

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系

碩士論文

Department of Agricultural Chemistry, College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

大豆中 genistein、daidzein、genistin 及 daidzin

之分離程序及以 *Bacillus subtilis* BCRC 19679

進行生物轉換之研究

Studies on the isolations of genistein, daidzein, genistin and daidzin from
soybean and their bioconversions by *Bacillus subtilis* BCRC 19679

吳博元

Bo-Yuan Wu

指導教授：蘇南維 博士

Advisor : Nan-Wei Su, Ph.D.

中華民國 103 年 7 月

July, 2014



謝誌

想起從大三進實驗室到現在就就要離開實驗室，這三年多的快樂時光是我一輩子不會忘記的。最感謝的無非是蘇南維老師對我的諄諄教誨，在老師的身上學到不僅止於專業知識，更多的是與人相處的道理，老師說的話我都有聽進去，會謹記在心中；再者是師公李敏雄老師，感謝您指導出全系最棒的蘇老師，感謝您每次一針見血的提點和對實驗室無微不至的關懷，由衷的感謝。再次感謝中興大學陳錦樹老師、嘉藥科大鍾玉明老師、本校食科所鄭光成老師撥冗給予論文的建議及提點。感謝大同大學段國仁老師予我啤酒的製程研究基本知識，開啟我對酒類研究濃厚的興趣。感謝金門大學賴盈璋教授對於金酒計劃的用心指導，著實感激不盡；感謝實踐大學劉麗雲老師、弘光大學林麗雲老師大力幫助執行金酒計劃。感謝中臺科大劉伯康老師給予我豐富的感官品評知識。感謝衛福部研檢組的大哥大姐們，包括曾素香科長、陳石松大哥、許哲綸大哥、傅偉銘學長、郭景豪大哥、江靜芸學姐，在你們身上學到許多專業知識，且每次面臨實驗問題你們也都給予實質上的幫助，著實感謝你們。

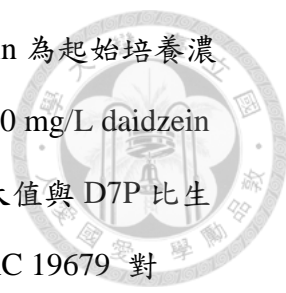
關於本研究室的成員們，我對你們的喜歡無法言喻，感謝總是笑咪咪的偉如猶如我的人生導師，感謝上達與許宸如兄弟般的存在，感謝廷方及凱強對我如母親般的細心照料，碩二的佳穎、偉晴、文韻，老師就交給你們了，不要把老師搞瘋；碩一的玉喜、玉萱你們要繼續加油喔！額外感謝竹丸、琇霞、玠錡、昱圻學姐、曉雯學姐以及劉媽，感謝你們把實驗室維持的這麼好並給我們良好的技術傳承。感謝廷浩、祖祺、嫵婷、明慧、承翰、育歆、日皓、博謙、韋欣，有你們的陪伴，使我的碩士生活增色許多。而在這學習旅途上，身旁兩個兄弟政勳及裕仁，感謝你們總是在我身邊攜伴著我，第三個兄弟柏嘉感謝你這六年來的不離不棄，沒有你們這幾個兄弟支撐著我，也許我也走不了這麼遠。感謝一直陪在我身邊的晉平，用你最包容的心保護著我，也在實驗忙碌期間給予我最多的時間及空間，沒有任何抱怨，只是靜靜的陪著我，內心滿滿的感謝。

最後，我將這篇論文僅獻給養育我長大的爸媽，有國及玉朱，感謝你們栽培我長大成人，使我在人生的道路上沒有走偏，你們的辛苦我和政餘都看在眼中也疼在心中，養育之恩無以回報，但求你們能夠身體健康，讓我這兒子好好照顧你們。

中文摘要



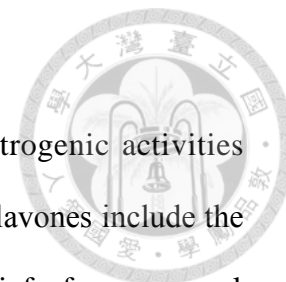
許多研究指出大豆異黃酮具有保健生理活性，為天然的植物雌激素。已知大豆中異黃酮可分為四類共 12 種化合物，含量最高的為 malonylglucoside 形式之異黃酮，其次為 glucoside 形式之異黃酮，而 aglycone 形式的含量最少。本研究室先前篩選得到 *Bacillus subtilis* BCRC 19679 菌株，可將 genistein、daidzein、genistin 及 daidzin 轉化成水溶性佳之 Genistein-7-O-phosphate (G7P) 和 Daidzein-7-O-phosphate (D7P)，推測能有效改善兩種異黃酮的生物可利用率。本研究室先前的研究係利用混和物形式進行轉化，對各別異黃酮的生物轉換尚未明瞭。本研究旨在探討 *Bacillus subtilis* BCRC 19679 對個別異黃酮生物轉化的情形，實驗分為兩部分，其一為製備 genistein、daidzein、genistin 及 daidzin 之回收程序，用以做為生物轉化之原料。另一為探討 *Bacillus subtilis* BCRC 19679 對上述異黃酮的生物轉化情形。結果顯示，中性氧化鋁可有效分離 genistein 及 daidzein。經由本研究建立的程序，可由原料(genistein : 56 %，daidzein : 26 %) 分離出 genistein (純度 : 95 % ; 回收率 : 89 %) 及 daidzein (純度 : 92 % ; 回收率 : 94 %)。鈣離子沉澱法可有效分離 genistin 及 daidzin。可由原料 (genistin: 38 %，daidzin: 8 %) 得到 genistin (純度 : 92 % ; 回收率 : 86 %) 及 daidzin (純度 : 91 % ; 回收率 : 92 %)。分離純化程序在本研究已在本研究中被建立。第二部分為分離出之各別異黃酮生物轉換之探討：*B. subtilis* BCRC 19679 對 genistein 有良好轉換效率，於 500-2000 mg/L 濃度區間，轉換率即大於 90%。比轉換速率的最大值 $1890 \mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 發生於以 500 mg/L genistein 為起始培養濃度、轉換 6 小時。G7P 生成濃度最大值 $6700 \mu\text{M}$ 發生於以 2000 mg/L genistein 為起始培養濃度，轉換 48 小時，轉換率達到 92 %。比生長速率最大值與 G7P 比生成速率有正相關性，屬於菌體連動型發酵模式。*B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzein 有良好的轉換效率，於 480-940 mg/L 濃度區間，轉換率即大於 90 %。



比轉換速率的最大值 $1400 \mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 發生於以 $1400 \text{ mg/L daidzein}$ 為起始培養濃度、轉換 6 小時。D7P 生成濃度最大值 $4800 \mu\text{M}$ 發生於以 $2800 \text{ mg/L daidzein}$ 為起始培養濃度；轉換 48 小時，轉換率 43%。比生長速率最大值與 D7P 比生成速率無連動性，屬於非菌體連動型發酵模式。*B. subtilis* BCRC 19679 對 genistin 有良好的轉換率，於 $1600\text{-}2400 \text{ mg/L genistin}$ 濃度區間，轉換率即大於 90%。比轉換速率最大值 $340 \mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 發生於以 $1600 \text{ mg/L genistin}$ 為起始濃度、轉換 24 小時。genistin 會先轉換為 genistein 後，再轉換為 G7P，為兩段式轉換模式。*B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzin 之轉換率，於 $1540\text{-}1840 \text{ mg/L daidzin}$ 濃度區間，轉換率大於 70%。比轉換速率最大值 $230 \mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 發生於以 $1840 \text{ mg/L daidzin}$ 為起始濃度、轉換 24 小時。daidzin 會先轉換為 daidzein 後，再轉換為 D7P，為兩段式轉換模式，故可得知 *B. subtilis* BCRC 19679 同時具有水解 glucosidic isoflavone 及磷酸化 aglyconic isoflavone 的能力；所有以 glucosidic isoflavone 為基質的生物轉化組別皆有 succinyl agluconic isoflavone 的生成。

關鍵字：大豆異黃酮、daidzein-7-O-phosphate、genistein-7-O-phosphate、各別異黃酮、分離程序

Abstract



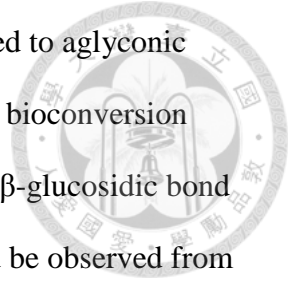
Soy isoflavones are the phytochemicals responsible for estrogenic activities observed *in vitro* and *in vivo* models. The beneficial effects of isoflavones include the reduction of serum lipids, increase of bone mineral density, relief of menopausal symptoms, and chemoprevention of mammary and prostate cancer and so on. A number of studies have revealed that the biological effects of isoflavones mainly attributed to their aglyconic forms rather than the glycosidic forms. However, aglycones have shown low bioavailability to humans due to their poor water solubility. In the previous work of our lab, a *Bacillus subtilis* strain designated as *Bacillus subtilis* BCRC 19679 showed the capability to convert daidzein and daidzin, as well as genistein and genistin into daidzein-7-O-phosphate (D7P) and genistein-7-O-phosphate (G7P). We considered that G7P and D7P could possess better bioavailability than aglyconic isoflavones. However, researches regarding individual isoflavone including genistein, genistin, daidzein and daidzin that was transformed by *B. subtilis* BCRC 19679 are still not clear. The objective of this study is to explore the biotransformation of individual isoflavone by *B. subtilis* BCRC 19679. The experimental works consist of two parts. One is to develop the isolation procedure of individual isoflavone for further studies, and the other is to investigate the kinetic biotransformations of the isolated isoflavone by *B. subtilis* BCRC 19679. The results show neutral aluminum oxide is a promising and good-performing adsorbent for the separation of genistein and daidzein from aglyconic isoflavone mixture. After performing the separation in accordance with our procedure, genistein with 89% of recovery and 95% of purity, and daidzein 94% of recovery and 92 % of purity could be obtained from the raw material of aglyconic mixture containing 56% of genistein and 26% of daidzein. Moreover, genistin and daidzin can be separated effectively from glucosidic isoflavone mixture by means of a calcium precipitation

process, and subsequently genistin with 86% of recovery and 92% of purity, and daidzin with 94% of recovery and 91% of purity could be obtained from the raw material of glucosidic mixture containing 38% of genistin and 8% of daidzin.

Regarding of the biotransformation of *B. subtilis* BCRC 19679 with each isolated isoflavone, the results showed that the bioconversion of daidzein and genistein have been going well with higher than 90% of conversion rate at the end of 48-h incubation with the concentration range of 500 to 2000 mg /L for genistein and that of 480 to 640 mg /L for daidzein. Moreover, for the specific conversion rate, the maximum value of 1890 $\mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ occurred at the 6th h culture broth with an initial concentration 500 mg/L of genistein, and 1400 $\mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ for daidzein, the same as occurring at the 6th h culture broth with an initial concentration 1400 mg /L of daidzein. Moreover, at the end of 48-h incubation with initial substrate levels of 2000 mg/L for genistein and that of 2800 mg/L for daidzein, the culture broth could contain maximum levels of 6700 μM for G7P and 4800 μM for D7P, respectively, The conversion rates for genistein and daidzein were 92% and 43% respectively. For the phosphorylation process with genistein by *B. subtilis* BCRC 19679, we observed specific growth rate was highly correlated to specific conversion rate, whereas this phenomenon did not be observed when daidzein was used as the conversion substrate.

For isoflavone glucosides, the bioconversion of daidzin and genistin proceeded successfully with higher than 90% of conversion rate at the concentration range of 1600 to 2400 mg/L for genistin and that higher than 70% of conversion rate of 1540-1840 mg/L for daidzin at the end of 48-h incubation. Moreover for the specific conversion rate, the maximum value of 370 $\mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ occurred at the 24th h culture broth with an initial concentration 1840 mg/L of genistin, and 230 $\mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ for daidzin the same as occurring at the 24th h culture broth with an initial concentration

1600 mg /L of daidzin . In this research, genistin was first hydrolyzed to aglyconic genistein, and then converted to G7P which represented a two-stage bioconversion which suggested *B. subtilis* BCRC 19679 enable both hydrolysis of β -glucosidic bond and phosphorylation. Besides, succinyl glucosidic isoflavones could be observed from all the culture broths that obtained from daidzin and genistin as a substrate.



目錄



中文摘要.....	iii
Abstract.....	V
目錄.....	I
圖目錄.....	III
表目錄.....	IV
縮寫表.....	V
第一章 前言.....	6
第二章 文獻整理.....	7
第一節、黃豆.....	7
第二節、植物性化學物質.....	8
2-1 植物性雌激素.....	8
2-2 類黃酮.....	11
第三節、大豆異黃酮.....	13
3-1 異黃酮之生理活性.....	13
3-2 大豆異黃酮之吸收與代謝.....	18
第四節、前驅藥物.....	23
第五節、分離與純化大豆異黃酮單體.....	25
5-1 分離去醣基大豆異黃酮 genistein 及 daidzein.....	26
5-2 分離帶醣基大豆異黃酮 genistin 及 daidzin.....	27
第三章 材料與方法.....	28
第一節、實驗大綱.....	28
第二節、實驗材料.....	29
2-1 菌株.....	29

2-2 大豆異黃酮.....	29
2-3 試藥與溶劑.....	29
2-4 培養基組成.....	30
第三節、實驗儀器.....	31
第四節、分析方法.....	32
4-1 高效液相層析法之異黃酮分析條件.....	32
4-2 大豆異黃酮含量計算方式.....	33
第五節、實驗方法.....	34
5-1 利用中性氧化鋁分離 genistein 及 daidzein.....	34
5-2 利用鈣離子沉澱法分離 genistin 及 daidzin.....	36
5-3 各別異黃酮單體純度計算及回收率計算.....	38
5-4 各別異黃酮對 <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 生長的影响.....	39
5-5 <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對各別異黃酮的生物轉化.....	39
5-6 統計分析.....	41
第四章 結果與討論.....	42
1. 分離 genistein 及 daidzein.....	42
2. 分離 genistin 及 daidzin.....	47
3. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 轉換 genistein 及 daidzein.....	50
4. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 轉換 genistin 及 daidzin.....	58
第五章 結論.....	66
第六章 參考文獻.....	68
附錄.....	68

圖目錄



圖 1-1. 六種主要的類黃酮化合物	12
圖 1-2. 大豆食品中異黃酮的結構	15
圖 1-3. 異黃酮代謝物(equol)與雌激素代謝物(estradiol)化學結構之比較	16
圖 1-4. Genistein 或高豆類含量膳食對促進人體健康之可能作用位置	17
圖 1-5. 異黃酮於腸道中之吸收與代謝途徑	19
圖 1-6. Biochanin A 及 genistein 在人體中之代謝	20
圖 1-7. Formononetin 及 daidzein 在人體中之代謝途徑	22
圖 5-1. 中性氧化鋁管柱分離 genistein 及 daidzein 流程圖	35
圖 5-2. 鈣離子沉澱法分離 genistin 及 daidzin 實驗流程圖	37
圖 4-1. 中性氧化鋁分離 genistein 及 daidzein TLC 圖	45
圖 4-2. Genistein 對 <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 生長之影響	52
圖 4-3. Daidzein 對 <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 生長之影響	52
圖 4-4. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 genistein 之生物轉化情形	54
圖 4-5. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 daidzein 之生物轉化情形	54
圖 4-6. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 genistein 之比轉換速率	55
圖 4-7. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 daidzein 之比轉換速率	55
圖 4-8. Genistein 對 <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 比生長速率之影響	56
圖 4-9. Daidzein 對 <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 比生長速率之影響	56
圖 4-10. Genistein 比生成速率及 G7P 比轉化效率之比較	57
圖 4-11. Daidzein 比生成速率及 D7P 比轉化效率之比較	57
圖 4-12. 不同 genistin 濃度對於 <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 之影響	60
圖 4-13. 不同 daidzin 濃度對於 <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 之影響	60
圖 4-14. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 genistin 之比生長速率	62

圖 4-15. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 daidzin 之比生長速率	62
圖 4-16. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 genistin 之比轉換速率	63
圖 4-17. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 daidzin 之比轉換速率	63
圖 4-18. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 genistin 之生物轉化情形	64
圖 4-19. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 daidzin 之生物轉化情形	64
圖 4-20. <i>Bacillus subtilis</i> BCRC 19679 轉化 genistin 之預測代謝路徑	65

表目錄

表 4-1. 中性氧化鋁 TLC 以不同展開系統分離 genistein 及 daidzein.....	44
表 4-2. 中性氧化鋁管柱分離 genistein 及 daidzein	46
表 4-3. 由鈣離子沉澱之上清液回收 daidzin	48
表 4-4. 由鈣離子沉澱物中回收 genistin.....	49
表 4-5. 不同 genistein 及 daidzein 濃度進行生物轉換倍增時間變化	53
表 4-6. 不同 genistin 及 daidzin 濃度進行生物轉換倍增時間變化.....	61

附錄

圖 1. RMA 原料 HPLC 圖譜	74
圖 2. RRMA 原料 HPLC 圖譜	74
圖 3. RMG 原料 HPLC 圖譜	74
圖 4 至 9. <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 genistein 轉化情形 (500-3000 mg/L).....	75
圖 10 至 15 <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 daidzein 轉化情形 (480-2820 mg/L).....	80
圖 16 至 21 <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 genistin 轉化情形 (800-4800 mg/L).....	86
圖 22 至 27 <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 對 daidzin 轉化情形 (770-4620 mg/L)	92
圖 28 至 29 <i>B. subtilis</i> BCRC 19679 生長 OD ₆₀₀ 與 CFU 及乾重校正曲線.....	98
圖 30 至 31. 分離個別異黃酮之 HPLC 圖譜	98



縮寫表

D7P	Daidzein-7-O-phosphate
G7P	Genistein-7-O-phosphate
HPLC	High performance liquid chromatography
O-DMA	<i>O</i> -demethylangolensin
SD	Standard Deviation
SSADH	Succinic semialdehyde dehydrogenase
SOD	Superoxide dismutase
TNC	Total nonstructural carbohydrate
BCS	Biopharmaceutics classification system
ER	Estrogen receptor

第一章 前言



大豆異黃酮廣泛存在於豆科植物之中，為植物的二級代謝物，由於結構及功能上與人體內雌激素相似，因此有植物性雌激素之稱。根據前人研究文獻指出，大豆異黃酮具有許多對於人體健康有益之生理功效，如預防骨質疏鬆、降低乳癌、前列腺癌及心血管疾病發生機率。存在於大豆中之異黃酮分成四大類共有 12 種，大豆及大豆加工食品中以配醣體形式存在的異黃酮於居多，為 malonylglucosides 和 glucosides。經醱酵後之大豆食品則以無配醣基者 aglycones 為主要形式，原因是在醱酵過程中經由葡萄糖苷酶的作用而將醣基部分去除。多項研究證實無配醣基之 genistein 和 daidzein 相較其它配醣基之異黃酮具有較高之保健功效。

依照藥品溶解度及穿透性分類原則，無配醣基之異黃酮屬低溶解度及低穿透率；BCS 分類分為第四類化合物，由於水溶性較差，導致其生物可利用率欠佳。因此，若能改善其溶解度，其生物可利用性將會被提升。近年來藥學研究家針對一些具有機能性但其水溶性及生物可利用率較差的成分以化學反應對該結構上進行官能基修飾，以改善其溶解度及有效成分之使用量。修飾方式如利用化學修飾、酵素修飾或進行微生物轉換修飾。鑑於本研究室前人研究發現，利用 *Bacillus subtilis* BCRC 19679 能把大豆異黃酮中的 daidzein 及 genistein 轉化成水溶性佳之 D7P (Daidzein-7-O-phosphate) 和 G7P (Genistein-7-O-phosphate)，因此推測能夠有效藉由改善其水溶性，進而達到增加生物可利用率及生物活性。先前研究中皆以大豆異黃酮混合物進行生物轉換，單一異黃酮生物轉換之動力學研究尚未明瞭，故本研究旨在分離單一異黃酮單體，並利用各別異黃酮進行 *Bacillus subtilis* BCRC 19679 之生物轉換。

第二章 文獻整理




第一節、黃豆

大豆有黑、白、黃、褐、青、斑數種顏色，學名為 *Glycine max*，為豆科一年生草本植物。在數千年前，中國已經栽培大豆作為食物，神農帝列為五穀之一。本草綱目記載，大豆可入藥，對於一些疾病有療效，如腎疾病、皮膚病、腳氣病、腹瀉、血毒病、便秘及貧血等(新編中藥大辭典，1982)。大豆當作食物，具有養顏美容、防老化、消水腫、除淤血等功能(連，1995)。

黃豆中含有約 40% 蛋白質，係由 18 種人體所需胺基酸構成，含量較多者依序為丙胺酸 alanine (21.9%)、麩胺酸 glutamic acid (18.4%)、精胺酸 arginine (17.9%)、絲胺酸 serine (15.5%)、天冬胺酸 aspartic acid (8.3%)，含硫胺基酸如甲硫胺酸(methionine)及半胱胺酸(cysteine)則較低。碳水化合物含量約 34%，其中非構造型碳水化合物(total nonstructural carbohydrate, TNC)的含量約 12.4%。TNC 中以澱粉及可溶性醣類為主，前者含量約 1-3%，後者差異較大，介於 6.2-16.5% 間(蔡，1994)。棉子糖(raffinose)、水蘇四糖(stachynose)等寡糖可促進腸管蠕動，排除體內脹氣而且有利於雙叉桿菌的增值，故具有整腸作用。大豆蛋白質是一種不含膽固醇而且容易消化吸收的高級蛋白質。此外，在人體內能合成卵磷脂，能強健腦部發育(鄭，2005)。另外還含有一些微量成份，包含在 5% 的灰份中，如：鉀、磷、鈣等。大豆尚含有一些特殊的機能性成份，如：卵磷脂 (lecithin)、皂素 (saponins)、固醇 (sterols)、植酸、異黃酮 (genistein, daidzein and glycitein) 和蛋白酶抑制劑等 (張，2002)。近年來許多研究證實大豆具有預防癌症的特性，尤其是與荷爾蒙有關的癌症，如：乳癌、前列腺癌及肺癌。除了抑制癌細胞作用之外，異黃酮特殊的結構使其具有雌激素的功能及具抗氧化活性等，因此異黃酮在近幾年逐漸受到重視。


第二節、植物性化學物質

2-1 植物性雌激素




植物性雌激素主要包括異黃酮 (isoflavones);木酚素 (lignans)和香豆雌酚 (coumestrol)等三大類。異黃酮大多存在於豆科植物中，常見的成分為 daidzein 及 genistein。穀類及種子類含有木酚素成分，其中以亞麻仁中亞麻仁木質素 (flaxlignan)含量最豐富。而香豆雌酚多存在於豆科及菊科植物，如蒲公英等。以上植物雌激素之化學結構皆具有與哺乳類生物相似 estrodiol 之化學結構，且具有類雌激素之生物活性，並與雌激素接受體 (estrogen receptors)具有微弱結合之能力(Ososki and Kennelly 2003)。此類植物雌激素中，又以異黃酮中的 genistein 之相關研究最多(Dixon 2004)。體外實驗證實，植物雌激素是一類生物活性較弱的雌激素，與哺乳動物的雌激素受體(estrogen receptor)的結合能力很低，且不同植物雌激素與 ER (雌激素受體)結合的親和力也不同。擬雌內酯的親和力最大，比雌二醇的親和力低 10-20 倍；其次是染料木黃酮，約低 100 倍；而黃豆苷原和雌馬醇等，至少低 1000 倍。不同的植物雌激素與 ER α 和 ER β 的親和力並不完全相同，擬雌內酯、芹黃素和柑桔苷元對 ER β 的親和力比 ER α 高，香豆雌酚、金雀異黃酮和黃豆苷元與 ER β 的親和力高於 ER α ，分別是 ER α 的 7、22 和 5 倍。(邵，2004)。

植物雌激素的分子結構與哺乳動物雌激素結構相似，是一類具有類似動物雌激素生物活性的植物成分，它們對激素相關疾病有廣泛作用，尤其對乳腺癌、前列腺癌、絕經期綜合徵、心血管病和骨質疏鬆有一定的預防作用。雖被人們稱為植物性雌激素，但它們本身不是激素。異黃酮活性成分，也就是天然的植物雌激素，其結構與女性體內的雌激素相似，可以起到模擬、干擾、雙向調節內分泌水平的生理作用，給廣大停經後女性帶來了新的預防停經後症狀方法。植物雌激素是從植物尤其是豆類植物中提取的可以替代雌激素的作用並同時防止雌激素不良反應的發生(陸，2008)。一定劑量的植物雌激素在體內能夠與雌激素受體(ER)



結合，發揮類似雌激素的作用。植物雌激素中劑量時，可以產生一定的雌激素活性；高劑量時，可以活化因體內雌激素水平限制未能活化的 ER，產生雌激素較強的效應；當植物雌激素使用足夠的劑量時，可以產生與體內 17β 雌二醇 (estradiol) 相似的效能。研究發現，食物中的植物雌激素在防治更年期綜合症、停經後骨質疏鬆症等方面有類似雌激素替代療法的作用。一些異黃酮在內源性雌激素相對缺少時具有雌激素效應，可以作為子宮切除後的代用品。歐洲已經人工合成了雌激素代用品依普黃酮 (ipriflavone) 作為骨質疏鬆的治療藥物，其代謝產物之一為 daidzein。另一方面，低劑量的植物雌激素和內源性雌激素競爭性地與 ER 結合形成 ER 複合物，佔據受體結合部位，阻止體內雌激素分子與受體相結合，因而有效地減弱了標靶細胞對雌激素的效應，而起到了抗雌激素作用。染料木黃酮活性不及雌激素的千分之一，它與乳腺細胞的 ER 結合，競爭性佔據 ER 位置，阻斷雌激素的作用。異黃酮與 ER 結合後，刺激性激素結合球蛋白的產生，並抑制酪胺酸酶和雌激素合成酶的活性，從而減輕雌激素的促細胞增殖的作用。雌激素通過刺激細胞增生誘發癌症，植物雌激素能夠通過雌激素拮抗作用減少乳腺癌和子宮癌的發生。(Peterson, 2011)。植物雌激素對乳腺癌、前列腺癌和結腸癌都有預防作用，這是因為植物雌激素與雌二醇競爭結合 ER，從而抑制了雌二醇對腫瘤細胞的促分裂作用，抑制了腫瘤細胞的生長。植物雌激素還有抗氧化的作用，而自由基被認為與體內腫瘤的形成有關(Adlercreutz, 1991)。

在 1996 年，有研究文獻稱，植物雌激素對正常人乳腺細胞有增生作用的報導(邵，2004)。此外，植物雌激素對心血管系統具有良好的保護作用。如異黃酮與 ER 結合後，可以降低體內膽固醇的含量，減少心血管疾病如高膽固醇、動脈硬化病變等的發生。植物雌激素具有雌激素起始劑和阻斷劑效應，對於婦女停經後因雌激素減少引起的一些疾病以及激素相關疾病有較好的預防和治療作用。植物雌激素也有不利的一面，它會改變婦女的月經週期，高劑量的植物雌激素對於人的生育和發育都有不良影響。因此尚需進行深入細緻的探討，進

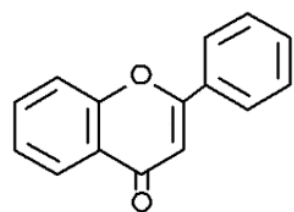


行更多的臨床研究，以便科學合理地開發和利用植物雌激素。在植物雌激素與人體健康關係研究中，細胞培養、動物模型、人體實驗和營養流行病學調查研究結果仍有許多相互矛盾之處。一方面是因為在細胞培養中的受試物多採用植物雌激素提取物，而在動物模型和人體實驗多採用含植物雌激素的食物如大豆和亞麻籽。食物成分複雜，所觀察到的結果中很可能有其它成分的作用。另一方面，結果還受實驗設計、對象選擇和觀察例數等諸多因素影響，尤其是人體實驗，有很多難以控制的影響因素(邵，2004)。

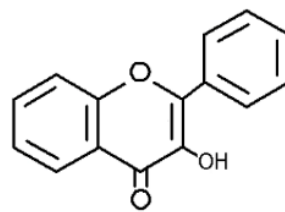
2-2 類黃酮

類黃酮係指化學結構類似於植物界黃酮類結構之化合物的總稱，為植物的二次代謝物，亦為花朵、果實、蔬菜及樹皮等植物表皮之細胞色素，截至目前為止，類黃酮的種類已被鑑定出超過 4000 種，由於類黃酮是具有抗氧化之功效，使其在蔬果中含量成為一熱門研究主題。類黃酮類化合物分為六大類（圖 1-1），包括：(1) 黃酮類，(2) 黃酮醇類，(3) 黃烷酮，(4) 兒茶素，(5) 花青素，(6) 異黃酮。大部分的類黃酮化合物存在於植物當中並且與醣基結合以帶醣基(glycoside-form)的形式存在，另外並有極少部分的不帶醣基(aglycones)形式。

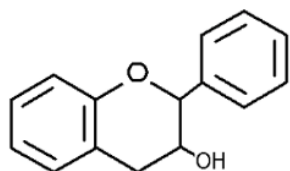
過去已有許多研究報告指出攝取特定的蔬菜或水果具有多樣的生理機能，包括(1) 降低及預防心血管疾病 (Sesso et al. 2003)，(2) 抗微生物作用(Cowan 1999)，(3) 調節免疫(Deák G 1990)，(4) 抑制癌細胞活性(Kuo et al. 1996)，(5) 其它生理機能等。



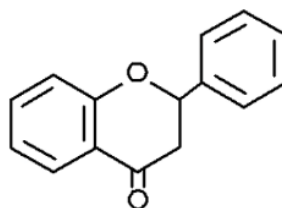
Flavones



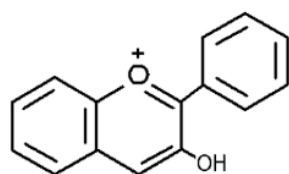
Flavonols



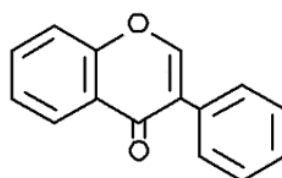
Flavan-3-ols



Flavanones



Anthocyanidins



Isoflavones



圖 1-1. 六種主要的類黃酮化合物

Fig. 1-1. The six major subclasses of flavonoids.




第三節、大豆異黃酮

異黃酮為大豆中主要的酚類化合物，在大豆中有三種類型異黃酮，依據主結構有無醣取代基及糖取代基的衍生狀態又可歸類為 4 種群組。不配醣苷之 aglycones 者有大豆苷元(daidzein)、染料木黃酮(genistein) 與黃豆黃素貳元(glycitein)，帶有 glucosides 則有染料木苷(genistin)、大豆苷(daidzin) 與黃豆苷(glycitin)，glucosides 結合有丙二醯(malonyl conjugate) 者有 malonyldaidzin、malonylgenistin 與 malonylglycitin，glucosides 有乙醯基(acetyl groups)者有 acetyldaidzin、acetylgenistin 與 acetylglycitin(圖 1-2)。存大豆中之異黃酮以帶有醣苷及 malonyl conjugate 佔多數(genistin、malonylgenistin、daidzin 與 malonyldaidzin)，而 aglycones 含量很少。以 malonyl-型式存在之醣苷形式異黃酮對熱不穩定，在加熱過程中會使其轉變為 acetyl-型式或是 glucosides 之型式 (Murphy 1994)。

3-1 異黃酮之生理活性

由於異黃酮之結構與雌激素相似，會與雌激素競爭其受體(receptor) 結合位置(binding site) (圖 1-3)，阻止過多的雌激素與其受體結合，而降低罹患乳癌的危險性 (Adlercreutz et al. 1991)。因為異黃酮可增加性腺荷爾蒙鍵結球蛋白，及抑制人體前脂細胞芳化酶(preadipocyte aromatase)，所以亦具有抗動情激素的功能 (Adlercreutz et al. 1993)。在防止骨質鬆症部份，研究顯示由於異黃酮是一種植物性雌激素，具有阻止骨質之再吸收及防止骨質鬆症等功能。

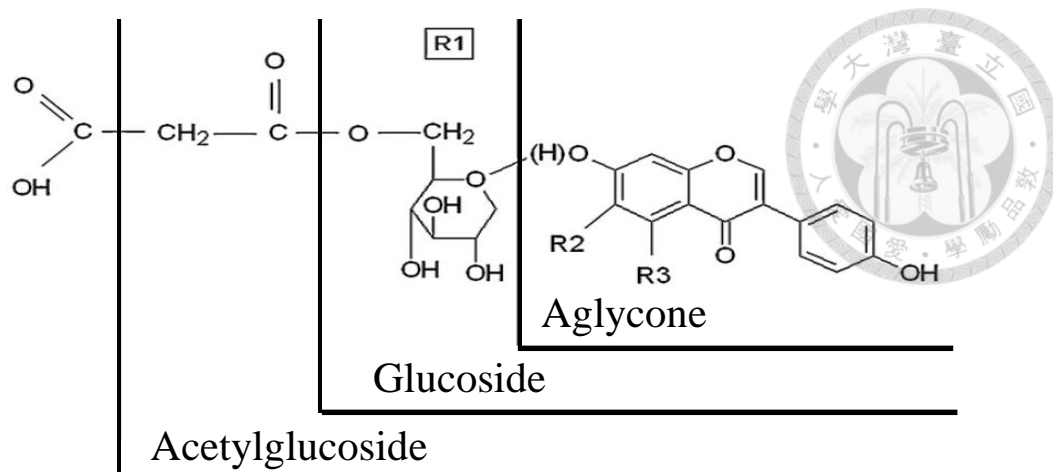
根據 Kishida (2000)動物實驗研究結果顯示，當比較餵食小鼠(mice)未經發酵及經 *Aspergillus awamori* 發酵之大豆粉對藥劑反應時，結果發現：經發酵後的冷凍乾燥大豆粉，以 aglycones 形式存在的異黃酮含量居多(約佔總異黃酮含量 90%)，其對降低小鼠因乙醛所引起的急性致命性，及 pentobarbital 所誘發的



昏睡時數，較未發酵之大豆(aglycones 形式存在的異黃酮含量約佔總異黃酮含量的 8.5%) 具有顯著效果。主要原因可能在於 aglycones 能有效被小腸吸收，而 glycoside 之吸收效果較差所致。相關研究顯示：異黃酮的吸收開始於小腸上端，其吸收受本身化學結構的影響，aglycones 在小腸的上端被吸收；含 Glycoside 在小腸末端中被吸收；acetylglycosides 和 malonylglycosides，則須經由大腸中 β -glucosidase 水解葡萄糖後才可被吸收(Barnes 1995)。當進一步分析小鼠(mice)肝臟中其 cytochrome P450(drug metabolizing enzyme；Phase I enzymes) 含量時，隨 aglycones 劑量增加而增加，更證實了異黃酮中 aglycones 具有促進肝細胞解毒的作用(Kishida et al. 2000)。

根據流行病學統計，西方國家的乳癌、前列腺癌、大腸癌罹患率遠超過於亞洲國家，研究學者推測，可能與飲食習慣中否攝取異黃酮含量之多寡有關。有關大豆中異黃酮的生理活性之研究如下：

1. 具有抗氧化性 (Naim et al. 1974)
2. 能抑制蛋白質酪胺酸激酶 (protein tyrosine kinase) (Akiyama et al. 1987)
3. 能抑制 DNA 的拓撲異構酶 (topoisomerase) (Okura et al. 1988)
4. 能有效降低乳癌的發生 (Adlercreutz et al. 1991)
5. 預防心血管疾病 (GARNER 1997)
6. 能增加骨質密度 (Somekawa et al. 2001)
7. 改善更年期症狀 (Nagata et al. 2001)



Malonylglucoside

Isoflavone	R ₁	R ₂	R ₃
Genistein	H	H	OH
Daidzein	H	H	H
Glycitein	H	OCH ₃	H
Genistin	C ₆ O ₅ H ₁₁	H	OH
Daidzin	C ₆ O ₅ H ₁₁	H	H
Glycitin	C ₆ O ₅ H ₁₁	OCH ₃	H
Acetyl-genistin	C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₃	H	OH
Acetyl-daidzin	C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₃	H	H
Acetyl-glycitin	C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₃	OCH ₃	H
Malonyl-genistin	C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₃ +COOH	H	OH
Malonyl-daidzin	C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₃ +COOH	H	H
Malonyl-glycitin	C ₆ O ₅ H ₁₁ + COCH ₃ +COOH	OCH ₃	H

圖 1-2. 大豆食品中異黃酮的結構

Fig. 1-2. Chemical structures of isoflavone in soybean foods. (Rostagno et al. 2007)

Estrogen

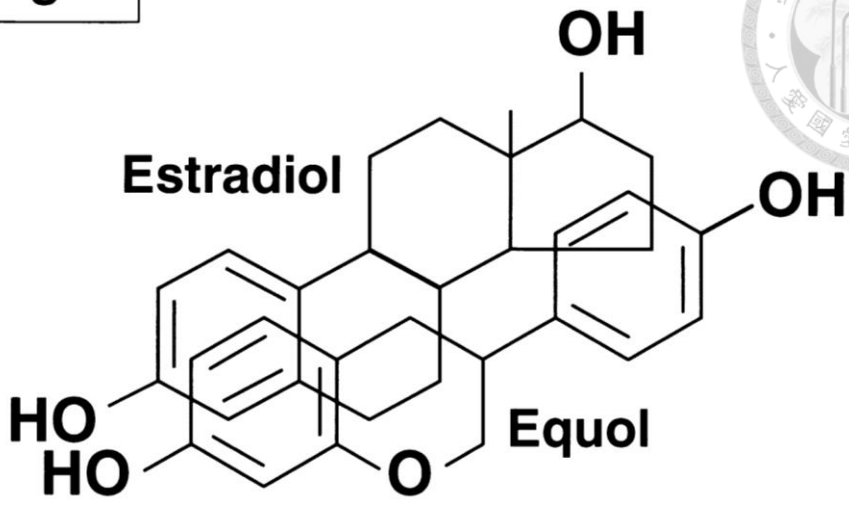


圖 1-3. 異黃酮代謝物與雌激素化學結構之比較

Fig. 1-3. Comparison of the structure of the isoflavone metabolite equol with that of estradiol showing the striking similarity in planar spatial arrangement of the two molecules. (Setchell and Cassidy 1999)

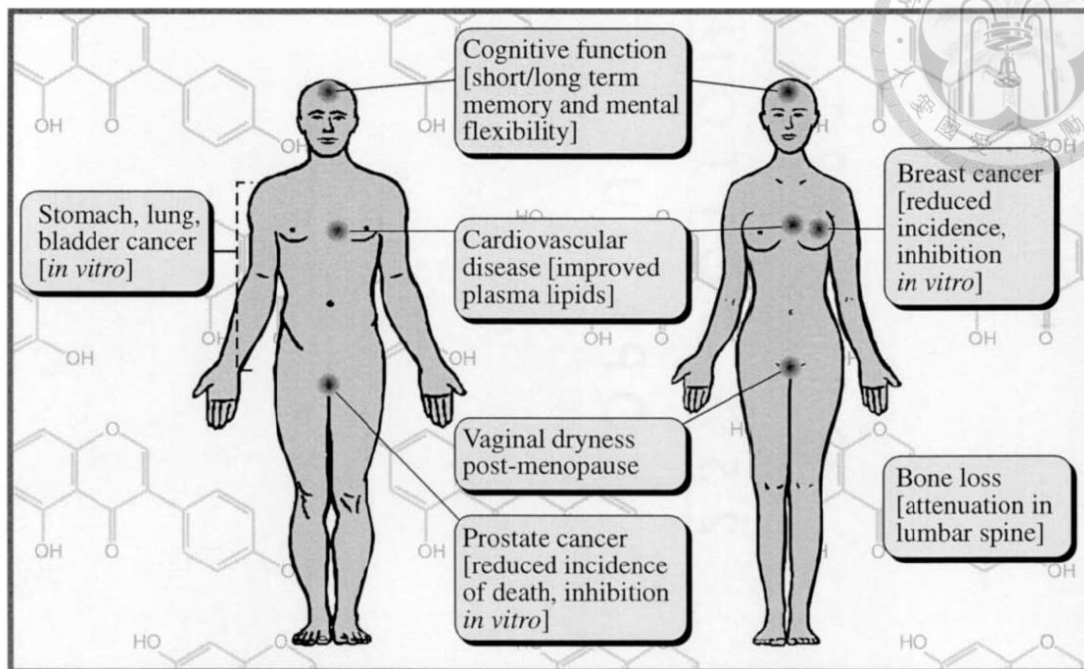


圖 1-4. Genistein 或高豆類含量膳食對促進人體健康之可能作用位置

Fig. 1-4. Proposed targets for beneficial effects of dietary genistein or a high soy diet on human health. (Dixon and Ferreira 2002)

3-2 大豆異黃酮之吸收與代謝

黃豆食品中之異黃酮多以配醣苷之形式存在(glycosides-form)，但在異黃酮之消化吸收則未被提出可以醣苷形式被人體吸收，很多研究都指出無配醣基異黃酮(aglycones-form)具有較小分子量且脂溶性較其它型式好，於腸道中吸收及可利用度相較其它形式之異黃酮高(Izumi et al. 2000) (圖 1-5)。但由於體內之消化液主要組成為水居多，而有文獻提出 aglycones 之水溶解性差，導致其生物可利用率不佳 (Xu et al. 2000)。

1. Genistein 之功能與吸收

Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone)是一種在豆科植物合成抗微生物的 phytoestrogen 和 phytoanticipins 時常見的一種前趨物。飲食中 genistein 的攝取經由流行病學及其在臨床實驗證實具有許多醫療上的用途，例如降低血清中前列腺特異性抗原(prostate specific antigen)及膽固醇濃度，對於乳癌以及停經後婦女症狀的減緩皆具有一定的療效。根據藥品溶解度及穿透性分類原則 (Biopharmaceutical Classification System ; BCS)，genistein 屬於第四類，即低溶解度及低穿透性(Waldmann et al. 2012)。genistein 在藥物動力學中的吸收、分布、代謝及排泄(ADME)研究證實，其在腸道中有能有效被吸收(圖 1-6)，但礙於其溶解度差，導致吸收率隨之下降(Yang et al. 2012)。

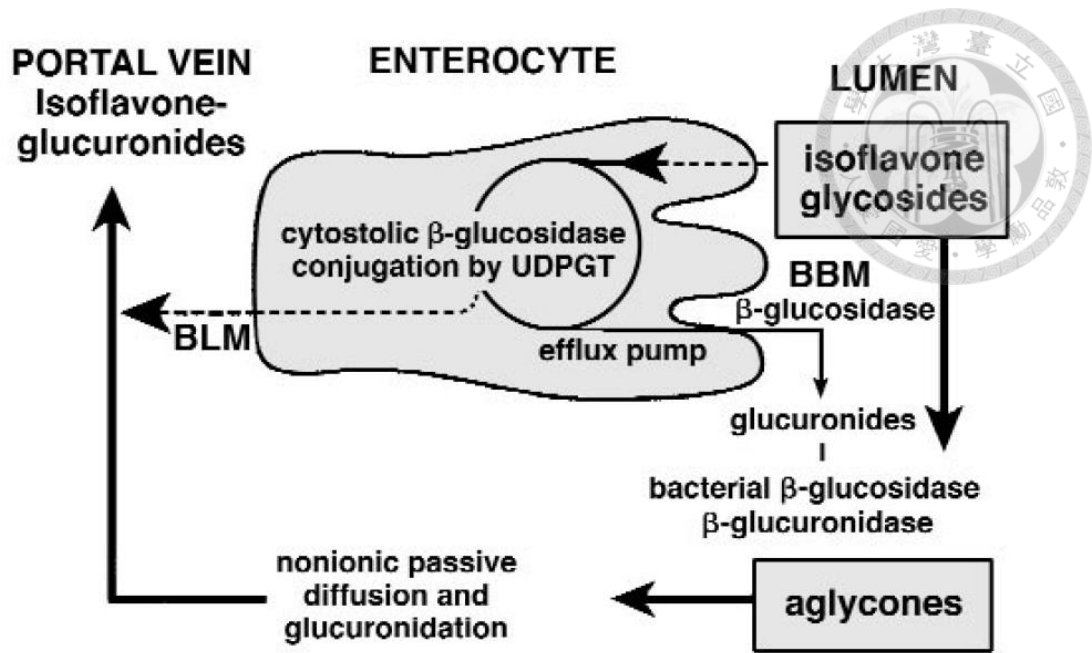


圖 1-5. 異黃酮於腸道中之吸收與代謝途徑

Fig. 1-5. General scheme of the mechanism of intestinal absorption and metabolism of isoflavone glycosides. BLM, basolateral membrane; BBM, brush border membrane.

(Setchell and Cassidy 1999)

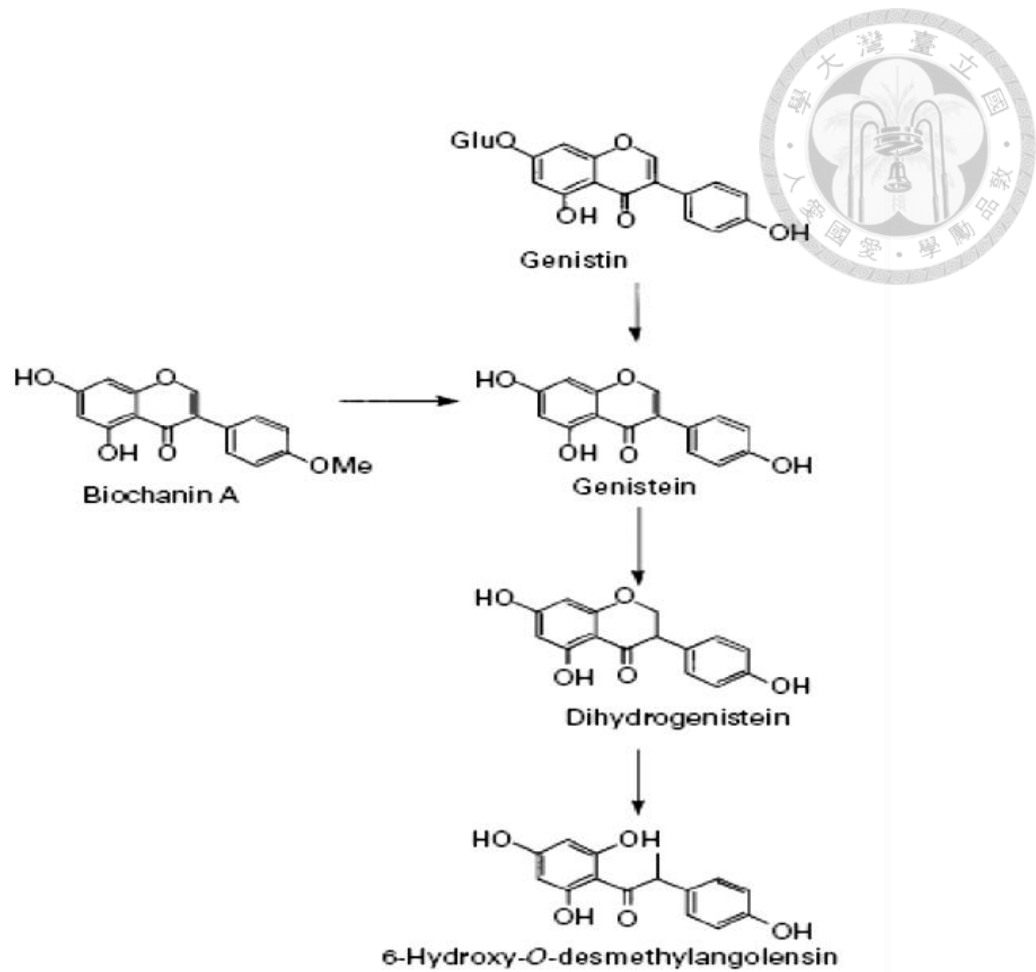


圖 1-6. Biochanin A 及 genistein 在人體中之代謝

Fig. 1-6. Metabolism of biochanin A and genistein in man. (Adlercreutz et al. 1987)

2. Daidzein 之功能與吸收

Daidzein 在人體中被吸收之後，則可進一步的被代謝為 dihydrodaidzein 並且被轉換為 *O*-demethylangolensin(O-DMA)以及 equol (圖 1-7) (Joannou et al., 1995 ; Setchell et al., 1998)。其中，daidzein 轉換成為 equol 之過程被認為是一個重大的發現，因為 equol 較其前趨物 daidzein 具有更佳之生理活性。近年來，大部分的研究指出 daidzein 具有許多的生化活性，如與雌激素類似及雌激素獨立之作用 (Alexandersen et al., 2001 ; Gao et al., 2001) ，此外並有研究指出 daidzein 對於癌症之預防，如直腸癌與睪丸癌具有效果。同樣地，由於 daidzein 之溶解性也較差，故其生物可利用率也欠佳。

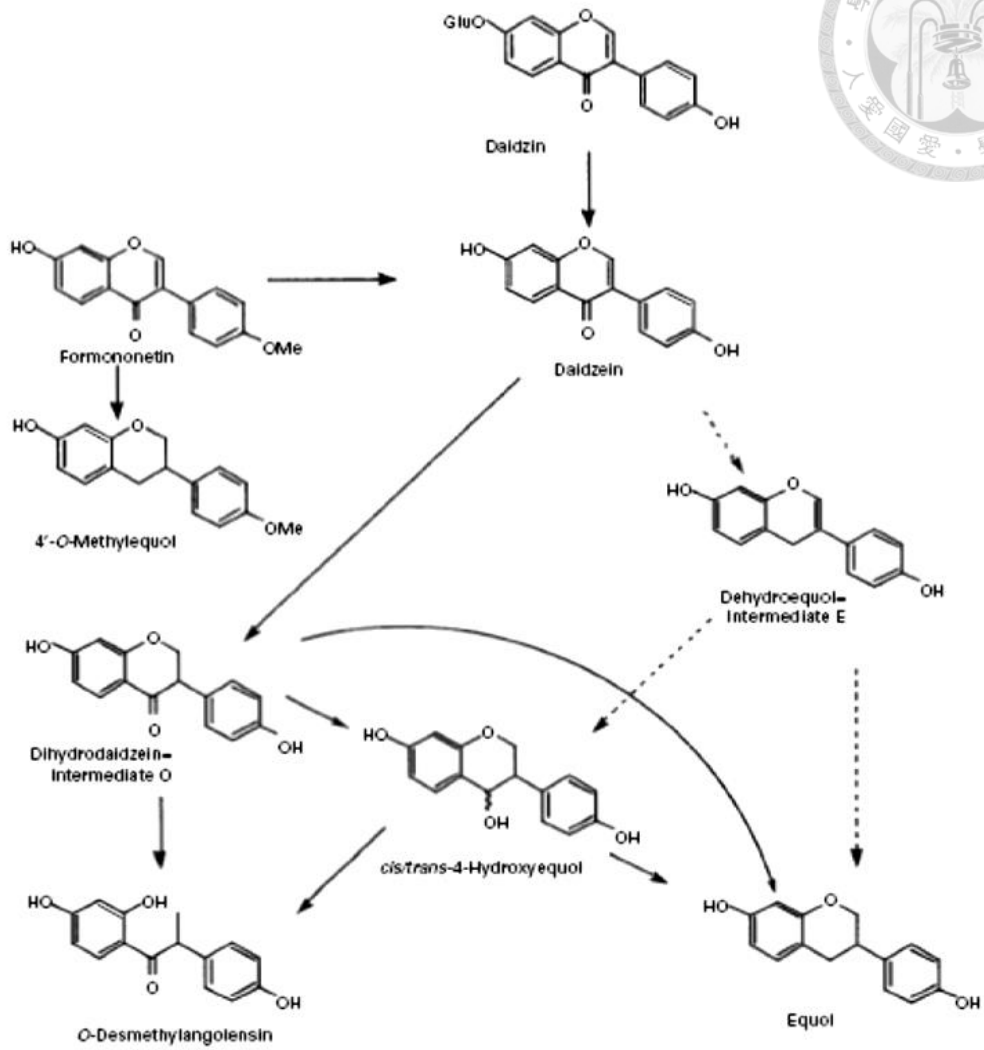


圖 1-7. Formnonetin 及 daidzein 在人體中之代謝途徑

Fig. 1-7. Metabolic pathways of formnonetin and daidzein in man.


(Adlercreutz et al. 1987)

第四節、前驅藥物

前驅藥物 (prodrug)，也稱前藥、藥物前驅等，是指藥物經過化學結構修飾後得到的在體外無活性或活性較小、在體內經酶或非酶的轉化釋放出活性藥物而發揮藥效的化合物。前驅藥物本身沒有生物活性或活性很低，經過體內代謝後變為有活性的物質，這一過程的目的在於增加藥物的生物利用率，加強細胞選擇性，降低藥物的毒性和副作用。目前前驅藥物分為兩大類：載體前驅藥物 (carrier-prodrug) 和生物前驅形式 (bioprecursor)。此外農藥中也有許多前驅藥物。載體前驅藥物是指具有活性的化合物與其運輸作用的載體通過共價鍵結合，在體內通過簡單的水解作用卸除載體，由活性化合物發揮藥理作用。載體前驅藥物與母體化合物相比往往活性微弱或無活性。對於載體的結構，多是親脂性，要求對生物體無害，且能及時釋放活性化合物。市場上口服青黴素類藥物往往採用載體前藥物的方式來提高生物可利用度。

前驅藥物是屬於藥物研究中藥物釋放最適化的範疇，在 1958 年，Albert 提出前驅藥物 (prodrugs) 概念，是指通過對生物活性化合物的化學修飾形成新的化合物後，於體內自發性產生或經酵素轉換釋放出具活性之原母藥，改善其釋放性質使其優於原母藥 (Albert 1958)。目的是希望 (1) 改變藥物吸收動力學：控制藥物的吸收，以改善藥物在體內輸送、分布及新陳代謝的時程。(2) 增加生物可利用性：提高水相溶解度，以增加在人體內濃度。(3) 減少副作用、降低毒性：消除因服用藥物而刺激腸胃、傷害肝腎等副作用。(4) 增加穩定性：增加最終藥物的穩定性。

磷酸在有機體細胞中起著重要的生理作用，它是去氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA) 的結構組成部分，在體內與靶標蛋白和受體進行特異性結合，是蛋白翻譯信號和磷脂的重要基團。藥物化學家對磷酸酯藥物進行了廣泛的研究，利用磷酸基團極性大的特點引入到水溶性差的藥物分子中改善藥物溶解性。磷酸酯前藥是為了改善藥物的溶解性而引入磷酸基團。這類前藥的設計主



要依靠磷酸基團的高負電性，即親水性強的特點改善藥物的極性相及非極性相之分配係數；另一方面，由於體內細胞膜上含有磷酸酯酶，當藥物進入體內，能迅速被水解成原藥發揮藥效 (JI Xun 2013)。鑑於本研究室前人研究發現，利用 *Bacillus subtilis* BCRC 19679 能把大豆異黃酮中的 daidzein 及 genistein 轉化成水溶性佳之 D7P (Daidzein-7-O-phosphate) 和 G7P (Genistein-7-O-phosphate)，因此推測能夠有效藉由改善其水溶性，進而達到增加生物可利用率及生物活性。並且 G7P 及 D7P 之純化程序已在先前研究中建立，經生物轉換後之培養液利用乙酸乙酯萃取、濃縮、正己烷沉澱及 HP-20 大孔樹脂之分離純化步驟後，D7P 和 G7P 在產物中的純度能夠從原來的 2.76% 提升至 83.1% 且回收率為 97.3% (林，2012；何，2011)。

第五節、分離與純化大豆異黃酮單體

本研究旨在發展一套簡易、快速又樣品量大的 genistein, daidzein, genistin, daidzin 萃取分離程序。洪等人以大豆全豆作為原料，60 % 甲醇溶劑萃取，萃取液經濃縮後形成大豆蜜，經由 HP-2MG 樹脂管柱吸附異黃酮，以 60 % 甲醇脫附製得含去糖基與帶糖基之異黃酮產物(daidzein、genistein、daidzin、glycitin 與 genistin)，產率為 0.26 %；再將所得產物藉由 HP-2MG 樹脂管柱進行分離，以 pH=12 氫氧化鈉溶液脫附，得到產率為 0.04 %，透過 FT-IR、UV-Vis 與 HPLC 分析鑑定為高純度的 genistin 成分；樹脂管柱接續以 60 % 甲醇作完全脫附，得到配糖型大豆異黃酮混合物，產率為 0.11 %，經由相同儀器檢測，得知該混合物是由 genistin、daidzin 與 glycitin 組成。(洪，2008)。Zeng 等人利用 polymethylacralate 樹脂層析管柱，以不同甲醇梯度進行流洗，將不同種類帶糖基異黃酮(genistin, daidzin, glycitin)分離，得到各別帶糖基異黃酮；再利用酸水解處理各別帶糖基異黃酮而得到去糖基異黃酮各別單體 (genistein, daidzein, glycitein)。(Zheng, 1997)。近年來大豆異黃酮單體分離的研究主要利用兩種方式：1.液相萃取，利用不同溶劑系統進行液相液相萃取 2.利用管柱層析分離各別異黃酮單體。例如 Ren 等人於 2012 年發表文章，利用水相及乙酸乙酯液相萃取之分布係數差異，分離 genistein 及其他異黃酮類化合物 (Ren, 2012)。亦有利用金屬離子鍵結能力差異分離異黃酮單體，使用的離子如 Fe^{3+} , Al^{3+} 及 Zn^{2+} ，分離各別異黃酮單體 (Priya, 2008)。但以上的方法皆因為操作溶劑體積龐大，耗費時間長，進樣量小的問題，故至今大量生產各別異黃酮方法尚未有一套完整的分離程序。

5-1 分離與純化去糖基大豆異黃酮 genistein 及 daidzein

PA Murphy 等人利用製備級 HPLC 分離各種異黃酮，在此研究中成功分離 genistein 及 daidzein，但因為進樣量極小，在製備大量標準品上有一定的限制 (PA Murphy, 1981)。苗等人利用薄層層析法建立 daidzein 和 genistein 的萃取，分離以及定性，定量的方法。首先用正己烷對豆粕脫脂，脫脂豆粕再以 70 % 的乙醇萃取，濃縮乙醇萃取液至無有機溶劑，然後加入與水相相同體積的乙酸乙酯萃取 3 次，合併並濃縮乙酸乙酯相。用 GF₂₅₄ 層析板，並以甲苯:氯仿:丙酮 (體積比為 4:18:18) 為展開劑對乙酸乙酯相進行薄層層析，然後對 R_f 值=0.55 及 R_f 值=0.63 的螢光條帶進行 HPLC 分析，並與 genistein 及 daidzein 標準品的 HPLC 譜圖對比，並取下 TLC 片上之 genistein 及 daidzein 做為標準品使用(苗，2005)。Tao 等人將葛根提取物與 0.1 M 的 Ni²⁺ 的溶液混合，並利用 silica gel 管柱層析法分離，以氯仿，甲醇流洗系統進行流洗，分離 genistein 及 daidzein (Tao, 2002)。

5-2 分離與純化帶醣基大豆異黃酮 genistin 及 daidzin

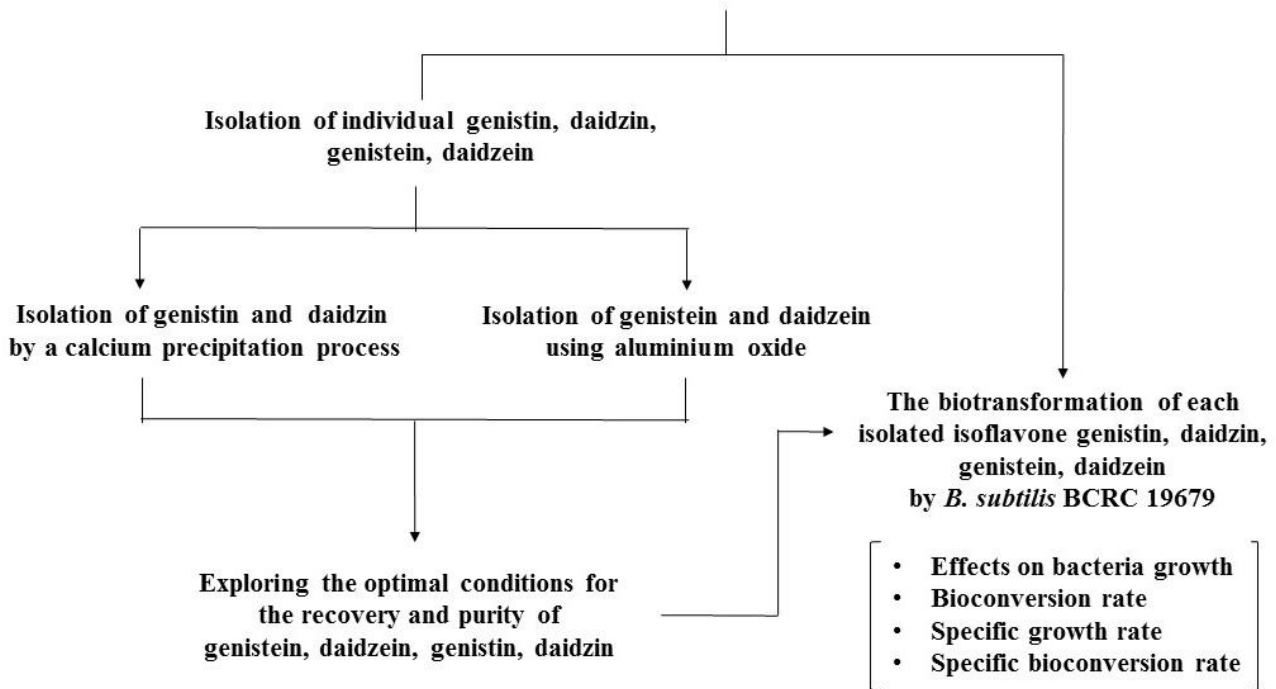
孫等人於 2008 年進行了 genistin 及 daidzin 的分離。利用丙酮萃取和無水乙醇再結晶等方法純化大豆異黃酮萃取物，得到純度較高的 genistin 和 daidzin 混合物。後以 Sephadex LH-20 柱層析進行 genistin 和 daidzin 的分離 (孫等人, 2008)。以不同濃度丙酮水溶液萃取異黃酮，確定萃取異黃酮溶劑為純丙酮較佳。以丙酮萃取次數研究中確定對 30 % 異黃酮粉中大豆異黃酮的方法為對原料等重量溶劑萃取三次。大豆異黃酮粉通過脫脂、丙酮萃取分離和無水乙醇再結晶後，大豆異黃酮回收率為 25.3 %。大豆異黃酮含量由 22.4 % 提高到 76.8 %。通過無水乙醇重結晶後的樣品為乳白色。用 Sephadex LH-20 (220 mm×15 mm) 管柱分離 genistin 和 daidzin 研究發現，流洗液中甲醇回收率，流速越大，genistin 和 daidzin 的分離效果越差。放大分離實驗中，分離得 genistin 10mg 和 daidzin 6mg。genistin 和 daidzin 通過 HPLC 分析得到了單一峰，純度大於 90 %。(孫, 2008)。亦可利用樹脂管柱來進行分離帶醣基異黃酮，如利用 Sepabeads SP207 大孔吸附樹脂分離萃取之大豆異黃酮。用乙醇從脫脂大豆中萃取的大豆異黃酮主要含有 genistin, daidzin, glycitin 及 acetyl-genistin。經 Sepabeads SP207 大孔吸附樹脂以不同乙醇梯度洗脫，可分離得到 genistin 及 acetyl-genistin；經 HPLC 檢測其純度均為 90 % 以上。

第三章 材料與方法



第一節、實驗設計架構

Studies on the isolations of genistin, daidzein, genistein, daidzin from soybean and their bioconversions by *Bacillus subtilis* BCRC 19679



第二節、實驗材料

2-1 菌株

本實驗室先前篩選之 *B. subtilis* FC-10 菌株，寄存於食品工業發展研究所 (生物資源保存及研究中心)，編號 BCRC 19679。



2-2 大豆異黃酮

以高雄黃豆五號為原料，五倍體積 60 % 甲醇進行萃取後，離心取出上清液減壓濃縮使萃取液剩餘約 60% 原始體積，進行 Diaion HP-20 樹脂進行區分：以蒸餾水及 40 % 甲醇流洗去除雜質，再以 70 % 甲醇流洗出帶糖基異黃酮，最後以 100 % 甲醇流洗去糖基異黃酮。所有形式之異黃酮皆以減壓濃縮去除有機溶劑後進行凍乾備用。去糖基異黃酮部分凍乾後純度為 82 % (含 genistein 為 56 %，daidzein 為 26 %)，樣品命名為 PRMA (preparative raw material aglycones)，HPLC 層析圖譜如附錄圖一。以另購買市售 40 % 去糖基大豆異黃酮原料(含 genistein 為 31 %，daidzein 為 10 %)，稱此原料為 RMA (raw material aglycones)，HPLC 層析圖譜如附錄圖二，以及 46 % 帶糖基異黃酮原料 (38 % genistin，8 % daidzin)，稱此原料為 RMG (raw material glucosides)，HPLC 層析圖譜如附錄圖三，以上述三者為實驗原料，所有原料樣品皆保存於 -20°C 冰箱中。

2-3 試藥與溶劑

1. Daidzein, Sigma
2. Diaion® HP-20, Mitsubishi Chemical Industries Limited
3. Ethyl acetate, Merck
4. Genistein, Sigma
5. n-Hexane, Merck
6. Hydrochloride acid, Merck
7. Citric acid, Merck

8. Acetic acid, Merck
9. Aluminum oxide (neutral; active stage II), Sigma
10. Calcium hydroxide, Merck
11. Chloroform, Merck



2-4 培養基組成

Nutrient Agar (NA) , Becton Dickinson

Approximate formula* per liter (L) purified water

- beef extract 3.0 g
- peptone 5.0 g
- agar 15 g

合成培養基組成

Ingredient	Content (w/v %)
Sucrose	2 g
Di-ammonium phosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1 g
Monopotassium phosphate KH_2PO_4	0.527g
Dipotassium phosphate K_2HPO_4	1.068g
Magnesium sulphate heptahydrate $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
Manganese sulphate pentahydrate $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.05 g

(adjusted to pH=7.)

第三節、實驗儀器



1. 分光光度計：日本 Hitachi 公司 U-1100 型
2. 冷凍乾燥機：美國 Labconco 公司
3. 微量離心機：Labnet 公司 C2500 型
4. 滅菌釜：日本 Tomy 公司 ES-315 型
5. 恆溫培養箱：台灣 Hotech 公司 low-temp incubator 707R
6. 減壓濃縮裝置：
 - I. 旋轉蒸發器：瑞士 Buchi 公司 Rotavapor R-14
 - II. 真空值控制器：瑞士 Buchi 公司 Vacuum Controller B-72
 - III. 水浴鍋：瑞士 Buchi 公司 Waterbath B-480
 - IV. 水幫浦：日本 Tokyo Rikakikai 公司 A-3S
 - V. 冷卻裝置：日本 Eyela 公司 Cool Ace CA-1111
7. 高效液相層析儀
 - I. 分析級高效液相層析儀
液相層析儀幫浦：日本 Hitachi 公司 L-2413
除氣裝置：德國 Thermo 公司 ERC-3215
液相層析偵測器：日本 Hitachi 公司 L-2420
資料處理利用 SISC 積分層析軟體：台灣 SISC 公司 2.01 版

第四節、分析方法

4-1 高效液相層析法之異黃酮分析條件

參考常致綱 (2006) 之方法加以修改，利用 HPLC 進行異黃酮之分析測定。以

下為分析條件：

Column: YMC-Pack ODS-AM (5 μ m, 250 \times 4.6 mm)

Mobile phase: solvent (A) : 0.1% (v/v) 醋酸水溶液

solvent (B) : 0.1% (v/v) 醋酸乙腈溶液

Flow rate : 1.0 mL/min

Sample loop : 20 μ L

Detector : Hitachi, DL-2413 (254 nm)

Pump : Hitachi, DL-2420 pump

HPLC 梯度流洗條件

前 20 分鐘內 solvent (B) 濃度由 15 % 增加至 20 %，於之後的 10 分鐘內增加至 24 %，並平衡 10 分鐘，之後在 6 分鐘再增加至 35 % 並平衡 8 分鐘，最後的 6 分鐘降回至 15 % 平衡 5 分鐘。重新注入樣品前，需以 15 % 平衡 15 分鐘。此梯度主要用於 12 種大豆異黃酮總含量快速測定的分析與定量，總分析時間為 65 分鐘。





4-2 大豆異黃酮含量計算方式

$$\text{Isoflavone content } (\mu\text{ g/g}) = \frac{A_S}{A_{I.S}} \times \frac{C_{I.S}}{\text{RRF}} \times \frac{V}{M_S}$$

$$\text{Isoflavone content } (\mu\text{ mol/g}) = \frac{A_S}{A_{I.S}} \times \frac{C_{I.S}}{\text{RRF}} \times \frac{V}{M_S} \times \frac{1}{\text{M.W}}$$

A_S =Peak area of isoflavone compounds

$A_{I.S}$ =Peak area of internal standard (benzoic acid)

$C_{I.S}$ =Concentration of internal standard

V =Final volume

M_S =Sample weight

RRF= Relative response factor


MW=Molecular weight

本研究計算大豆異黃酮含量所採用之 RRF 值以苯甲酸為內標準品與分子量

Isoflavone compound	RRF _{benzoic acid}	Molecular Weight
Daidzin	8.52	416
Genistin	10.42	432
Malonyldaidzin	4.93	502
Malonylgenistin	9.13	458
Daidzein	19.65	254
Genistein	16.38	270
Daidzein 7-O-phosphate	12.85	334
Genistein 7-O-phosphate	15.63	350

第五節、實驗方法

5-1 利用中性氧化鋁管柱層析分離 Genistein 及 Daidzein



實驗步驟如圖 5-1。將中性氧化鋁粉末 400 g 以流洗液 (乙酸乙酯:甲醇:水 (65:25:4))，2 倍體積浸泡平衡隔夜，填充至製備級管柱中，並以 1 倍體積流洗液平衡。注入去糖基大豆異黃酮樣品原料溶液 PRMA (5.7g / 400 mL Ethyl acetate: methanol: water (65:25:4))，以 3 倍管柱體積之流洗液沖提，流洗速度：1.5 mL/ min，確保 daidzein 完全洗出，收集流洗出之 daidzein 部分減壓濃縮後凍乾備用。將流洗完畢之管柱粉末傾倒至燒杯，加入 1 % 鹽酸甲醇溶液 500 mL，以攪拌器攪拌 1 小時，使 genistein 從中性氧化鋁粉末脫附，此脫附動作重複三遍，共得總液體 1600 mL。將脫附液進行減壓濃縮後，以蒸餾水超音波震盪懸浮後離心得沉澱物，加入 1000 mL 丙酮進行回溶後離心去除沉澱物，減壓濃縮，以水懸浮，進行凍乾。

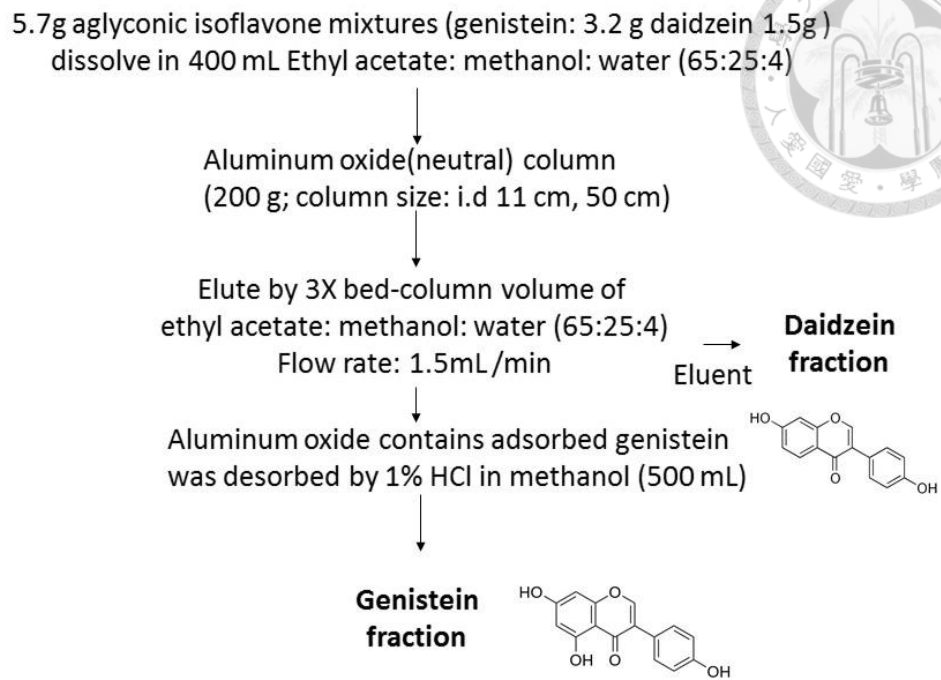


圖 5-1. 中性氧化鋁管柱分離 genistein 及 daidzein 流程圖

Fig 5-1. The flow chart for separation of genistein and daidzein by aluminum oxide chromatography.

5-2 利用鈣離子沉澱法分離 genistin 及 daidzin

參考 Dobbins 等人發表之方法並加以修飾(Dobbins, 2006)。將 46 % 帶醣基異黃酮原料 RMG 100 g 溶解於 800mL 丙酮中，加入 5 % 氫氧化鈣水溶液 200 mL，攪拌一小時後進行過濾，分別收集濾液(濾液 1) 及濾餅得濾餅。將濾餅以重新懸浮於 10 % 檸檬酸進行脫附，攪拌 1 小時後過濾回收不溶部分。將上述不溶物以 800 mL 丙酮溶解後再次加入 2.5 % 氫氧化鈣水溶液 200 mL，攪拌反應一小時後進行過濾得濾餅，將濾餅以 10 % 檸檬酸進行脫附 1 小時後再次過濾得濾餅，將濾餅以 800 mL 丙酮溶解後，過濾去除不溶物，減壓去除丙酮後，進行凍乾後得到 genistin。另將上述濾液 1 加入 4.9 g 之氫氧化鈣進行沉澱，過濾後得上清液即為 daidzin，凍乾後備用。實驗流程表如圖 5-2。

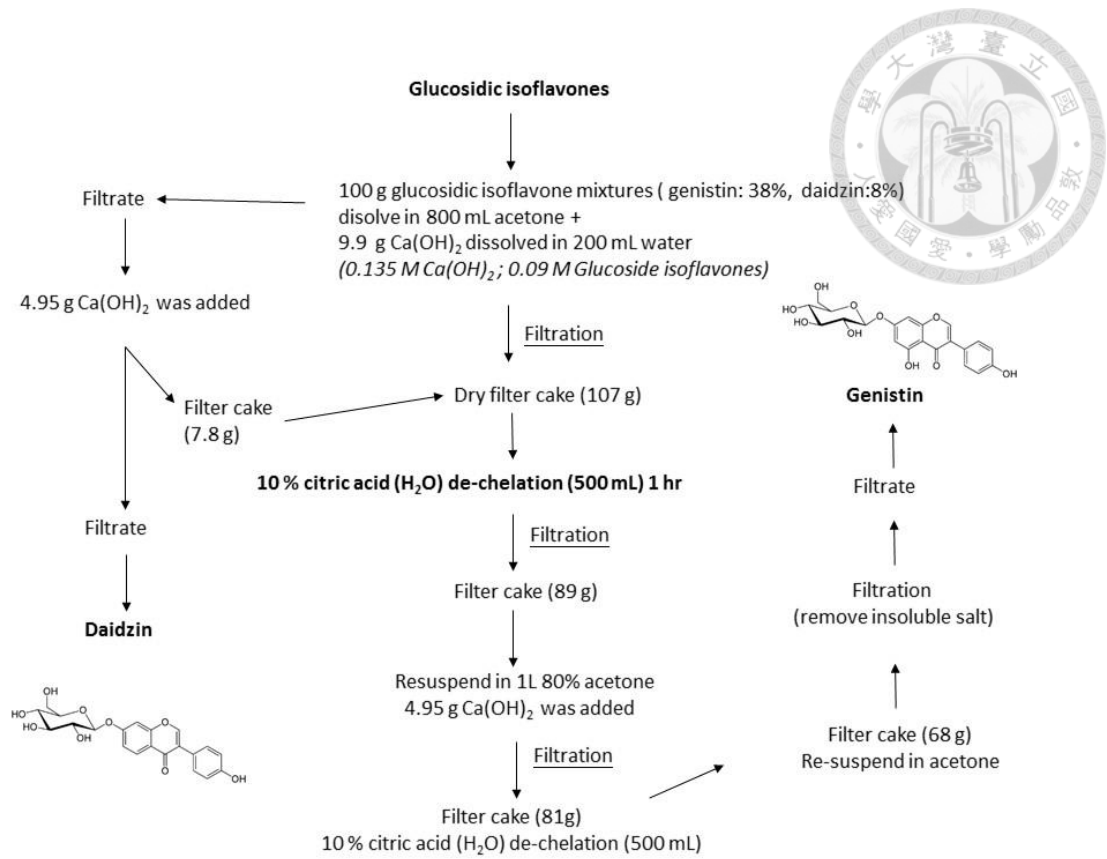


圖 5-2. 鈣離子沉澱法分離 genistin 及 daidzin 實驗流程圖

Fig 5-2. The flow chart for the separation of genistin and daidzin by a calcium precipitation method.

5-3 各別異黃酮單體純度計算及回收率計算

(1) 各別異黃酮單體純度計算

將所有經分離後之 genistein, daidzein, genistin 及 daidzin，各別步驟之樣品進行凍乾後精確稱量，以甲醇溶解後，加入內標準品，以 HPLC 進行定量分析，計算單位重量中目標異黃酮的含量。

$$\text{Purity of target compound in sample} = \frac{\text{Weight of target compound (g)}}{\text{Weight of sample (g)}} \times 100\%$$

(2) 各別異黃酮單體回收率計算

將所有經分離後之 genistein, daidzein, genistin, daidzin，各別步驟之樣品進行凍乾後精確稱重，以甲醇溶解後，加入內標準品，以 HPLC 進行定量分析，並測定原料原始各別異黃酮之含量以進行回收率之計算。

$$\text{Recovery of target compound in sample} = \frac{\text{Weight of target compound in sample (g)}}{\text{Weight of target compound in original material (g)}} \times 100\%$$

5-4 各別異黃酮對 *B. subtilis* BCRC 19679 生長的影響

將 *B. subtilis* BCRC 19679 於 NA 固態培養基以四區劃線法在 37°C 培養 12 小時，取出單一菌落，接種至 100 mL 之合成培養基中，於 37°C 培養 24 小時後，做為種菌使用。生長曲線測定方法：取不同時期之培養液 200 μ L 加入 20% 甲醇 800 μ L，vortex 後測定 600 nm 之吸光值。

5-5 *B. subtilis* BCRC 19679 對各別異黃酮的生物轉化

(1) 種菌活化

將 *B. subtilis* BCRC 19679 於 NA 固態培養基以四區劃線法在 37°C 培養 12 小時，取出單一菌落，接種至 100 mL 之合成培養基中，於 37°C、155 rpm，培養 24 小時後，做為種菌使用。

(2) *B. subtilis* BCRC 19679 在各別異黃酮基質濃度下之轉化率

將種菌接種 5 mL 至 85 mL 之合成培養基中，再加入 10 mL 不同濃度之 genistein, daidzein, genistin 及 daidzin (每個試驗組皆為單一異黃酮)，濃度設計列表為下，各試驗組異黃酮濃度皆以純度及分子量進行校正。於 37°C、155 rpm 培養 48-72 小時，每間隔 6 小時取樣。取出 100 μ L 稀釋 10 倍，加入內標準品測定異黃酮之變化。

Concentration	1 1850 μ M	2 3700 μ M	3 4400 μ M	4 5550 μ M	5 7400 μ M	6 11000 μ M
Genistein (mg/L)	500	1000	1200	1500	2000	3000
Daidzein (mg/L)	470	940	1130	1410	1880	2820
Genistin (mg/L)	800	1600	1920	2400	3200	4800
Daidzin (mg/L)	770	1540	1840	2310	3080	4620

D7P 及 G7P 之轉化率計算方式：

$$\text{Bioconversion rate of G7P(\%)} = \frac{\text{content of G7P (mmole)}}{\text{content of initial genistein (mmole)}} \times 100\%$$

$$\text{Bioconversion rate of D7P (\%)} = \frac{\text{content of D7P (mmole)}}{\text{content of initial daidzein (mmole)}} \times 100\%$$

D7P 及 G7P 之比轉化速率計算方式：

$$\text{Specific bioconversion rate of G7P} = \frac{dG7P \text{ conc. (}\mu\text{M)}}{OD600.T}$$

$$\text{Specific bioconversion rate of G7P} = \frac{dG7P \text{ conc. (}\mu\text{M)}}{OD600.T}$$

B. subtilis BCRC 19679 比生長速率計算方式：

$$\text{Specific growth rate of } B. \textit{subtilis} \text{ BCRC 19679} = \frac{OD600f - OD600i}{OD600i T}$$

比生長速率計算方式 (μ)：每小時單位單位菌體所增加的菌體量稱為比生長速率。倍增時間為菌體量倍增之時間。假定在任何時間 (t)，微生物細胞數目的增加速率 (dN/dt) 正比於已經存在的總細胞數目 (N)，則得： $dN/dt = \mu N$ 。經積分得： $\ln N_t - \ln N_0 = \mu t$ ，對於一倍增時間， $t = T_d$ ， $N_t = 2N_0$ 的培養物： $\ln 2N_0 - \ln N_0 = \mu T_d$ 。得： $\mu = \ln 2 / T_d$ 。

參數含義：

μ ：比生長速率，單位 h^{-1}

t ：時間，單位 h

N ：任何時間處微生物細胞量

N_t ：開始培養 t 時間過後生物細胞量

N_0 ：開始時微生物細胞量

T_d ：倍增時間，即為微生物細胞量變為原來的兩倍所需的時間

5-6 統計分析

本研究的數據在比較是否有統計上的顯著差異時，使用單因子變異分析 (ANOVA, analysis of variance)，信心範圍為 95% ($p < 0.05$)。



第四章 結果與討論



1. 分離 genistein 及 daidzein

Wang 等人於 1971 年發表之論文顯示，利用中性氧化鋁進行薄層層析，以 chloroform : methanol : water (65:25:4) 作為展開相，可將 genistein 及 daidzein 分離 (Rf 值分別為 0 及 0.78)(Wang, 1971)。

本研究以此為基礎，考量後續將放大製備程序，首先探討展開溶劑之更變，因原方法之展開相中氯仿為主要展開溶劑，會對人體及環境造成較大的傷害，故以不同展開系統進行取代。取代之展開溶劑系統如表 4-1，以乙酸乙酯、甲醇、丁醇、正己烷及水，混合不同比例系統進行展開，在展開相取代試驗中，乙酸乙酯，甲醇及水混合系統展開相 genistein 及 daidzein 兩者 Rf 值差值皆可大於 0.7，最後選用以 ethyl acetate : methanol : water (65:25:4) 作為展開相，取代原有氯仿之展開相系統，在此展開相中，genistein 及 daidzein Rf 值分別為 0.1 以及 0.9。TLC 展開圖於圖 4-1。

將 TLC 層析條件應用於管柱層析製備

建立中性氧化鋁管柱製備大量 genistein 及 daidzein 試驗中，填充中性氧化鋁管柱 (200 g; column size: 11 × 50 cm)，準備 5.7 g PRMA (純度: 82 %) 溶於 400 mL ethyl acetate: methanol: water (65:25:4)，確定流洗液 (ethyl acetate: methanol: water (65:25:4)) 三倍管柱體積流洗後即可將 daidzein 完全流洗出管柱，收集後減壓濃縮去除有機溶劑後，進行凍乾即可得到 daidzein (純度: 92 %; 回收率: 94 %)。而將吸附於中性氧化鋁管柱之 genistein 以含 1% 鹽酸之甲醇溶液進行攪拌脫附 1 小時，脫附後以 Waterman 131 號濾紙過濾得上清液，固體部分再次以含 1% 鹽酸之甲醇溶液 500 mL 進行攪拌脫附 1 小時進行脫附動作，重複三次。共得總液體 1600 mL。將脫附液進行減壓濃縮後，以蒸餾水超

音波震盪懸浮後離心得沉澱物，加入 1000 mL 丙酮進行回溶後離心去除沉澱物，減壓濃縮去除有機溶劑，以水懸浮，進行凍乾得 genistein (純度：95 %；回收率：89 %)。經後續試驗得知，中性氧化鋁管柱分離法亦可運用於製備 genistin 及 daidzin，以 RMG 為製備原料，步驟皆如同上述製備 genistein 及 daidzein 之方法，唯有改變原料來源，製備得到 genistin 及 daidzin 回收率及純度如表 4-2-1。

表 4-1. 中性氧化鋁 TLC 薄層層析以不同展開系統分離 genistein 及 daidzein

Table 4-1. Separation of genistein and daidzein by aluminum oxide TLC in different solvent systems.

Develop solvent system (%, v/v)	R _f value		Developing time (mins)
	Genistein	Daidzein	
Chloroform: methanol: water (65:25:4)	0.02~0.1	0.93	40
Ethyl acetate: methanol: water (65:25:4)	0.01~0.1	0.90	45
Ethyl acetate: methanol: water (65:20:4)	0.1~0.2	0.93	45
Ethyl acetate: methanol: water (65:15:4)	0.2	0.88	45
Ethyl acetate: methanol: water (65:10:4)	0.02~0.1	0.90	45
Ethyl acetate: butanol (10:1)	0.5	0.79	50
Ethyl acetate: butanol (5:1)	0.35	0.85	50
Ethyl acetate: butanol (1:1)	0.2	0.85	50
Ethyl acetate: hexane (20:1)	0.1~0.3	0.35	40
Ethyl acetate: hexane (10:1)	0~0.1	0.4	40
Ethyl acetate: hexane (5:1)	0~0.5	0.6	40

R_f is referred to the ratio of isoflavone distance from origin to solvent front distance from origin.

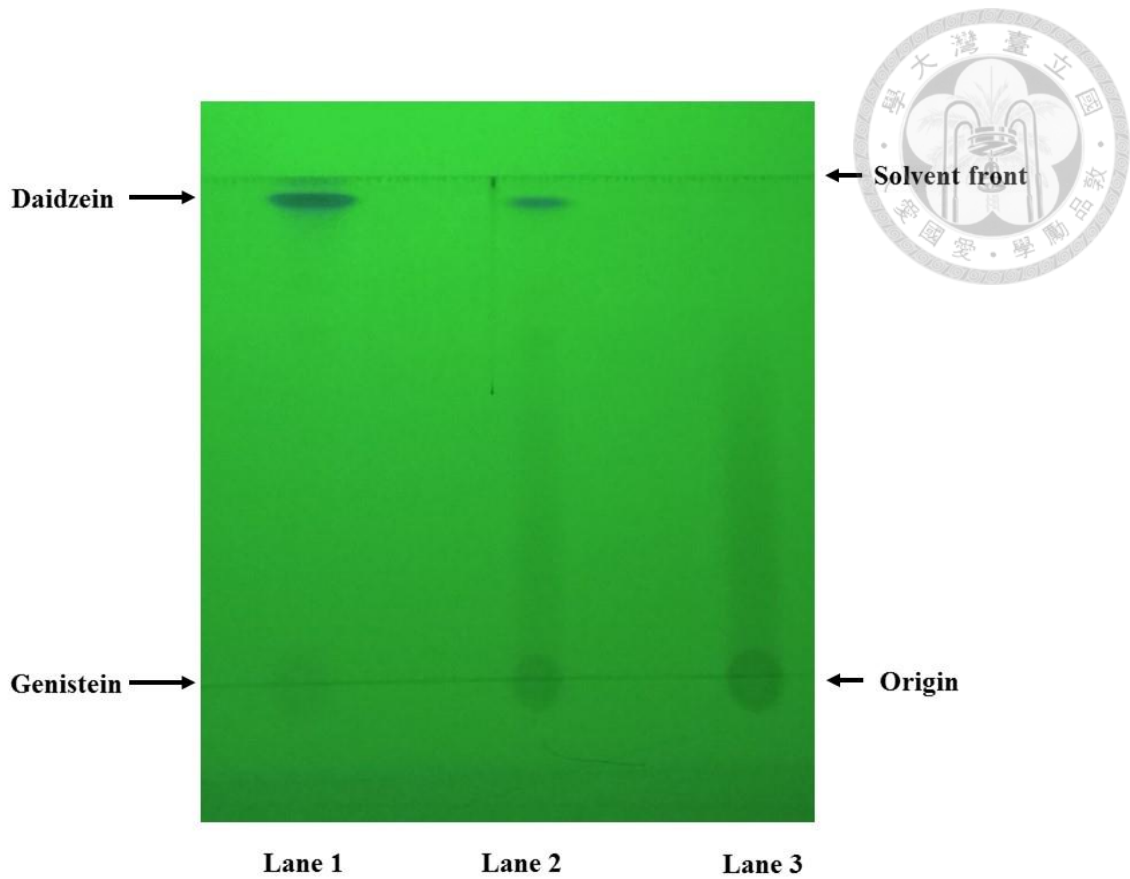
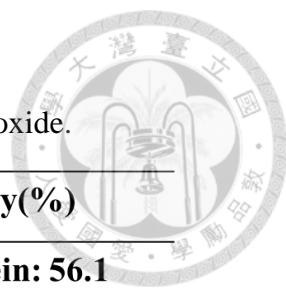


圖 4-1. 中性氧化鋁 TLC 薄層層析以 ethyl acetate: methanol: water (65:25:4)展開系統分離 genistein 及 daidzein。

Fig 4-2. Aluminum oxide TLC profile of genistein and daidzein in ethyl acetate: methanol: water (65:25:4) solvent system. Lane 1: daidzein standard sample, Lane 2: the mixture of genistein standard and daidzein standard. Lane 3: genistein standard sample. Developing time: 45 min.

表 4-2. 中性氧化鋁管柱分離 genistein 及 daidzein

Table 4-2. Isolation of genistein and daidzein by neutral aluminum oxide.



	Recovery(%)	Purity(%)
Raw material	—	Genistein: 56.1 Daidzein: 26.7
Genistein	89.4	95.2
Daidzein	94.1	92.7

表 4-2-2 中性氧化鋁管柱分離 genistin 及 daidzin

Table 4-2-2 Isolation of genistin and daidzin by neutral aluminum oxide.

	Recovery(%)	Purity(%)
Raw material	—	Genistin: 38.1 Daidzin: 8.2
Genistin	82.3	92.6
Daidzin	97.4	91.9

2. 分離 genistin 及 daidzin

本方法參考自 Dobbins 等人發表之方法(Dobbins, 2006)，該方法記載以鈣離子進行螯合 genistin 使其沉澱之製備過程，以 60 % 丙酮做為反應系統，加入鈣離子進行螯合，再利用 15 % 鹽酸進行 genistin 脫附，回收率為 65 %，純度 > 90 %，此專利並未探討 daidzin 製備程序。但因仿照該方法進行 genistin 之分離，結果並不符該方法所記載，故本研究改變不同的反應溶劑系統、氫氧化鈣使用量、脫附系統，使程序製備更為簡易及快速，製備出更高純度之 genistin 及 daidzin，且有更高的回收率。經試驗後將反應系統改為 80% 丙酮。氫氧化鈣之使用量也進行修正，原方法之氫氧化鈣使用量為原料異黃酮莫耳數之 5.2 倍，方可進行鈣離子沉澱之程序；經不同氫氧化鈣使用量試驗後，以原料異黃酮莫耳數 1.5 倍之氫氧化鈣使用量為最佳條件，而第二次鈣離子沉澱使用量為原始原料異黃酮莫耳數 0.75 倍，經鈣離子沉澱後之 genistin-Ca 複合物需經過酸脫附可得到 genistin，原方法使用 15 % 鹽酸溶液進行脫附，脫附時間為 3 小時。本研究使用與鈣離子鍵結能力更強之檸檬酸溶液作為脫附系統，由前人研究表示鈣離子與檸檬酸有很大之鍵結強度 (D.N. Misra, 1996)。經不同濃度檸檬酸溶液及不同脫附時間試驗後，以 10 % 檸檬酸溶液、脫附 1 小時，為最佳脫附條件，最後得到 genistin 純度為 92 %；回收率為 86 %。在鈣離子與 genistin 沉澱過程中，過濾後上清液經過第二次鈣離子沉澱去除微量 genistin 後可得到 daidzin，純度為 91 %，回收率為 92.4 %。Genistin 及 daidzin 回收率及純度將以不同步驟進行探討，探討步驟如表 4-3 及表 4-4。



表 4-3. 由鈣離子沉澱之上清液回收 daidzin

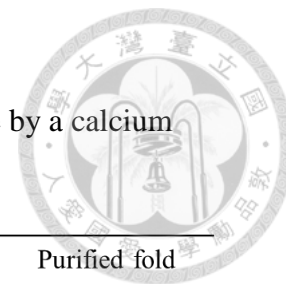
Table 4-3. Recovery of daidzin from the supernatant of glucosidic isoflavone mixture through calcium precipitation process.

	Yield (g)	Recovery (%)	Purity (%)	Purified fold
Raw material	100.8	100.0	7.2	1.0
1 st supernatant from Ca ²⁺ precipitation	7.8	95.1	89.1	12.3
2 nd supernatant from Ca ²⁺ precipitation	7.3	92.4	91.7	12.6

100.8 g RMG (purity: 45.4%) dissolve in 1000 mL 80% acetone, 1st supernatant from Ca²⁺ precipitation: after precipitation by adding 9.9 g Ca(OH)₂, the supernatant from 1st Ca²⁺ precipitation through filtration, 2nd supernatant from Ca²⁺ precipitation: after precipitation by adding 4.9 g Ca(OH)₂, the supernatant from 2nd Ca²⁺ precipitation through filtration N=3.

表 4-4. 由鈣離子沉澱物中回收 genistin

Table 4-4. Recovery of genistin from glucosidic isoflavone mixture by a calcium precipitation process.



	Yield (g)	Recovery (%)	Purity (%)	Purified fold
Raw material	100.8	100	38.2	1.0
1 st 10 % citric acid de-chelation	55.7	88.2	61.1	1.6
2 nd 10 % citric acid de-chelation	45.1	87.6	74.7	1.9
Re-suspend in acetone (remove insoluble salt)	35.9	86.1	92.2	2.4

100.83 g RMG (purity: 45.4%) dissolve in 1000 mL 80% acetone, 1st 10 % citric acid de-chelation: the residue from 1st Ca²⁺ precipitation was de-chelate by 10 % citric acid. 2nd 10 % citric acid de-chelation: the residue from 2nd Ca²⁺ precipitation was de-chelate by 10 % citric acid. N=3.



3. *B. subtilis* BCRC 19679 轉換 genistein 及 daidzein

3.1 Genistein 及 daidzein 對 *B. subtilis* BCRC 19679 生長之影響

配製內含 500-3000 mg/L genistein 及 470-2820 mg/L daidzein 之合成培養基做為轉化培養基，於 37°C、155 rpm 轉換 48 小時，每隔 3 小時取樣並進行 HPLC 分析異黃酮之濃度變化。

隨著系統 genistein 濃度上升 (與控制組比較)，genistein 對微生物生長有延長倍增時間的效果；控制組於 12 小時倍增時間為 0.95 h，genistein 500 mg/L 轉換 12 小時倍增時間增加為 1.43 h，最高濃度 genistein 3000 mg/L 轉換 12 小時倍增時間更延長為 4.57 h。daidzein 於濃度 1130 mg/L 以下進行生物轉換 24 小時之內，微生物倍增時間 (Td) 與控制組並無顯著性差異。結果顯示出，genistein 相較於 daidzein 更具延長微生物初期倍增時間的能力。本研究室許等人於 genistein 與 daidzein 溶解度試驗中得知，genistein 水中溶解度為 0.82 mg/L，daidzein 為 0.36 mg/L，溶解度的差異可能為造成兩者生長相異的因素，亦或是 genistein 及 daidzein 本身存在著對微生物毒性之差異性，前人文獻指出 genistein 於低濃度下對 *Staphylococcus aureus* 及 *Bacillus anthracis* 具有抑制生長的效果 (Hong, 2006)；Andrej Tarkowski 等人利用 *Streptococcus pasteurianus*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori* 及 *Escherichia coli* 作為試驗微生物，探討 genistein 及 daidzein 之抑制微生物生長能力，結果顯示，genistein 在各別微生物皆較 daidzein 有抑制微生物生長的效果，並且推測此抑菌效果來自 genistein 對細菌之 topoisomerase II 有較強之抑制活性，間接影響到細菌第 II 型 DNA 拓撲異構酵素穩定性 (Andrej Tarkowski, 2004)。個別異黃酮對微生物之生長影響，測定 OD₆₀₀ 之數值與 CFU/ml 及菌體乾重之校正公式於附錄。

3.2 *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistein 及 daidzein 之生物轉化情形

B. subtilis BCRC 19679 對 genistein 500-2000 mg/L 轉換 48 小時有良好的轉換效率(>90%)，如圖 4-4，比轉換速率最大值 1890 $\mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 發生於起始濃度 500 mg/L genistein、轉換 6 小時。比較比生長速率及 G7P 比生成速率，如圖 4-10，根據 T. Koso 等人提出之微生物轉換模式理論(T. Koso, 1969)，故可推斷 genistein 為菌體連動型之微生物發酵轉換模式。G7P 最高生成濃度為 6700 μM (genistein 2000 mg/L(7400 μM)；轉換 48 小時)。*B. subtilis* BCRC 19679 對 480-940 mg/L daidzein 進行微生物轉換 48 小時有良好的轉換效率(>90%)。比轉換速率最大值 1400 $\mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 發生於起始濃度 1400 mg/L daidzein、轉換 6 小時，由比生成速率可得知以 daidzein 做為目標物進行生物轉換與以 genistein 做為目標物進行生物轉換模式之差異，genistein 最高比生成速率出現在最低濃度組別，而 daidzein 最高比生成速率出現在最低濃度組別 D7P 最高生成濃度為 4800 μM (daidzein 2800 mg/L；轉換 48 小時，轉換率 43%)。比生長速率最大值與 D7P 比生成速率無相關性，屬於非菌體連動型發酵模式。各別 genistein 及 daidzein 於不同濃度及不同時間點之轉換率及 G7P、D7P 生成濃度圖於附錄圖 4-1 至圖 5-6。

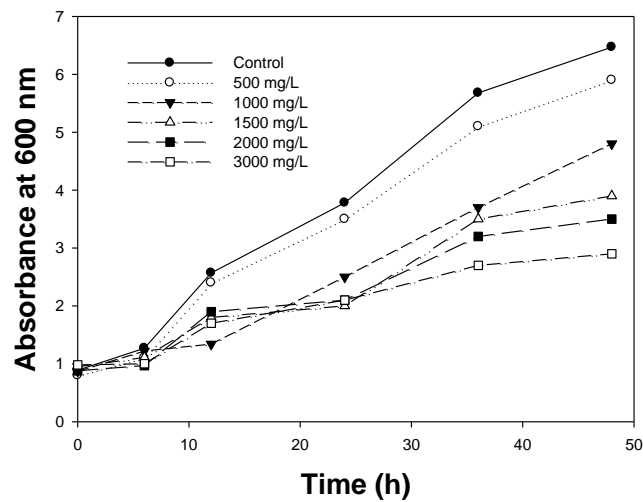


圖 4-2. Genistein 對 *B. subtilis* BCRC 19679 生長的影響

Fig 4-2. Effects of genistein on bacterial growth of *B. subtilis* BCRC 19679.

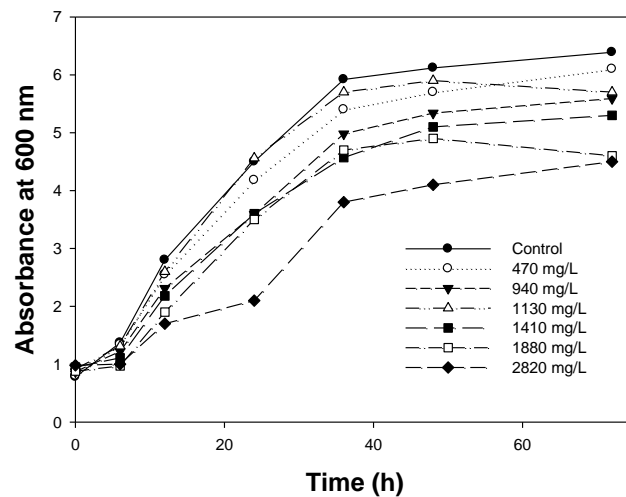


圖 4-3. Daidzein 對 *B. subtilis* BCRC 19679 生長的影響

Fig 4-3. Effects of daidzein on bacterial growth of *B. subtilis* BCRC 19679.

Bacterial culture was carried out in a 500 mL flask containing 100 mL cultural broth including 5 mL of inoculum, 85 mL of synthesis medium and 10 mL of genistein or daidzein solution. Culture was incubated under 150 rpm at 37°C, and sample of 0.2 mL cultural broth was taken to determine the absorbance at 600 nm.

表 4-5. *B. subtilis* BCRC 19679 於不同 genistein 或 daidzein 濃度進行生物轉換之
倍增時間(Td)變化

Table 4-5. The change of doubling time (Td) in different concentrations of genistein
and daidzein bioconverted by *B. subtilis* BCRC 19679 during 48 h after inoculation.

(A) Genistein

Concentration (mg/L)	Control	500	1000	1200	1500	2000	3000
Incubation time (h)	Td (h)						
6	0.89	0.79	0.99	2.88	4.48	18.72	20.79
12	0.95	1.43	2.49	1.08	1.18	8.54	4.57
24	2.13	2.65	2.97	1.90	1.97	1.75	1.59
36	3.22	2.75	2.56	9.70	3.92	5.61	7.43
48	25.36	22.03	8.62	15.38	14.55	15.05	14.73

(B) Daidzein

Concentration (mg/L)	Control	480	960	1130	1410	1880	2820
Incubation time (h)	Td (h)						
6	0.89	0.87	0.88	1.11	1.78	4.48	9.56
12	0.95	1.07	1.40	1.08	0.85	0.92	0.96
24	2.13	2.21	2.43	1.81	2.13	1.82	1.97
36	3.22	3.68	2.98	3.38	3.92	3.26	11.37
48	25.36	17.80	18.11	17.57	15.00	20.37	18.71

Bacterial culture was carried out in a 500 mL flask containing 100 mL cultural broth including 5 mL of inoculum, 85 mL of synthesis medium and 10 mL of genistein or daidzein solution. Culture was incubated under 150 rpm at 37°C, and sample of 0.2 mL cultural broth was taken to determine the absorbance at 600 nm.

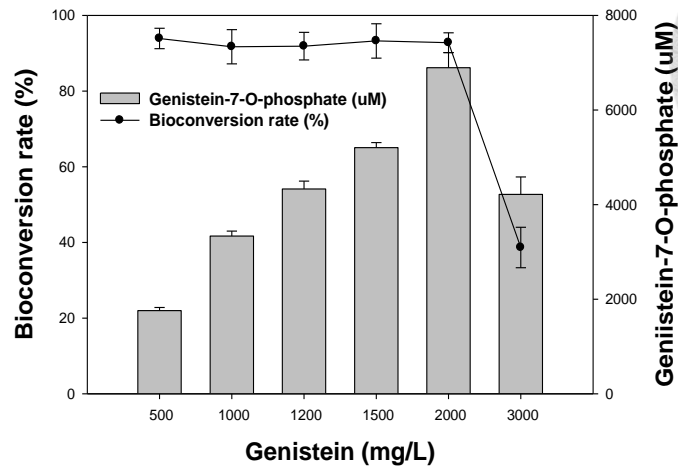


圖 4-4. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistein 之生物轉化情形 (培養基中含 500-3000 mg/L genistein)

Fig 4-4. Biotransformation of genistein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 500-3000 mg/L genistein during 48-h incubation. n=3, mean \pm SD

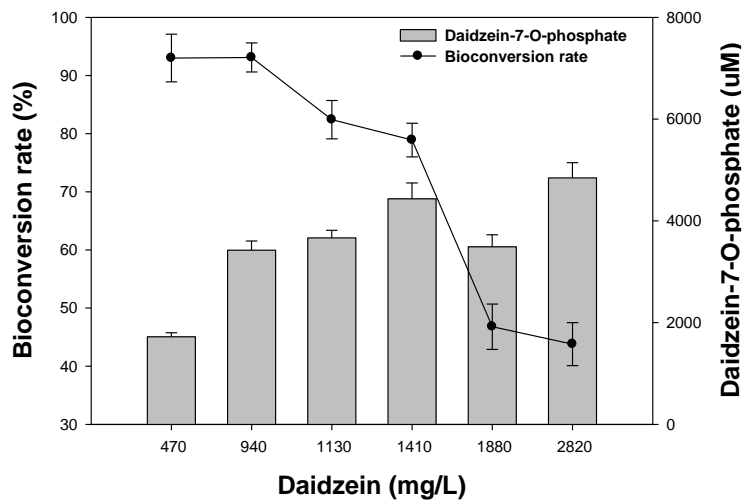


圖 4-5. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzein 之生物轉化情形 (培養基中含 470-2820 mg/L daidzein)

Fig 4-5. Biotransformation of diadzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 470-2820 mg/L daidzein during 48-h incubation. n=3, mean \pm SD

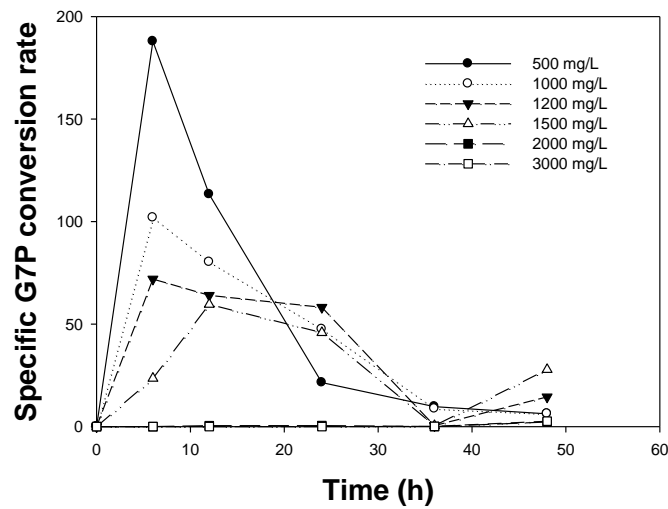


圖 4-6. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistein 之比轉換速率(培養基中含 500-3000 mg/L genistein)

Fig 4-6. Specific conversion rate is referring to the biotransformation of genistein in 500-3000 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 during 48-h incubation. n=3

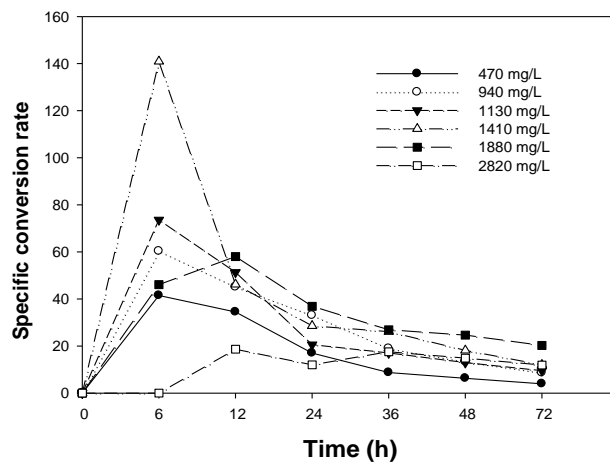


圖 4-7. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzein 之比轉換速率(培養基中含 470-2820 mg/L daidzein)

Fig 4-7. Specific conversion rate is referring to the biotransformation of daidzein in 470-2820 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 during 72-h incubation. n=3

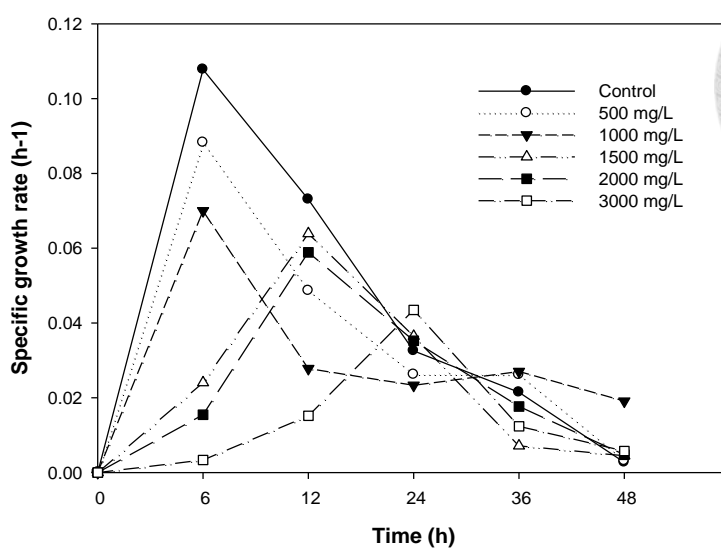


圖 4-8. Genistein 對 *B. subtilis* BCRC 19679 比生長速率之影響(培養基中含 500-3000 mg/L genistein)

Fig 4-8. Specific growth rate is referring to the biotransformation of genistein in 500-3000 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 during 48-h incubation. n=3.

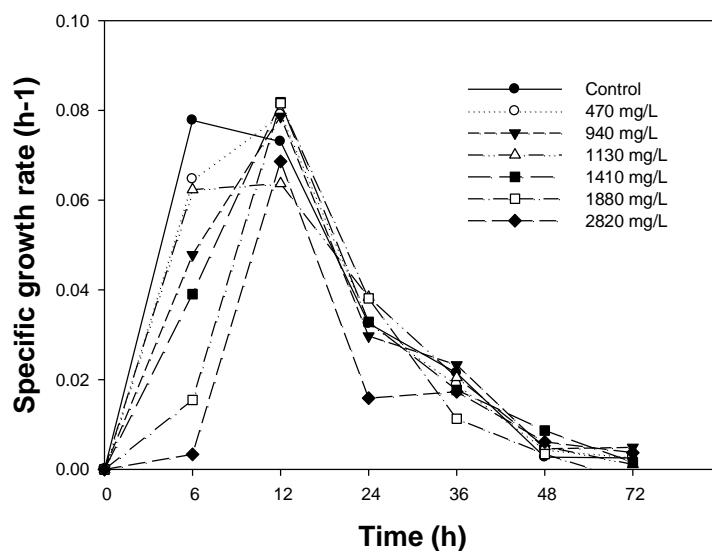


圖 4-9. Daidzein 對 *B. subtilis* BCRC 19679 比生長速率之影響(培養基中含 470-2820 mg/L daidzein)

Fig 4-9. Specific growth rate is referring to the biotransformation of daidzein in 470-2820 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 during 48-h incubation. n=3.

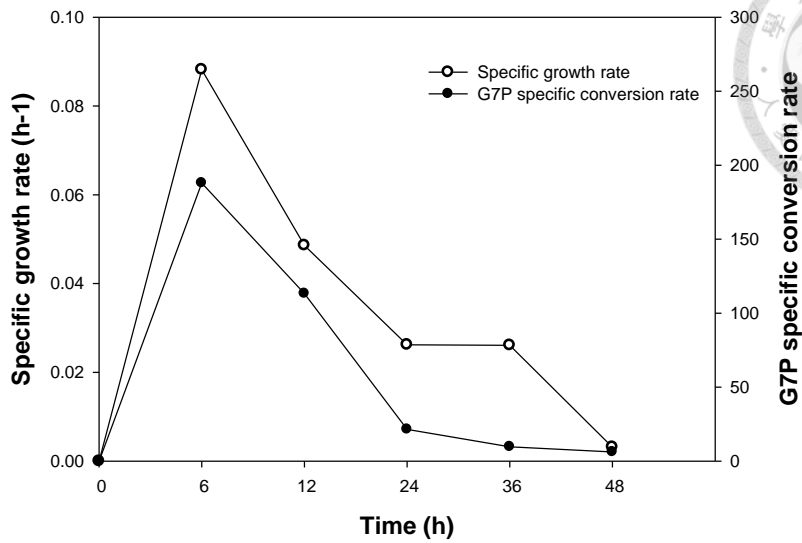


圖 4-10. *B. subtilis* BCRC 19679 於 genistein 500 mg/L 比生成速率及 G7P 比轉化效率之比較

Fig 4-10. Compare of specific growth rate and G7P specific conversion rate by *B. subtilis* BCRC 19679 in 500 mg/L genistein. n=3.

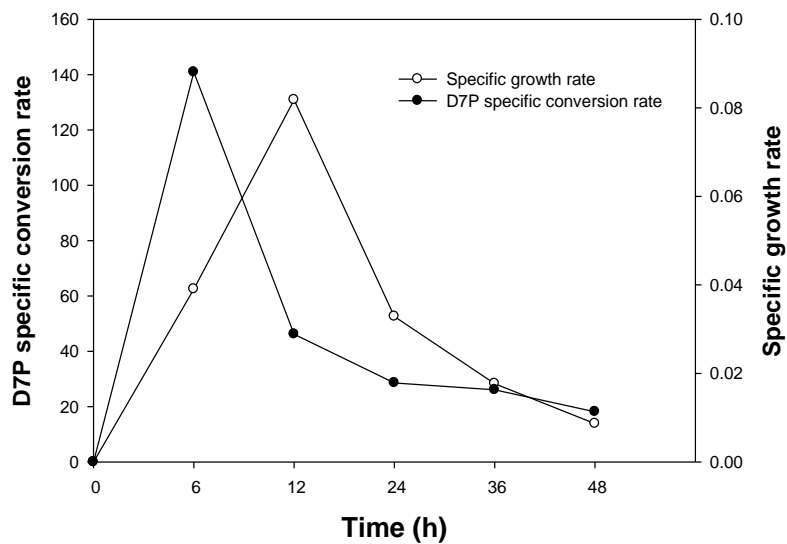


圖 4-11. *B. subtilis* BCRC 19679 於 daidzein 1410 mg/L 比生成速率及 D7P 比轉化效率之比較

Fig 4-11. Compare of specific growth rate and D7P specific conversion rate by *B. subtilis* BCRC 19679 in 1410 mg/L daidzein. n=3.


4. *B. subtilis* BCRC 19679 轉換 genistin 及 daidzin

4-1. Genistin 及 daidzin 對 *B. subtilis* BCRC 19679 生長之影響

B. subtilis BCRC 19679 於低濃度 800mg/L genistin 進行生物轉換，倍增時間 (Td)與控制組並無顯著差異；但以中高濃度 genistin (> 1600 mg/L) 進行生物轉換，微生物倍增時間(Td)與控制組相比有顯著延長。*B. subtilis* BCRC 19679 於濃度 1920 mg/L daidzin 以下進行生物轉換，微生物倍增時間 (Td)與控制組並無顯著性差異。結果顯示出，genistin 相較於 daidzin 更具延長 *B. subtilis* BCRC 19679 初期倍增時間的能力。由 genistin 及 daidzin 兩者比生長速率結果得知，genistin 比生長速率隨著濃度的上升，比生長速率最高點出現時間點有延後之現象，而 daidzin 組別除高濃度組別(daidzin 4620 mg/L)比生長速率最高點有延後外，其餘處理組皆無明顯延後。

4-2 *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistin 及 daidzin 之生物轉化情形

B. subtilis BCRC 19679 於 1600-2400 mg/L genistin 進行微生物轉換 48 小時有良好的轉換率(> 90 %)，而最低濃度(800 mg/L)組別轉換率為 64 %，原因來自於部分 genistin 轉換為 succinly genistin 後並不會繼續轉換成 G7P，即使延長轉換時間，succinly genistin 濃度亦維持不變 (0.2 peak area ratio, peak area ratio: succinyl genistin peak area/ IS peak area)，並穩定存在於培養系統中。實驗中發現 genistin 於中低濃度(800-2400 mg/L)進行生物轉換 48 小時，會先轉換為 genistein，再轉換為 G7P，為兩段式轉換模式，轉換模式於圖 4-20 中表示。genistin 之 G7P 比生成速率最大值(340 $\mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$) 遠低於 genistein 之 *B. subtilis* BCRC 19679 (189 $\mu\text{M OD}_{600}^{-1}\text{h}^{-1}$)，原因為 *B. subtilis* BCRC 19679 以 genistin 做為轉換目標物時，*Bacillus subtilis* BCRC19679 會先將大部分 genistin 轉換成為去醣基形式之 genistein，再轉化為 genistein-7-O-phosphate；少部分的 genistin 會轉換為 succinly genistin 並於轉換系統中達到動態平衡，此轉換過程 genistin



處理組較 genistein 處理組長，故考慮時間參數計算比轉換效率後，造成兩者比轉換速率之差別。可得知 *Bacillus subtilis* BCRC 19679 同時具有水解 genistin 及磷酸化 genistein 的能力並且於轉換系統中同時進行；所有試驗組別中皆有 succinyl genistin 的生成，濃度範圍為 0.05-0.2 (peak ratio, peak ratio: succinyl genistin peak area/ IS peak area)。 *B. subtilis* BCRC 19679 轉換 daidzin 的結果中顯示， *B. subtilis* BCRC 19679 於 1540-1840 mg/L daidzin 進行轉化，轉換率皆可大於 70%。其餘濃度處理組皆小於 70%。D7P 比轉換速率最大值 $230 \mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 發生於 daidzin 起始濃度 1840 mg/L、轉換 24 小時。且 daidzin 會先轉換為 daidzein 後，再轉換為 D7P，為兩段式轉換模式，故可得知 *Bacillus subtilis* BCRC 19679 同時具有水解 glucosidic isoflavone 及磷酸化 aglyconic isoflavone 的能力；所有 glucosidic isoflavone 生物轉化試驗組別中皆有 succinyl genistin 或 succinyl daidzin 的生成，Park CU 等人以 *Bacillus subtilis* 轉換大豆異黃酮，亦發現到兩個新的異黃酮衍生物：succinyl-beta-daidzin 及 succinyl-beta-genistin 的生成 (Park CU, 2010)。

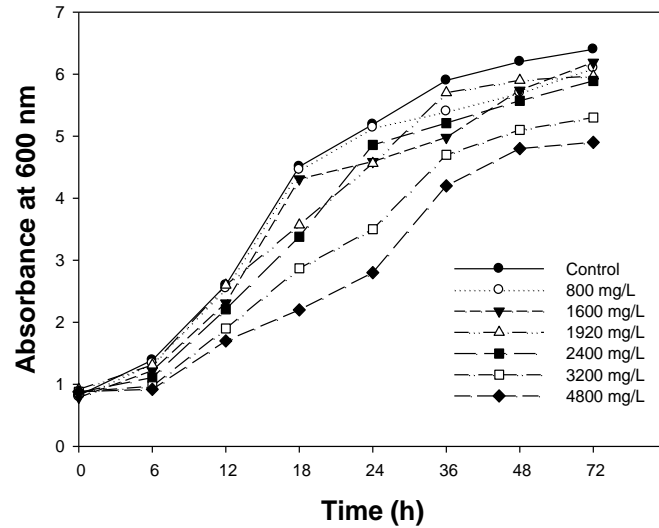


圖 4-12.不同 genistin 濃度對於 *B. subtilis* BCRC 19679 之影響

Fig. 4-12. Effects of genistin on bacterial growth of *B. subtilis* BCRC 19679.

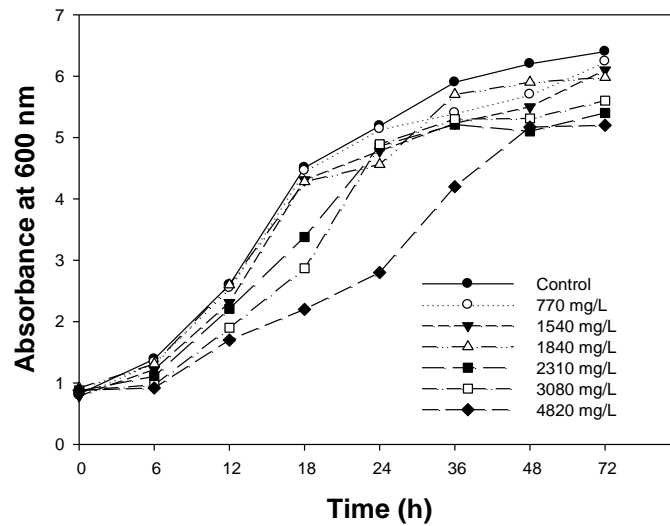


圖 4-13.不同 daidzin 濃度對於 *B. subtilis* BCRC 19679 之影響

Fig. 4-13. Effects of daidzin on bacterial growth of *B. subtilis* BCRC 19679.

Bacterial culture was carried out in a 500 mL flask containing 100 mL cultural broth including 5 mL of inoculum, 85 mL of synthesis medium and 10 mL of genistein or daidzein solution. Culture was incubated under 150 rpm at 37°C, and sample of 0.2 mL cultural broth was taken to determine the absorbance at 600 nm.

表 4-6. *B. subtilis* BCRC 19679 於不同 genistin 及 daidzin 濃度進行生物轉換微生物 24 小時內倍增時間(Td)之變化

Table 4-6. The change of doubling time (Td) in different concentrations of genistin and daidzin bioconverted by *B. subtilis* BCRC 19679 during 48-h incubation.

(A) Genistin

Concentration (mg/L)	Control	800	1600	1920	2400	3200	4800
Incubation time (h)	Td (h)						
6	0.89	0.82	1.34	2.88	4.48	9.59	20.79
12	0.91	1.73	2.49	1.08	1.18	1.91	4.57
24	2.12	2.45	2.97	3.90	4.97	1.75	3.59
36	3.57	2.99	6.56	8.70	15.92	5.61	10.24
48	26.13	22.03	18.62	17.38	17.55	15.05	18.73

(B) Daidzin

Concentration (mg/L)	Control	770	1540	1840	2310	3080	4620
Incubation time (h)	Td (h)						
6	0.89	0.82	0.97	1.24	4.48	4.61	11.65
12	0.91	1.05	1.32	1.36	2.91	1.91	4.57
24	2.12	2.34	2.97	3.90	5.88	1.75	3.59
36	3.57	3.21	3.56	8.70	10.92	5.61	13.24
48	26.13	27.03	28.62	17.38	20.55	17.63	19.73

Bacterial culture was carried out in a 500 mL flask containing 100 mL cultural broth including 5 mL of inoculum, 85 mL of synthesis medium and 10 mL of genistein or daidzein solution. Culture was incubated under 150 rpm at 37°C, and sample of 0.2 mL cultural broth was taken to determine the absorbance at 600 nm.

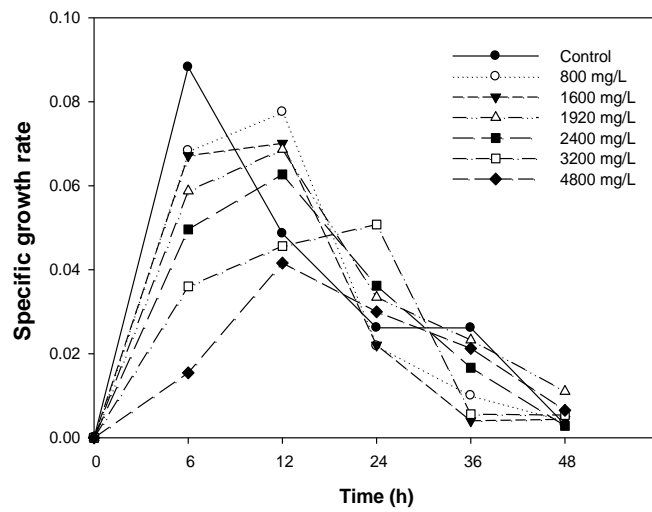


圖 4-14. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistin 之比生長速率 (培養基中含 800-4800 mg/L genistin)

Fig 4-14. Specific growth rate is referring to the biotransformation of genistin in 800-4800 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 during 48-h incubation. n=3

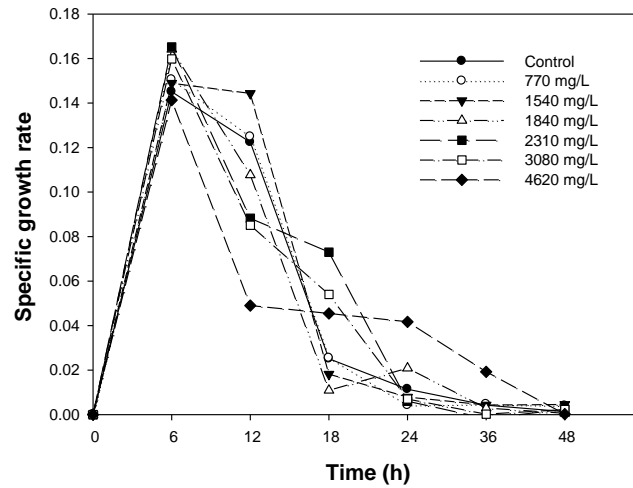


圖 4-15. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzin 之比生長速率 (培養基中含 770-4620 mg/L genistin)

Fig 4-15. Specific growth rate is referring to the biotransformation of daidzin in 770-4820 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 during 48-h incubation. n=3

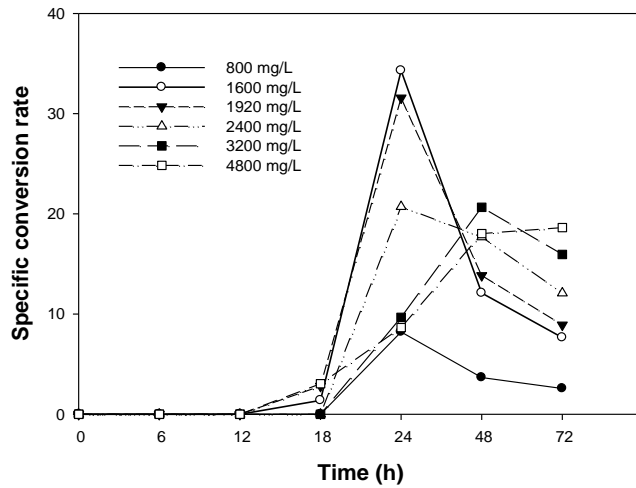


圖 4-16. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistin 之比轉換速率 (培養基中含 800-4800 mg/L genistin)

Fig 4-16. Specific conversion rate is referring to the biotransformation of genistin in 800-4800 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 during 72-h incubation. n=3

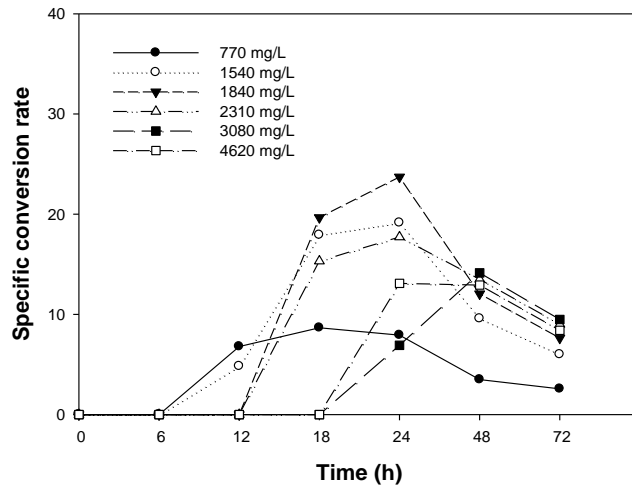


圖 4-17. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzin 之比轉換速率 (培養基中含 770-4620 mg/L genistin)

Fig 4-17. Specific conversion rate is referring to the biotransformation of daidzin in 770-4620 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 during 72-h incubation. n=3

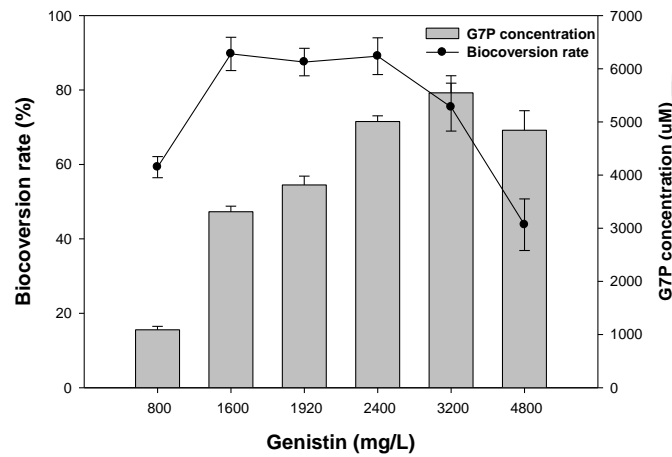


圖 4-18. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistin 之生物轉化情形 (培養基中含 800-4800 mg/L genistin)

Fig 4-18. Biotransformation of genistin by *B. subtilis* BCRC 19679 with 800-4800 mg/L genistin during 48-h incubation. n=3, mean \pm SD

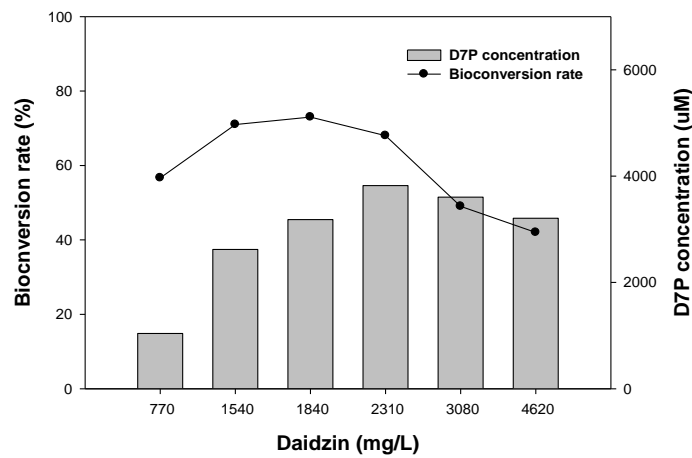


圖 4-19. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzin 之生物轉化情形 (培養基中含 770-4620 mg/L daidzin)

Fig 4-19. Biotransformation of daidzin by *B. subtilis* BCRC 19679 with 770-4620 mg/L daidzin during 48-h incubation. n=3, mean \pm SD.

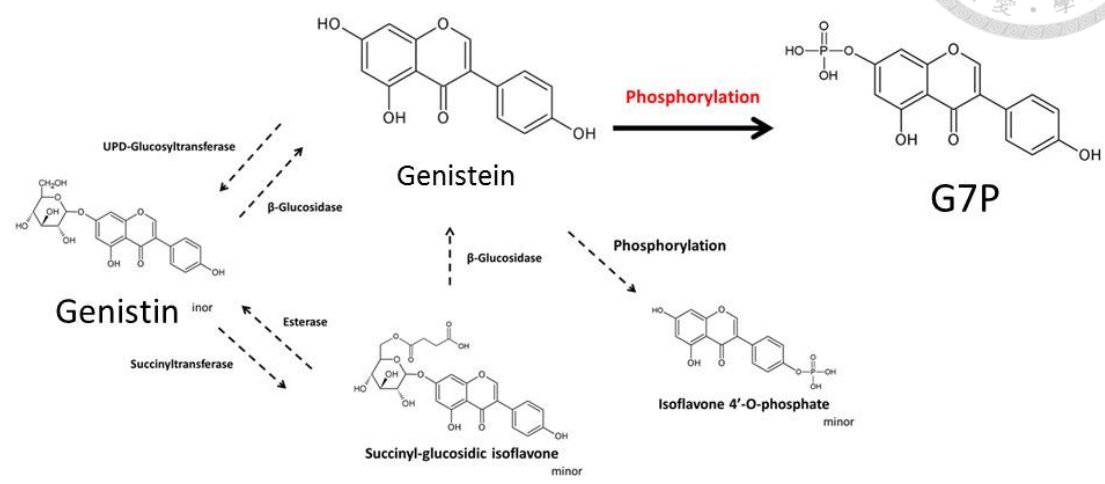


圖 4-20. *Bacillus subtilis* BCRC 19679 轉化 genistin 之預測代謝路徑

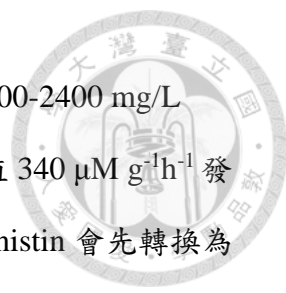
Fig. 4-20. Proposed bioconversion pathway of genistin by *Bacillus subtilis* BCRC 19679

第五章 結論



本研究成功建立 genistein、daidzein、genistin 及 daidzin 之分離程序，並利用上述製備產物進行 *B. subtilis* BCRC 19679 的生物轉換，探討各別異黃酮對 *B. subtilis* BCRC 19679 生長之影響及其轉換動力學，獲得以下結論：

1. 中性氧化鋁可有效分離 genistein 及 daidzein。經由本研究建立的程序，可由原料(genistein : 56 % , daidzein : 26 %)分離出 genistein (純度 : 95 % ; 回收率 : 89 %) 及 daidzein (純度 : 92 % ; 回收率 : 94 %)。
2. 鈣離子沉澱法可有效分離 genistin 及 daidzin。經由本研究建立的程序，可由原料(genistin: 38 % , daidzin: 8 %) 得到 genistin (純度 : 92 % ; 回收率 : 86 %) 及 daidzin (純度 : 91 % ; 回收率 : 92 %)。
3. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistein 有良好轉換效率，於 500-2000 mg/L 濃度區間，轉換率即大於 90%。比轉換速率的最大值 $1890 \mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 發生於以 500 mg/L genistein 為起始培養濃度、轉換 6 小時。G7P 生成濃度最大值 $6700 \mu\text{M}$ 發生於以 2000 mg/L genistein 為起始培養濃度，轉換 48 小時，轉換率達到 92 %。比生長速率最大值與 G7P 比生成速率有正相關性，屬於菌體連動型發酵模式。
4. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzein 有良好的轉換效率，於 480-940 mg/L 濃度區間，轉換率即大於 90 %。比轉換速率的最大值 $1400 \mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 發生於以 1400 mg/L daidzein 為起始培養濃度、轉換 6 小時。D7P 生成濃度最大值 $4800 \mu\text{M}$ 發生於以 2800 mg/L daidzein 為起始培養濃度；轉換 48 小時，轉換率 43%。比生長速率最大值與 D7P 比生成速率無連動性，屬於非菌體連動型發酵模式。

- 
5. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistin 有良好的轉換率，於 1600-2400 mg/L genistin 濃度區間，轉換率即大於 90%。比轉換速率最大值 $340 \mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 發生於以 1600 mg/L genistin 為起始濃度、轉換 24 小時。genistin 會先轉換為 genistein 後，再轉換為 G7P，為兩段式轉換模式。
6. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzin 之轉換率，於 1540-1840 mg/L daidzin 濃度區間，轉換率大於 70%。比轉換速率最大值 $230 \mu\text{M g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 發生於以 1840 mg/L daidzin 為起始濃度、轉換 24 小時。daidzin 會先轉換為 daidzein 後，再轉換為 D7P，為兩段式轉換模式，故可得知 *Bacillus subtilis* BCRC 19679 同時具有水解 glucosidic isoflavone 及磷酸化 aglyconic isoflavone 的能力；所有 glucosidic isoflavone 生物轉化試驗組別中皆有 succinyl genistin 或 succinyl daidzin 的生成。

第六章 參考文獻



- 李淑芬。1997年。鹼性發酵食品。食品工業月刊。29：17-25
- 何幸容。2008年。納豆菌發酵豆奶的開發及其品質評估。國立中興大學食品暨應用生物科技學系碩士論文。
- 何曉雯。2012年。納豆菌對大豆異黃酮轉化之研究。國立台灣大學農業化學系研究所碩士論文。
- 周澤川。2008年。利用分子模版之技術自中國傳統藥材提煉異黃酮素之防癌藥劑。中醫藥學年報。26(1)：125-160
- 連大進。1995年。台灣黑豆利用與生產展望。農業世界 147：39-42。
- 許元勳。2005年。納豆菌發酵製品介紹及國內研發現況。農業生技產業季刊。3：45-52。
- 蔡文福。1994年。大豆。雜糧作物各論。
- 常致綱。2006年。大豆異黃酮定量方法之改良及加工方式對大豆異黃酮種類轉換之研究。國立台灣大學農業化學系研究所碩士論文。
- 鄭光成。2005年。利用根黴菌之深部培養法開發機能性醱酵黑豆食品之研究。國立台灣大學微生物與生化學研究所碩士論文。
- 洪筱鈞。2008年。大豆中分離高純度 Genistin 之程序。國立高雄應用科技大學化學工程系碩士班論文。
- 林綉霞。2013年。利用微生物轉化生產水溶性大豆異黃酮條件之探討。國立台灣大學農業化學系研究所碩士論文。
- 新編中藥大辭典。1982年。第三冊。新文豐出版社，台南市。
- Adlercreutz H, Bannwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T, Arosemena PJ, Kellis JT, Jr., Vickery LE (1993) Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. The journal of steroid

biochemistry and molecular biology 44 (2):147-153

Adlercreutz H, Hockerstedt K, Bannwart C, Bloigu S, Hamalainen E, Fotsis T, Ollus A (1987) Effect of dietary-components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver-metabolism of estrogens and on sex-hormone binding globulin (Shbg). J steroid biochem 27 (4-6):1135-1144.

Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, Fotsis T, Hamalainen E, Hasegawa T, Okada H (1991) Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. The American journal of clinical nutrition 54 (6):1093-1100

Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. The Journal of biological chemistry 262 (12):5592-5595

Albert A (1958) Chemical aspects of selective toxicity. Nature 182 (4633):421-423.

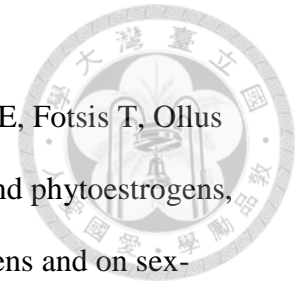
Barnes S (1995) Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. The Journal of nutrition 125 (3 Suppl):777S-783S

Cowan MM (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical microbiology reviews 12 (4):564-577

Chen Hsu, Hsiao-Wen Ho, Chi-Fon Chang, Shang-Ta Wang, Ting-Fang Fang, Ming Hsiung Lee, Nan-Wei Su,(2013) Soy isoflavone-phosphate conjugates derived by cultivating *Bacillus subtilis* var. natto BCRC 80517 with isoflavone, Food research international 53, 487–495

Deák G MG, Láng I, Nékám K, González-Cabello R, Gergely P, Fehér J. (1990) Effects of two bioflavonoids on certain cellular immune reactions in vitro. Acta physiol 76 (2):113-121.

Dixon RA (2004) Phytoestrogens. Annual review of plant biology 55:225-261.



Dixon RA, Ferreira D (2002) Genistein. *Phytochemistry* 60 (3):205-211

Garner A (1997) The effects of phytoestrogens on bone. *Nutrition research* 17
(10):1617-1632

Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y,

Kikuchi M (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher
amounts than their glucosides in humans. *The journal of nutrition* 130
(7):1695-1699

JI Xun WJ, Zhang Lei, Zhao Lin-xiang, Jiang Hua-liang, Liu Hong (2013)

Application of phosphates and phosphonates prodrugs in drug research and
development. *Acta pharmaceutica sinica* 48 (5):621-634

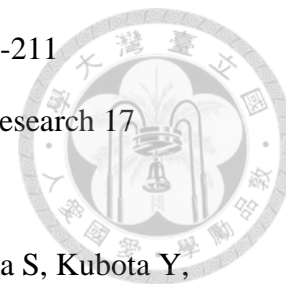
Kishida T, Ataki H, Takebe M, Ebihara K (2000) Soybean meal fermented by

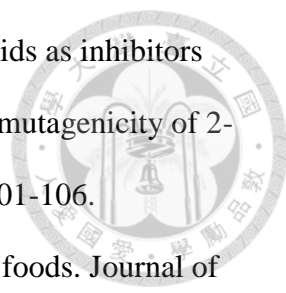
Aspergillus awamori increases the cytochrome P-450 content of the liver
microsomes of mice. *Journal of agricultural and food chemistry* 48 (4):1367-
1372

Katavic, P. L., et al. (2007). Flavonoids as opioid receptor ligands: identification and
preliminary structure-activity relationships. *J.nat prod* 70(8): 1278-1282.

Kato, A., et al. (2008). Structure-activity relationships of flavonoids as potential
inhibitors of glycogen phosphorylase. *Journal of agricultural and food chemistry*
56(12): 4469-4473.

Kuo A, Cappelluti S, Cervantes-Cervantes M, Rodriguez M, Bush DS (1996) Okadaic
acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene
expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleurone cells. *The
Plant cell* 8 (2):259-269.



- 
- Lee, H., et al. (1994). The structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of cytochrome P-450 enzymes in rat liver microsomes and the mutagenicity of 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f] quinoline. *Mutagenesis* 9(2): 101-106.
- Murphy H-jwapa (1994) Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of agricultural and food chemistry* 42 (8):1666-1673
- Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N, Shimizu H (2001) Soy product intake and hot flashes in Japanese women: results from a community-based prospective study. *American journal of epidemiology* 153 (8):790-793
- Naim M, Gestetner B, Zilkah S, Birk Y, Bondi A (1974) Soybean isoflavones. Characterization, determination, and antifungal activity. *Journal of agricultural and food chemistry* 22 (5):806-810
- Okura A, Arakawa H, Oka H, Yoshinari T, Monden Y (1988) Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12] Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 157 (1):183-189
- Ososki AL, Kennelly EJ (2003) Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy research* 17 (8):845-869.
- P. A. Murphy and Wang, H. J. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of agricultural and food chemistry* 1994, 42: 1666-1673.
- Ross JA, Kasum CM (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of nutrition* 22:19-34.
- Rostagno MA, Palma M, Barroso CG (2007) Microwave assisted extraction of soy isoflavones. *Analytica chimica acta* 588 (2):274-282.
- Sesso HD, Liu S, Gaziano JM, Buring JE (2003) Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women. *The Journal of nutrition* 133

(7):2336-2341

Setchell KD, Cassidy A (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *The journal of nutrition* 129 (3):758S-767S

Somekawa Y, Chiguchi M, Ishibashi T, Aso T (2001) Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstetrics and gynecology* 97 (1):109-115

Tommos A Dobbins (2006). Process for isolating genistin from soybean isoflavones mixture. US patent, No7084263 B2.

Waldmann S, Almukainzi M, Bou-Chacra NA, Amidon GL, Lee BJ, Feng JF, Kanfer I, Zuo JZ, Wei H, Bolger MB, Lobenberg R (2012) Provisional biopharmaceutical classification of some common herbs used in western medicine. *Mol pharmaceut* 9 (4):815-822.

Wang, L. C. (1971). Separation of soybean isoflavones from their 5-hydroxy derivatives by thin-layer chromatography. *Anal biochem* 42(1): 296-298.

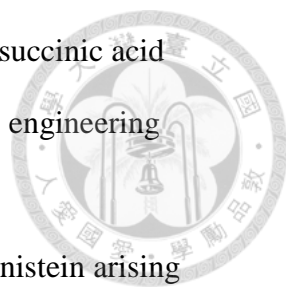
Xu X, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S (2000) Neither background diet nor type of soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women. *The Journal of nutrition* 130 (4):798-801

Yang Z, Kulkarni K, Zhu W, Hu M (2012) Bioavailability and pharmacokinetics of genistein: mechanistic studies on its ADME. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 12 (10):1264-1280

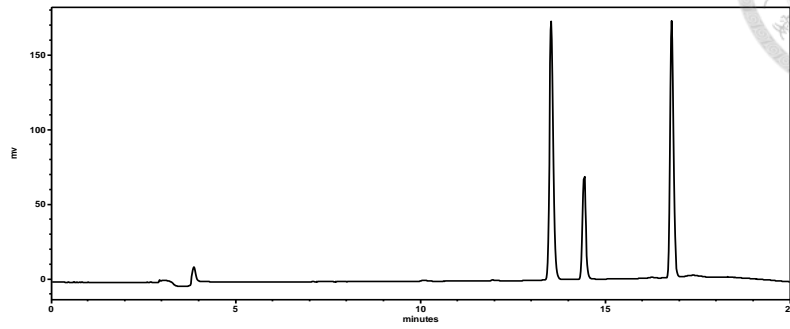
Chen, B. H., et al. (2008). A new approach to bioconversion reaction kinetic parameter identification. *AIChE Journal* 54(8): 2155-2163.

Sampaio, F. C., et al. (2005). Bioconversion of d-xylose to xylitol by *debaryomyces hansenii* UFV-170: Product formation versus growth. *Process biochemistry* 40(11): 3600-3606.



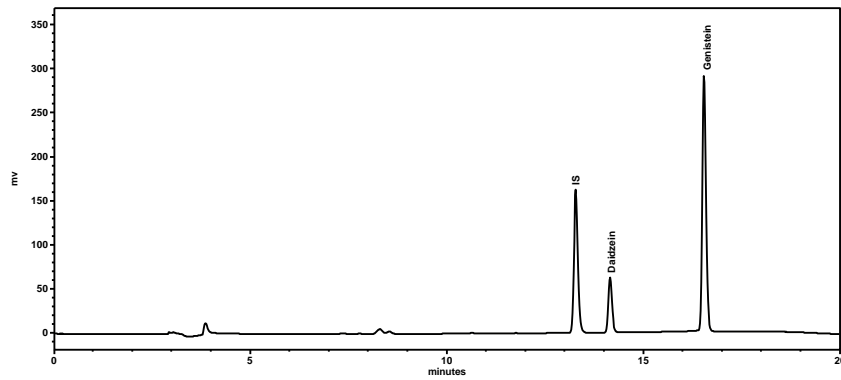
- 
- Song, H., et al. (2008). Modeling of batch fermentation kinetics for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Biochemical engineering Journal* 40(1): 107-115.
- Ulanowska, K., et al. (2006). Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch microbiol* 184(5): 271-278.
- Verdrengh, M., et al. (2004). Phytoestrogen genistein as an anti-staphylococcal agent. *Microbes and infection* 6(1): 86-92.
- Wang, M., et al. (2013). An effective and green method for the extraction and purification of aglycone isoflavones from soybean. *Food science and biotechnology* 22(3): 705-712.
- Zheng, B., A. J. Yegge, T. D. Bailey, Sullivan and L. James. Process for the isolation and purification of isoflavones. US Patent [5,679,806]. 1997.

附錄



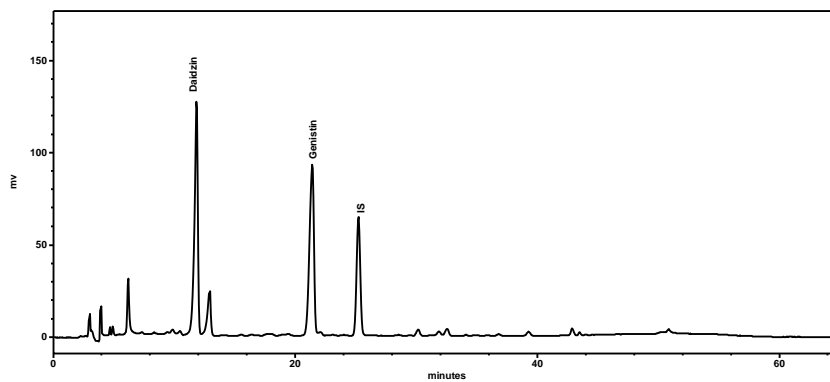
附錄圖 1. PRMA 原料 HPLC 圖譜

Appendix 1. HPLC profile of PRMA isoflavone material



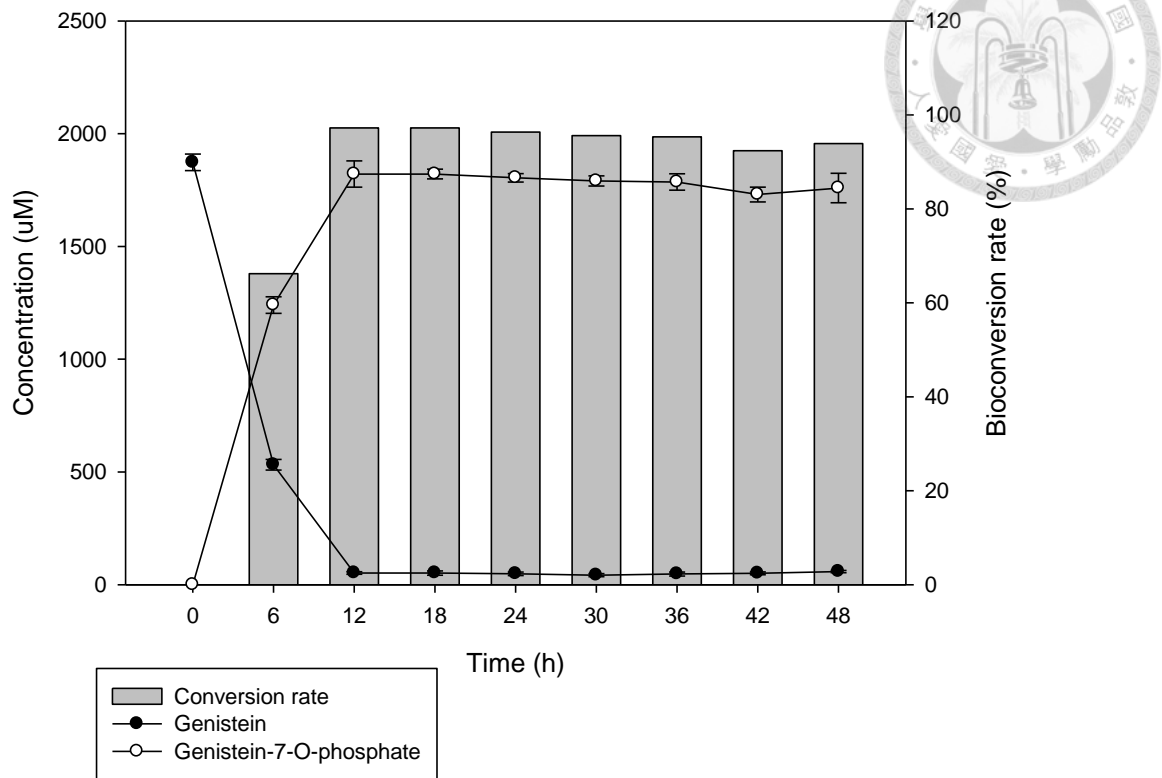
附錄圖 2. RMA 原料 HPLC 圖譜

Appendix 2. HPLC profile of RMA isoflavone material.



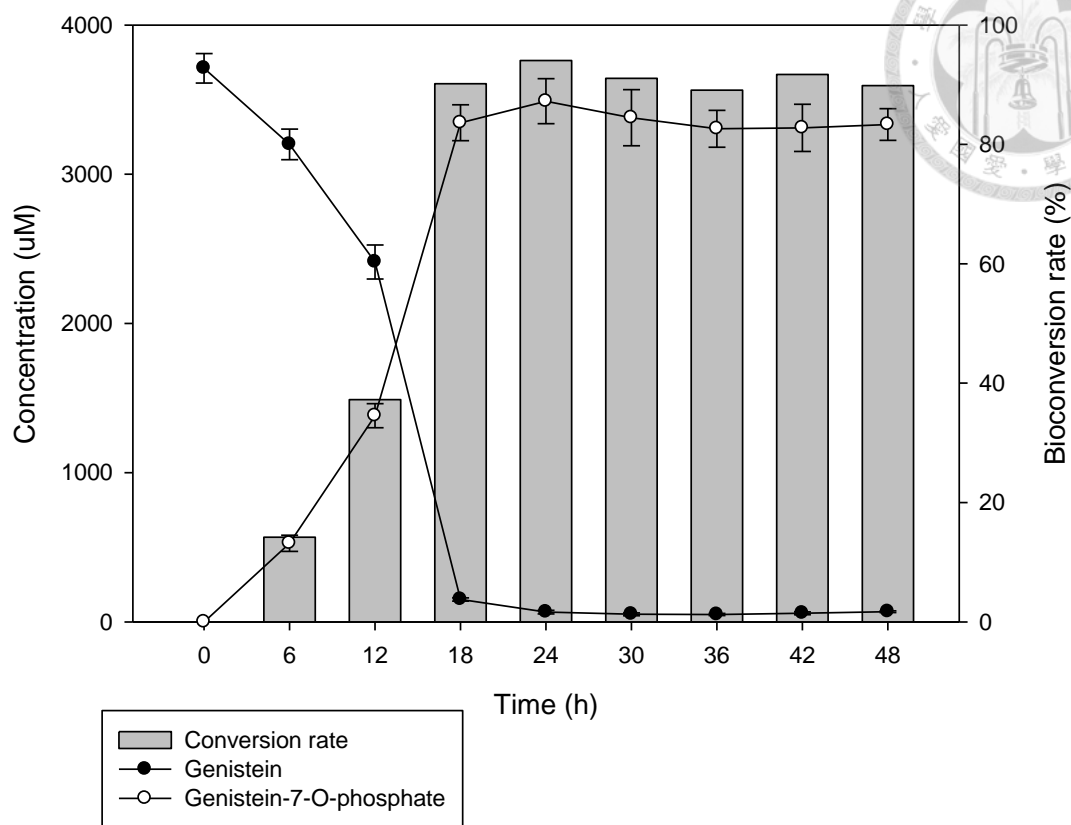
附錄圖 3. RMG 原料 HPLC 圖譜

Appendix 3. HPLC profile of RMG isoflavone material.



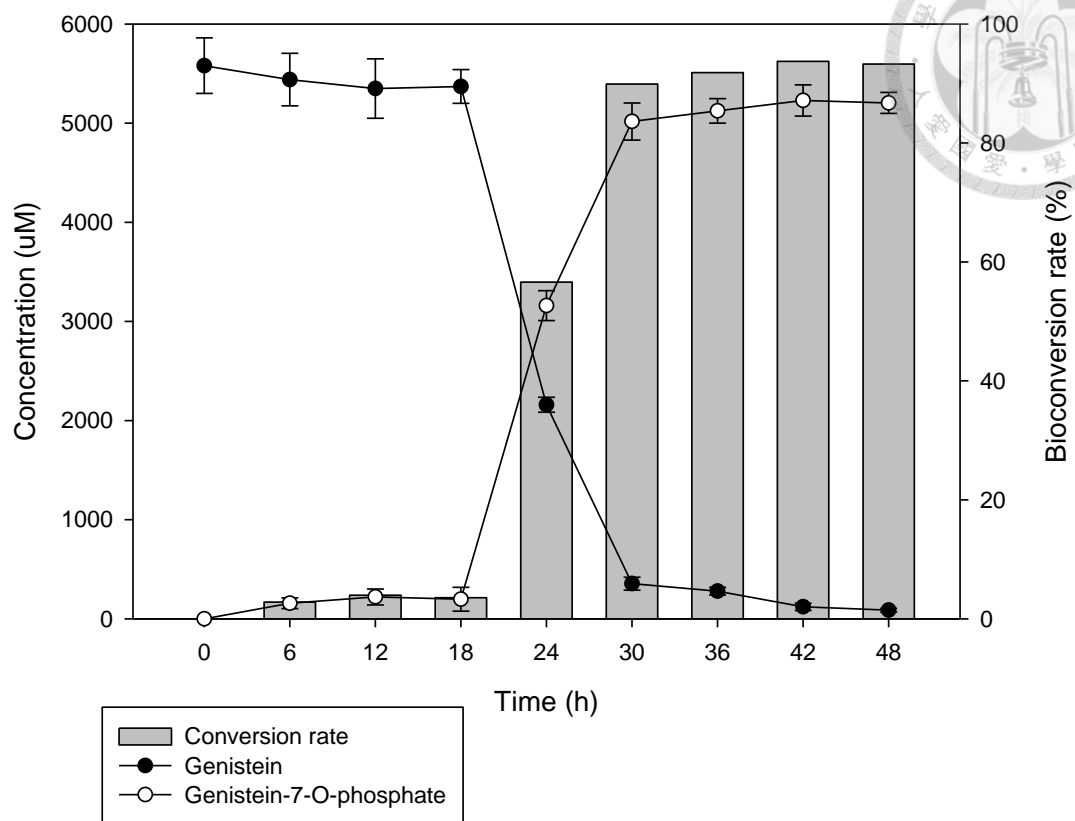
附錄圖 4. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistein 生物轉化情形 (培養基含 500 mg/L)

Appendix 4. Biotransformation of genistein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 500 mg/L genistein during 48-h incubation. n=3, mean± SD



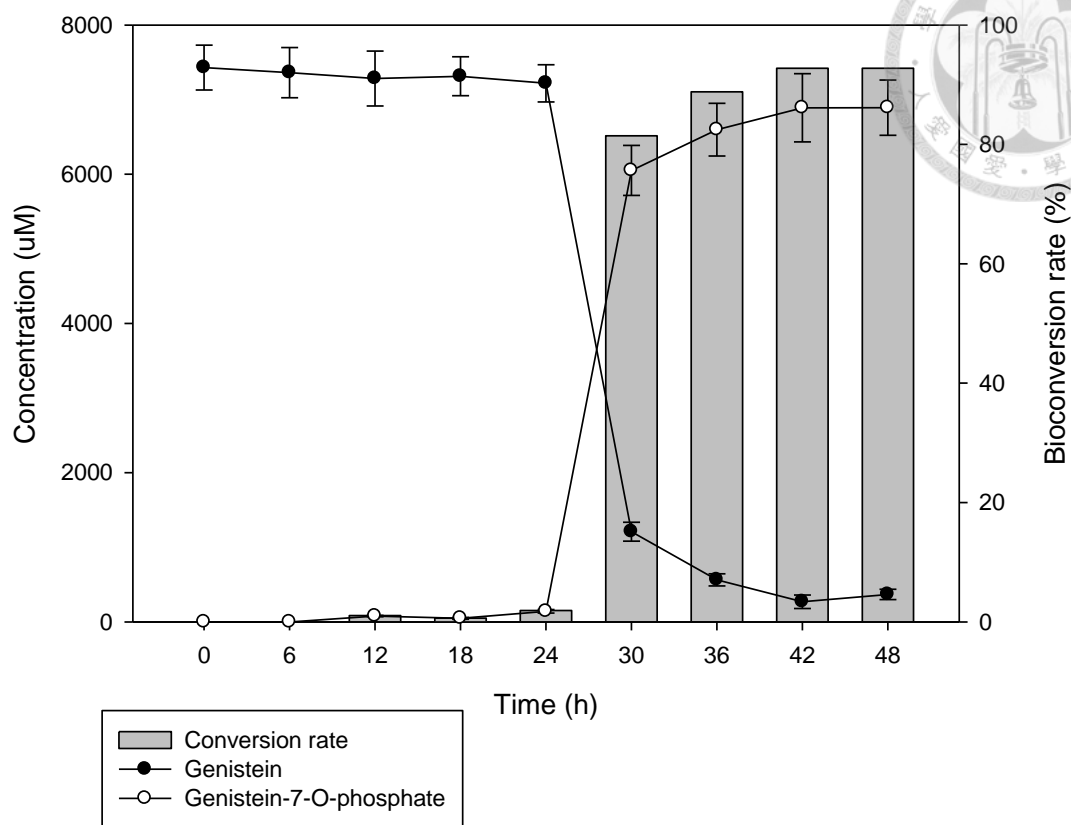
附錄圖 5. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistein 生物轉化情形 (培養基含 1000 mg/L)

Appendix 5. Biotransformation of genistein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 1000 mg/L genistein during 48-h incubation. n=3, mean± SD



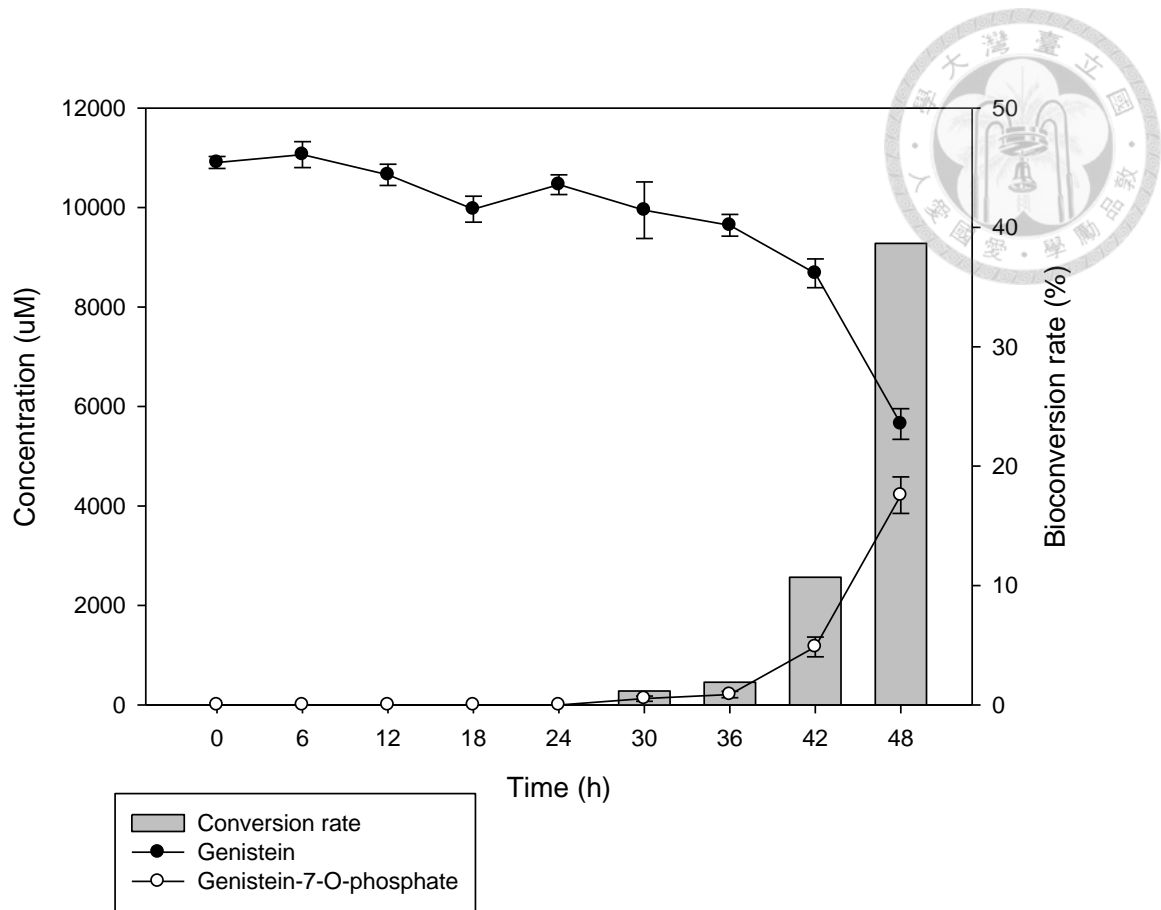
附錄圖 7. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistein 生物轉化情形 (培養基含 1500 mg/L)

Appendix 7. Biotransformation of genistein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 1500 mg/L genistein during 48-h incubation. n=3, mean± SD



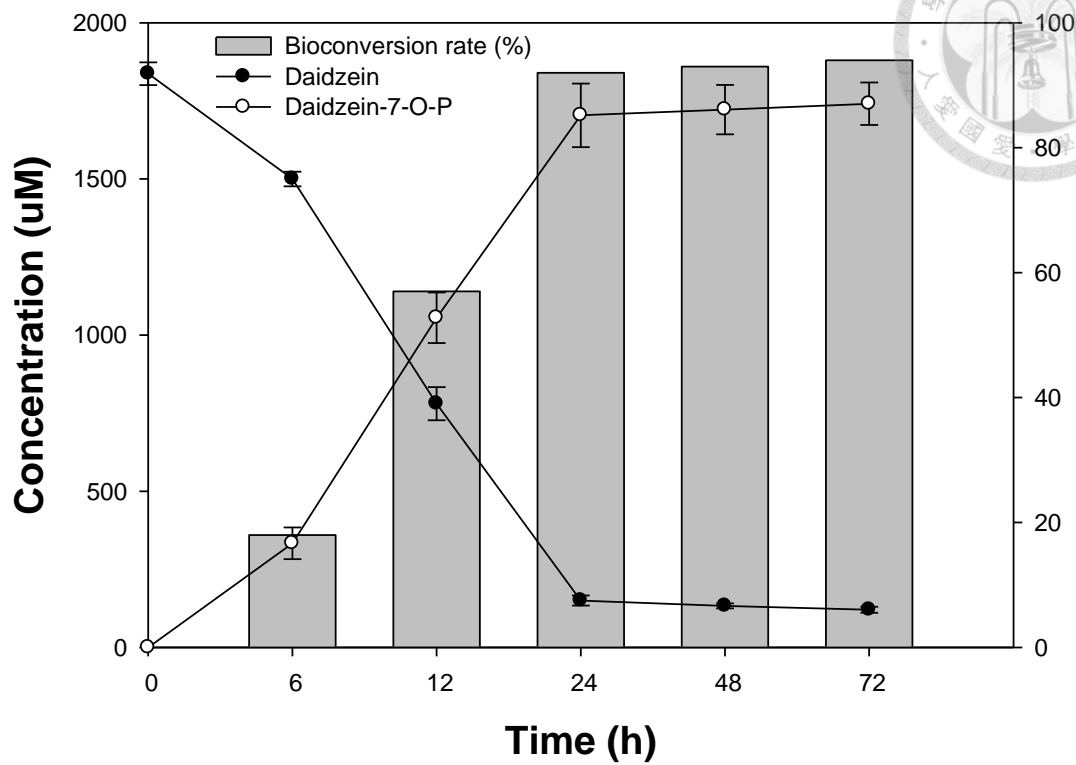
附錄圖 8. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistein 生物轉化情形 (培養基含 2000 mg/L)

Appendix 8. Biotransformation of genistein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 2000 mg/L genistein during 48-h incubation. n=3, mean± SD



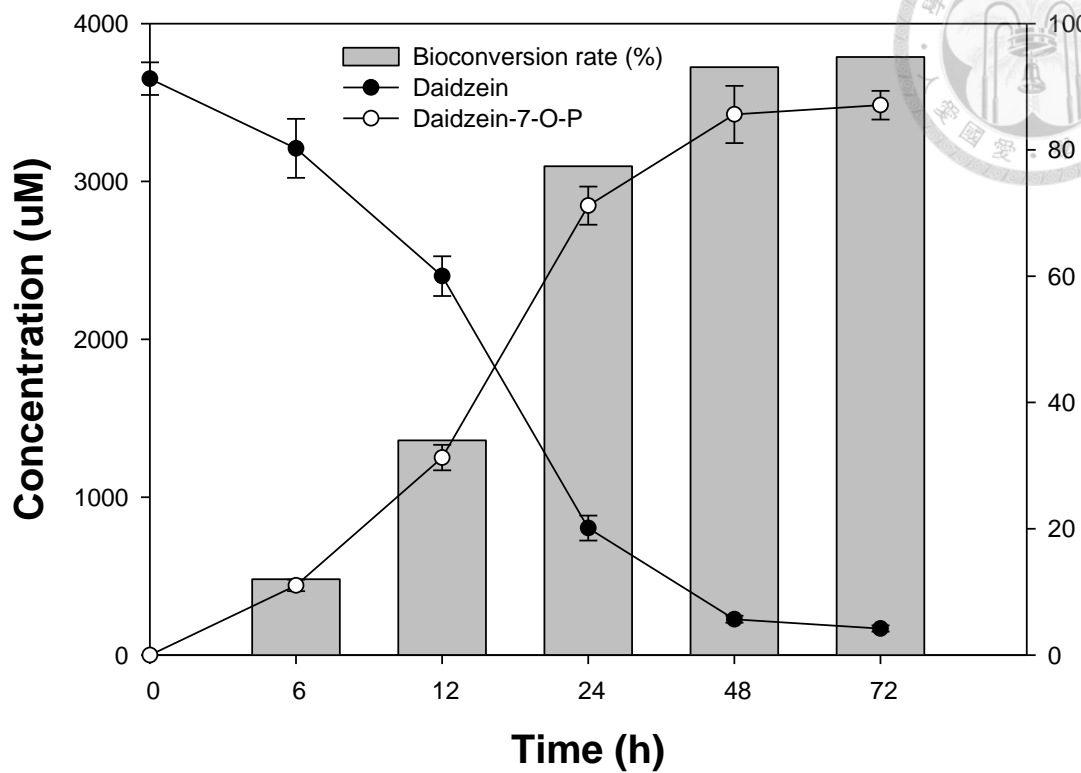
附錄圖 9. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistein 生物轉化情形 (培養基含 3000 mg/L)

Appendix 9. Biotransformation of genistein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 3000 mg/L genistein during 48-h incubation. n=3, mean± SD



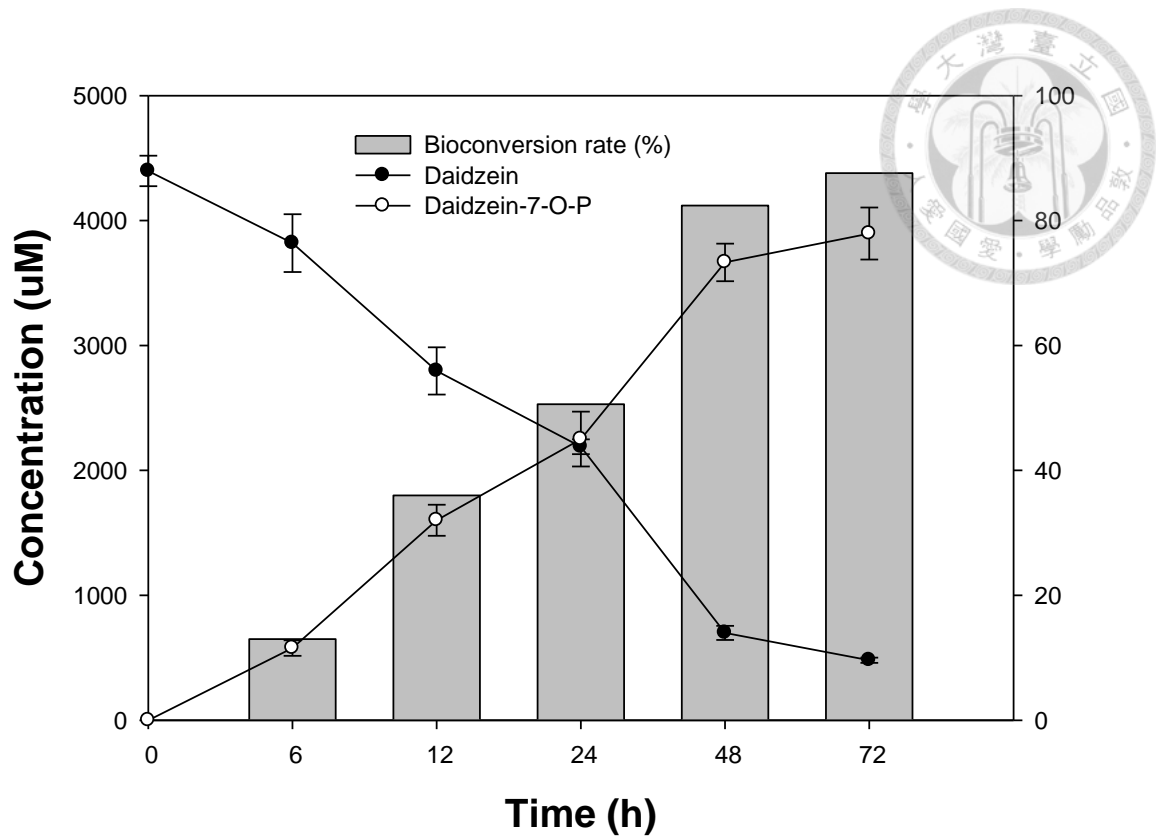
附錄圖 10. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzein 生物轉化情形 (培養基含 480 mg/L)

Appendix 10. Biotransformation of daidzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 480 mg/L daidzein during 72-h incubation. n=3, mean± SD.



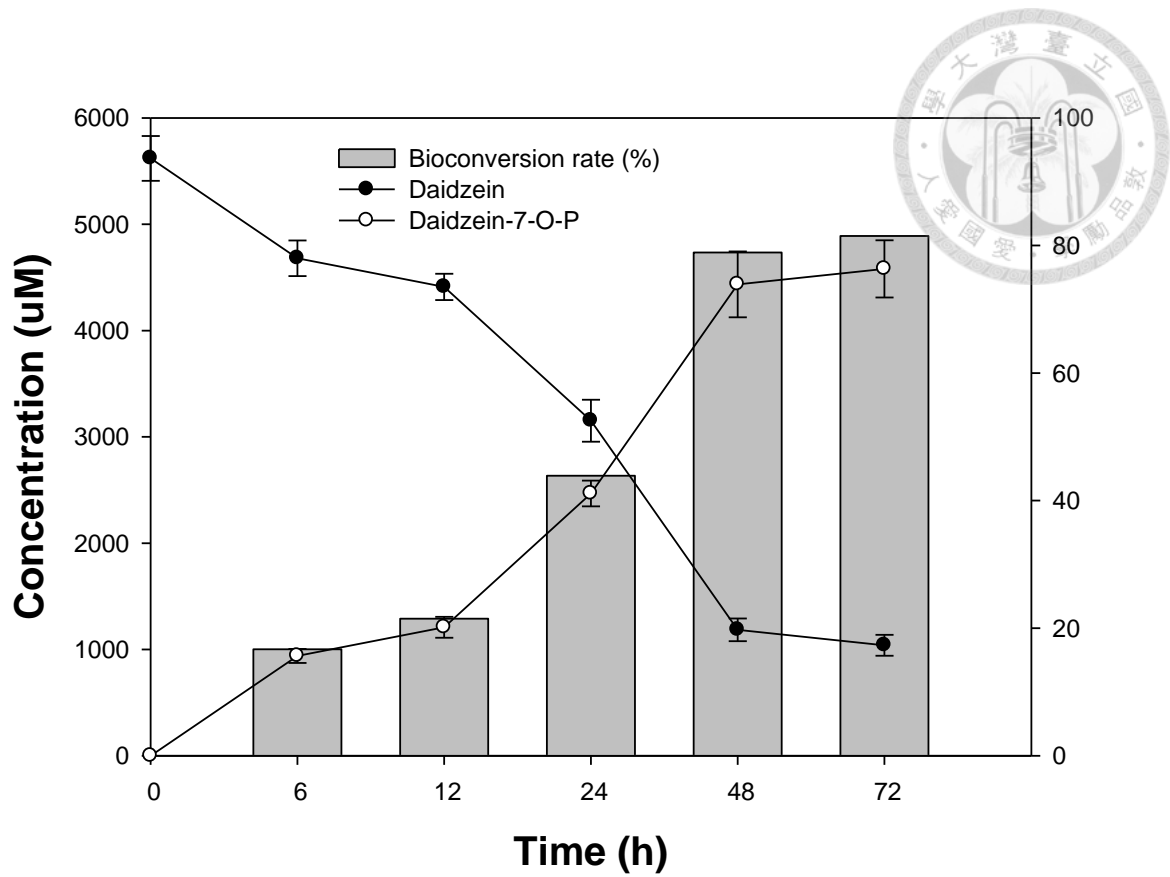
附錄圖 11. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzein 生物轉化情形 (培養基含 960 mg/L)

Appendix 11. Biotransformation of daidzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 960 mg/L daidzein during 72-h incubation. n=3, mean± SD.



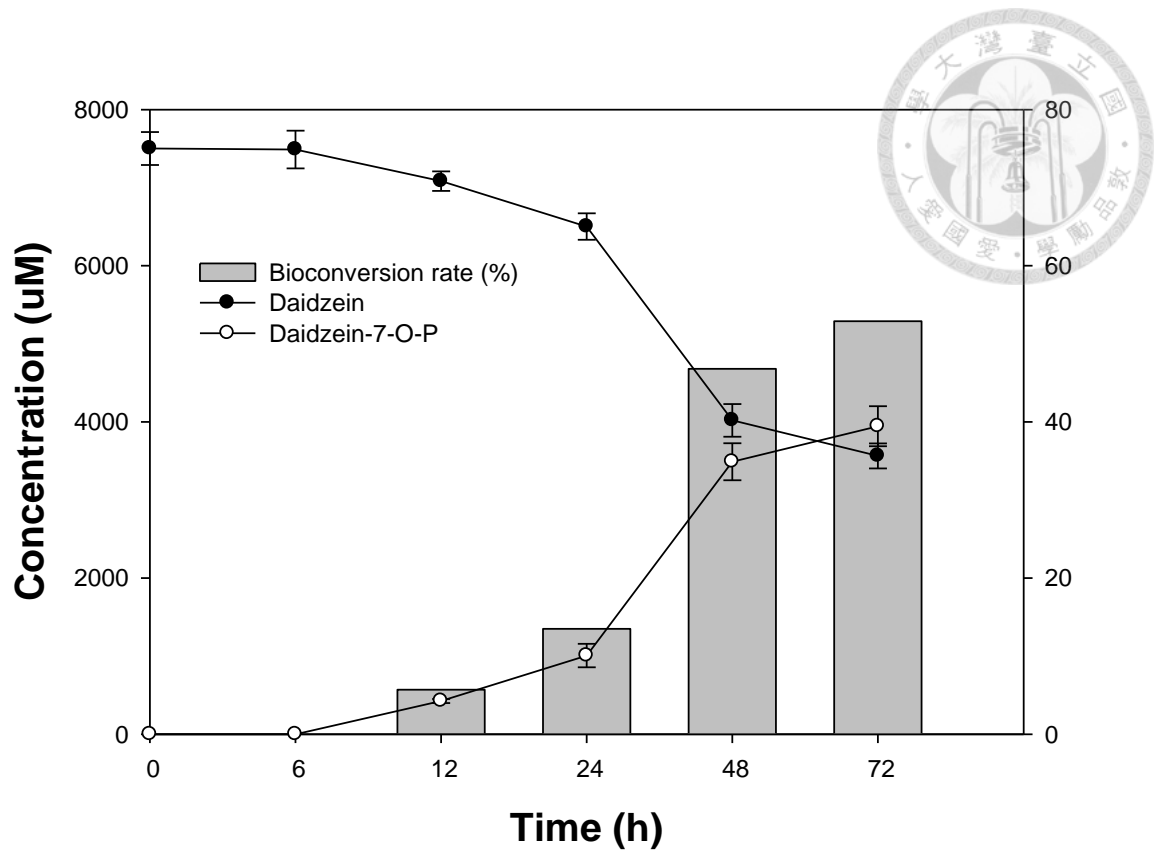
附錄圖 12. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzein 生物轉化情形 (培養基含 1130 mg/L)

Appendix 12. Biotransformation of daidzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 1130 mg/L daidzein during 72-h incubation. n=3, mean± SD.



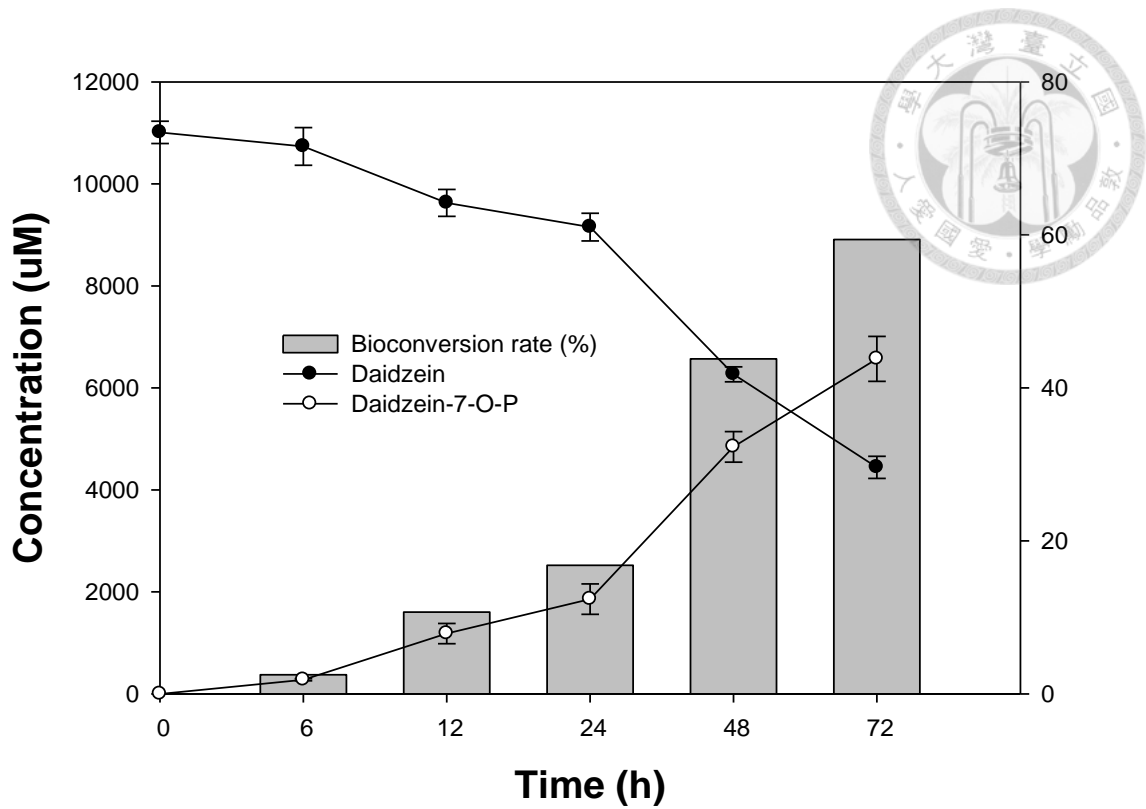
附錄圖 13. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzein 生物轉化情形 (培養基含 1410 mg/L)

Appendix 13. Biotransformation of daidzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 1410 mg/L daidzein during 72-h incubation. n=3, mean± SD.



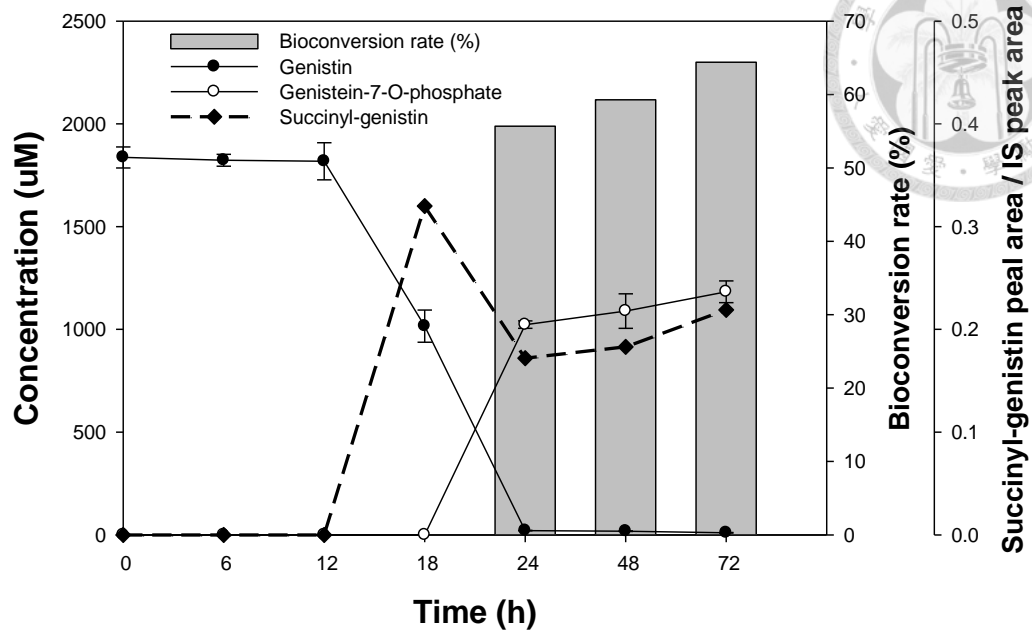
附錄圖 14. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzein 生物轉化情形 (培養基含 1880 mg/L)

Appendix 14. Biotransformation of daidzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 1880 mg/L daidzein during 72-h incubation. n=3, mean± SD.



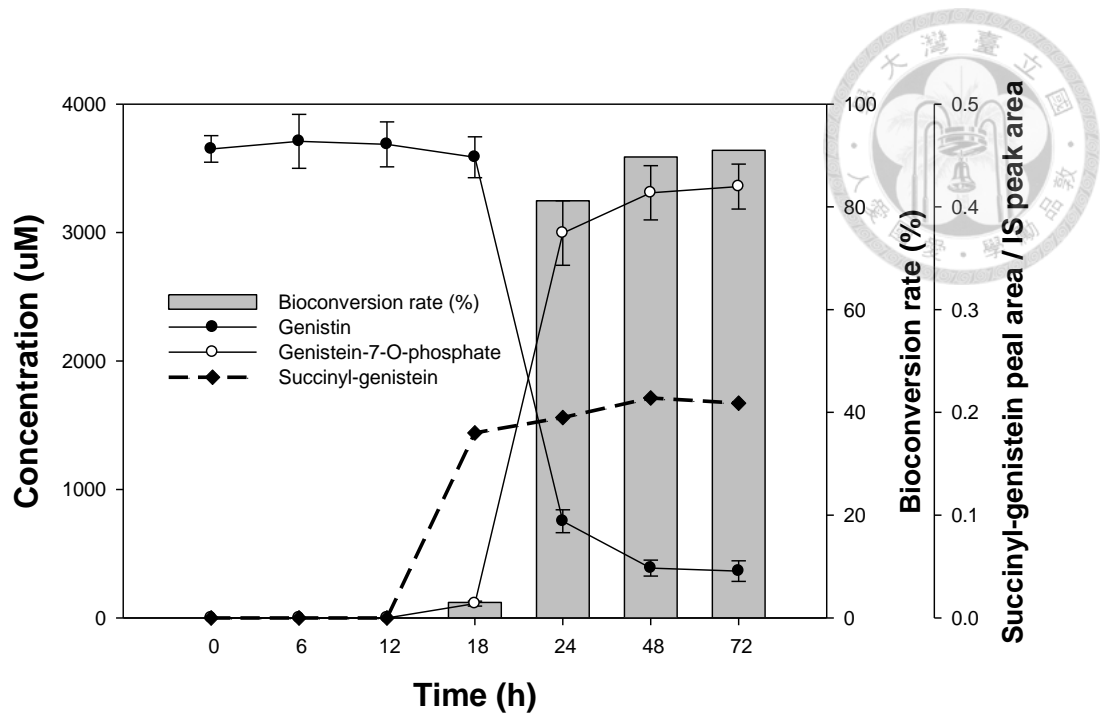
附錄圖 15. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzein 生物轉化情形 (培養基含 2820 mg/L)

Appendix 15. Biotransformation of daidzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 2820 mg/L genistein during 72-h incubation. n=3, mean± SD.



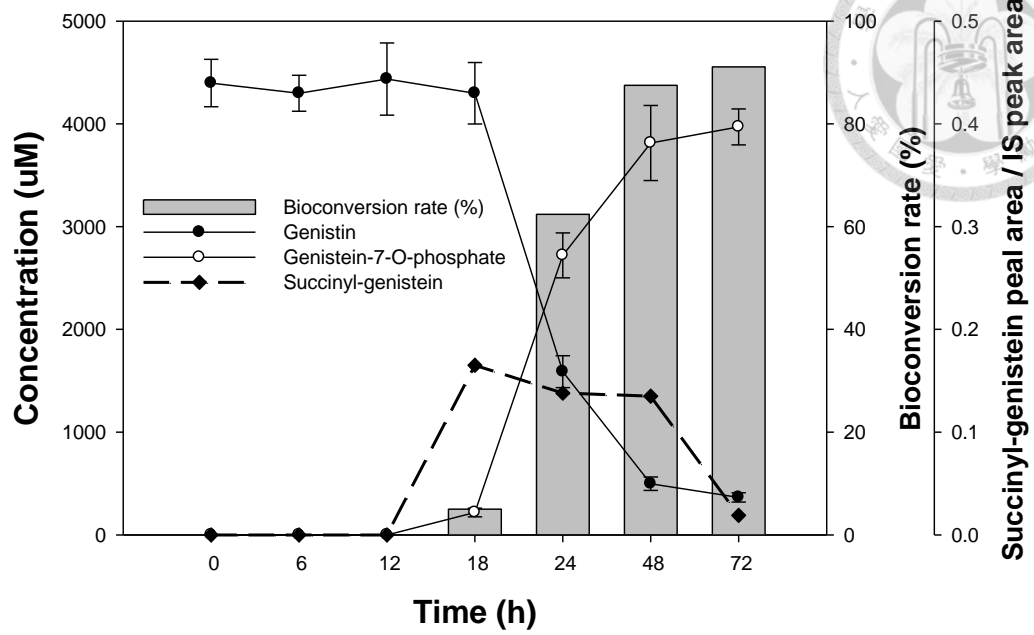
附錄圖 16. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistin 生物轉化情形 (培養基含 800 mg/L)

Appendix 16. Biotransformation of genistin 800 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 in 72h. n=3, mean value± SD.



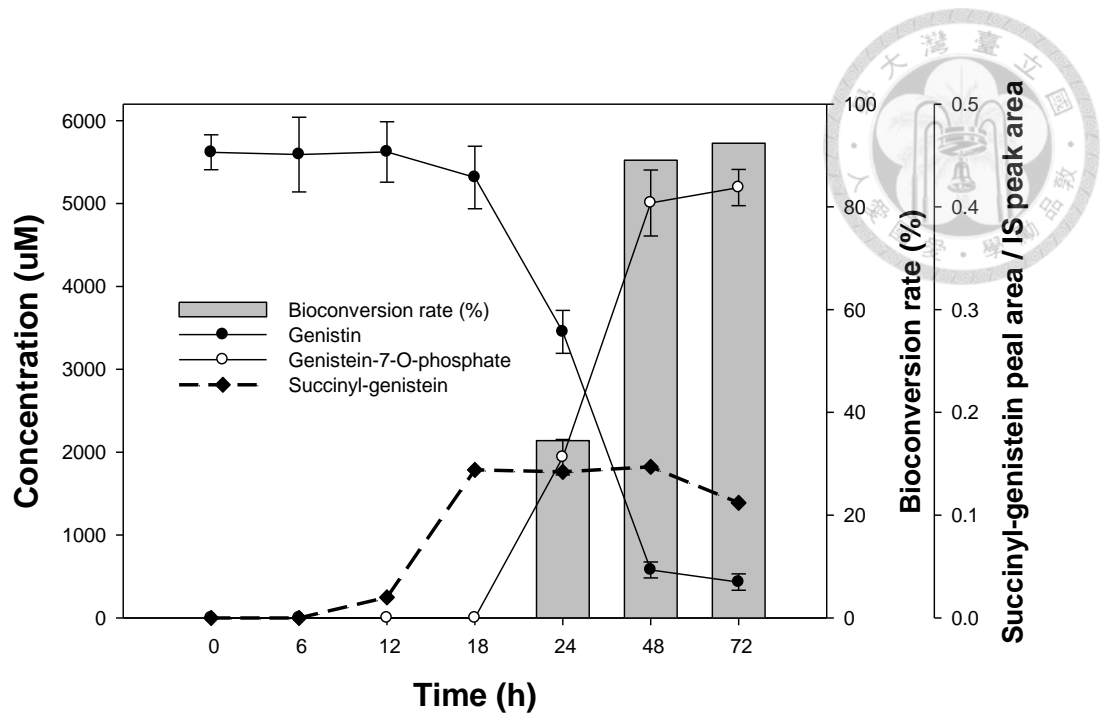
附錄圖 17. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistin 生物轉化情形 (培養基含 1600 mg/L)

Appendix 17. Biotransformation of genistin 1600 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 in 72h. n=3, mean value± SD.



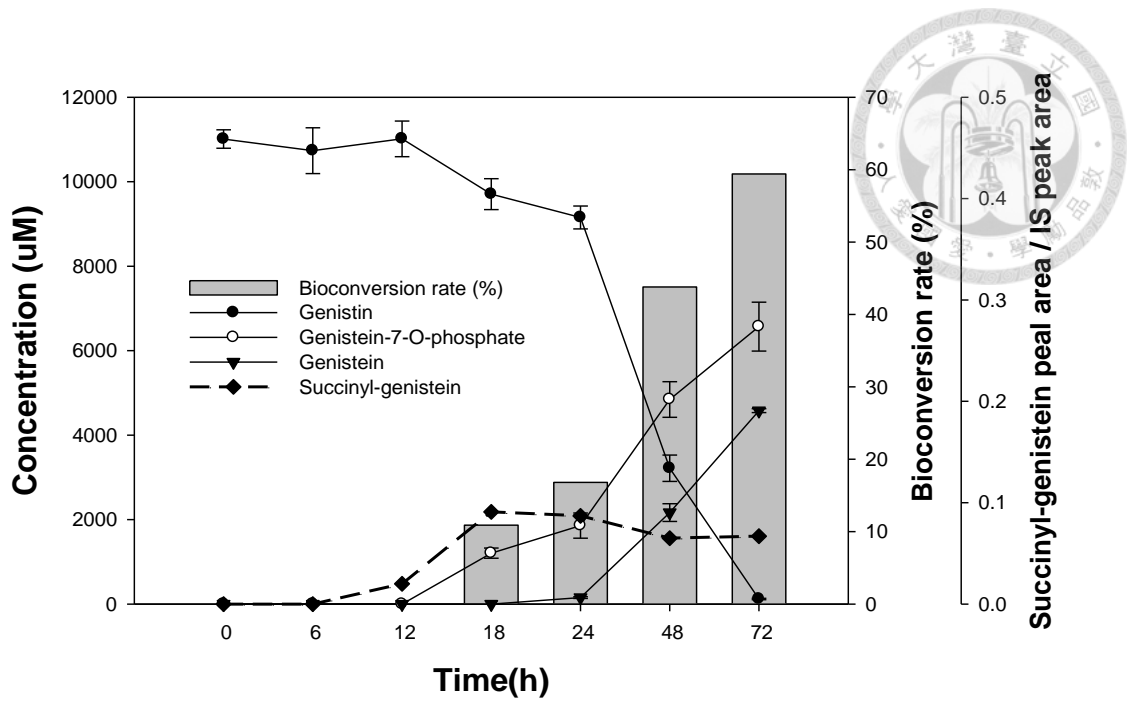
附錄圖 18. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistin 生物轉化情形 (培養基含 1920 mg/L)

Appendix 18. Biotransformation of genistin 1920 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 in 72h. n=3, mean value± SD.



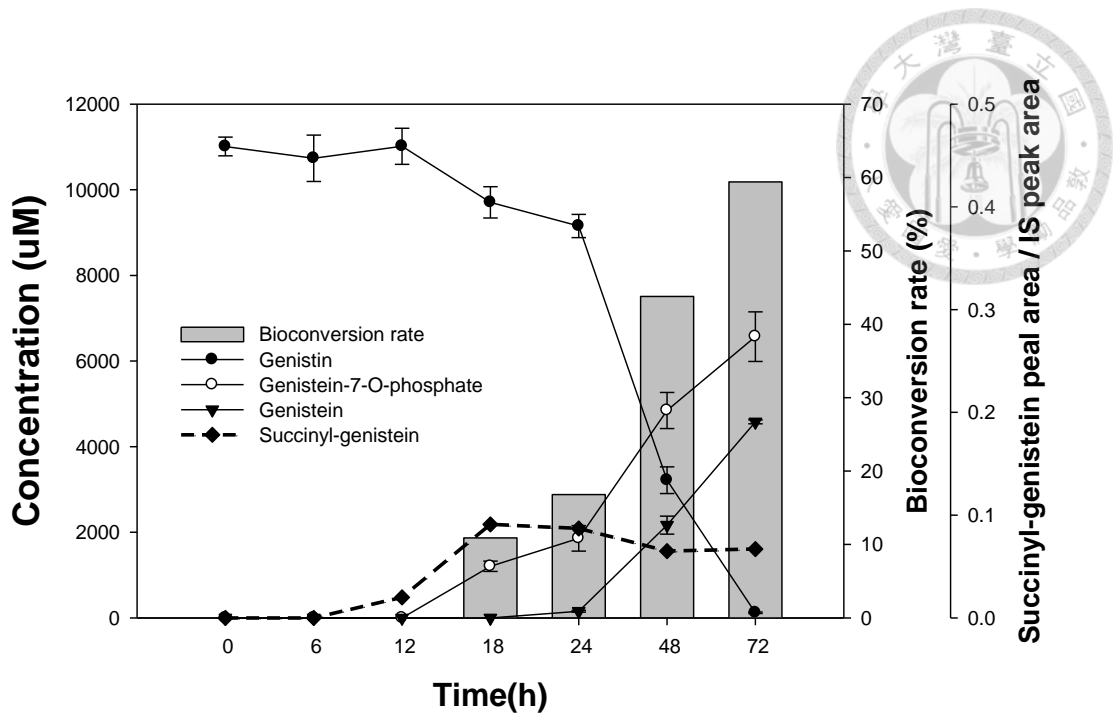
附錄圖 19. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistin 生物轉化情形 (培養基含 2400 mg/L)

Appendix 19. Biotransformation of genistin 2400 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 in 72h. n=3, mean value± SD.



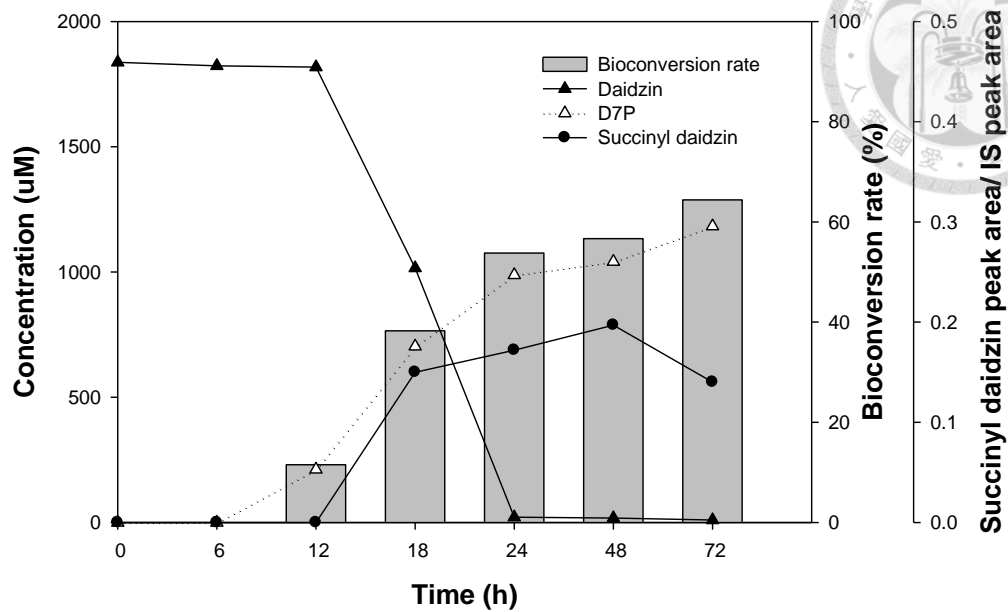
附錄圖 20. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistin 生物轉化情形 (培養基含 3200 mg/L)

Appendix 20. Biotransformation of genistin 3200 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 in 72h. n=3, mean value± SD.



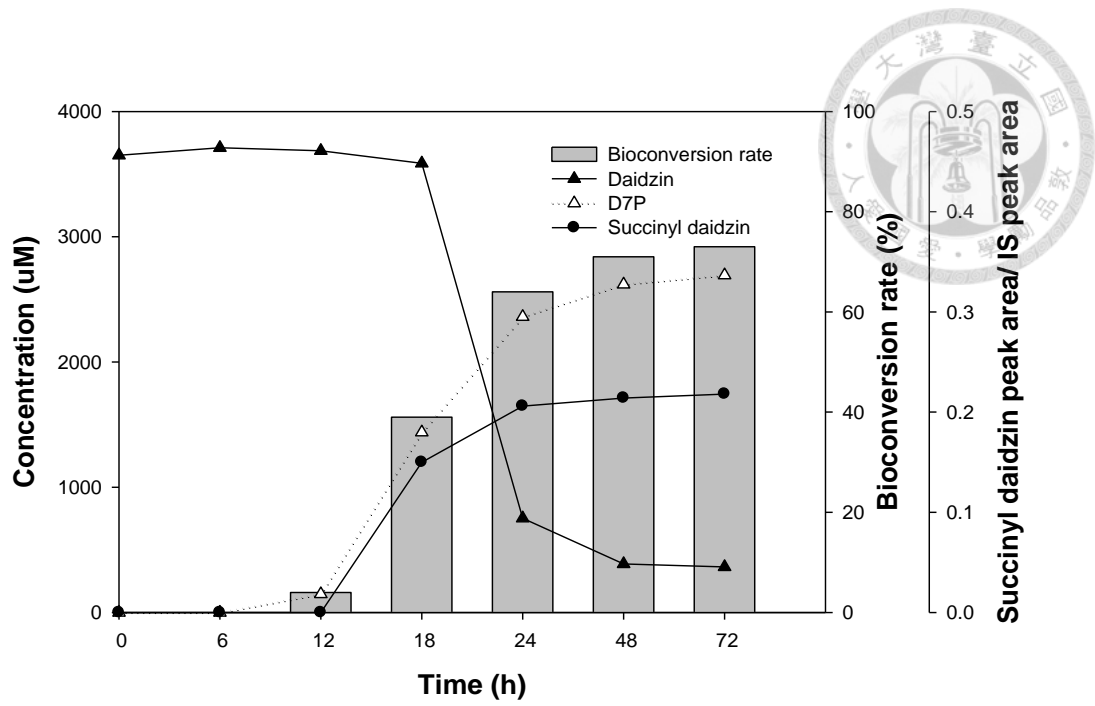
附錄圖 21. *B. subtilis* BCRC 19679 對 genistin 生物轉化情形 (培養基含 4800 mg/L)

Appendix 21. Biotransformation of genistin 4800 mg/L with *B. subtilis* BCRC 19679 in 72h. n=3, mean value \pm SD.



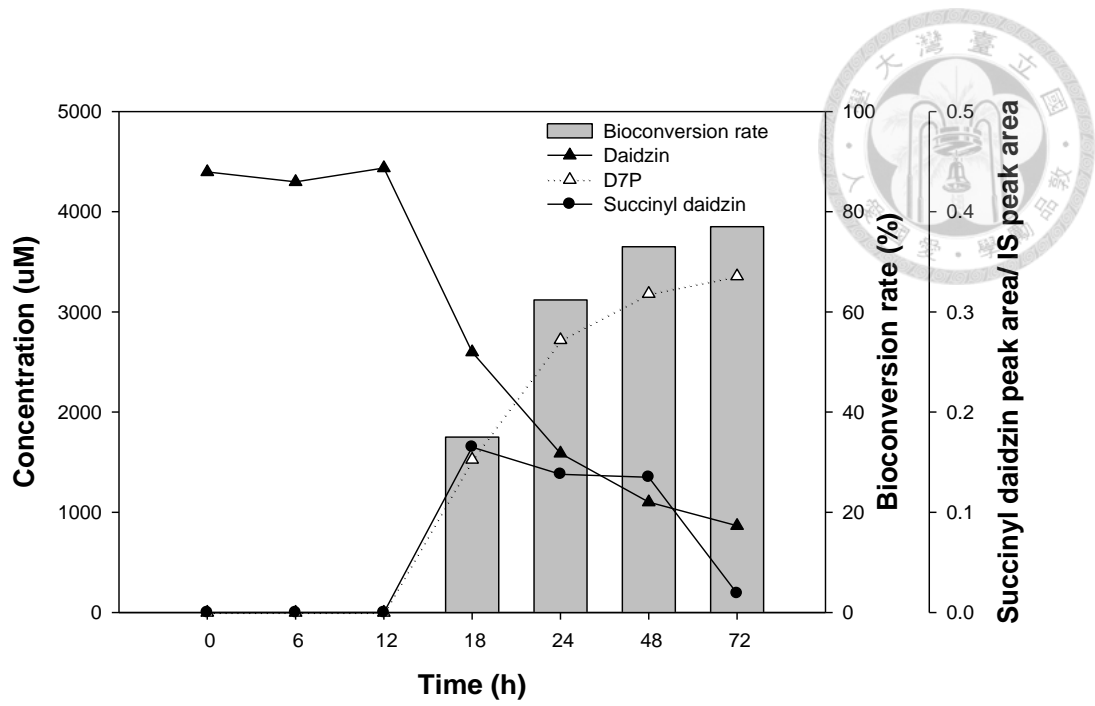
附錄圖 22. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzin 生物轉化情形 (培養基含 770 mg/L)

Appendix 22. Biotransformation of daidzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 770 mg/L daidzin during 72-h incubation. n=3, mean± SD.



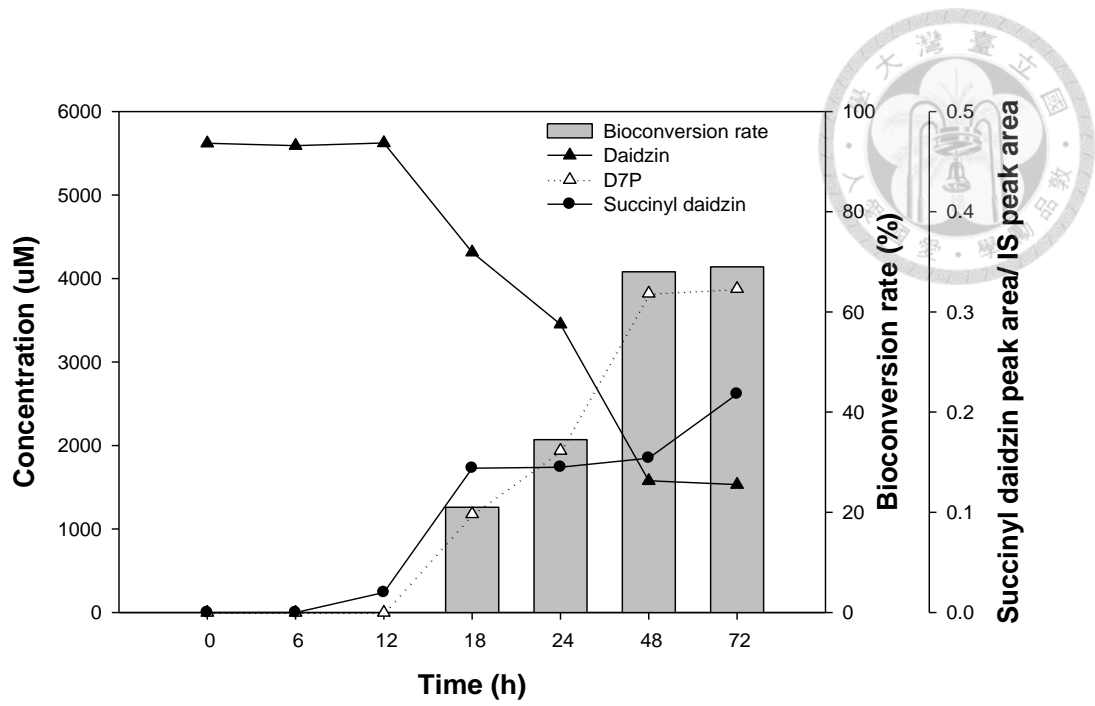
附錄圖 23. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzin 生物轉化情形 (培養基含 1540 mg/L)

Appendix 23. Biotransformation of daidzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 1540 mg/L daidzin during 72-h incubation. n=3, mean± SD.



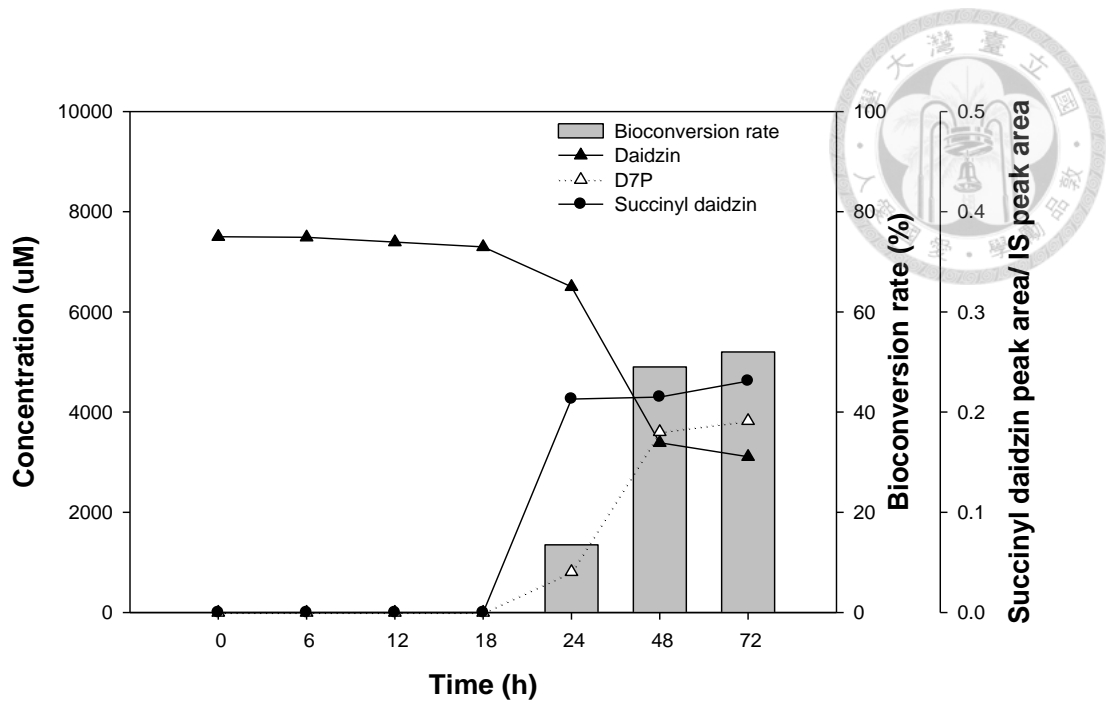
附錄圖 24. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzin 生物轉化情形 (培養基含 1840 mg/L)

Appendix 24. Biotransformation of daidzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 1840 mg/L daidzin during 72-h incubation. n=3, mean± SD.



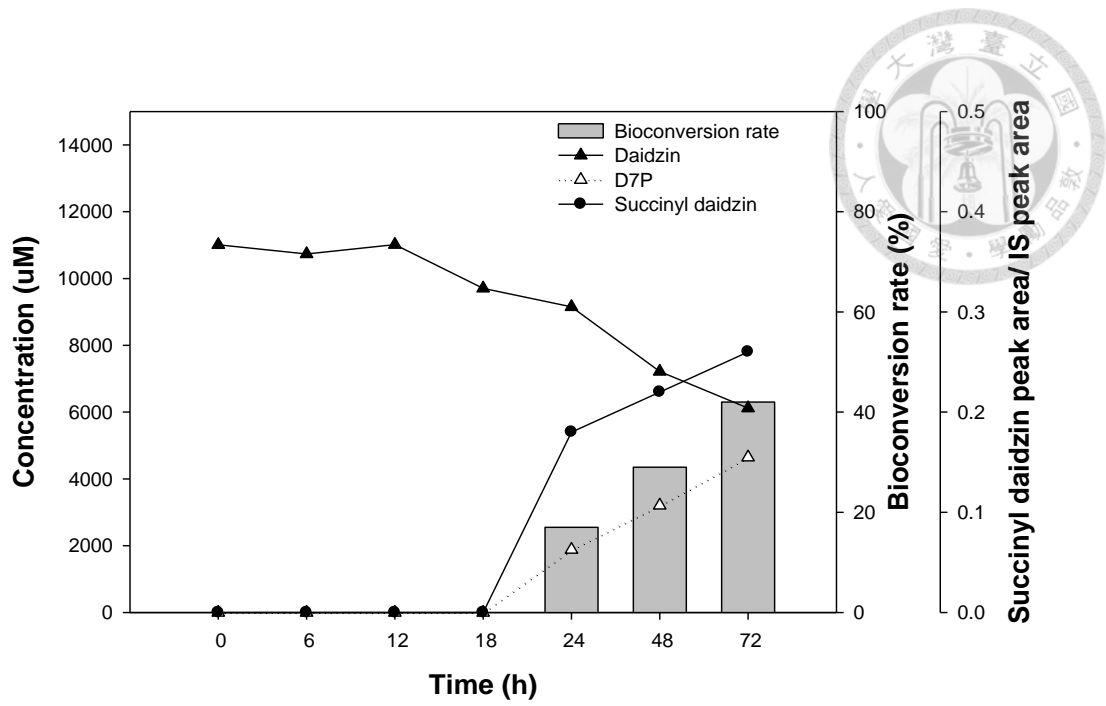
附錄圖 25. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzin 生物轉化情形 (培養基含 2310 mg/L)

Appendix 25. Biotransformation of daidzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 2310 mg/L daidzin during 72-h incubation. n=3, mean± SD.



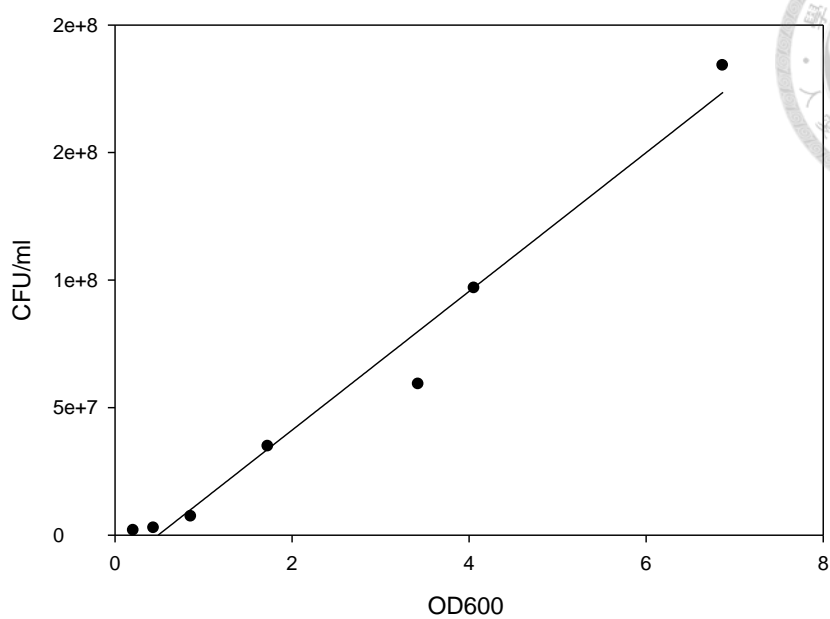
附錄圖 26. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzin 生物轉化情形 (培養基含 3080 mg/L)

Appendix 26. Biotransformation of daidzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 3080 mg/L daidzin during 72-h incubation. n=3, mean± SD.



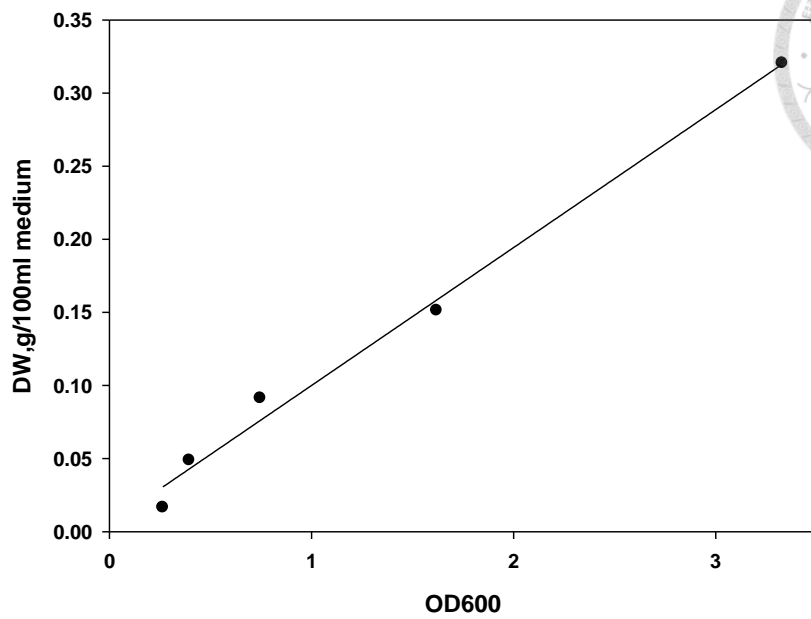
附錄圖 27. *B. subtilis* BCRC 19679 對 daidzin 生物轉化情形 (培養基含 4620 mg/L)

Appendix 27. Biotransformation of daidzein by *B. subtilis* BCRC 19679 with 4620 mg/L daidzin during 72-h incubation. n=3, mean± SD.

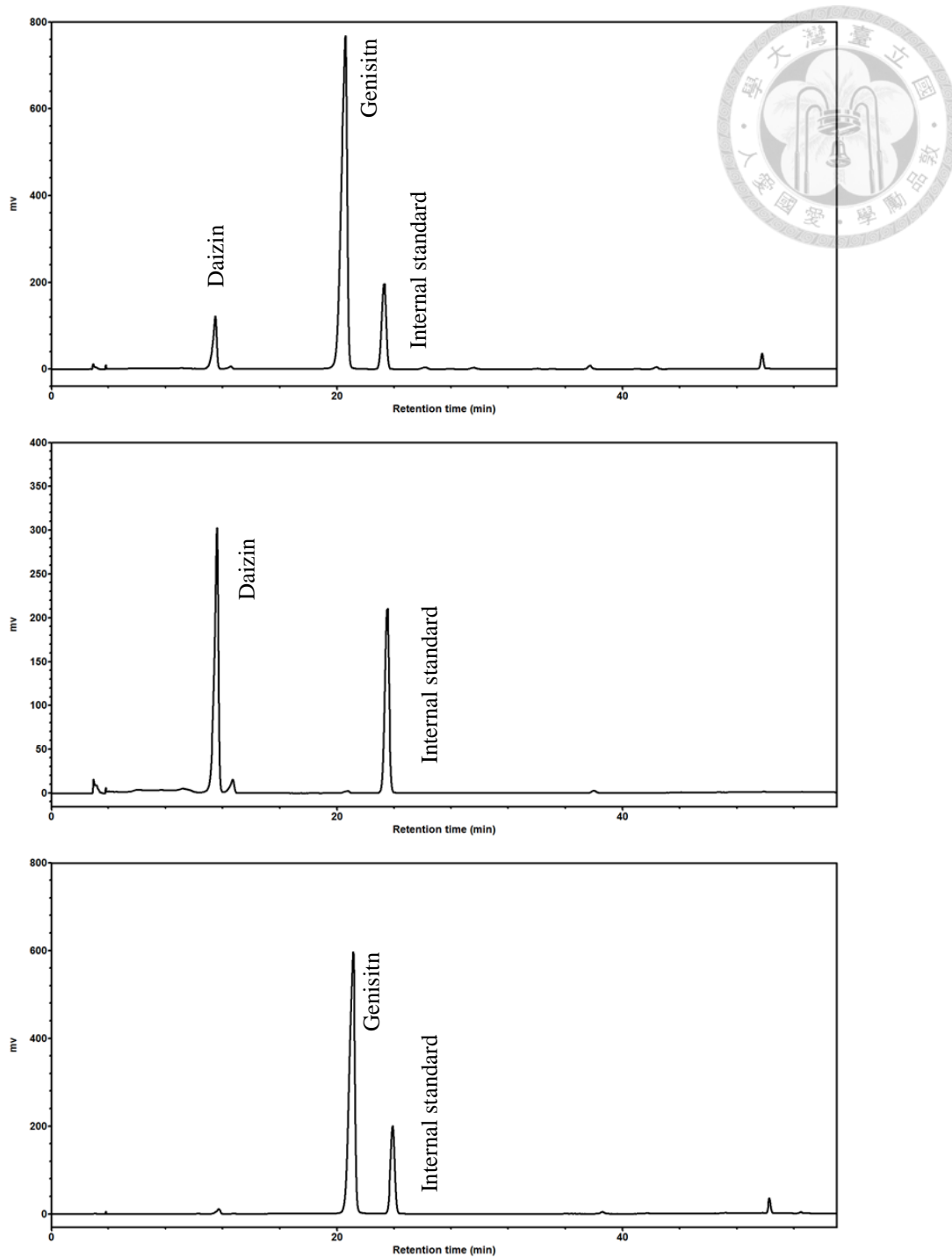


附錄圖 28. *B. subtilis* BCRC 19679 微生物生長測定 OD₆₀₀ 與 CFU 之校正曲線

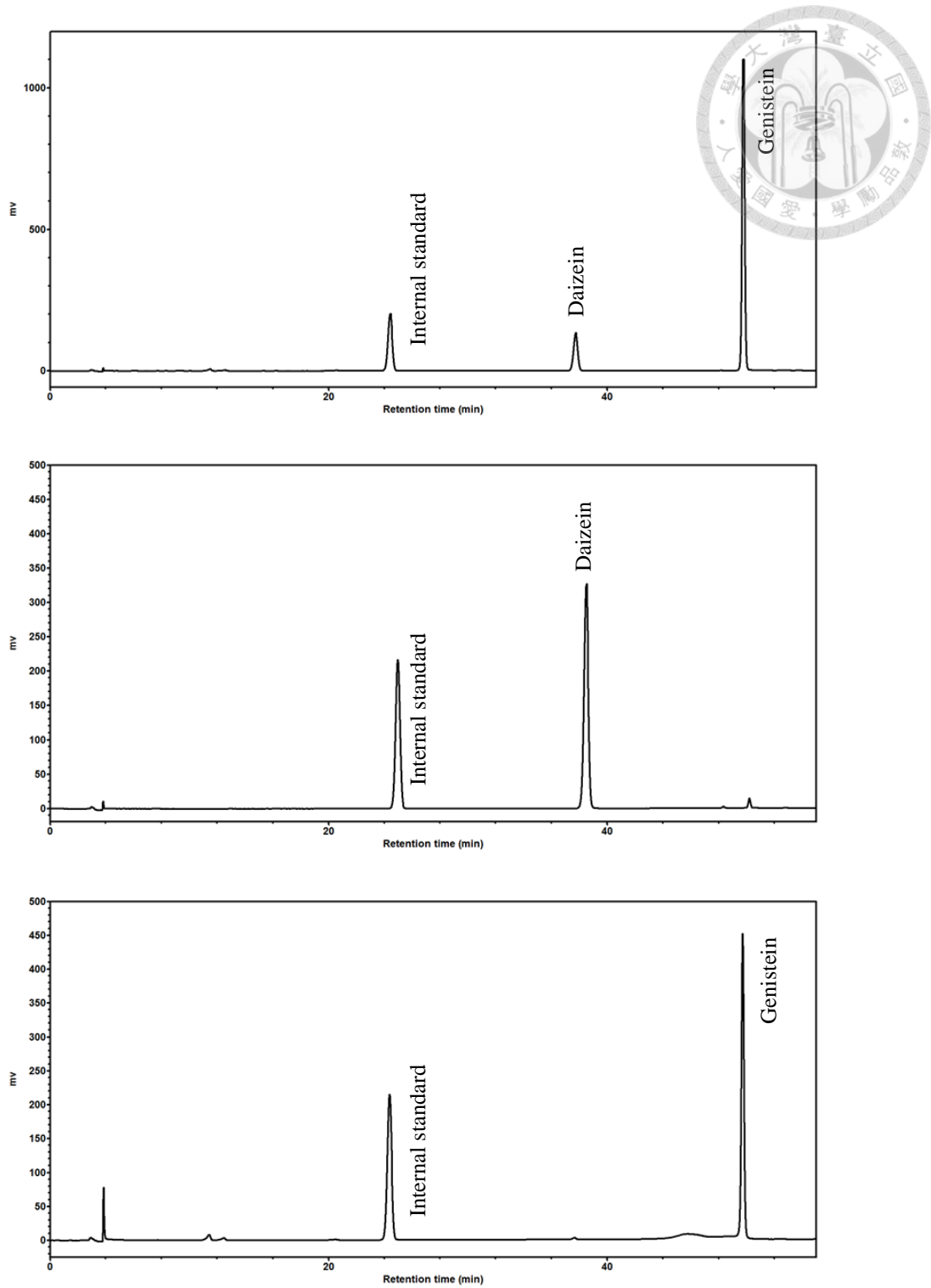
$$(y = 3E+07x - 1E+07, R^2 = 0.9753)$$



附錄圖 29. *B. subtilis* BCRC 19679 微生物生長測定 OD₆₀₀ 與菌體乾重之校正曲線 ($y = 0.0943x + 0.0056, R^2 = 0.991$)



附錄圖 30. RMG 原料利用鈣離子沉澱法分離 genistin 及 daidzin 之層析圖譜



附錄圖 31. RMA 原料利用中性氧化鋁分離 genistein 及 daidzein 之層析圖譜