-DM)的可能原因。故本研究懷疑促進抗氧化能力之連苯三酚($\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_3$)、鄰二羥基($\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$)與甲氧基(OCH_3)亦可能是電子轉移之主因，亦推測與電子核能力有關。

4. 結論

本研究發現紅鳳菜的萃取液經WLP72菌株進行脫色，其脫色代謝物具有氧化還原峰，能有效促進電子轉移，提高脫色。若利用脫色篩選方法來評估是否有可產生促進電子轉移脫色代謝物能力的天然植物及菌株，研究中亦發現紅鳳菜的濃度必須高於臨界濃度以上，才能使其脫色代謝物具有有效促進電子轉移之能力。後續研究將探討其他可行之天然植物，是否亦有可能促進電子轉移及脫色的能力，並與紅鳳菜進行相互比較來定義最佳化之應用條件。

致謝

感謝科技部計畫：以東北部台灣本土生物資源應用於功能性生物技術之可行性研究(MOST 102-2221-E-197 -016 -MY3, MOST 104-2622-E-197 -006 -CC3)之經費補助。

參考文獻

- [1] J. Q. Lian, K. Han, P.L. Yueh, C.C. Hsueh, B.Y. Chen. Interactive influences of decolorized metabolites on electron-transfer characteristics of microbial fuel cells. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 2016, pp. 297-304.
- [2] M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125, pp. 288-306.
- [3] L. Lu, M. Qiang, F. Li, H. Zhang, S. Zhang. 2014. Theoretical investigation on the antioxidative activity of anthocyanidins: A DFT/B3LYP study. *Dyes and Pigments*, 103, pp. 175-182.

- [4] A. Rashidi. 2016. Antiradical and reductant activities of anthocyanidins and anthocyanins, structure - activity relationship and synthesis. *Food Chemistry*, 194, pp.1275-1282.
- [5] B. García, J. Castillo, J Lorente, A Ortuño, J.A. Del. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68, pp. 457-462.
- [6] B.Y. Chen, W.-M. Chen, H.Y. Kuo, C.C. Hsueh. 2009. Comparative assessment upon dye removal capability of indigenous bacterial strains from Lanyang Plain in northeast Taiwan. *Journal of Hazardous Materials*, 161, pp. 526-533.
- [7] Y. S. Imada, H. Zhang , R. Tanaka , Tomomichi Ohno and Koichiro Shimomura. 2010. Identification of Novel Poly-Acylated Anthocyanins from *Gynura bicolor* Leaves and Their Antioxidative Activity. *Food Science and Technology Research*, pp. 16, 479-486.
- [8] B. Nemzer, Z. Pietrzkowski, A. Spórna, P. Stalica, T. Michałowski, S. Wybranie. 2011. Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food Chemistry*, 127, pp. 42-53.
- [9] Igarashi, K., K. Takanashi, M. Makino, and T. Yasui. 1989. Antioxidative activity of major anthocyanin
- [10] T. Ak, İ. Gülçin. 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions*, 174, pp. 27-37.
- [11] H.D. Jang, K.S. Chang, Y.S. Huang, C.L. Hsu, S.H. Lee, M.S. Su. 2007. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. *Food Chemistry*, 103, pp. 749-756.
- [12] M. Friedman, H.S. Jurgens. 2000. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agric Food Chem.*, 48(6), pp. 2101-10.
- [13] R. Farhoosh, S. Johnny, M. Asnaashari, N. Molaahmadibahraseman, A. Sharif. 2016. Structure - antioxidant activity relationships of o-hydroxyl, o-methoxy, and alkyl ester derivatives of p-hydroxybenzoic acid. *Food Chemistry Volume 194*, pp. 128 - 134
- [14] Y. S. Imada, H. Zhang , R. Tanaka, Tomomichi Ohno and Koichiro Shimomura. 2010. Identification of Novel Poly-Acylated Anthocyanins from *Gynura bicolor* Leaves and Their Antioxidative Activity. *Food Science and Technology research*, 16, pp. 479-486.
- [15] M. Ávila, M. Hidalgo, C.S. Moreno, C. Pelaez, T. Requena, S.P. Teresa. 2009. Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*. *Food Research International*, 42(10), pp. 1453 - 1461.
- [16] K. Keppler, H.U. Hump. 2005. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(17), pp. 5195 - 5205
- [17] W. Bors , W. Heller, C. Michel, M. Saran. 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.*, 186, pp. 343-55.
- [18] H.M. Ali, W. Almagribi, M.N. Rashidi. 2016. Antiradical and reductant activities of anthocyanidins and anthocyanins, structure - activity relationship and synthesis. *Food Chemistry*, 194, pp. 1275 - 1282
- [19] F. Shahidi, P. Ambigaipalan. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects. *Journal of Functional Foods Part B*, 18, pp. 820 - 897.