

Feasibility Study on Applications of Fermented Tea Extracts for Bioenergy and Biorefinery

An-Wei Hsu, 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, Chung-Chuan Hsueh, Bor-Yann Chen. Feasibility Study on Applications of Fermented Tea Extracts for Bioenergy and Biorefinery. *Science Discovery*. Vol. 5, No. 3, 2017, pp. 174-178. doi: 10.11648/j.sd.20170503.13

Received: January 20, 2017; **Accepted:** May 5, 2017; **Published:** May 11, 2017

Abstract: As known, tea contained abundant antioxidant compositions significant to human health due to major components of polyphenols and Flavonoids. Prior studies indicated that -OH substituent-rich aromatic compounds could have electron shuttling capabilities for bioenergy recycling. Thus, it was suspected that antioxidant compositions would be crucial to bioelectrochemical characteristics to be expressed. Prior studies also revealed that decolorized intermediates evidently could enhance redox-mediating capabilities. Thus, it was suggested that such capabilities should be strongly associated to antioxidant and electron-transfer characteristics. For sustainable development, using naturally-present/generated and environmentally compatible plants as precursor(s) for further applications of recycling and reuses is more ecologically appropriate. Thus, this feasibility study tended to use myriads of fermented tea extracts for comparative study of bio-electrochemistry. Meanwhile, exploration of contents of antioxidants could provide further perspectives for applications in biofuel cells and functional foods. The findings also suggested that highly fermented tea extract would exhibit less electron-shuttling capabilities due to less content of polyphenolics remained in tea residues. In fact, this result was in parallel with the capabilities of antioxidants as revealed in literature. This findings could be used for diverse applications in bioenergy and biorefinery.

Keywords: Antioxidant, Electrochemistry, Electronic Shuttle, Bioenergy, Biorefinery

發酵茶葉於生物能源及生物精煉上之可行性研究

許安瑋, 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: 眾所皆知, 茶葉具有益於人體健康之抗氧化物成分, 主要是由多酚和類黃酮分子構成之抗氧化成分。先前研究指出含-OH官能基之芳香族化合物可能具有電子梭之中介能力, 可用於生物能源再利用之應用上。因此推論可能存在著抗氧化成分及生物電化學相關特性。先前研究更指出染料脫色中間物確實可提升電子傳遞之能力, 因此合理推論此種性質可能與其抗氧化性等電子傳遞作用有所關聯。但隨著綠色永續環保意識的抬頭, 選擇天然綠色環境生態相容之可食用性植物作為前趨物原料, 更可有利於後續能源再利用精煉。因此本研究嘗試對多種不同發酵程度茶類進行生物電化學評估比較分析, 以及對抗氧化活性之相關評估研究, 以利於後續深入評估應用於生物電池與醫藥及保健食品之相關領域上。本研究發現茶類發酵程度越高實不利於電子傳遞特性之表達, 此點與文獻中指出之抗氧化活性平行正相關, 主要原因可能在於含有較低之多酚類化合物所致。此結果可應用於生物能源及生物精煉上。

关键词：抗氧化物，電化學，電子梭，生物能源，生物精煉

1. 引言

文獻[1]中指出與電化學活性相關聯之抗氧化能力與電子梭能力可能是電子轉移相關之特性。先前研究[15]發現含-OH及-NH₂化學物質可具有能促進脫色及生物產電之電子梭能力，而且富含多酚類化合物之可食用性植物類，極可能具有生物電子梭特性。因此基於環境生態友善性之永續考量，自天然可食用植物中篩選出類似電子梭特性之相關物質，已是目前綠色環境生物技術及能源生物發酵製程上極重要之研究課題。另有文獻指出中國歷史悠久之茶葉飲品更富含有多酚及類黃酮類等抗氧化物成分存在，可能具提神清腸整胃作用[2, 3]。再者，電化學分析研究更指出含兒茶素之茶葉，亦具有氧化還原峰之電子梭特性[4, 5, 6]，因此合理懷疑天然中草藥所含的色素可能亦是電子移轉之發色基團，且具有人體需要的營養物質或可能具有豐富的藥膳作用，例如：綠茶、滇紅與普洱等常見茶類，其富含天然多酚、黃酮化合物被認為可能是促進健康的植物化學物質，就因其(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[2, 3]。再者，當單一分子之茶類化合物經微生物分解，亦可能產生更多具有電化學特性衍生之酚類化合物分子，因此亦可能有更高之生物電化學特性。本研究尤其對不同發酵程度的茶葉進行相關抗氧化與電化學研究，並篩選可能具有抗氧化能力的茶葉，以利於進行後續應用於保健食品之相關領域。本初考研究結果指出茶葉之發酵程度對其產生之電化學特性影響極鉅。更發現抗氧化活性與電子梭特性，實質上是彼此平行正相關的，此發現更可用於生物能量及生物精煉之相關綠色永續之應用上。

2. 材料與方法

2.1. 茶葉萃取(水萃與酒萃)

就永續發展而言，茶葉由於是歷史悠久且低生物毒性之天然飲料來源，因此評估其再利用之可行性更加重要。為利於評估，本研究先取定未使用過之茶葉來進行評價。首先將不同發酵程度的茶葉，例如：綠茶(*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)、普洱茶(*Camellia assamica* (Mast.) Chang)、滇紅(*Camelliaboreali-yunnanica*)，先取新鮮2.5g 切碎磨細，分別溶於50mL的50%乙醇溶液(Ethanol extract)與50mL的蒸餾水(Water extract)兩種萃取劑中，浸泡30分鐘，再以減壓濃縮在65℃下煮沸2小時，進行抽氣過濾，取其萃液，再以去離子水將其定量至50mL，以利後續評估分析。

2.2. 循環伏安法

將茶葉萃取液以氮氣去氧曝氣15分鐘，後掃描1.5V到-1.5V，速率為10mV·s⁻¹。由於茶葉本為多元複方之混合物，因此以六次掃描觀察是否具有氧化還原峰，再將具

有此特性之樣品，再進行循環伏安100圈以觀察其峰隨時間是否具有可逆性穩定變化趨勢。之後再比較微生物脫色前後之電化學特性變化差異，以利於比較分析。

2.3. 菌株前培養

本研究取定研究室自行篩選具有降解脫色偶氮染料能力之菌株，*Shewanella haliotis* WLP72, *Aeromonas* sp. NIU01，加入經滅菌後LB培養基配成之培養液(25 g L⁻¹)，再將菌株分別加入培養液中，進行兩次活化12小時之搖瓶前培養馴化，以利後續微生物降解研究。為檢測其天然植物降解代謝物是否可具有促進生物產電之能力，將活化後的株菌菌液取1ml及茶葉萃取液50ml，加入含50 ml，兩倍之LB(1:1 V:V)稀釋後搖瓶培養，再以30℃、125 rpm條件下搖瓶培養12小時後，開始靜置20 hr以上使其萃液，在厭氧條件下進行微生物降解，以用於後續電化學分析試驗。

2.4. 微生物電池-交流阻抗與極化曲線

本研究為確認其茶葉萃取液是否具有促進電子轉移能力有效增進產電功率，故藉由微生物燃料電池為平台來檢測其功效。在電池達到穩定電壓輸出後，使用線性伏安法以進行極化曲線來量測[7]。以WLP72殖種之微生物電池在電化學量測前先量測量開路電壓(即無外電阻條件下之電壓值)，並以開路電壓值作為電位掃描之極值，並作慢速掃描(即掃描速率(scan rate) ≤ 1 mV s⁻¹)以獲得極化曲線之數據，極化曲線的量測範圍在0CV~0V之間，掃描速率為1 mV s⁻¹，而輸出功率、功率密度及電流密度的計算可由 $P=U^2/R=IU/A$ (A為電池陽極面積)來求得。

利用電化學交流頻譜儀(HIOKI 3522-50, Japan)以測量MFCs交流阻抗頻譜(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)，以二極法MFCs陽極為工作電極，陰極為參考電極與輔助電極[9]，在穩定電壓輸出的開路條件下，頻率為10⁴至5×10³ Hz進行正弦擾動振幅為10.0 mV [8]。以獲得的阻抗圖(EIS curve)與x軸的截距則為實際阻抗(real impedance, Z_{re})，可作為電解質電阻(electrolyte resistance, R_{ele})；而阻抗圖中的曲線在x軸交點後的曲線投影長度是反應動力電阻(kinetic resistance)與質傳電阻(diffusion resistance)之和(R_{kin} + R_{diff})將三者總和值則為電池內阻R_{in}(R_{elec}+R_{kin}+R_{diff})藉由總和電阻以瞭解茶葉萃取液對電池內阻之影響[9, 10]。

2.5. DPPH抗氧化試驗

取0.666mL的1mMDPPH(溶於95%酒精)的等分試樣溶液加入石英比色杯中，然後加入0.333mL不同濃度的茶葉萃取液。在室溫下避光30min後，在515nm測定吸光度。定義對應於DPPH自由基清除的百分比的清除能力可由下式估算測定：

$$\text{DPPH radical scavenging} = \left[1 - \frac{(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

其中 $\text{ABS}_{\text{sample}}$ 是DPPH與萃液之間經30min反應後的吸光度， $\text{ABS}_{\text{blank}}$ 是空白（0.333毫升的萃液和0.666毫升溶劑）而 $\text{ABS}_{\text{control}}$ 的吸光度是（0.333毫升溶劑和0.666mL的DPPH溶液）（標準方法詳見[11]）。

利於生物電化學特性之表達。此點與文獻上指出高發酵程度實不利於多酚類化合物之存在亦有所關聯。後續會試驗不同菌株對不同發酵程度茶葉的電化學影響，以及生物能源及電化學啟動發酵及生物精煉之永續應用研究上。

3. 結果與討論

3.1. 茶葉萃取方法評估

首先評估不同萃取方法（水萃與酒萃）是否對茶萃取效果有所影響，何者方能萃取出較高含量之多酚類成分，以利於後續促進電子移轉相關評估研究。首先將水萃與酒萃的茶葉萃取液分別進行循環伏安法測試，來確認是否具有促進電子轉移的氧化還原峰。由圖1可發現無論是水萃或是酒萃皆具有促進電子轉移的氧化還原峰，但是水萃顯然更優於酒萃，具有較顯著的氧化還原峰，其原因可能為水浴萃取能提取較多較親水之酚類分子，另外酚類結構式中含有一OH鍵，因此較易親水形成氫鍵而溶解，故對水溶解度高，後續萃取皆採用水浴萃取為標準作業程序。

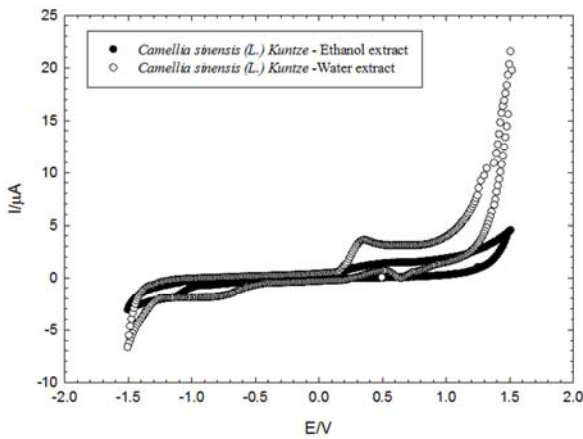


圖1 綠茶水萃與酒萃的循環伏安圖的比較。

3.2. 微生物降解茶葉萃取液之電化學評估

由於茶葉之品質差異可能在於發酵程度，因此為評估各種不同發酵程度茶葉萃取液經微生物轉化後是否具電子梭之特性以促進電子轉移。先將茶葉萃取液與經WLP72希瓦氏菌微生物處理後之茶葉萃取液分別進行循環伏安法測試，來觀察是否具有或增加促進電子轉移的氧化還原峰大小。結果顯示（圖2）經過微生物處理後的萃液皆優於未經微生物處理，文獻指出[12]經微生物處理後各種大分子的茶多酚(tea polyphenols)會轉變為各種沒食子酸和其他單體酚類化合物，這些單體酚類具有更多可用的羥基，不僅可用於增加抗氧化能力，其貢獻質子的能力更可促進電子轉移[13]，（如圖3所示），而且未發酵茶綠茶（*Camellia sinensis* (L.) Kuntze）優於全發酵茶普洱茶（*Camellia assamica* (Mast.) Chang）與滇紅（*Camelliaboreali-yunnanica*）。代表發酵程度越高實不

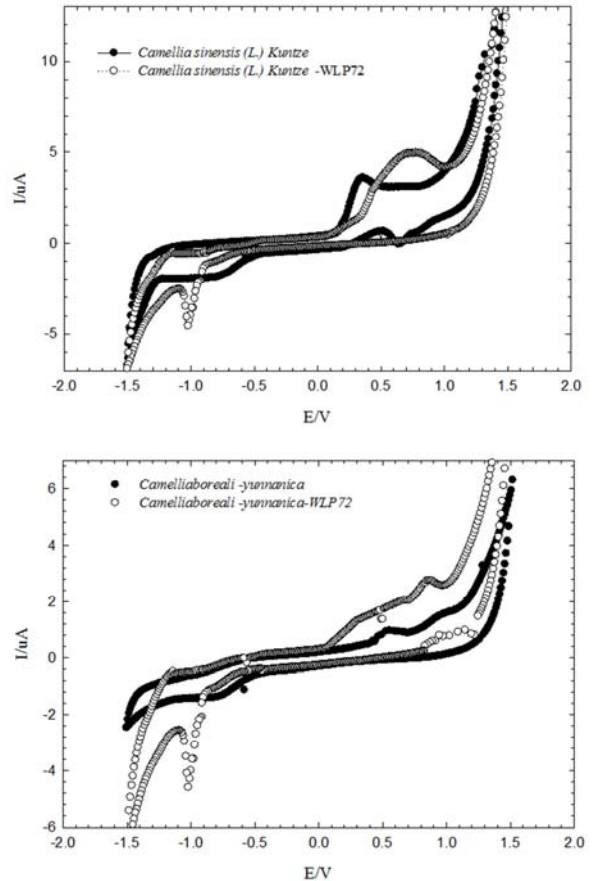


圖2 Shewanella sp (WLP72) 菌株處理前後的綠茶(*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)和紅茶(*Camelliaboreali-yunnanica*) 萃取物的循環伏安圖的比較。

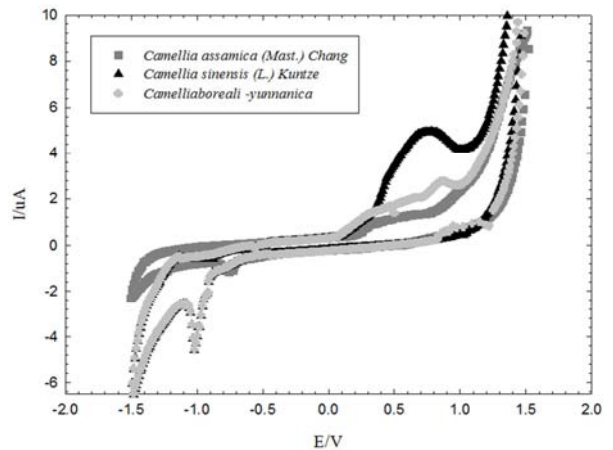


圖3 不同發酵程度茶葉（綠茶、普洱茶、滇紅）萃取液經希瓦氏菌WLP72微生物處理前後的循環伏安圖比較。

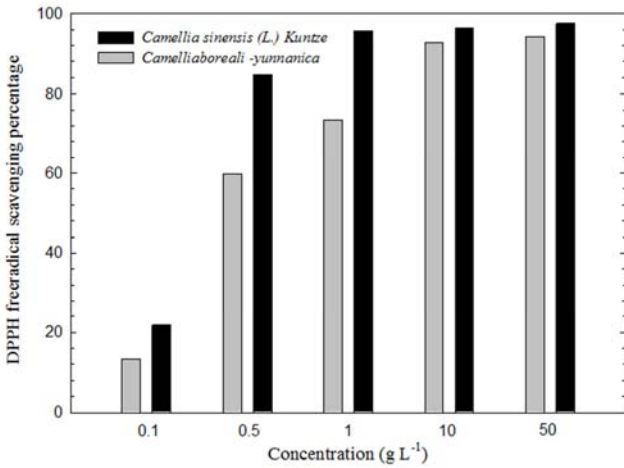


圖4 不同濃度(0.1、0.5、1、10、50g L⁻¹)的茶萃物(綠茶、滇紅)在30分鐘內，1mM濃度的DPPH溶液中其自由基清除率。

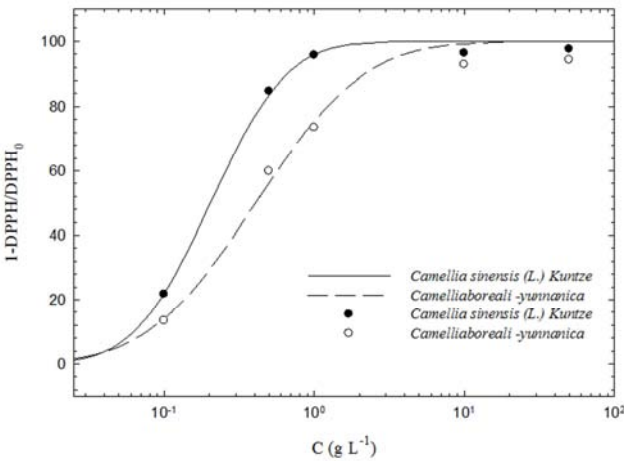


圖5 不同濃度(0.1、0.5、1、10、50g L⁻¹)的茶萃物(綠茶、滇紅)在30分鐘時之清除DPPH自由基的劑量反應曲線比較圖。

3.3. 茶葉萃取液-抗氧化能力評估

為確定抗氧化與電子轉移之關聯性，故將不同濃度(0.1、0.5、1、10、50g L⁻¹)的綠茶與滇紅萃取液進行清除DPPH自由基的抗氧化能力試驗，由圖4可看出當茶萃液濃度增加，隨著多酚類化合物濃度增大，其DPPH自由基之清除效率亦隨之上升。圖5及表一更指出以茶葉在約0.2~0.4g L⁻¹即具EC₅₀之清除效果，由B值大於1更可看出茶葉自由基清除效果是相當有效的。而且未發酵茶(綠茶)無論在何種濃度下其抗氧化能力皆優於發酵茶(滇紅)，圖五之劑量響應曲線亦明顯指出綠茶(位於右邊之曲線)具較高之抗氧化消除活性(EC₅₀: 0.203g L⁻¹(綠茶) < 0.408 g L⁻¹(滇紅))，兩者之響應曲線方程式分別為 $Y=6.74+2.51 \log Z$ (綠茶) $Y=5.69+1.77 \log Z$ (滇紅) (評估方法詳見文獻[14])，而該結果也與預期猜測具有較強氧化還原電子梭特性之茶葉其抗氧化能力也越強相符，其原因可能為抗氧化是電子轉移的過程，而具有較強電子梭特性的茶葉其電子轉移能力也更強，故兩者之間為正相關之趨勢，代表富含多酚化合物之抗氧化活性確實具有電化學特性。

表1 以“自由基清除”為評價指標定義出之劑量響應關係式及有效濃度劑量(單位: g L⁻¹)比較。

	EC ₀	EC ₂₀	EC ₅₀	Y=A+B log Z
綠茶	0.022	0.094	0.203	Y=6.74+2.51 log Z
滇紅	0.017	0.137	0.408	Y=5.69+1.77 log Z

3.4. 茶葉萃取液-交流阻抗與級化曲線(MFC)

表2 微生物染料電池添加不同發酵程度茶葉之交流阻抗。

MFC condition	R _{elec} (Ω)	R _{kin} +R _{diff} (Ω)	Total R _{in} (Ω)
Blank	11.95	461.90	473.85
Camellia sinensis (L.) Kuntze	11.76	314.53	326.29
Camellia assamica (Mast.) Chang	14.59	452.32	466.91

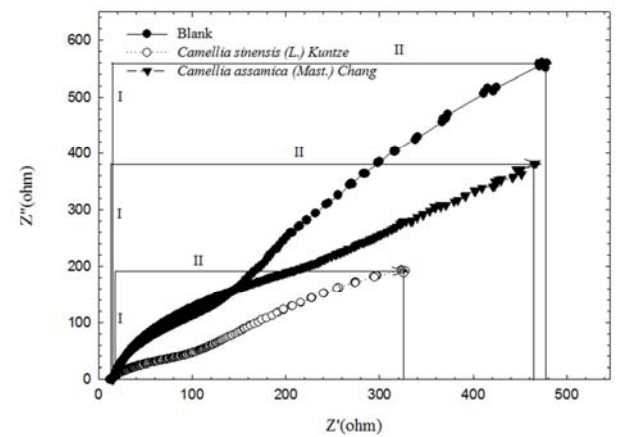
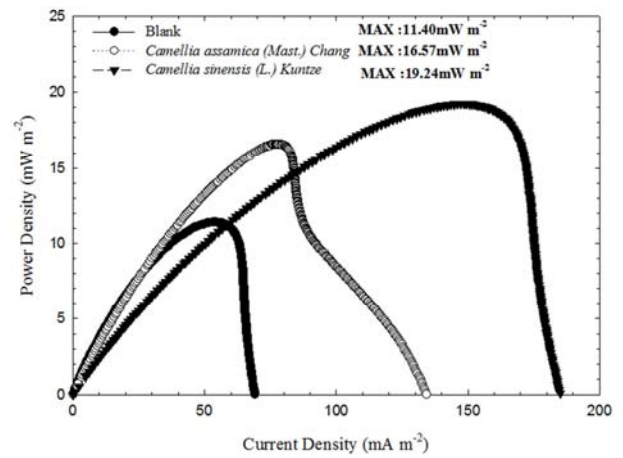


圖6 以WLP72殖種之微生物燃料電池來評估之綠茶與普洱極化曲線與交流阻抗圖(內)。

再者，圖6更可看出當隨添加不同發酵程度的茶葉後，其功率密度由原本未添加之11.40 mW m⁻²提升至16.57 mW m⁻²(普洱茶 *Camellia assamica (Mast.) Chang*)及19.24 mW m⁻²(綠茶 *Camellia sinensis (L.) Kuntze*)，可看出添加茶葉萃取液皆能使其功率密度提升越多，尤其是未發酵茶葉(綠茶 *Camellia sinensis (L.) Kuntze*)更為顯著。

然而圖五與表2可得知，其交流阻抗則會隨著添加之茶葉萃取液而降低，且發酵程度越低其降低交流阻抗的能力越強。事實上，文獻中即指出

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603000669>) 未發酵茶中與半發酵茶富含聯苯三酚基團(pyrogallol groups)與兒茶酚(catechol)和沒食子酸酯基團(gallate groups)等促進電子轉移的成份,而發酵茶則因為發酵製程的原因,可能將各種多酚(polyphenols)轉變為茶黃素(theaflavins)進而降低促進電子轉移的功效。因此未來在運用於食品保鮮或是在生物能量及精煉上,宜取用低發酵茶,其抗氧化及電子中介作用為最佳,更有利生物能源相關之生物精煉應用。

4. 結論

未經微生物降解處理的茶萃取物比較發現,電化學特性是綠茶>普洱。經WLP72微生物處理後更可顯示出具顯著電子轉移能力,代表茶萃取物確實可有效地表現氧化還原中介能力並刺激MFC發電,不過因發酵作用,茶可能會減弱茶萃取物的ES能力。進一步的研究將尋求具高富含ES之植物萃取物作為增強劑或刺激劑來刺激MFC和進一步的生物煉製應用中生物能源再利用,後續研究將探討電子梭性質表現之最佳條件(例如:萃取溫度與萃取環境,例如:pH、溫度等),並證明其能促進電子轉移與抗氧化能力之相關佐證,並定義最佳化之應用條件及可能應用之生物能源及精煉相關領域。

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 104-2622-E-197-006 -CC3, MOST 105-2622-E-197-012-CC3; MOST 105-2221-E-197-022)之經費補助。

參考文獻

- [1] B. Y. Chen, C. C. Hsueh, Deciphering Electron Shuttles for Bioremediation and Beyond. *American Journal of Chemical Engineering*, 4(5), 2016, pp. 114-121.
- [2] D. Zhao, N. P. Shah. Antiradical and tea polyphenol-stabilizing ability of functional fermented soymilk-tea beverage. *Food Chemistry*, 158(1), 2014, pp. 262-269.
- [3] G. Rusak, D. Komes, S. Likić, D. Horžić, M. Kovač. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110(4), 2008, pp. 852-858.
- [4] A. Masek, M. Zaborski, E. Chrzescijanska. Electrooxidation of flavonoids at platinum electrode studied by cyclic voltammetry. *Food Chem*, 127(2), 2011, pp. 699-704.
- [5] R. d. Q Ferreira, S. J Greco, M Delarmelina, K. C. Weber. Electrochemical quantification of the structure/antioxidant activity relationship of flavonoids. *Electrochimica Acta*, 163, 2015, pp. 161-166.
- [6] O Makhotkina, P. A Kilmartin. The use of cyclic voltammetry for wine analysis: determination of polyphenols and free sulfur dioxide. *Anal Chim Acta*, 668(2), 2010, pp. 155-65.
- [7] B. E Logan, J. M. Regan, "Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells," *Trends in Microbiology*, 14, 2006, pp. 512-518.
- [8] Y Zuo, D. Xing, J. M Regan, B. E Logan. Isolation of the Exoelectrogenic Bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by Using a U-Tube Microbial Fuel Cell. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(10), 2008, pp. 3130-3137.
- [9] Y Sharma, B Li, "The variation of power generation with organic substrates in single-chamber microbial fuel cells (SCMFCs)," *Bioresource Technology*, 101, 2010, pp. 1844-1850.
- [10] E. Katz, I Willner, "Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors," *Electroanalysis*, 15, 2003, pp. 913-947.
- [11] K. F. Gracy, F. Oliveir, T. Tormin, M. F. Raquel Sous, Alberto de Oliveir, Sérgio A. L. de Moraes, Eduardo M. Richter, Rodrigo A. A. Munoz. Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 192(1), 2016, pp. 691-697.
- [12] R. Tabasco, F. Sánchez-Patán, M. Monagas, B. Bartolomé, B. V. Moreno-Arribas, C. Peláez, T. Requena. Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism. *Food Microbiology*, 2011, 28(7), pp. 1345-1352.
- [13] Y. Yilmaz, R. T. Toledo. Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52 (2), pp. 255 - 260.
- [14] Bor-Yann Chen, Hsuan-Liang Liu, Yun-Wen Chen, Yang-Chu Cheng. Dose-response assessment of metal toxicity upon indigenous *Thiobacillus thiooxidans* BC1, *Process Biochemistry*, 39(6), 2004, pp. 737-748.
- [15] B. Y. Chen, C. C. Hsueh, S. Q. Liu, J. Y. Hung, Y. Qiao, P. L. Yueh, Y. M. Wang. Unveiling characteristics of dye-bearing microbial fuel cells for energy and materials recycling: Redox mediators, *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(35), 2013, pp. 15598-15605.