

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

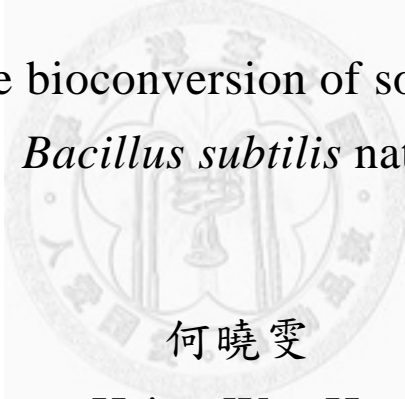
National Taiwan University

Master Thesis

納豆菌對大豆異黃酮轉化之研究

Studies on the bioconversion of soy isoflavones by

Bacillus subtilis natto



何曉雯

Hsiao-Wen Ho

指導教授：蘇南維 博士

Advisor: Nan-Wei Su, Ph.D.

中華民國 101 年 1 月

January, 2012

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

納豆菌對大豆異黃酮轉化之研究

Studies on the bioconversion of soy isoflavones by
Bacillus subtilis natto

本論文係何曉雯君 (R97623027) 在國立臺灣大學農業化學系研究所完成之碩士學位論文，於民國 101 年 01 月 16 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

韓南維

(指導教授)

李敏雄

陳錦樹

古國豪

鍾玉明

謝誌

時光飛逝，歲月如梭，一轉眼從考上研究所到現在不知不覺的過了好幾年，感謝蘇南維教授給我這個機會進入食化實驗室，在蘇老師的指導之下，讓我從一個什麼儀器都不太懂不會操作的情況下，經歷了兩年的磨練而成為修理 HPLC 的達人。這篇論文由於有蘇老師的督促、指導與啟發，才得以完成，真的很感謝蘇老師。也很感謝李敏雄教授在研究室 meeting 時給予的指導及關心，讓本研究更順利發展。

論文初稿完成之際，承蒙台灣大學農化系李敏雄名譽教授、中興大學食品暨應用生物科技系陳錦樹教授、嘉義大學應用化學系古國隆教授、嘉南藥理科技大學食品科技系鍾玉明教授撥冗審閱、校正，並給予諸多寶貴意見，由衷感謝。

感謝嘉義大學應用化學系古國隆教授提供 MS 的儀器以及 King 跟戴戴的協助。感謝中央研究院基因體中心張七鳳博士在 NMR 方面的協助，使本篇有一個完整的結果。

也很感謝食化實驗室的大家，謝謝劉媽在生活上的協助及關心。也感謝實驗室已畢業的學長姐，泰瑛學長、騰旭學長、彥志學長、幼佳學姐、維家學姐，謝謝你們在實驗上的指導，尤其是帶生材實驗的協助。謝謝上達學長、小 Q、小蘭、偉如、昱圻、玠錡、宛琳、綉霞、小強、葭蓁、許宸、博元、廷浩在過去的日子一起討論實驗、一起歡樂、聽我吐苦水、談論媽媽經等等，因為有你們讓我的研生活放鬆許多。也非常謝謝許宸在實驗末段的幫忙，讓我可以在这學期順利畢業。

最後要感謝的是我的家人，感謝爸爸、媽媽、姐姐、哥哥的激勵及關心，讓我考上台大；感謝公公、婆婆幫忙帶小孩，讓我可以專注於研究；感謝老公、阿亨與寶寶，使我的人生充滿歡樂，感謝一路上大家的陪伴，謝謝！

何曉雯 謹誌

中華民國一〇一年一月

目錄

目錄.....	I
圖目錄.....	IV
表目錄.....	VII
摘要.....	VIII
Abstract.....	IX
第一章 前言.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
第一節、大豆異黃酮.....	2
1. 大豆異黃酮之介紹.....	2
2. 異黃酮之生理功效.....	5
2.1 抗氧化能力.....	5
2.2 避免心血管疾病.....	5
2.3 預防骨質疏鬆症.....	6
2.4 減緩女性更年期不適症狀.....	6
2.5 抗癌能力.....	6
第二節、異黃酮之生理代謝.....	8
第三節、異黃酮之生物轉化.....	12
1. 大豆中的酵素.....	12
2. 異黃酮之微生物轉化.....	14
3. 異黃酮經生物轉化後之衍生物.....	16
第三章 材料與方法.....	20
第一節、實驗架構.....	20
第二節、實驗材料.....	20
1. 材料.....	20

2. 試藥	20
3. 菌株	21
4. 培養基	21
第三節、儀器設備	21
第四節、實驗方法	22
1. 大豆異黃酮之萃取與純化	22
1.1 大豆之前處理	22
1.2 大豆異黃酮之萃取	22
1.3 Diaion HP-20 疏水性管柱之層析分離	23
1.4 大豆異黃酮之分離	23
2. 大豆異黃酮之含量分析	23
3. 大豆異黃酮含量之計算	24
4. 微生物之生物轉化異黃酮	26
4.1 菌株篩選	26
4.2 異黃酮之預處理	26
4.3 大豆異黃酮之生物轉化	26
5. 製備 NDA1、NDA2	26
6. 分離與純化 NDA1、NDA2	27
6.1 半製備型 HPLC	27
6.2 LH-20 管柱之層析分離	28
7. 以 LC-MS 分析 Daidzein、Genistein、NDA1、NDA2	28
8. 以 NMR 分析 NDA1、NDA2	28
第四章 結果與討論	30
第一節、大豆異黃酮之含量分析	30
第二節、微生物之生物轉化異黃酮	38

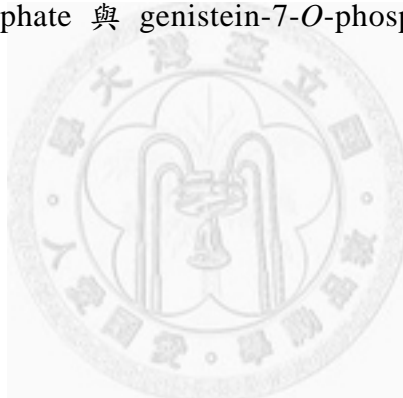
1. 最適菌株篩選	38
2. 大豆異黃酮之生物轉化	41
2.1 <i>B. subtilis</i> FC-10 對 aglycone isoflavones 之生物轉化	41
2.2 <i>B. subtilis</i> FC-10 對 glucosidic isoflavones 之生物轉化	45
2.3 <i>B. subtilis</i> FC-10 對 isoflavone malonylglucosides 之生物轉化	49
3. NDA1 與 NDA2 之分離與純化.....	55
4. NDA1 與 NDA2 之結構鑑定	60
4.1 UV 吸收光譜	60
4.2 LC-MS/MS 分析	65
4.3 NMR 光譜鑑定.....	72
第五章 結論	81
第五章 結論.....	82
第六章 參考文獻	83
附錄 一	90
附錄 二.....	91

圖目錄

圖 1. 大豆中異黃酮素之化學結構式	4
圖 2. 異黃酮代謝物 equol 與雌激素代謝物 estradiol 化學結構之比較	7
圖 3. 尿液樣品中 Daidzein 經由人體代謝成 equol 之途徑	10
圖 4. 異黃酮葡萄糖苷於腸道之吸收與代謝機制	11
圖 5. Daidzein (1) 及 glycitein (2) 經由 <i>Microbacterium aborescens</i> 轉化為 6,7,4'-trihydroxyisoflavone (3).....	17
圖 6. 8-Hydroxydaidzein 與 8-hydroxygenistein 之化學結構	18
圖 7. 6'- <i>O</i> -succinylglucosides 異黃酮之化學結構.....	19
圖 8. 大豆脫脂後 60% 甲醇萃取物之 HPLC 分析圖譜	31
圖 9. 通過 HP-20 管柱之 40% 甲醇洗出液之 HPLC 分析圖譜	33
圖 10. 通過 HP-20 管柱之 70% 甲醇洗出液之 HPLC 分析圖譜	34
圖 11. 通過 HP-20 管柱之 70% 甲醇洗出液經 121°C 加熱 30 分鐘之 HPLC 分析 圖譜.....	35
圖 12. 通過 HP-20 管柱之 100% 甲醇洗出液之 HPLC 分析圖譜	36
圖 13. 大豆異黃酮之產物 (由左而右依序為：glucosides、malonylglucosides、 aglycones)	37
圖 14. Aglycones 經由 <i>B. subtilis</i> FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (a) 0 h ; (b) 4 h	42
圖 15. Aglycones 經由 <i>B. subtilis</i> FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (c) 8 h ; (d) 12 h	43
圖 16. Aglycones 經由 <i>B. subtilis</i> FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (e) 24 h	44
圖 17. Glucosides 經由 <i>B. subtilis</i> FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (a) 0 h ; (b) 4h	46
圖 18. Glucosides 經由 <i>B. subtilis</i> FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (c) 8 h ; (d) 12h	

.....	47
圖 19. Glucosides 經由 <i>B. subtilis</i> FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (e) 24 h	48
圖 20. Malonylglucosides 經由 <i>B. subtilis</i> FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (a) 0 h ; (b) 4 h.....	50
圖 21. Malonylglucosides 經由 <i>B. subtilis</i> FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (a) 8 h ; (b) 12 h.....	51
圖 22. Malonylglucosides 經由 <i>B. subtilis</i> FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (e) 24 h ; (f) 48 h.....	52
圖 23. Malonylglucosides 經由 <i>B. subtilis</i> FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (g) 72 h ; (h) 96 h.....	53
圖 24. Malonylglucosides 經由 <i>B. subtilis</i> FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (i) 120 h ; (j) 144 h.....	54
圖 25. 發酵液通過 HP-20 之濾液.....	56
圖 26. 以 100% 甲醇流洗發酵液通過 HP-20 管柱之洗出液.....	57
圖 27. 以半製備級 HPLC 分析 NDAs 之圖譜.....	58
圖 28. NDAs 通過 LH-20 管柱後之 HPLC 分析圖譜 (a) NDA1 ; (b) NDA2	59
圖 29. 大豆異黃酮之 UV 吸收光譜 (a) daidzin ; (b) daidzein	61
圖 30. NDA1 之 UV 吸收光譜.....	62
圖 31. 大豆異黃酮之 UV 吸收光譜 (a) genistin ; (b) genistein.....	63
圖 32. NDA2 之 UV 吸收光譜.....	64
圖 33. Daidzein 標準品之 ESI-MS/MS 圖譜	66
圖 34. NDA1 之 Full MS 圖譜	67
圖 35. NDA1 之 ESI-MS/MS 圖譜.....	68
圖 36. Genistein 標準品之 ESI-MS/MS 圖譜	69
圖 37. NDA2 之 Full MS 圖譜	70

圖 38. NDA2 之 ESI-MS/MS 圖譜.....	71
圖 39. NDA1 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖.....	73
圖 40. NDA1 之二維 NMR($^{13}\text{C-}^1\text{H COSY, HSQC}$)光譜圖.....	74
圖 41. NDA1 之 $^{13}\text{C-}^{31}\text{P}$ 耦合光譜圖.....	75
圖 42. NDA1 之 $^{31}\text{P-NMR}$ 光譜圖.....	76
圖 43. NDA2 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖.....	77
圖 44. NDA2 之二維 NMR($^{13}\text{C-}^1\text{H COSY, HSQC}$)光譜圖.....	78
圖 45. NDA2 之 $^{13}\text{C-}^{31}\text{P}$ 耦合光譜圖.....	79
圖 46. NDA1 之 $^{31}\text{P-NMR}$ 光譜圖.....	80
圖 47. Daidzein-7- <i>O</i> -phosphate 與 genistein-7- <i>O</i> -phosphate 之化學結構.....	81



表目錄

表 1. 四個不同國家的 20 個黃豆品種之大豆異黃酮含量.....	3
表 2. 各類大豆食品中異黃酮之含量.....	13
表 3. 傳統大豆食品中異黃酮之含量.....	15
表 4. 本研究中計算大豆異黃酮含量之 RRF 值(relative response factor)與分子 量.....	25
表 5. 大豆脫脂後 60% 甲醇萃取物之異黃酮含量.....	32
表 6. <i>Bacillus subtilis</i> 菌株轉化 glucosides 之能力.....	39



摘要

近來大豆異黃酮對人體的保健功效獲得全世界的關注。大豆中的異黃酮可分為四大類：glucosides、malonylglucosides、acetylglucosides 及 aglycones。在這些異黃酮中，僅有 aglycones 具有生物活性，而 glucosides 須經由腸道微生物轉化成 aglycones 之型式才可被腸道吸收。因此大多數研究著力於以酵素水解或藉由微生物將 glucoside conjugates 轉化成 isoflavone aglycones，但本研究發現 isoflavone aglycones 可進一步被微生物轉化。

本研究從市售納豆篩選出 24 株納豆菌株 *Bacillus subtilis* strains，以生物轉化方式轉化 glucosides，發現 glucosides 會被轉化為 aglycones，有 23 株菌株可進一步的轉化 aglycones 產生新的成分。將發酵液以 HPLC 分析，發現 aglycones 轉化之物質可能為新的異黃酮衍生物(derivatives)，暫且命名為 NDA1、NDA2。

以液相層析質譜質譜儀(LC-MS/MS)分析，並與 aglycones 的質譜結果比較，結果顯示這兩種未知成分 NDA1、NDA2 確實為 aglycones 的衍生物，NDA1 之 m/z : 335 ($M+H^+$)，NDA2 之 m/z : 351 ($M+H^+$)。以 NMR 鑑定 NDA1 為 Daidzein-7-*O*-phosphate；NDA2 為 Genistein-7-*O*-phosphate。

Daidzein-7-*O*-phosphate 與 Genistein-7-*O*-phosphate 的水溶性比 aglycones 佳，有利於後續之開發利用。

關鍵字：大豆異黃酮、異黃酮衍生物、生物轉化、*Bacillus subtilis*、aglycones

Abstract

Isoflavones in soybean gained worldwide attention because of their benefits for human health. There are four chemical forms of natural isoflavones existing in soybean namely glucosides, malonylglucosides, acetylglucosides, and aglycones. Among these isoflavones, only aglycones rather than predominant glucosidic conjugates show their bioactivities to human. Glucosidic conjugates have to be transformed into their corresponding aglycone prior adsorption and utilization by intestinal microflora in human. Hence, most of the relevant studies were devoted on the conversion of glucosidic conjugates of isoflavone into their corresponding aglycones, no matter by hydrolysis using glucosidic enzymes or directly fermented/conversed through microorganisms.

In this study, 24 strains of *Bacillus subtilis* natto selected from commercial products of natto were employed to conduct the conversion of soy isoflavones. According to the HPLC chromatograms of isoflavone analysis, several new components were observed and considered to be possible novel derivatives of isoflavones based on the growth of peaks representing novel derivatives along with the decline of peaks representing isoflavone aglycones. Almost all of the strains used in this study were able to converse soy isoflavone aglycones to the corresponding novel derivatives. Two predominant novel derivatives namely NDA1 and NDA2 were considered with a relationship to daidzein and genistein, respectively.

The identification of NDA1 and NDA2 was conducted by LC-MS/MS and NMR spectra. The results indicated that NDA1 was possible a daidzein conjugate with an italic 335 ($M+H^+$), and NDA2 was a genistein conjugate with an italic 351

(M+H⁺). The possible chemical formula of NDA1 and NDA2 were characterized respectively as daidzein-7-*O*-phosphate and genistein-7-*O*-phosphate by NMR. The two novel isoflavone conjugates with better solubility than their original forms aglycone would be advantageous to further application.

Key words: Isoflavone, Isoflavone derivative, bioconversion, *Bacillus subtilis*, aglycones



第一章 前言

大豆從幾世紀之前就被使用，是許多亞洲國家飲食中重要的一部份，在人類的食物中，大豆含有最高濃度的異黃酮。異黃酮是一種植物雌激素，具有許多生理功能，目前已被證實可避免心血管疾病與某些癌症的發生、預防骨質疏鬆以及減緩女性更年期的不適症狀。

異黃酮共有 12 種，非發酵大豆食品所含的異黃酮以含醣基的 glucosides 含量較多，如 malonyldaidzin 與 malonylgenistin；發酵大豆食品則以不含醣基的 isoflavone aglycones 居多，如 daidzein 和 genistein，其原因是發酵過程中含醣基之異黃酮經由 β -glucosidase 水解去除醣基，而不含醣基之 daidzein 和 genistein 在人體腸道內較容易被吸收。

納豆是由枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 發酵熟黃豆製成，以往只發現 *B. subtilis* 具有產生 β -glucosidase 之能力， β -glucosidase 可將 isoflavone glucosides 中之 glucose 水解切除，游離出 isoflavone aglycones，並未發現 *B. subtilis* natto 可進一步將 isoflavone aglycones 轉化成其他衍生物。

本研究發現 *B. subtilis* natto 可將 isoflavone aglycones 轉化為 aglycones 之衍生物，並對其衍生物進行結構鑑定，接著大量製備 aglycones 之衍生物，發展一套分離與純化 aglycones 衍生物之方法。

第二章 文獻回顧

第一節、大豆異黃酮

1. 大豆異黃酮之介紹

大豆異黃酮 (isoflavone) 是類黃酮 (flavonoids) 的其中一類化合物，其與類黃酮的結構差異在於 B 苯環原先連接於 2 的位置轉移到 3 的位置(Kudou, 1991)。異黃酮又被稱作植物雌激素，因為其化學結構與雌激素相似，並同樣可被雌激素受體辨識(Clarkson et al., 1995)。異黃酮富含於黃豆之中，在黃豆中約含有 0.1~0.4% (w/w)，其總量與組成會隨著植株的品種、年齡、栽種的區域與環境之不同而有所差異(Potter, 1998)，如表 1 所示。

異黃酮主要有 12 種衍生物，可分為四種形式，第一種是不含醣基的糖苷配基(aglycone)形式，包括 daidzein, genistein, 與 glycitein；第二種是 β -葡萄糖苷(β -glucosides)的形式，包括 daidzin, genistin 與 glycitin；第三種是丙二醯葡萄糖苷(malonylglucosides)的形式，包括 malonyldaidzin, malonylgenistin 與 malonylglycitin；第四種是乙醯葡萄糖苷(acetylglucosides)的形式，包括 acetyldaidzin, acetylgenistin 與 acetylglycitin(Kudou, 1991)，如圖 1 所示。

流行病學之研究指出，攝食大豆異黃酮對人類健康有許多益處，例如：可避免心血管疾病(如：動脈硬化、冠狀動脈心臟病)、預防骨質疏鬆、減緩女性更年期的不適症狀、避免某些癌症發生(如：乳癌、前列腺癌、結腸癌)(Cotterchio, 2006)，並可降低血清中的低密度脂蛋白膽固醇(LDL cholesterol)(Zhuo et al., 2004)。

表 1. 四個不同國家的20個黃豆品種之大豆異黃酮含量

Table 1. Isoflavone content of 20 soybean cultivars from four different countries of origin.

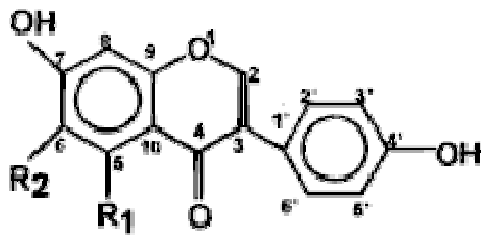
Number	Cultivar ^a	Level (mg/g of soybean)													
		DE	DI	mDi	aDI	GY	GYI	mGYI	aGYI	GE	GI	mGI	aGI	TI	
1	Chernovitska 9	0.0225	0.3052	1.3656	0.2208	0.0116	0.3357	0.3887	0.0260	0.0140	0.3898	1.1592	Tr	2.3162	
2	Veselovska	Tr	0.5937	1.3615	0.3210	Tr	0.2008	0.2858	0.0875	Tr	0.6257	1.9440	Tr	2.9385	
3	Amurska	0.0246	0.4510	2.4811	0.3421	Tr	0.2311	0.4651	0.0745	0.0094	0.5505	1.9018	Tr	3.5026	
4	Cerivnica stepu	0.0191	0.4633	2.1997	0.3337	0.0255	0.2443	0.3645	0.0749	0.0089	0.5117	1.8175	Tr	3.2703	
5	Mandzurska	0.0200	0.2262	1.1969	0.2724	Tr	0.1858	0.3597	0.0846	0.0088	0.3647	1.4751	Tr	2.2597	
6	Venera	0.0517	0.6340	3.3178	0.4514	0.0240	0.2415	0.4422	0.1222	0.0282	0.7135	2.4896	Tr	4.5904	
7	Valjevka	Tr	0.3899	1.7754	0.3332	Tr	0.2096	0.4006	0.1136	0.0133	0.5871	1.9247	Tr	3.0917	
8	Ana	0.0392	0.6612	2.8967	0.3583	Tr	0.2484	0.4106	0.1067	0.0242	0.6805	2.1640	Tr	4.0945	
9	NS-L-410015	0.0418	0.5874	2.2346	0.3165	Tr	0.2023	0.3298	0.0976	0.0313	0.6438	1.8227	Tr	3.4271	
10	Galina	0.0189	0.5815	3.2111	0.3693	0.0223	0.2127	0.3795	0.0833	0.1084	0.5099	2.0736	Tr	4.0918	
11	Sargent	0.0221	0.3191	1.4217	0.3946	0.0232	0.1818	0.2495	0.1064	0.0155	0.6459	2.0581	0.0084	2.9578	
12	MN 1801	0.0375	0.4637	1.7902	0.3244	0.0255	0.2263	0.2674	0.0894	0.0295	0.5855	1.6753	0.0195	3.0274	
13	Ne1900	0.0413	0.6825	2.5369	0.2855	Tr	0.2640	0.3308	0.0811	0.0203	0.5741	1.5624	Tr	3.4639	
14	Barnes	0.0270	0.4150	1.8468	0.4682	0.0286	0.1921	0.2698	0.1168	0.0210	0.7206	2.4230	0.0078	3.5430	
15	MN 0901	0.0312	0.4969	2.0912	0.4151	0.0250	0.2123	0.3335	0.1108	0.0177	0.7384	2.1870	Tr	3.6147	
16	Chang Nong 5	0.0219	0.4412	2.1689	0.2793	Tr	0.2741	0.4735	0.0797	0.0128	0.4291	1.5094	Tr	3.0644	
17	JJ 96021	0.0326	0.4999	2.5488	0.3633	Tr	0.2971	0.4327	0.0939	0.0233	0.6062	2.0559	Tr	3.7494	
18	Ba 28	0.0194	0.2287	0.7593	0.1367	Tr	0.2454	0.2532	Tr	0.0107	0.2548	0.7281	Tr	1.4501	
19	NM 97002/1	0.0195	0.2824	1.6723	0.3399	0.0252	0.3194	0.6168	0.0738	0.0118	0.4709	1.8899	Tr	3.0925	
20	Jilin Province	0.0454	0.5020	2.3702	0.3460	0.0114	0.2061	0.3647	0.1026	0.0275	0.6170	1.9409	Tr	3.5382	
	Average	0.0298	0.4613	2.0623	0.3336	0.0222	0.2365	0.3709	0.0908	0.0230	0.5610	1.8401	0.0119	3.2542	
	Min StD × 10 ⁻⁵	0.1	4.5	0.6	0.5	0.5	1.1	1.2	0.6	1.9	0.2	2.7	40.2		
	Max StD × 10 ⁻⁵	59.1	76.1	148.0	195.3	103.9	228.2	147.8	135.8	868.3	51.5	109.2	40.27		

^aCultivars 1–5 are from Russia, 5–10 from Serbia, 11–15 from the United States, and 16–20 from China. Min StD, minimal SD of three analysis of the same sample; Max StD, maximal SD of three analysis of the same sample.

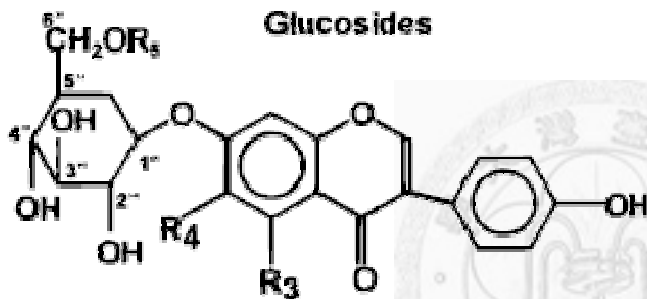
DE, daidzein; DI, daidzin; mDI, malonyl-daidzin; aDI, acetyl-daidzin; GY, glycitein; mGYI, malonyl-glycitein; aGYI, acetyl-glycitein; GE, genistein; GI, genistin; mGI, malonyl-genistin; aGI, acetyl-genistin; TI, total isoflavone; Tr, trace amount.

(Tepavcevic et al., 2010)

Aglycones



R ₁	R ₂	Compound
H	H	Daidzein
OH	H	Genistein
H	OCH ₃	Glycitein



R ₃	R ₄	R ₅	Compound
H	H	H	Daidzin
OH	H	H	Genistin
H	OCH ₃	H	Glycitin
H	H	COCH ₃	6''-O-Acetyldaidzin
OH	H	COCH ₃	6''-O-Acetylgenistin
H	OCH ₃	COCH ₃	6''-O-Acetylglycitin
H	H	COCH ₂ COOH	6''-O-Malonyldaidzin
OH	H	COCH ₂ COOH	6''-O-Malonylgenistin
H	OCH ₃	COCH ₂ COOH	6''-O-Malonylglycitin

Fig 1. The chemical forms of isoflavones in soybean.

圖 1. 大豆中異黃酮素之化學結構式

(Murphy, 1994)

2. 異黃酮之生理功效

2.1 抗氧化能力

異黃酮可作為天然的抗氧化劑，因為它們屬於多酚類化合物，自然的存在於植物中，已被證實有清除自由基的活性。自由基為活性化學物質，會氧化生物性分子，導致基因突變、組織受到傷害、細胞凋亡，這些反應於病理上會造成癌症、肺氣腫、肝硬化、動脈粥狀硬化、關節炎以及一些退化性疾病(Roberfroid & Calderon, 1995)。

許多體外試驗顯示 genistein 的化學預防效應與其抗氧化活性有關，genistein 可以抑制紫外線對惡性黑色素腫瘤細胞所誘發的 DNA 氧化傷害(Russo et al., 2006)。Genistein 也可以清除因為氧化壓力(oxidative stress)而產生的過氧化氫，但它對於其他過氧化系統的清能力較低，進一步的研究顯示，genistein 比 daidzein 更能抑制 β -carotene linoleate 的氧化(Record et al., 1995)。

2.2 避免心血管疾病

人類在更年期後罹患冠狀動脈心血管疾病的風險大增(Rosenberg, 1981)，而脂質代謝異常是更年期後導致小動脈硬化的主要原因(Kannel, 1987)。過去研究指出，猴子經由餵食含大豆分離蛋白且含異黃酮 glucosides(9.14 mg/kg/d)的導致粥狀動脈硬化之飲食，能顯著降低低密度脂蛋白(LDL)與極低密度脂蛋白(VLDL)膽固醇(Anthony, 1997)。在人體的臨床試驗中，攝食含有高量異黃酮(96 mg/d)之大豆分離蛋白(50 g/d)的組別與含有少量異黃酮(6 mg/d)之大豆分離蛋白(50 g/d)的組別相比，含有高量異黃酮的組別可降低血清中 LDL 膽固醇 0.15 mmol/L(Zhuo et al., 2004)。以上研究顯示，大豆異黃酮具有降血脂與抗粥狀動脈硬化之活性。

2.3 預防骨質疏鬆症

更年期之後的骨質疏鬆症與卵巢荷爾蒙的缺乏有關，會引起與年齡相關的骨質流失，尤其是在停經後的十年內，骨質會迅速流失(Gruber, 1984)。傳統上，治療停經後所引起的骨質疏鬆症大多以藥物抑制骨質的再吸收作用，如雌激素(estrogen)、抑鈣激素(calcitonin)(Genant et al., 1989)，但是雌激素會伴隨著某些副作用，如子宮內膜癌與乳癌(Ravnikar, 1987)。大豆異黃酮的結構與雌激素相似，圖 2 為異黃酮代謝物 equol 與雌激素代謝物 estradiol 的化學結構之比較。在體內與體外試驗證實 daidzein、genistein 及其 glycosides 具有雌激素的功效(Farmakalidis et al., 1985)，以管餵方式餵食切除卵巢之大鼠，餵給 daidzin 與 genistin (50 mg/kg/d) 4 週後，發現 daidzin 與 genistin 均可避免大鼠的骨質流失(Ishida et al., 1998)。近來也有研究發現，以大豆製品為基礎飲食，包括豆漿、大豆蛋白等，對母鼠的骨質密度具有正面的效果(Arjmandi et al., 1996; Omi et al., 1994)。

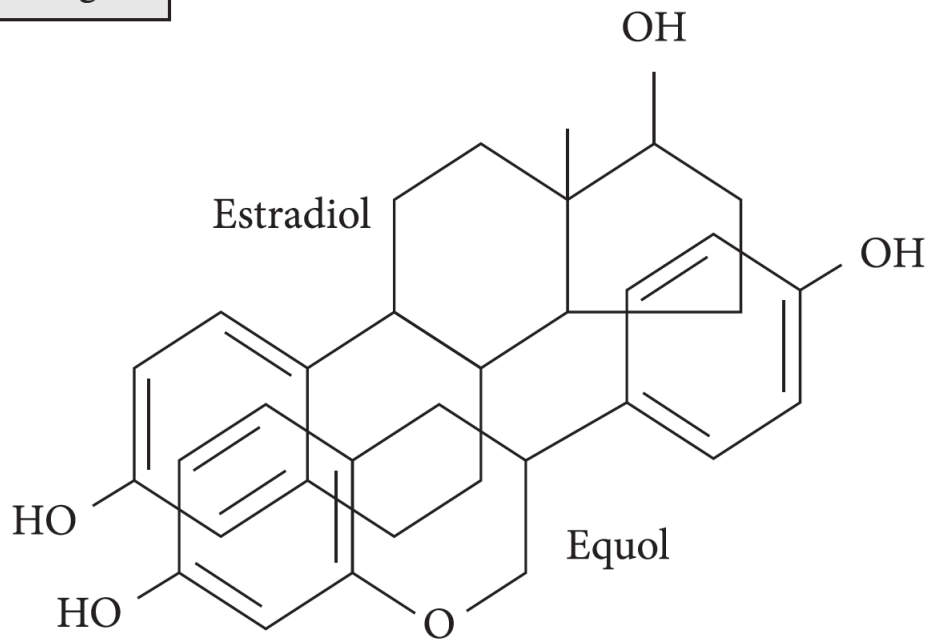
2.4 減緩女性更年期不適症狀

有研究指出，每日攝取 70 mg 異黃酮，六週後，可降低血管舒縮症狀(vasomotor symptoms)，並可改善早期的憂鬱症狀。因此，異黃酮可以作為替代傳統以雌激素方式的治療(Jou et al., 2005)。

2.5 抗癌能力

黃豆是東方國家為主食之一，流行病學之研究顯示，在這些富含大豆飲食的地區，雌激素-依賴性(estrogen-dependent)的疾病，如乳癌、卵巢癌的罹患率較低(Adlercreutz & Mazur, 1997)。植物雌激素，如木酚素(lignan)與大豆異黃酮被認為對雌激素-依賴性的乳癌與大腸癌扮演一個重要的防禦角色(Setchell et al., 1984 and 1981)。

Estrogen



Isoflavone

Fig 2. 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.

圖 2. 異黃酮代謝物 equol 與雌激素代謝物 estradiol 化學結構之比較

(Setchell & Cassidy, 1999)

第二節、異黃酮之生理代謝

在攝食大豆異黃酮之後，大豆異黃酮會被腸道中的 β -glucosidase 水解成 aglycones，之後再被吸收或進一步地形成特定的代謝物，包括雌馬酚(equol)及 p-ethylphenol(Axelson et al., 1984; Joannou et al., 1995)。Daidzin 經水解後形成 daidzein，再藉由腸道微生物代謝，還原轉化成 S-equol，如圖 3 所示(Wang et al., 2005)。先前有研究指出，異黃酮在循環與尿液中，主要是以葡萄糖醛酸(glucuronic acid)的型式存在(Shelnutt et al., 2000)。異黃酮在大鼠腸細胞中，經由 UDP-glucuronyltransferase (UGT)作用後，形成葡萄糖醛酸的型式(Sfakianos et al., 1997)，但在大鼠的門脈血液中，幾乎只有 equol-glucuronide，此結果顯示腸道可以將異黃酮進行葡萄糖醛酸化(glucuronidation)，或直接吸收異黃酮葡萄糖醛酸苷進入到腸肝循環中，再進入膽管(King et al., 1996; Sfakianos et al., 1997)。許多 UDP-glucuronyltransferase 的同工酶(isozyme)具有特異性，例如在結腸中，UGT-1A10 對 genistein 具有高度的特異性(Doerge et al., 2000)，而在鼠肝中，daidzein 可與多種 UGT isozyme 進行葡萄糖醛酸化，包括：UDP-1A1 和 UDP1A9(Doerge et al., 2000)。

另有研究指出，在大鼠的小腸內形成的 genistein glucuronide，約有三分之一會回到內腔，再被結腸中細菌所生產的 glucuronidases 水解(Mykkanen et al., 1997)。在血液中，硫酸鹽型式的異黃酮的含量相對於葡萄糖醛酸型式少，推測硫酸鹽型式的異黃酮是經由肝臟或腎臟代謝產生(Adlercreutz et al., 1993)。

大豆食品中的異黃酮以 glucosides 型態的含量最多，但不易被腸道吸收，而部份的 aglycones 會在胃被吸收(Piskula et al., 1999)，因此要吸收 glucosides 之異黃酮，需先水解其糖基。在小腸近端，小腸的刷狀緣膜(brush border membrane)上有 β -glucosidases 可將部份異黃酮水解(Malathi & Crane, 1969)，這些酵素在空腸(jejunum)中，對黃酮類具有高度的活性，且 β -glucosidases 也可穿過頂膜(apical membrane)水解 glucosides 型式之異黃酮(Hays et al., 1996)，由於

水解後產生的 aglycones 為多酚類物質，其 pKa 有利於從空腸中非離子被動擴散，因而吸收進入肝門靜脈(portal vein)，如圖 4 所示(Setchell et al., 2002)。



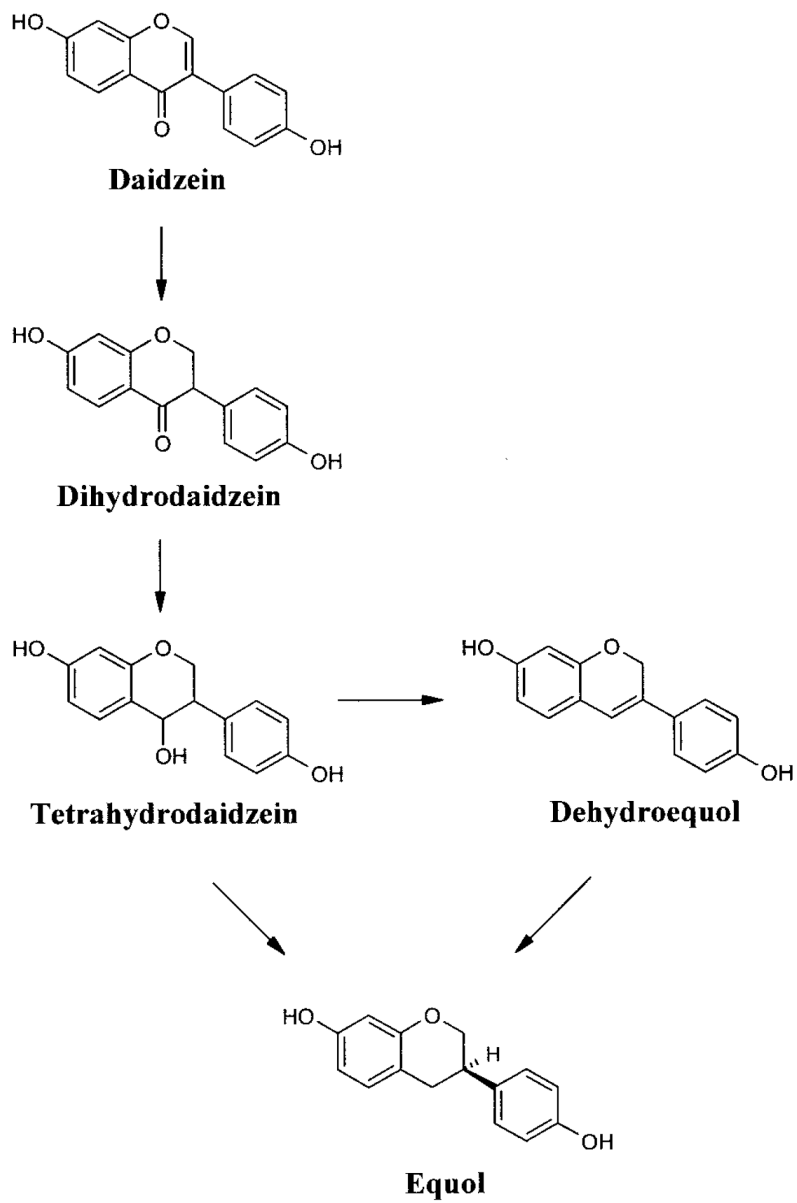


Fig 3. Proposed metabolic pathway leading to formation of equol from daidzein in a urine sample.

圖 3. 尿液樣品中 Daidzein 經由人體代謝成 equol 之途徑

(Wang et al., 2005)

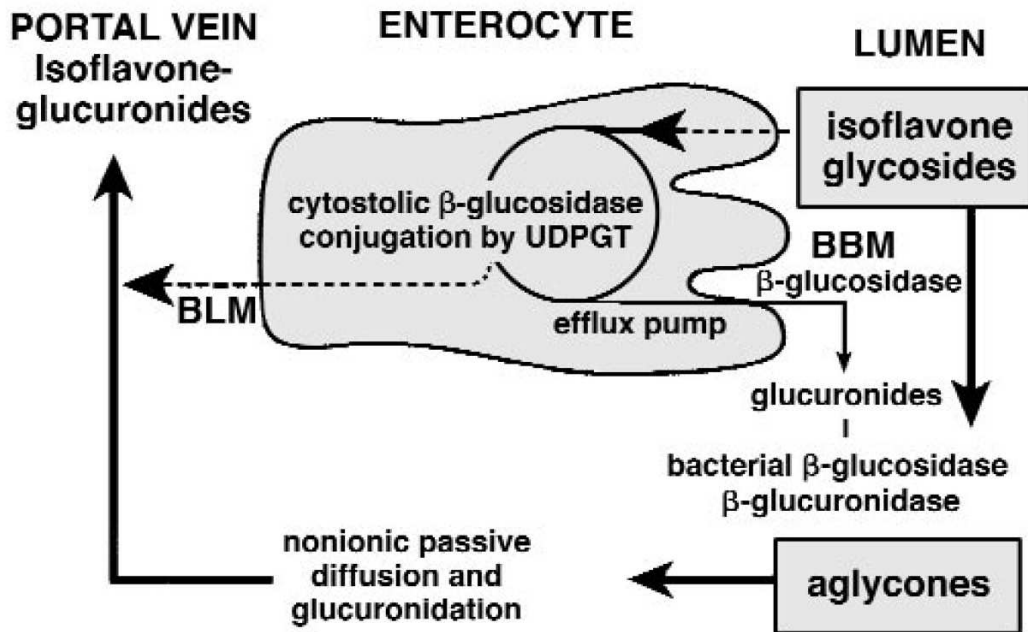


Fig 4. General scheme of the mechanism of intestinal absorption and metabolism of Isoflavone glycosides. BLM, basolateral membrane; BBM, brush border membrane.

圖 4. 異黃酮葡萄糖苷於腸道之吸收與代謝機制

(Setchell et al., 2002)

第三節、異黃酮之生物轉化

1. 大豆中的酵素

大豆與大豆製品中的異黃酮會隨著加工條件而轉變，表 2 為各類大豆食品中之異黃酮含量(Song et al., 1998)，不同的加工處理，會使異黃酮互相轉變，因而改變食品的食用價值。

(Matsuura M., 1989)指出，在浸泡大豆的過程中，daidzein 和 genistein 的量與大豆中的 β -glucosidases 有關。大豆中的 β -glucosidases 可分為 β -glucosidases-A、 β -glucosidases-B 及 β -glucosidases-C，其中又以 β -glucosidases-B 和 β -glucosidases-C 具有將豆漿中的 daidzin 與 genistin 水解成 daidzein 和 genistein 之能力，而 genistin 比 daidzin 更容易被 β -glucosidases 水解 (Matsuura, 1993)。

過去曾經在大豆的根發現 β -glucosidases，此 β -glucosidases 對於 glucosides 與 malonylglucosides 有高度特異性，可以將異黃酮之糖苷鍵水解(Hsieh & Graham, 2001)。

在 2010 年(Chiou et al., 2010)等人發現從大豆豆渣中分離出新的 β -glucosidase，此 β -glucosidase 為 75kDa 的單體，只能水解非 malonylglucosides 之異黃酮，而對 malonylglucosides 之異黃酮無作用。

表 2. 各類大豆食品中異黃酮之含量

Table 2. Isoflavone contents of representative soyfoods

Product	Aglycone			Glucoside			Malonyl-			Acetyl-			Normalized ²			
	Dein	Gein	Glei	Din	Gin	Glin	Din	Gin	Glin	Din	Gin	Glin	Dein	Gein	Glei	Total ²
Vinton 81 ^{3,4}	21 ^f	22 ^h	0 ^f	163 ^f	178 ^h	50 ^{d,e}	1364 ^b	1467 ^a	137 ^c	0 ^e	29 ^e	0 ^{d,e}	811 ^c	914 ^e	105 ^d	1830 ^d
TVP ³	13 ^{g,h}	31 ^g	26 ^c	524 ^b	660 ^c	150 ^b	95 ⁱ	197 ^h	63 ^e	193 ^c	334 ^d	93 ^b	488 ^f	737 ^f	210 ^b	1435 ^{e,f}
Roasted soybeans ⁵	44 ^e	77 ^c	58 ^b	474 ^c	568 ^{d,e}	70 ^{d,e}	46 ^j	65 ⁱ	74 ^d	40 ^d	71 ^e	54 ^{b,c}	379 ^g	506 ^h	174 ^{b,c}	1059 ^g
Tofu ³	116 ^c	140 ^b	26 ^c	453 ^c	562 ^e	130 ^{b,c}	753 ^e	788 ^e	131 ^c	54 ^d	66 ^e	0 ^{d,e}	806 ^c	939 ^e	179 ^{b,c}	1924 ^d
Fried tofu ⁵	63 ^d	90 ^d	18 ^d	340 ^e	523 ^f	87 ^{c,d}	338 ^g	410 ^g	60 ^e	85 ^d	110 ^{d,e}	0 ^{d,e}	490 ^f	693 ^f	106 ^d	1289 ^f
Roasted soyflour ⁵	18 ^{f,g}	16 ^h	13 ^{d,e}	470 ^e	584 ^d	62 ^{d,e}	956 ^d	885 ^c	46 ^f	1643 ^b	1375 ^b	56 ^{b,c}	1696 ^b	1626 ^b	109 ^d	3431 ^b
Tempeh ³	318 ^a	518 ^a	31 ^c	117 ^g	346 ^g	34 ^{d,e}	404 ^g	750 ^f	34 ^g	68 ^d	76 ^e	65 ^{b,c}	633 ^e	1168 ^d	109 ^d	1910 ^d
Miso ³	61 ^d	39 ^f	11 ^e	157 ^f	122 ⁱ	37 ^{d,e}	1180 ^c	979 ^b	217 ^b	0 ^e	0 ^e	0 ^{d,e}	759 ^{e,d}	625 ^g	150 ^{b,c,d}	1534 ^e
Soy milk ³	18 ^{f,g}	19 ^h	10 ^e	410 ^d	710 ^b	65 ^{d,e}	690 ^f	871 ^{d,e}	39 ^{f,g}	22 ^{d,e}	820 ^c	89 ^b	632 ^e	1384 ^c	124 ^{c,d}	2140 ^c
Soy hot dog ⁵	9 ^h	18 ^h	9 ^e	36 ^h	69 ^j	16 ^e	13 ^k	43 ⁱ	16 ^h	0 ^e	4 ^e	15 ^d	38 ^h	86 ⁱ	36 ^e	160 ^h
Soygerm ⁵	303 ^b	114 ^c	684 ^a	5208 ^a	1664 ^a	6505 ^a	3466 ^a	857 ^d	3313 ^a	10830 ^a	2616 ^a	3952 ^a	11204 ^a	3092 ^a	8905 ^a	23201 ^a
LSD	7	6	6	38	18	57	28	25	12	57	284	32	98	38	63	157

¹ Dein, daidzein; Gein, genistein; Glei, glycitein; Din, daidzin; Gin, genistin; Glin, glycitin; TVP, textured soy protein; LSD, least significant difference. Numbers within a column with different superscript letters are significantly different, $P < 0.05$.

² Adjusted for molecular weight.

³ Data from 3 replications.

⁴ 1994 crop.

⁵ Data from 2 replications.

(Song et al., 1998)

2. 異黃酮之微生物轉化

Glucosides 之異黃酮較不易被腸道的上皮吸收，其生物活性也較 aglycones 型式之異黃酮低(Miksicek, 1995; Setchell et al., 2002)。人體或微生物的 β -glucosidases 可將大豆異黃酮之醣基水解，黏膜上的 β -glucosidases 也已證實具有水解 isoflavone glucosides 的功能(Ioku et al., 1998; Setchell et al., 2002)。腸道中，不同的微生物也能將 glucosides 之異黃酮轉化為 aglycones，如 lactobacilli、bifidobacteria、bacteroides 及 *Escherichia coli*(Hur et al., 2000)。高碳水化合物之飲食可能促進腸道的發酵作用，提高植物雌激素之生物轉化，大大地增加 equol 之形成。

(Chien et al., 2006)等人提出，藉由乳酸菌及 bifidobacteria 可將豆漿中含醣基之異黃酮(glucosides、malonylglucosides、acetylglucosides)轉化為 aglycones，其轉化能力與 β -glucosidases 之活性有關。

表 3 為幾種傳統大豆製品之異黃酮含量，glucosides 之異黃酮在未發酵的大豆製品中含量較高，在發酵後的大豆製品含量較低，而發酵後的大豆食品中以 aglycones 為主(Murphy, 1994)。例如以 *Aspergillus oryzae* 發酵的味噌、以 *Bacillus subtilis natto* 發酵的納豆、以 *Rhizopus oligosporus* 發酵的天貝等，其 aglycones 之含量皆高於未發酵的大豆(Kuo et al., 2006)。

表 3. 傳統大豆食品中異黃酮之含量

Table 3. Isoflavone contents ($\mu\text{g/g}$) of traditional soy foods

product	glucoside			malonyl			acetyl			aglycon		
	Din	Gin	Glin	Din	Gin	Glin	Din	Gin	Glin	Dein	Gein	Glein
	roast soybeans	460 b	551 d	68 b	45 b	63 f	72 a	397 a	743 a	102 a	39 e	69 e
instant beverage A ^c	444 b	775 a	76 a	39 b	144 d	40 c	5 b	24 b	33 b	18 g	44 g	20 d
instant beverage B ^c	404 c	718 b	77 a	58 b	202 b	43 b	8 b	27 b	33 b	15 g	38 h	20 d
instant beverage C ^c	468 b	674 c	68 b	61 b	179 c	42 bc	9 b	22 b	33 b	15 g	32 i	20 d
instant beverage D ^c	525 a	745 ab	75 a	98 b	259 a	44 b	12 b	26 b	33 b	30 f	50 f	21 cd
tofu	25 e	84 f	8 e	159 ab	108 e	nd	8 b	1 b	29 b	46 d	52 f	12 f
tempeh	2 e	65 f	14 d	255 a	164 c	nd	11 b	nd	nd	137 c	193 b	24 b
bean paste	nd	96 ef	21 c	nd	nd	19 e	1 b	2 b	nd	271 a	183 c	54 a
honzukuri miso ^d	72 d	123 e	18 c	nd	nd	22 d	1 b	11 b	nd	34 f	93 d	15 e
fermented bean curd	nd	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	143 b	223 a	23 bc
lsd ^e	35	32	3	127	16	3	23	38	8	4	5	2

^a Data from three replications. Values in column with different letters were significantly different at $\alpha = 0.05$; dry samples.

^b Abbreviations: Din, daidzin; Gln, genistin; Glin, glycitin; Dein, daidzein; Gein, genistein; Glein, Glycitein; tr, trace; nd, not detected.

^c 90 and 91, 1990 and 1991 crop years; H and I, different locations. ^d Different commercial sources. ^e Least significant difference.

(Murphy, 1994)

3. 異黃酮經生物轉化後之衍生物

目前有許多與轉化大豆異黃酮相關的研究，例如以 *Bacillus subtilis*、*Rhizopus*、*Aspergillus* 等菌種發酵大豆中的異黃酮(Esaki, 1994)，在大豆的發酵食品中，可以發現異黃酮的衍生物。

在發酵黃豆食品天貝的過程中，可以發現異黃酮的衍生物 6,7,4'-trihydroxyisoflavone，此衍生物具有抗氧化活性(György, 1964)。發酵天貝通常以 *Rhizopus* 菌屬發酵(Ebata, 1972)，但研究指出仍有其他種類的細菌參與發酵(Baumann, 1992)。(Klusa, 1993)發現只有 *Rhizopus* 存在時，無法將 daidzein 或 glycitein 轉化成 6,7,4'-trihydroxyisoflavone。而從天貝中分離出的 *Brevibacterium epidermidis* 與 *Micrococcus luteus* 具有將 glycitein 以 *O*-demethylation 作用轉化成 6,7,4'-trihydroxyisoflavone 的能力。而另一株從天貝分離的菌株 *Microbacterium aborescens* 則有將 daidzein 轉化成 glycitein 與 6,7,4'-trihydroxyisoflavone 的能力，如圖 5 所示。

在日本沖繩(Okinawa)有人將 *Aspergillus saitoi* 用於發酵黃豆以製造"awaori"(小米酒)，經過 *A. saitoi* 發酵的黃豆含有抗氧化物質 8-hydroxydaidzein 與 8-hydroxygenistein，如圖 6 所示，此兩種物質分別是由 daidzein 與 genistein 轉化生成。蒸煮過的黃豆，接種 *A. saitoi*，在 30°C 發酵 5 天，發現黃豆中的 daidzin 與 genistin 轉化為 daidzein 與 genistein，再分別轉化為 8-hydroxydaidzein 與 8-hydroxygenistein (Esaki, 1997)。

(Toda et al, 1999)在 *Bacillus subtilis* species 發酵的韓國食品 cheonggukjang 與 *B. subtilis* natto 發酵的納豆中發現含有 6'-*O*-succinyldaidzin、6'-*O*-succinylgenistin、6'-*O*-succinylglycitin，這三者分別是 daidzin、genistin、glycitin 的衍生物，它們具有避免骨質流失的功能，圖 7 為 6''-*O*-succinylglucosides 之化學結構。

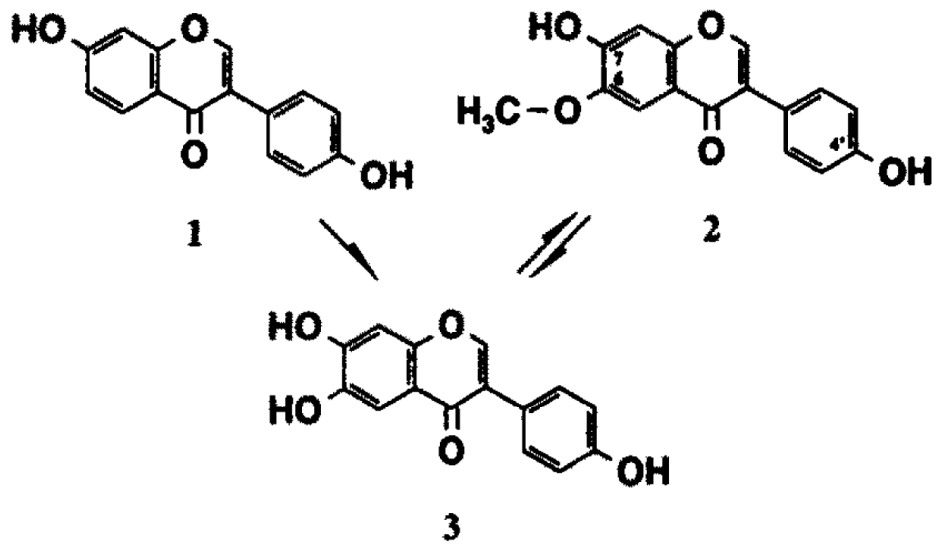


Fig 5. 6,7,4'-Trihydroxyisoflavone (3) transforme from daidzein (1) and glycitein (3) by *Microbacterium aborescens*.

圖 5. Daidzein (1) 及 glycitein (2) 經由 *Microbacterium aborescens* 轉化為 6,7,4'-trihydroxyisoflavone (3)

(Klusa, 1993)

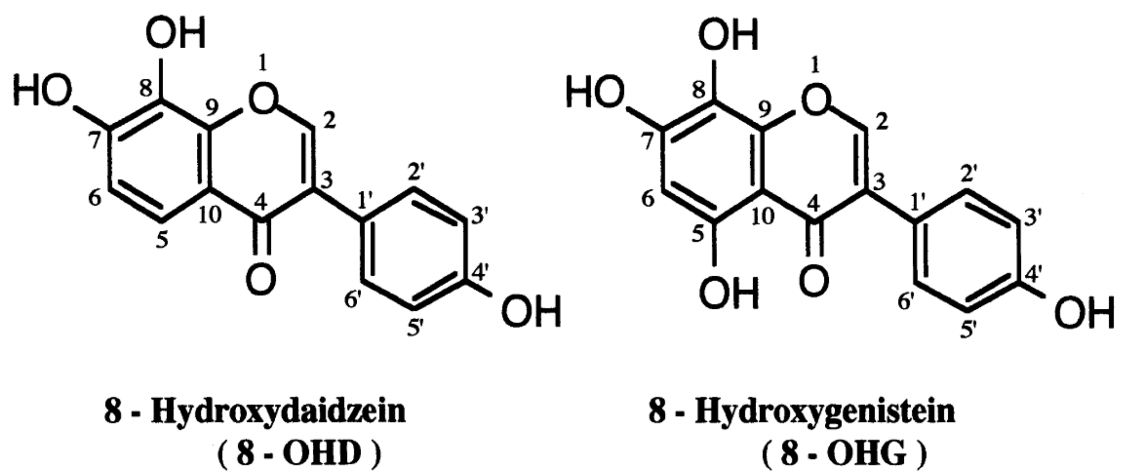


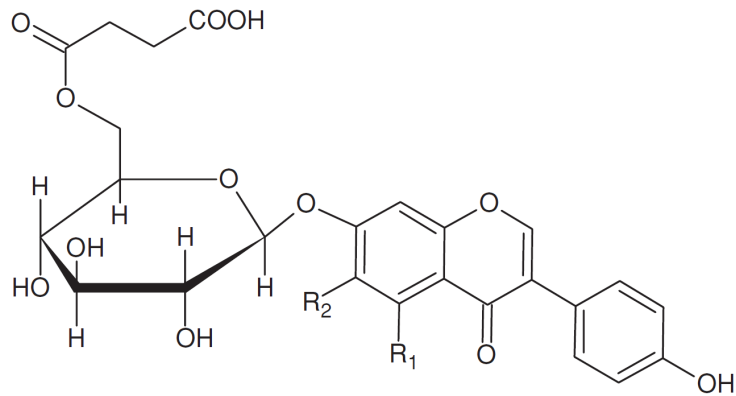
Fig 6. Chemical structures of 8-hydroxydaidzein and 8-hydroxygenistein.

圖 6. 8-Hydroxydaidzein 與 8-hydroxygenistein 之化學結構



(Esaki, 1997)

	genistein	daidzein	glycitein
R ₁	OH	H	H
R ₂	H	H	OCH ₃



Succinyl- β -glucoside

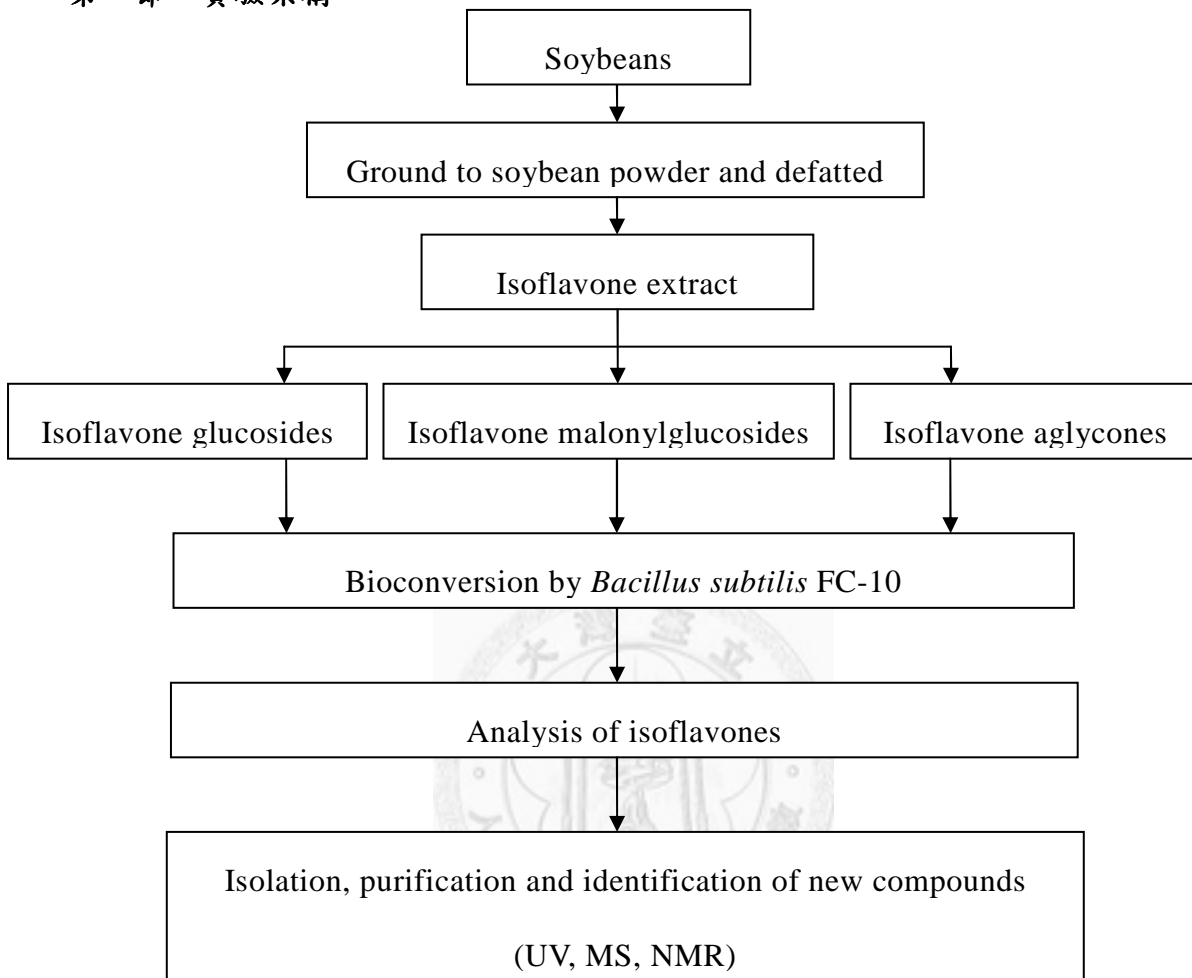
Fig 7. Chemical structures of 6'-*O*-succinylglucosides of isoflavone.

圖 7. 6'-*O*-succinylglucosides 異黃酮之化學結構

(Park et al., 2010)

第三章 材料與方法

第一節、實驗架構



第二節、實驗材料

1. 材料

大豆 (*Glycine max* L.), Organic B0552 SOYBEAN 2007 crop, 由台灣新竹湖口豆之味豆腐坊提供, 為美國密蘇里州進口, 非基因改造之黃豆。

2. 試藥

大豆異黃酮的分離與純化

- (1) Acetic acid (CH₃COOH) , Merck
- (2) Acetonitrile (CH₃CN) , Merck
- (3) Benzoic acid (C₆H₅COOH) , Sigma
- (4) Hexane (CH₃(CH₂)₄CH₃) , Merck
- (5) Methanol (CH₃OH) , Merck
- (6) Sand , J. T. Baker
- (7) DIAION® HP-20 , Mitsubishi Chemical Industries Limited
- (8) Sephadex™ LH-20 , Amersham Biosciences

3. 菌株

本實驗室從市售納豆篩選之 *Bacillus subtilis* FC-0、1、2、3、4、5、6、7、9-1a、9-1b、9-2、10、11-1、11-2、12-1、12-2、13、13-1、14-1、15-2a、15-2b、16-1、16-2、17-1，共 24 株菌株

4. 培養基

- (1) Nutrient Broth (NB) , Becton Dickinson

Approximate formula* per liter (L) purified water

- beef extract 3.0 g

- peptone 5.0 g

- (2) Agar

第三節、儀器設備

分光光度計：日本 Hitachi 公司 U-1100 型。

冷凍乾燥機：美國 Labconco 公司。

微量離心機：德國 Heraeus 公司 Biofuge pico。

粉碎機：台灣 佑崎機械有限公司，JA-14 原泰奇粉碎機。

殺菌釜：日本 Tomy 公司 ES-315 型。

恆溫培養箱：台灣 Hotech 公司 low-temp incubator 707R。

減壓濃縮裝置：

- 旋轉蒸發器：瑞士 Büchi 公司 Rotavapor R-14。
- 真空值控制器：瑞士 Büchi 公司 Vacuum Controller B-72。
- 水浴鍋：瑞士 Büchi 公司 Waterbath B-480。
- 水幫浦：日本 Tokyo Rikakikai 公司 A-3S。
- 冷卻裝置：日本 Eyela 公司 Cool Ace CA-1111。

高效液相層析儀：

- 液相層析儀幫浦：Model 584 Solvent Delivery Module (ESA Biosciences, USA)
- 除氣裝置：德國 Thermo 公司 ERC-3215 α 。
- 液相層析儀偵測器：Spectro Monitor® 3200
- 資料處理利用 SISC 積分層析軟體：台灣 SISC 公司 2.01 版。

第四節、實驗方法

1. 大豆異黃酮之萃取與純化

1.1 大豆之前處理

秤取 100 g 大豆，以粉碎機粉碎，加入 1000 mL n-hexane 於室溫攪拌萃取 24 小時，再以抽氣過濾裝置分離濾液與豆渣，濾液為含有大豆油的部份，而豆渣備用。

1.2 大豆異黃酮之萃取

將上述豆渣加入 1000 mL 60% 甲醇於室溫攪拌萃取 2 小時，以抽氣過濾裝置分離濾液與豆渣，再以 1000 mL 60% 甲醇於室溫攪拌萃取 2 小時，共萃取兩

次，將兩次濾液合併，經減壓濃縮抽離甲醇，濃縮約至 300 mL，減壓濃縮的溫度需在 40°C 以下，以避免 malonylglucosidic isoflavones 降解。

1.3 Diaion HP-20 疏水性管柱之層析分離

稱取 20 g Diaion HP-20 疏水性樹脂，以 100% 甲醇浸潤，填充於長 32 公分，直徑 2.5 公分之玻璃管柱，填充後 bed volume 約 70 cm³(3.9 cm² × 18 cm)，而 void value 約 45 mL。待 HP-20 均勻沉降後，以蒸餾水取代管柱中的甲醇，直到洗出液不含甲醇，再將大豆異黃酮濃縮液通入管柱。管柱流出速率約 1.25 mL/min。

1.4 大豆異黃酮之分離

參考(林, 2008)之方法，利用 HP-20 疏水性管柱將大豆異黃酮分離

將上述大豆異黃酮濃縮液，通過 HP-20 疏水性管柱，再以大量清水流洗，流洗至流出液為透明澄清，接著以 40% 甲醇流洗，收集前 150 mL 黃色溶液，此為 malonylglucosidic isoflavones 洗出液。

之後改用 70% 甲醇流洗，收集約 100 mL 橘紅色溶液，此為 glucosidic isoflavones 洗出液。最後用 100% 甲醇流洗，收集約 150 mL，此為 isoflavone aglycones 洗出液。

將 malonylglucosides、glucosides、aglycones 洗出液分別減壓濃縮抽乾甲醇，再分別冷凍乾燥，可得 malonylglucosides、glucosides 以及 aglycones 型式之異黃酮乾燥粉末。Glucosidic isoflavones 洗出液在冷凍乾燥前，先以殺菌釜加熱至 121°C，30 分鐘，此步驟是為了將殘餘的 malonylglucosidic isoflavones 轉變為 glucosidic isoflavones。

2. 大豆異黃酮之含量分析

參考(常, 2006)之方法，以 HPLC 分析大豆異黃酮之含量。

Column: YMC-Pack ODS-AM C18 (5 μ m, 250 \times 4.6 mm)

Mobile phase: solvent (A): 0.1% 醋酸水溶液

solvent (B): 0.1% 醋酸溶於乙腈

Flow rate: 1.0 mL/min

Sample loop: 20 μ L

Detection : 254 nm (Spectro Monitor® 3200)

Pump: Model 584 Solvent Delivery Module (ESA Biosciences, USA)

分析級 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 6 分鐘，之後在 8 分鐘內增加至 35%，並平衡 6 分鐘，在之後的 5 分鐘內降回 15%。此梯度主要用於 12 種大豆異黃酮總含量之分析與定量，總分析時間為 55 分鐘。重新注入樣品前，需以 15% 平衡 15 分鐘。

3. 大豆異黃酮含量之計算

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

A_S = Peak area of isoflavone compounds

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

$C_{I.S.}$ = The concentration of internal standard (benzoic acid = 1000 ppm)

V = Final volume (mL)

M_S = Sample weight (g)

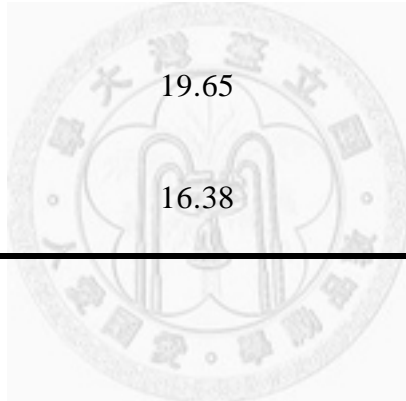
RRF = Relative response factor

MW = Molecular weight

表 4. 本研究中計算大豆異黃酮含量之 RRF 值(relative response factor)與分子量

Table 4. The RRF value was used to calculate the isoflavone content in the study.

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



4. 微生物之生物轉化異黃酮

4.1 菌株篩選

將 *Bacillus subtilis* FC 編號 0 至 17-1 等 24 株菌株，分別取一接種環菌落至已滅菌的 5 mL NB 中，於 37°C、震盪(100 rpm)培養 12 小時，之後測定其 OD₆₀₀ 大於 0.6，再加入 1 mL 0.3% 自行製備的 glucosidic isoflavones 溶液，於 37°C 震盪(100 rpm)培養 12 小時。取 1 mL 發酵液加入 1 mL 含有內標(Benzoic acid)之甲醇溶液後，離心(13,000 rpm, 10 min)，以分析級 HPLC 分析之。

4.2 異黃酮之預處理

稱取 0.3 g isoflavone glucosides 和 isoflavone aglycones 凍乾粉末，分別溶於 100 mL 蒸餾水，將 glucosides 和 aglycones 水溶液置於殺菌釜 121°C，滅菌 15 分鐘。

稱取 0.3 g malonylglucosides 凍乾粉末，溶於 100 mL 無菌水，再以 0.22 μm 濾膜過濾除菌，因 malonylglucosides 遇高溫會降解成 glucosides。

4.3 大豆異黃酮之生物轉化

將 *Bacillus subtilis* FC-10 於 NA 平板以四區劃線法於 37°C 培養 12 小時，挑出單一菌落，接種至 NB 培養液，於 37°C、100 rpm 震盪培養 12 小時，此為預培養液。

將預培養液接 1 mL 至 29 mL NB，於 37°C 震盪培養 12 小時後，分別加入 6 mL 0.3% isoflavone glucosides、malonylglucosides、aglycones 之溶液（相當於 0.5 mg Isoflavone/mL），於 37°C 震盪培養 24 小時。測定 0, 4, 8, 12, 24 小時，異黃酮之變化。

5. 製備 NDA1、NDA2

取 *Bacillus subtilis* FC-10 之單一菌落接種至 200 mL NB，培養於 37°C，震盪培養 12 小時。分別接 5 mL 菌液至 40 個含有 145 mL NB 之錐形瓶，培養 12 小時，每瓶加入 0.3% isoflavone aglycones 30 mL，培養 24 小時後，離心(12,500 rpm, 20 min)，取上清液。

6. 分離與純化 NDA1、NDA2

將上述發酵液通過 HP-20 疏水性管柱，收集濾液，再以蒸餾水流洗，收集流洗液，合併濾液與流洗液，以冷凍乾燥將液體凍乾，再將凍乾粉末以 1:10 (w/v) 用 2 M NaCl_(aq) 回溶，以 6 N HCl 調整至 pH 1，以 1:1(v/v) 乙酸乙酯萃取 3 次，合併乙酸乙酯層，將乙酸乙酯層減壓濃縮至乾，乾燥物以乙醇回溶，再以 1 N NaOH_(aq) 調整至 pH 5.5，此時會有沉澱生成，將乙醇減壓濃縮至乾，以純水回溶，以 6 N HCl 調整至 pH 1，在 13000 rpm 離心 10 分鐘，將上清液以半製備級 HPLC 分析，並收集流洗液，將收集到的 NDA1 與 NDA2 流洗液減壓濃縮，分別進入 LH-20 管柱，將雜質與 NDA1 和 NDA2 分離，得到純的 NDA1 與 NDA2，將此兩種純化物質凍乾，以進行 LC-MS 與 NMR 之分析。

6.1 半製備型 HPLC

Column: SUPELCO Discovery® BIO Wide Pore C18 (250 × 10 mm, 5 μm)

Mobile phase: solvent (A): 0.1% 三氟醋酸水溶液

solvent (B): 0.1% 三氟醋酸溶於甲醇

Flow rate: 4 mL/min

Sample size: 100 μL

Detector: Waters Tunable Absorbance Detector (254 nm)

Pump: Spectra Series P100, Thermo Fisher Scientific Inc., Barrington, IL, U.S.A.

HPLC 梯度流洗條件：

前 15 分鐘，Solvent (B)由 10%增加至 25%，並平衡 10 分鐘，總分析時間為 25 分鐘，重新注入樣品前需以 Solvent (B)10%平衡 20 分鐘。

6.2 LH-20 管柱之層析分離

取 20 g LH-20 樹脂，以甲醇膨潤 24 h，再以 50% 甲醇膨潤 12 h，再置換成純水膨潤 6 h，將此樹脂裝填至長 30 cm，直徑 1.5 cm 的玻璃管柱。再以 HPLC 收集 NDA1 與 NDA2。

HPLC 條件：

Column: LH-20 column

Mobile phase: ultrapure water

Flow rate: 1.3 mL/min

Sample size: 2 mL

Detector: Waters Tunable Absorbance Detector (254 nm)

Pump: Spectra Series P100, Thermo Fisher Scientific Inc., Barrington, IL, U.S.A.



7. 以 LC-MS 分析 Daidzein、Genistein、NDA1、NDA2

以 Thermo Finnigan LCQ 質譜分析系統(Thermo Finnigan LCQ Aadvantag, San Jose, CA)進行分析，樣品經由 Agilent 1100-Series HPLC system 分析，分析條件與「大豆異黃酮之含量分析」相同。MS 離子化方式為 ESI，以 positive V mode 分析，capillary temp: 200.5°C，cone voltage: 40 V，capillary voltage: 3.73 V。

8. 以 NMR 分析 NDA1、NDA2

以 DMSO- d_6 溶解測試樣品，裝於 NMR tube 中，以 600 MHz 的 NMR 光譜

儀器測試氫核、碳核在磁場作用下的吸收及相對位置，以推測樣品結構。 ^1H 以 $\text{DMSO-}d_6$ 作為內標， $\delta = 2.578$ ； ^{13}C 以 $\text{DMSO-}d_6$ 作為內標， $\delta = 39.9$ ； ^{31}P 以 triphenylphosphate 做為外標， $\delta = -17.5$ 。



第四章 結果與討論

第一節、大豆異黃酮之含量分析

100 g 大豆粉經由 n-hexane 脫脂後，其豆渣以 60% 甲醇在室溫下萃取 2 小時，萃取兩次，所得之濾液以 HPLC 進行分析，大豆異黃酮之量測結果如表 5 所示，大豆異黃酮含量為 3589 $\mu\text{g/g}$ ，即本實驗所使用的大豆其異黃酮含量約為 0.36%。

實驗結果發現在大豆中以 malonylglucosides 型式的異黃酮含量最高，其含量大約為 0.23%，其中 malonyldaidzin 含量為 1223 $\mu\text{g/g}$ ，malonylgenistin 含量為 1111 $\mu\text{g/g}$ 。其次含量較高的為 glucosides 形式之異黃酮，其含量大約為 0.1%，daidzin 的含量為 481 $\mu\text{g/g}$ ，genistin 的含量為 534 $\mu\text{g/g}$ 。大豆中含量最低的異黃酮為 aglycones，其總量約為 0.02%，daidzein 含量為 93 $\mu\text{g/g}$ ，genistein 含量為 147 $\mu\text{g/g}$ 。圖 8 為 100 g 大豆粉脫脂後的 60% 甲醇萃取物之 HPLC 分析圖譜。

脫脂後的大豆粉以 60% 甲醇萃取後，其萃取液經減壓濃縮抽離甲醇，由於 HP-20 樹脂會吸附異黃酮，將不含甲醇的萃取液通過 HP-20 疏水性管柱，先以大量清水流洗至澄清，洗去不被 HP-20 樹脂吸附的物質，再以 40% 甲醇流洗，收集約 150 mL 的黃色流洗液，此黃色液體主要為 malonylglucosides 型式之異黃酮。圖 9 為 60% 甲醇萃取液通過 HP-20 管柱之 40% 甲醇洗出液 HPLC 分析圖譜。

接著以 70% 甲醇流洗，收集約 100 mL 的橘紅色流洗液，此流洗液主要為 glucosides 形式之異黃酮，如圖 10 所示。將 70% 甲醇流洗液減壓濃縮抽離甲醇，接著以 121°C，處理 15 min，可將殘餘的 malonylglucosides 轉變成 glucosides 形式的異黃酮，如圖 11 所示。最後以 100% 甲醇流洗，流洗液抽離甲醇，以 HPLC 分析，此部份為 aglycones 形式之異黃酮，如圖 12 所示。將以上三種形式之異黃酮冷凍乾燥，做為後續微生物實驗的轉化基質。圖 13 為三類大豆異黃酮之產物。

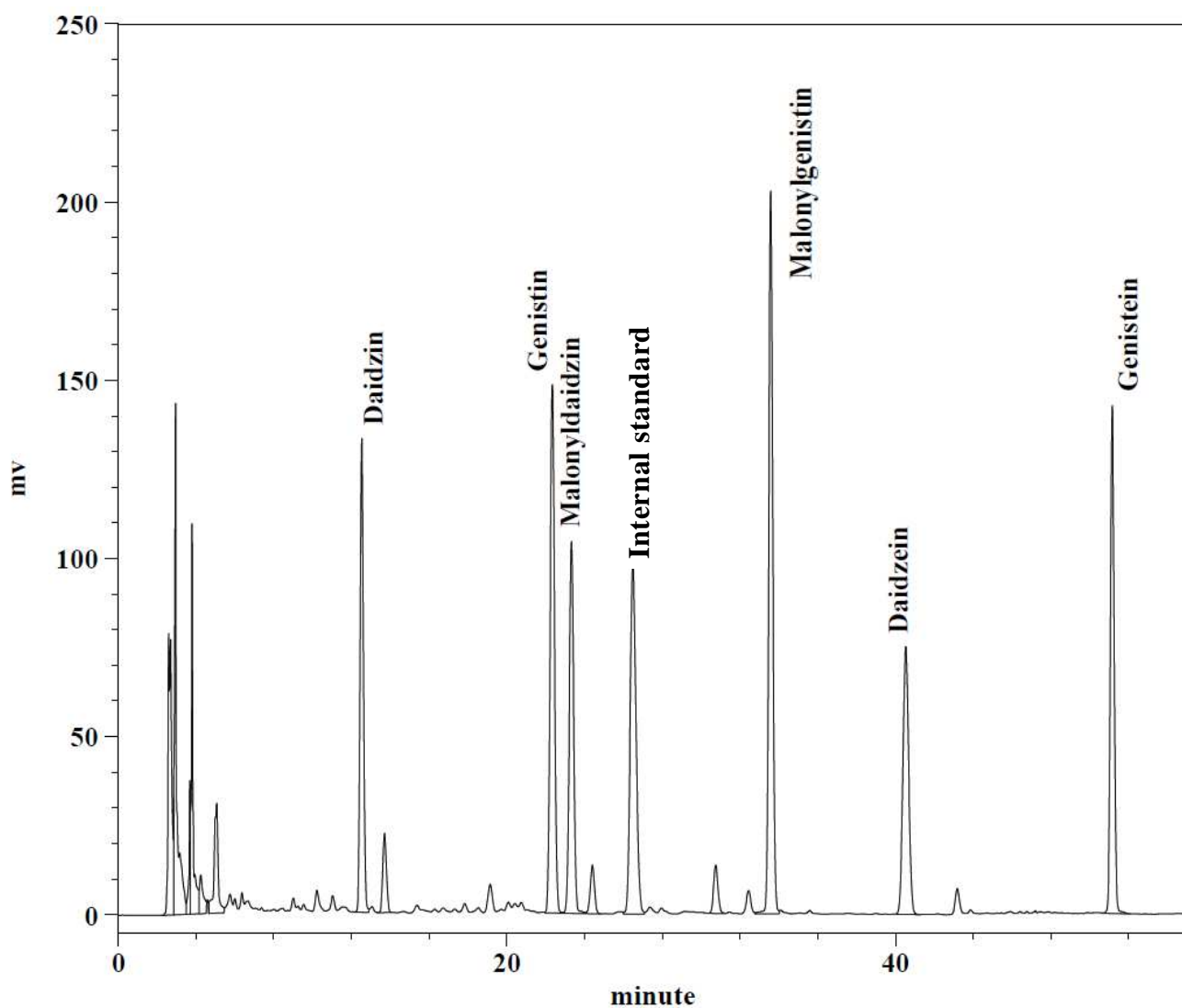


Fig 8. HPLC chromatogram of the 60% MeOH crude extract from defatted soybeans.

圖 8. 大豆脫脂後 60% 甲醇萃取物之 HPLC 分析圖譜

表 5. 大豆脫脂後 60% 甲醇萃取出之異黃酮含量

Table 5. Content of isoflavones in the 60% MeOH extract from defatted soybeans.

	Isoflavones content ($\mu\text{g/g}$ soybean)						Total
	Daidzin	Genistin	M-daidzin	M-genistin	Daidzein	Genistein	
Crude extract	481	534	1223	1111	93	147	3589

M-daidzin : Malonyldaidzin

M-genistin : Malonylgenistin

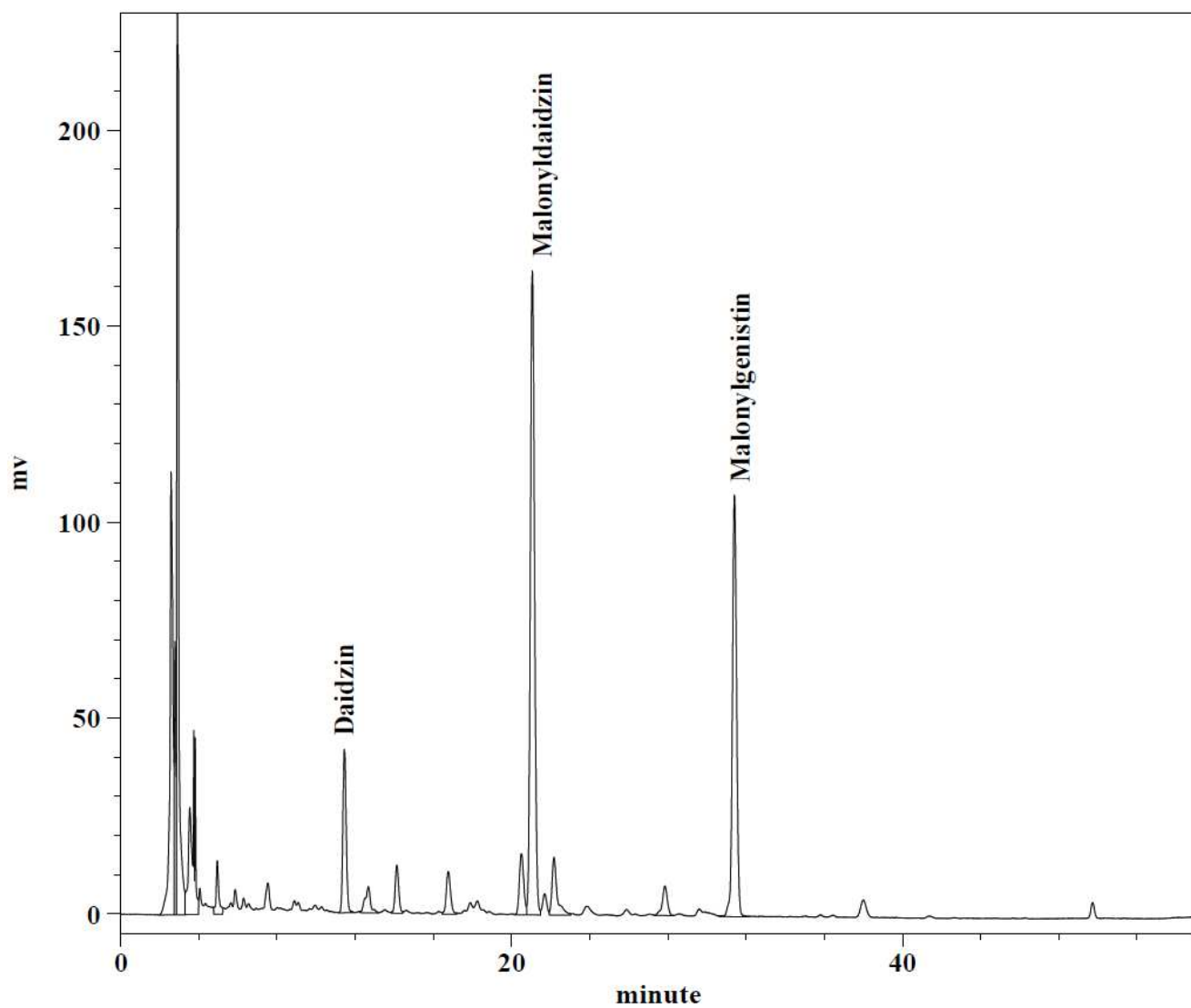


Fig 9. HPLC chromatogram of the 40% MeOH eluate from HP-20 column.

圖 9. 通過 HP-20 管柱之 40% 甲醇洗出液之 HPLC 分析圖譜

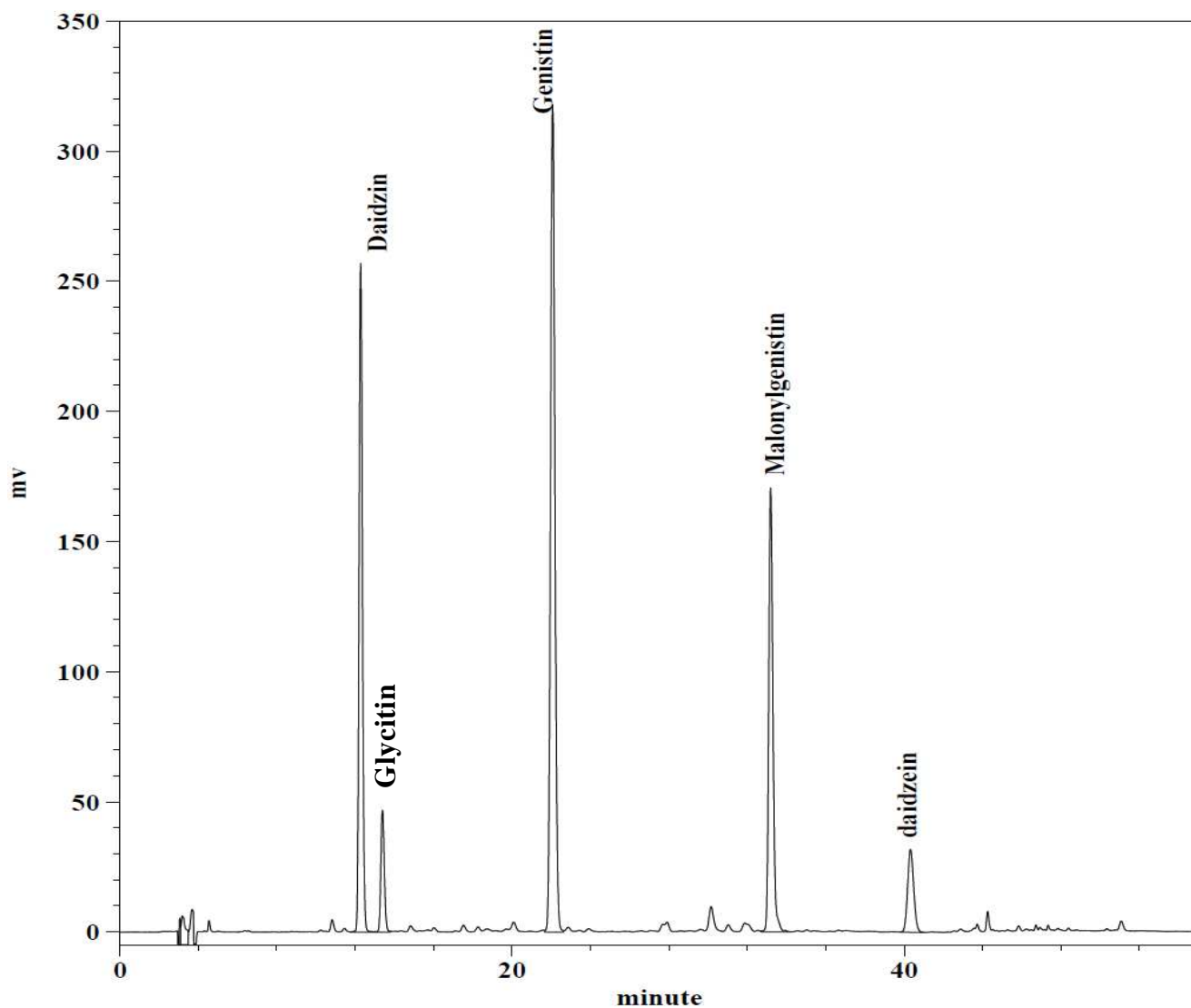


Fig 10. HPLC chromatogram of the 70% MeOH eluate from HP-20 column.

圖 10. 通過 HP-20 管柱之 70% 甲醇洗出液之 HPLC 分析圖譜

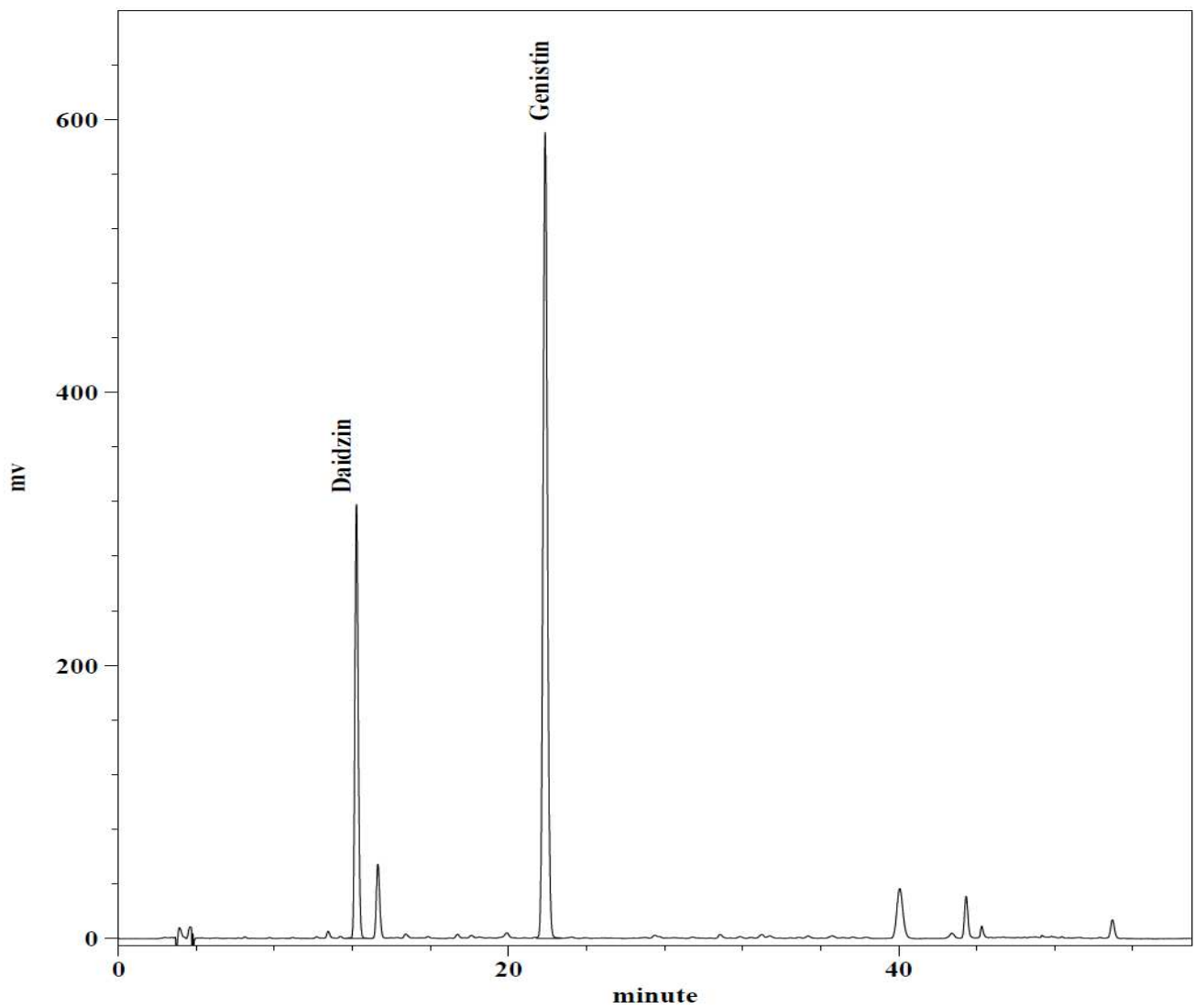


Fig 11. HPLC chromatogram of the 70% MeOH eluate from HP-20 column followed by heating 121°C, 30 min.

圖 11. 通過 HP-20 管柱之 70% 甲醇洗出液經 121°C 加熱 30 分鐘後之 HPLC 分析圖譜

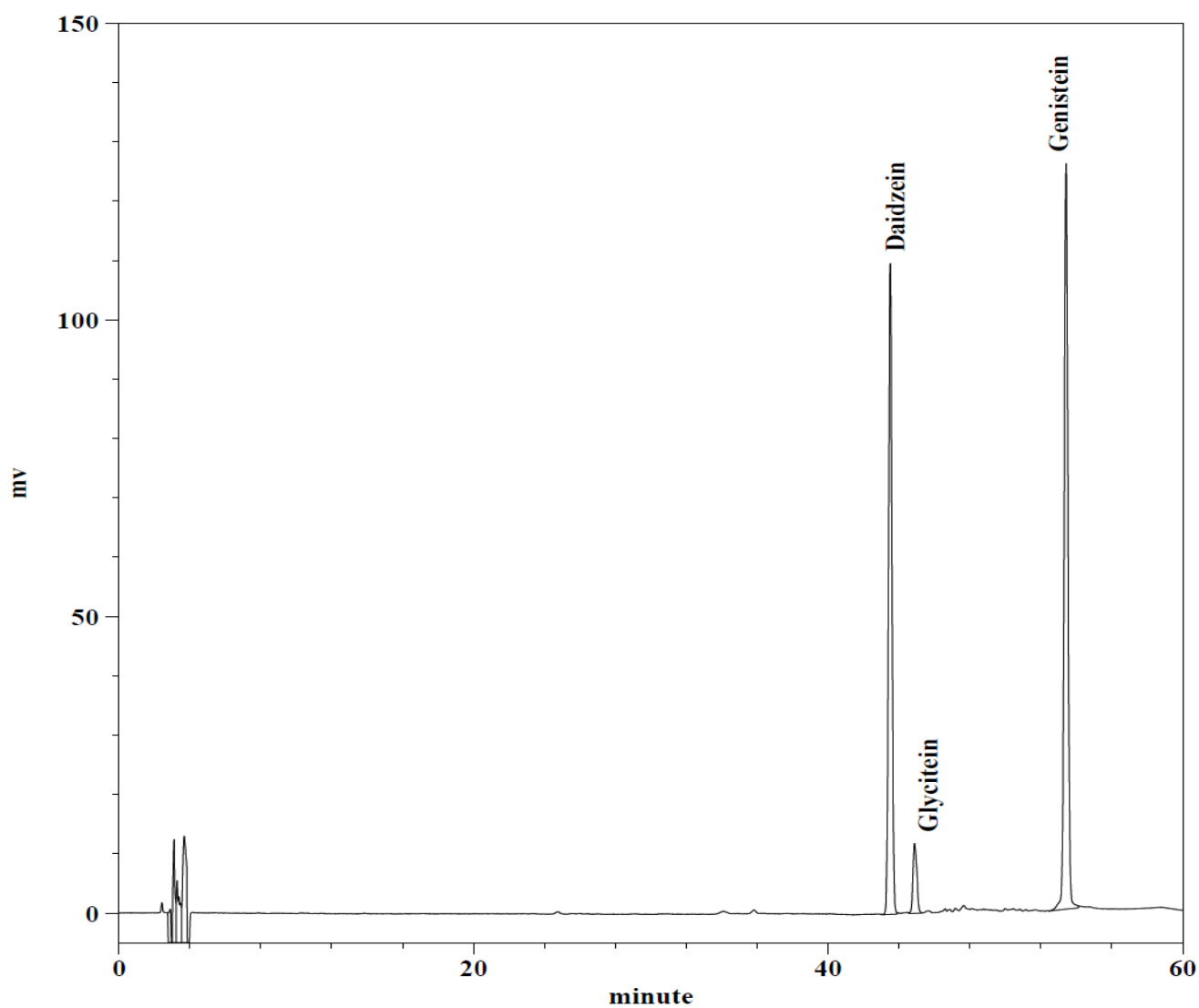


Fig 12. HPLC chromatogram of the 100% MeOH eluate from HP-20 column.

圖 12. 通過 HP-20 管柱之 100% 甲醇洗出液之 HPLC 分析圖譜



Fig 13. Products of isoflavone from soybean. (Left to right is isoflavone glucosides, isoflavone malonylglucosides, and isoflavone aglycones)

圖 13. 大豆異黃酮之產物 (由左而右依序為：isoflavone glucosides、isoflavone malonylglucosides、isoflavone aglycones)

第二節、微生物之生物轉化異黃酮

1. 最適菌株篩選

分析結果顯示，*B. subtilis* 的轉化能力可分為三大類，**第一類**：具有將 isoflavone glucosides 轉化成 isoflavone aglycones 之能力，並具有將 isoflavone aglycones 轉化成 NDAs 之能力。**第二類**：具有將 isoflavone glucosides 轉化成 isoflavone aglycone 之能力，但將 isoflavone aglycones 轉化成 NDAs 能力較差者。**第三類**：將 isoflavone glucosides 轉化成 isoflavone aglycones 之能力較差，且無法轉化成 NDAs 者。

表 6 為各菌株轉化 isoflavone glucosides 之能力，除了 *B. subtilis* FC-15-2a 不具有將異黃酮轉化成 NDAs 之能力，其餘 23 株菌株皆可將 isoflavone glucosides 轉化成 isoflavone aglycones，再將 isoflavone aglycones 轉化成 NDAs，其中以 *B. subtilis* FC-10 的轉化能力最佳，所以選用此菌株做為後續實驗菌株。

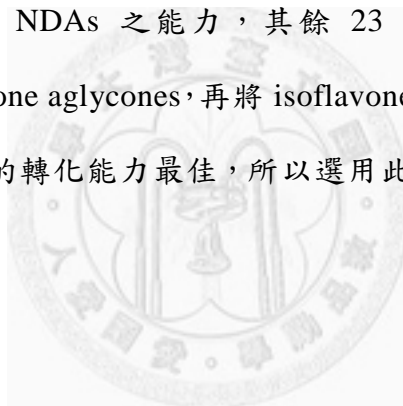


表 6. *Bacillus subtilis* 菌株轉化 isoflavone glucosides 之能力

Table 6. The ability of *B. subtilis* strain for transforming isoflavone glucosides.

轉化產物之能力	菌株編號							
	FC-0	FC-1	FC-2	FC-3	FC-4	FC-5	FC-6	FC-7
Aglycones	+	+++++	++	+++++	+	+	++++	+++++
NDA	+	++++	++	++++	+	+	++	++

轉化產物之能力	菌株編號							
	FC-9-1a	FC-9-1b	FC-9-2	FC-10	FC-11-1	FC-11-2	FC-12-1	FC-12-2
Aglycones	+++++	+++++	+	+++++	+++++	++++	+++++	+++++
NDA	+++	++	+	+++++	++++	++++	++++	+++

轉化產物之能力	菌株編號							
	FC-13	FC-13-1	FC-14-1	FC-15-2a	FC-15-2b	FC-16-1	FC-16-2	FC-17-1
Aglycones	+++++	+++++	+++++	+	+	++++	+++++	+++++
NDAAs	++	++++	++++	-	+	+	+++	++++

*+號愈多，表示轉化能力愈強。



2. 大豆異黃酮之生物轉化

2.1 *B. subtilis* FC-10 對 aglycone isoflavones 之生物轉化

isoflavone aglycones 經由 *B. subtilis* FC-10 作用 4 h，isoflavone aglycones 之含量下降，且有 NDA1 與 NDA2 產生，在此顯示 isoflavone aglycones 為 NDAs 的前驅物。



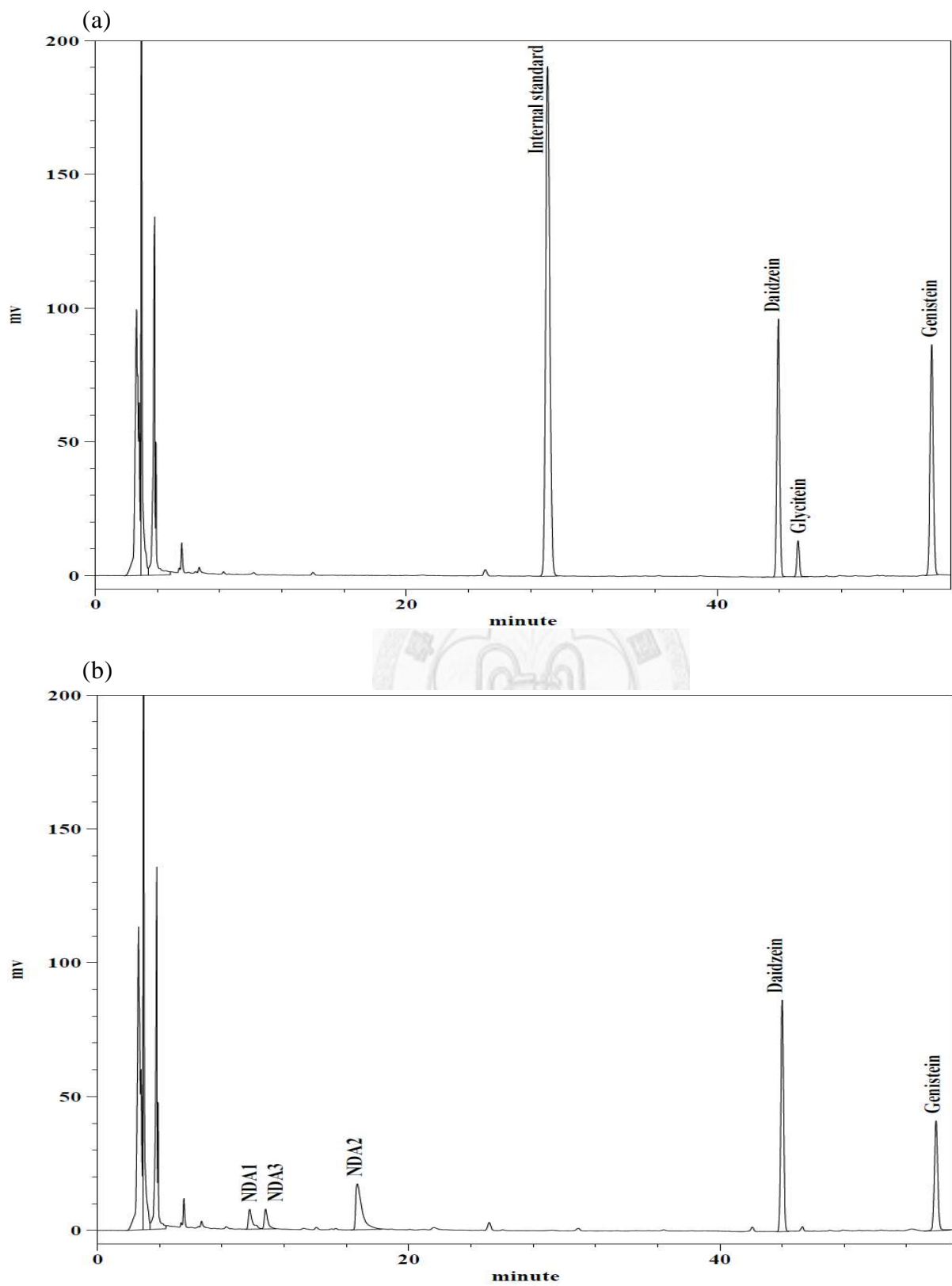


Fig 14. HPLC chromatogram of isoflavone aglycones transformed by *B. subtilis*

FC-10, (a) 0 h ; (b) 4 h

圖 14. Aglycones 經由 *B. subtilis* FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (a) 0 h ; (b) 4 h

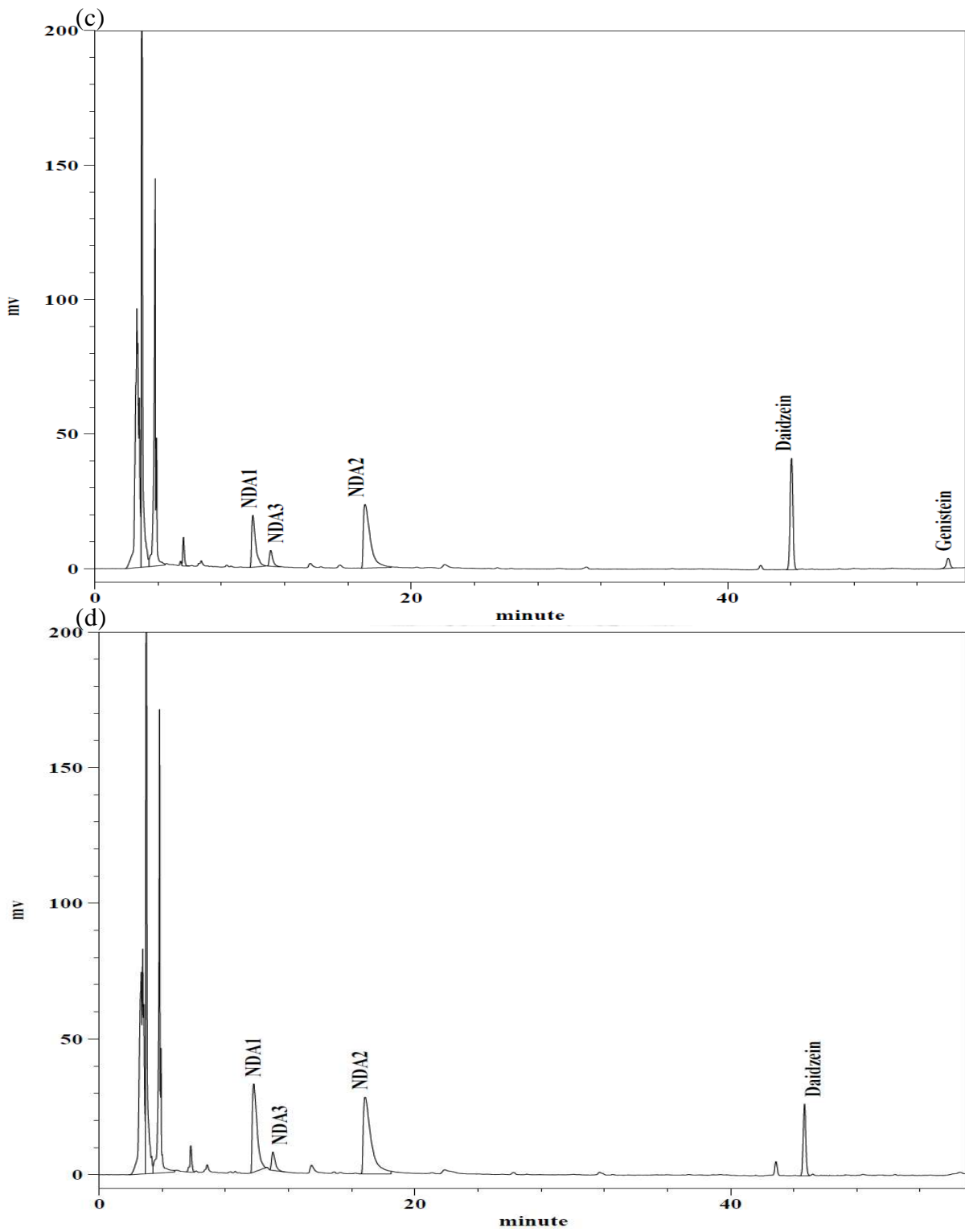


Fig 15. HPLC chromatogram of isoflavone aglycones transformed by *B. subtilis* FC-10, (c) 8 h ; (d) 12 h

圖 15. Aglycones 經由 *B. subtilis* FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (c) 8 h ; (d) 12 h

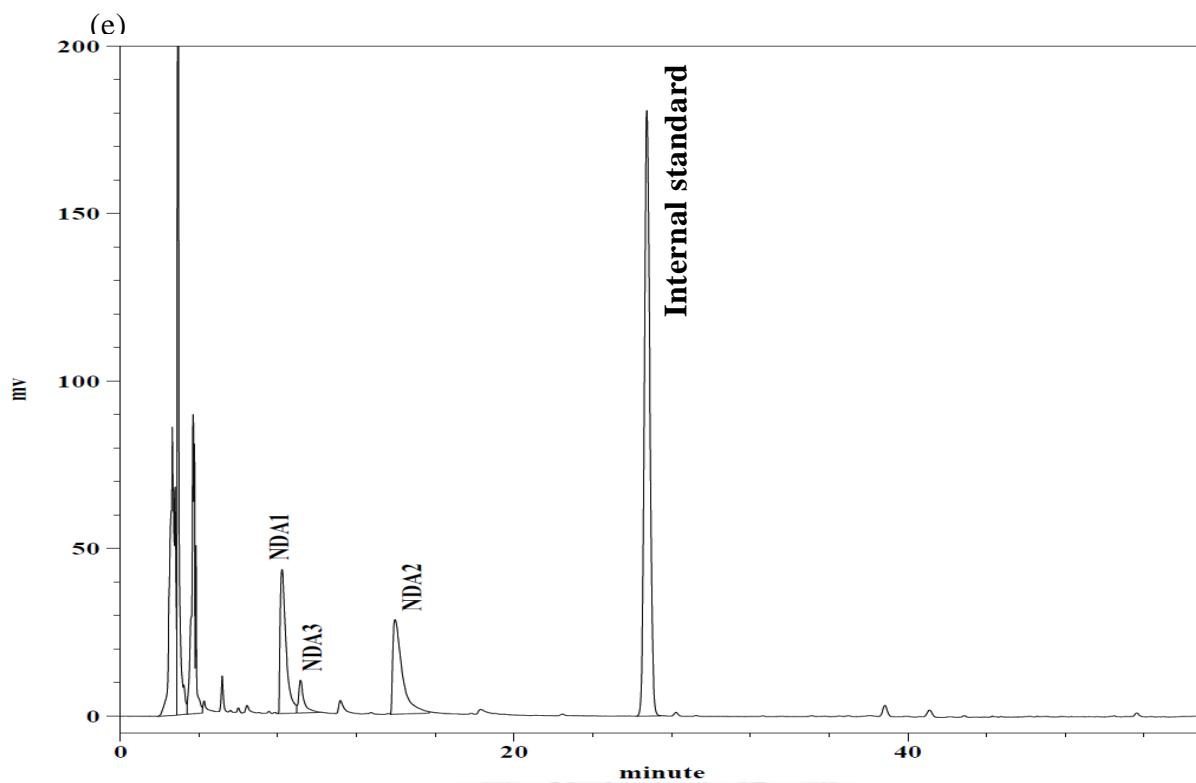


Fig 16. HPLC chromatogram of isoflavone aglycones transformed by *B. subtilis*

FC-10, (e) 24 h

圖 16. Aglycones 經由 *B. subtilis* FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (e) 24 h

2.2 *B. subtilis* FC-10 對 glucosidic isoflavones 之生物轉化

Glucosidic isoflavones 經由 *B. subtilis* FC-10 作用後，glucosides 形式之異黃酮會隨時間轉化成 aglycones 形式之異黃酮 (daidzin 轉化為 daidzein, genistin 轉化為 genistein)，再轉化為 NDAs (daidzein 轉化為 NDA1, genistein 轉化為 NDA2)，圖 17~圖 19 為 glucosidic isoflavones 經由 *B. subtilis* FC-10 作用 0~24 h 之 HPLC 分析圖譜。

在菌液中加入 glucosides 之異黃酮 4 h 後，daidzin 與 genistin 的含量大幅度地減少，而 daidzein 與 genistein 的含量大大增加，顯示 *B. subtilis* FC-10 能產生將 glucosides 之異黃酮轉化成 aglycones 的酵素，(Setlow et al, 2004)指出 *B. subtilis* 具有 β -glucosidase 活性，可將 glucosides 之異黃酮水解成 aglycones 之形式。

經 *B. subtilis* FC-10 作用 4~24 h 之間，aglycones 逐漸減少，在 8~24 h 之間，NDA1 及 NDA2 的產量逐漸增加。

在本實驗進行到 12 h 已偵測不出 genistin，但在 24 h 仍有少許的 daidzin 未被轉化，顯示 genistin 轉化成 genistein 的速率較 daidzin 轉化成 daidzein 快。

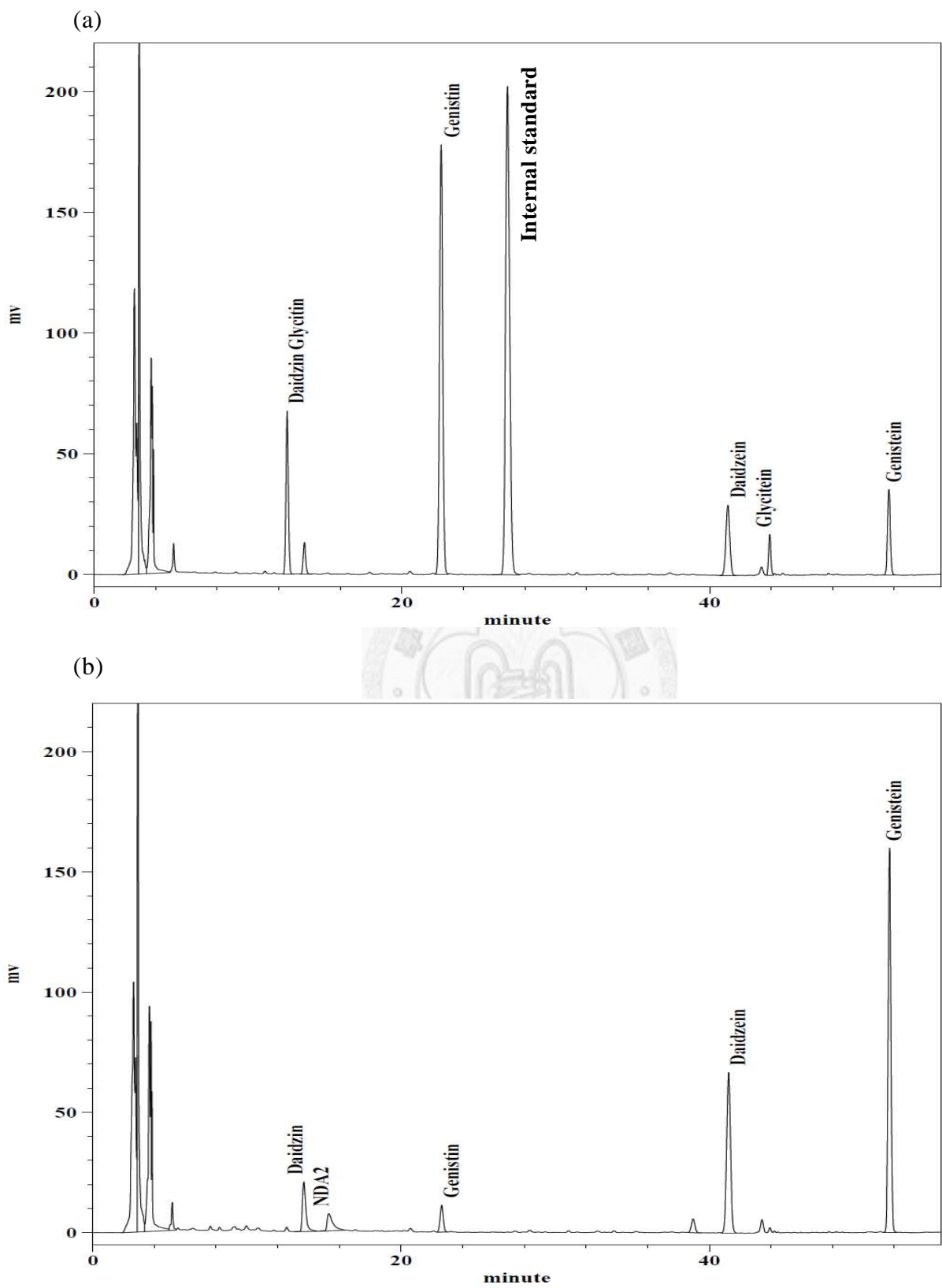


Fig 17. HPLC chromatogram of isoflavone glucosides transformed by *B. subtilis*

FC-10, (a) 0 h ; (b) 4h

圖 17. Glucosides 經由 *B. subtilis* FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (a) 0 h ; (b) 4h

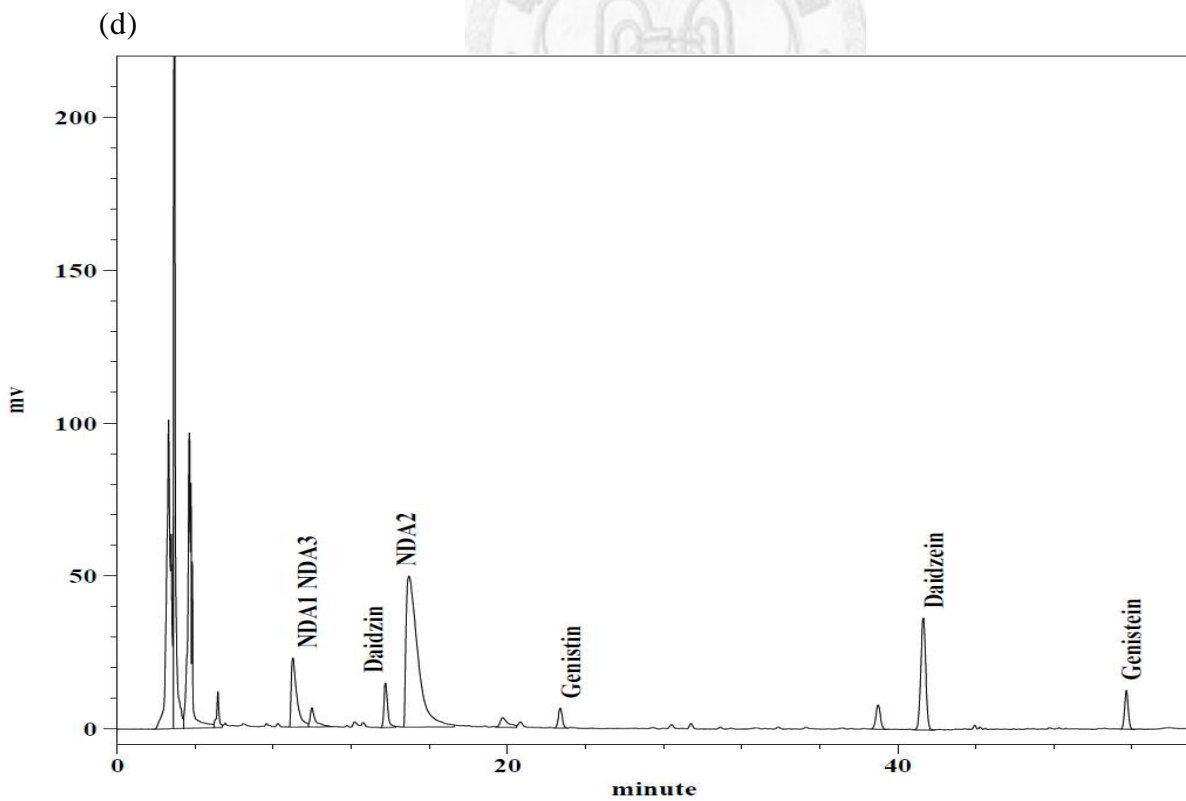
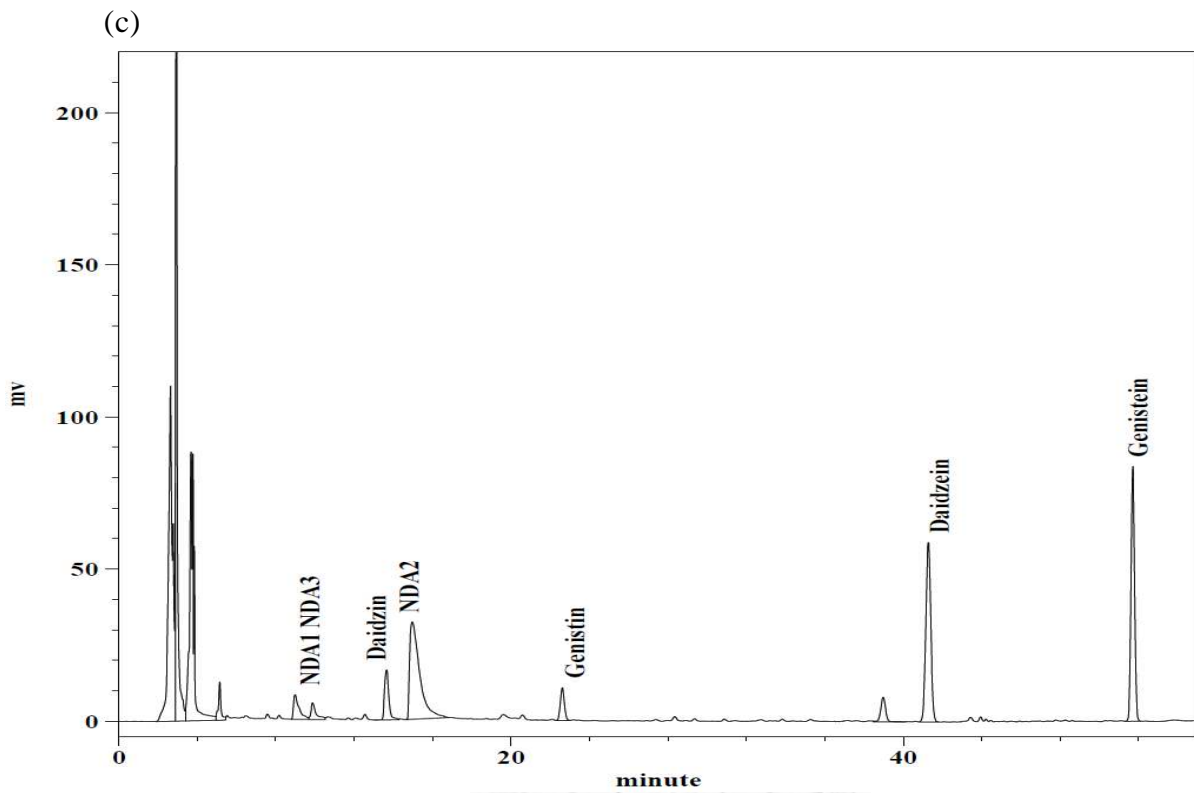


Fig 18. HPLC chromatogram of isoflavone glucosides transformed by *B. subtilis* FC-10, (c) 8 h ; (d) 12h

圖 18. Glucosides 經由 *B. subtilis* FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (c) 8 h ; (d) 12h

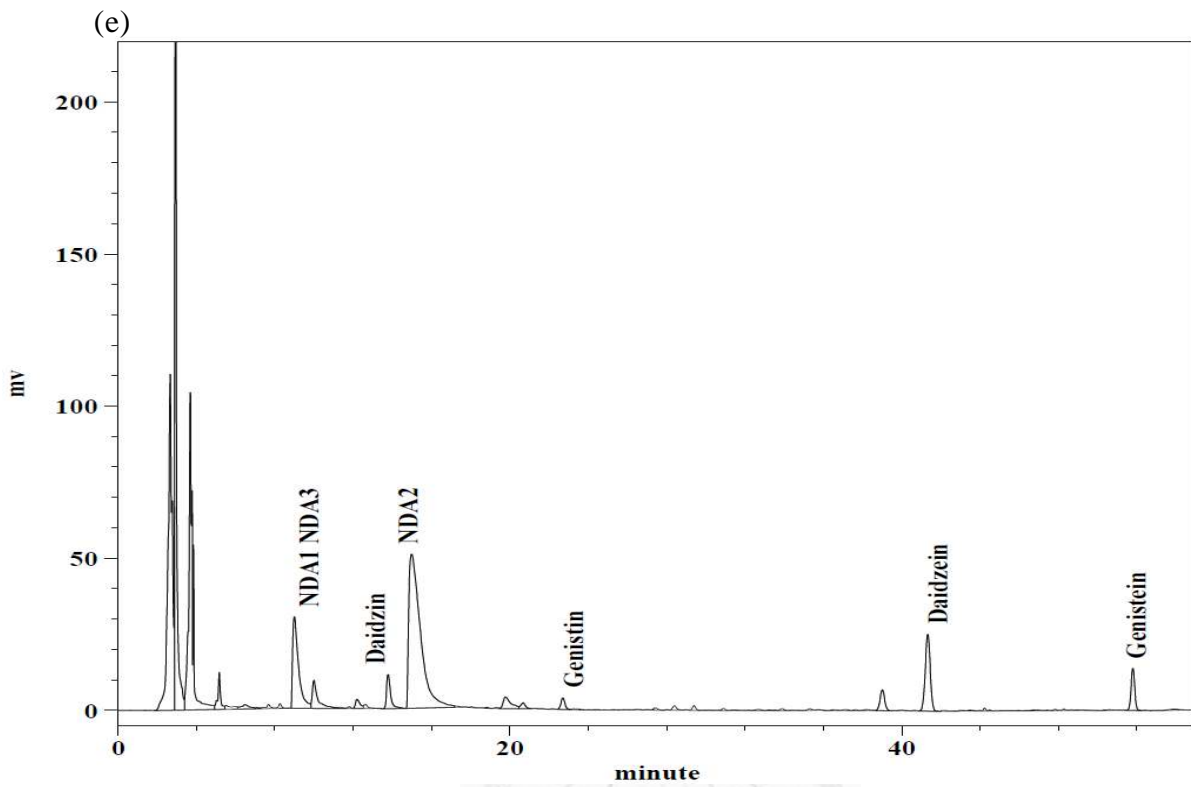


Fig 19. HPLC chromatogram of isoflavone glucosides transformed by *B. subtilis* FC-10, (e) 24 h

圖 19. Glucosides 經由 *B. subtilis* FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (e) 24 h

2.3 *B. subtilis* FC-10 對 isoflavone malonylglucosides 之生物轉化

Isoflavone malonylglucosides 在培養液內的起始濃度為 malonyldaidzin 125 $\mu\text{g/mL}$ ，malonylgenistin 63 $\mu\text{g/mL}$ ，在此 isoflavone malonylglucosides 含有少量的 daidzin 16 $\mu\text{g/mL}$ ，圖 20~圖 24 為 isoflavone malonylglucosides 經由 *B. subtilis* FC-10 作用之 HPLC 層析圖譜，經由 *B. subtilis* FC-10 作用 8 小時後，daidzin 全部被轉化成 daidzein，isoflavone malonylglucosides 在 0~144 小時慢慢轉化為 aglycones，卻沒有 NDAs 的產生，可能是 malonylglucosides 在轉化為 aglycones 時，產生抑制生成 NDAs 之物質。



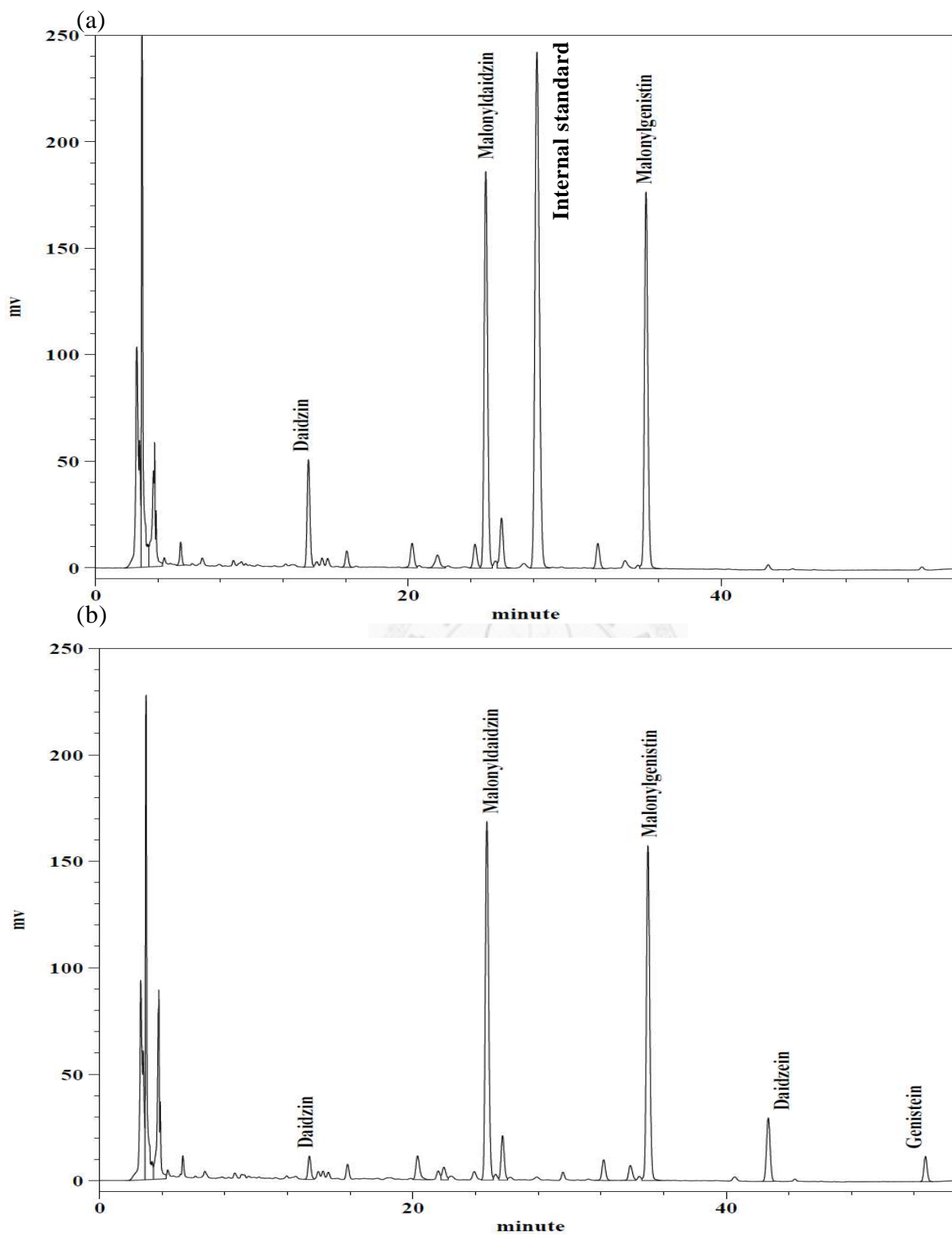


Fig 20. HPLC chromatogram of isoflavone malonylglucosides transformed by *B. subtilis* FC-10, (a) 0 h ; (b) 4 h

圖 20. Malonylglucosides 經由 *B. subtilis* FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (a) 0 h ; (b) 4 h

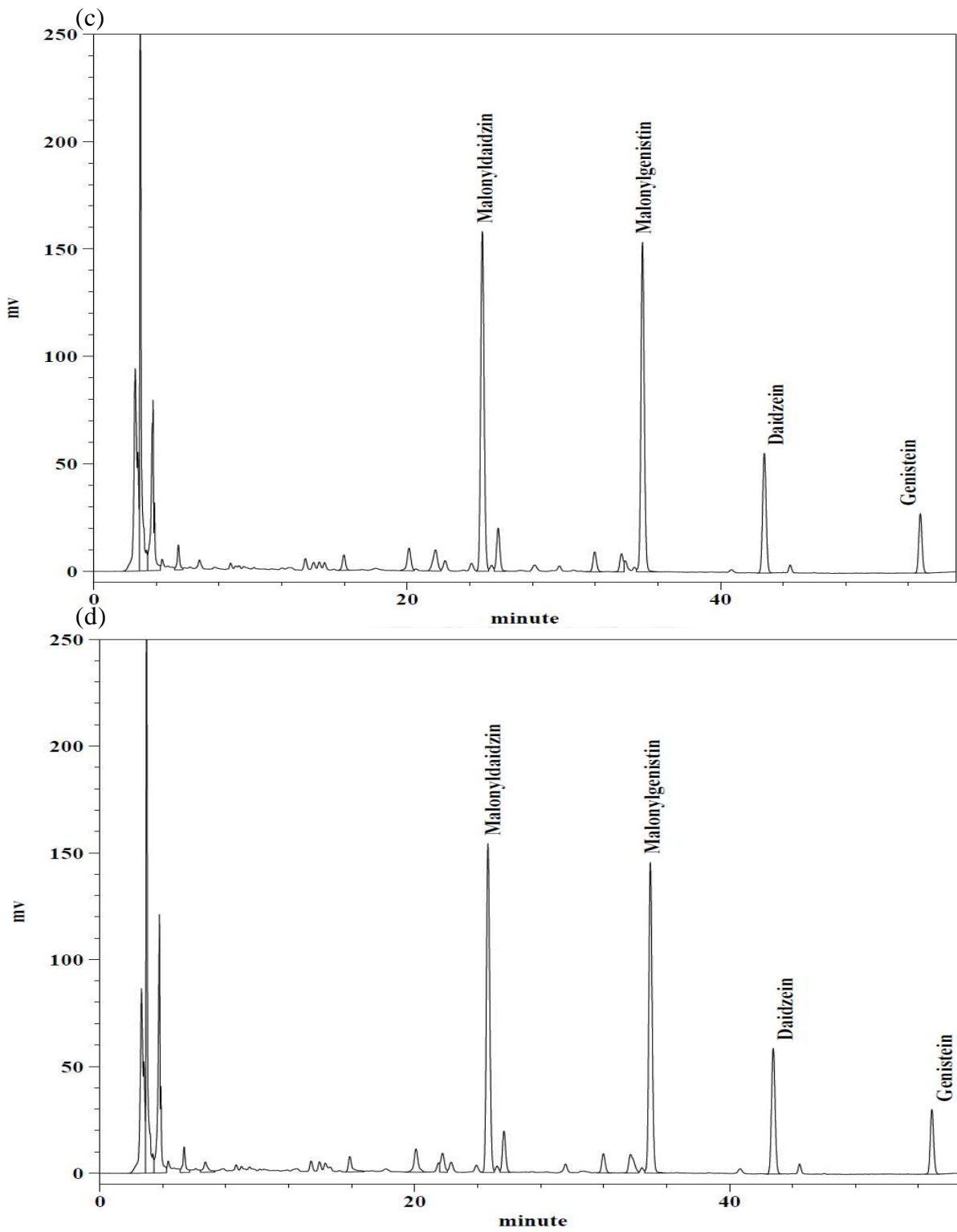


Fig 21. HPLC chromatogram of isoflavone malonylglucosides transformed by *B. subtilis* FC-10, (c) 8 h ; (d) 12 h

圖 21. Malonylglucosides 經由 *B. subtilis* FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (a) 8 h ; (b) 12 h

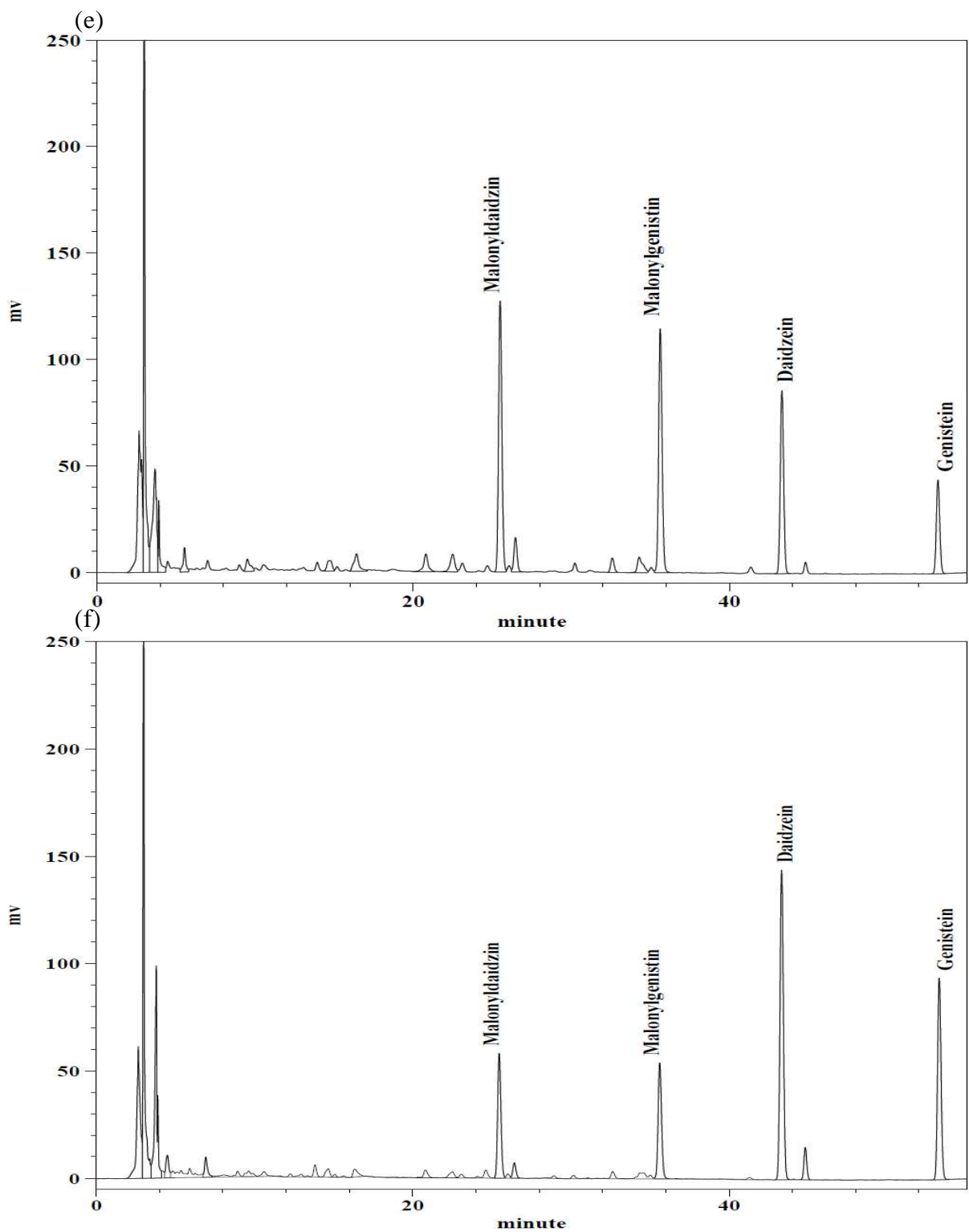


Fig 22. HPLC chromatogram of isoflavone malonylglucosides transformed by *B. subtilis* FC-10, (e) 24 h ; (f) 48 h

圖 22. Malonylglucosides 經由 *B. subtilis* FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (e) 24 h ; (f) 48 h

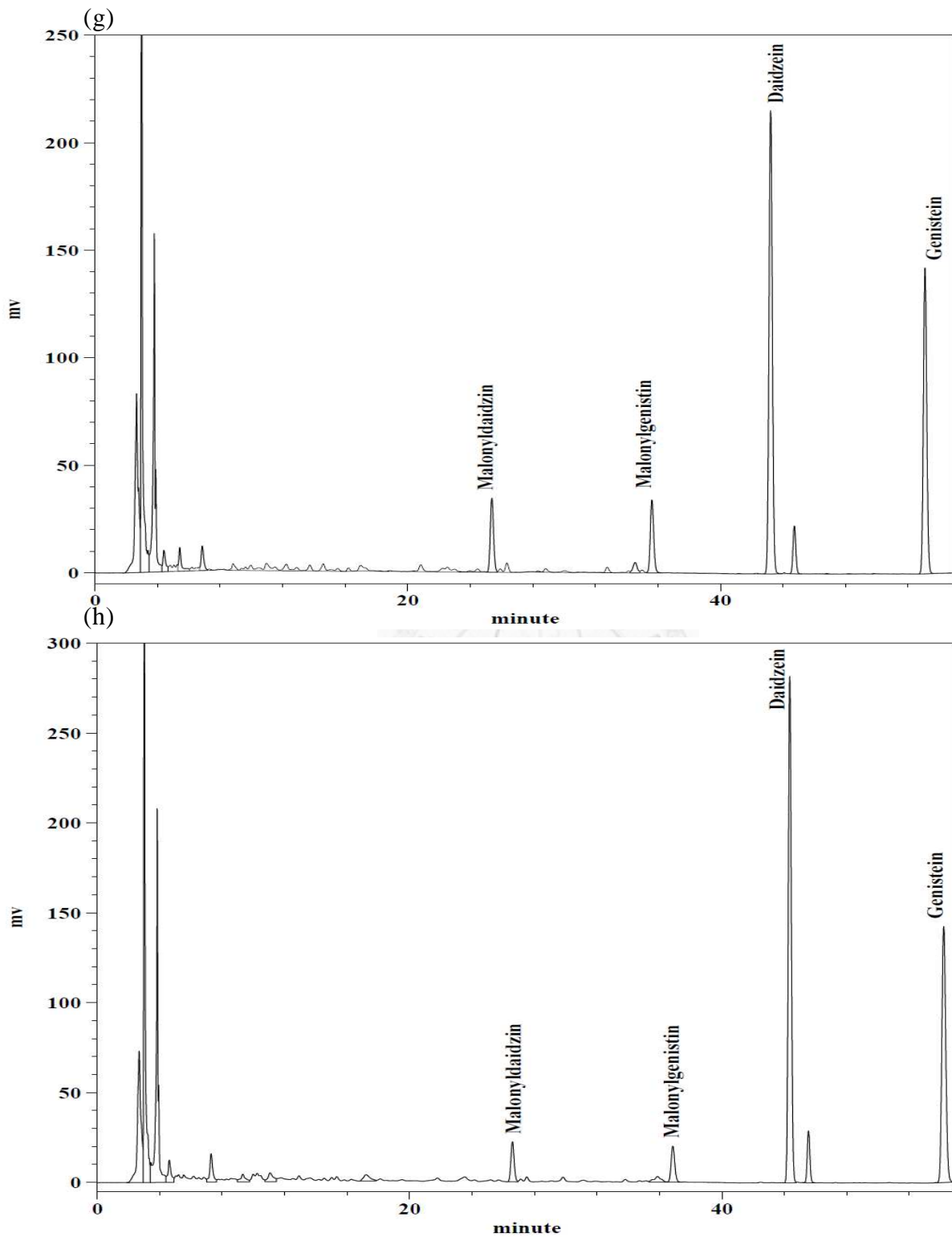


Fig 23. HPLC chromatogram of isoflavone malonylglucosides transformed by *B. subtilis* FC-10, (g) 72 h ; (h) 96 h

圖 23. Malonylglucosides 經由 *B. subtilis* FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (g) 72 h ; (h) 96 h

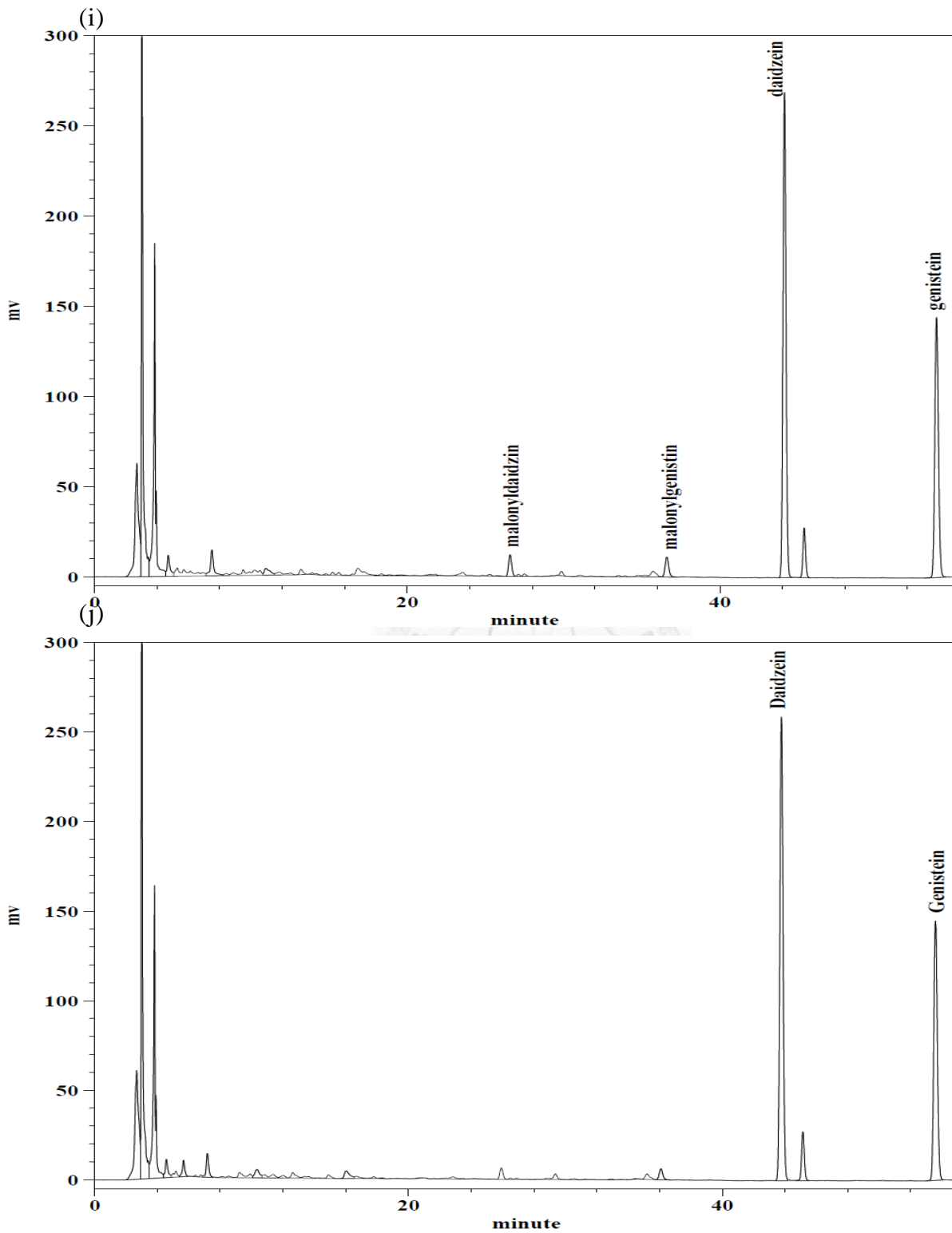


Fig 24. HPLC chromatogram of isoflavone malonylglucosides transformed by *B. subtilis* FC-10, (i) 120 h ; (j) 144 h

圖 24. Malonylglucosides 經由 *B. subtilis* FC-10 轉化之 HPLC 分析圖譜 (i) 120 h ; (j) 144 h

3. NDA1 與 NDA2 之分離與純化

將發酵液通過 HP-20 疏水性管柱，收集流出液，此流出液含有 NDA1 與 NDA2(如圖 25 所示)；而 HP-20 樹脂可將未轉化之異黃酮吸附，圖 26 為 100% 甲醇流洗通過發酵液的 HP-20 管柱之洗出液 HPLC 層析圖譜，可發現被 HP-20 所吸附的物質是未被 *B. subtilis* FC-10 轉化的 aglycones。

將收集到的流出液凍乾，將凍乾樣品以 1:10 (W/V) 加水回溶，以 6 N HCl 調整至 pH 1，使 NDAs 為不解離狀態，再以乙酸乙酯萃取 NDAs，發現 NDAs 分佈於乙酸乙酯層。將乙酸乙酯層抽乾以乙醇回溶，以 NaOH 調整至 pH5.5，此時有 NDAs 沉澱生成，收集沉澱物，去除溶劑，以水回溶沉澱物，以 6 N HCl 調整至 pH 1，以半製備級 HPLC 回收 NDA1 與 NDA2，圖 27 為以半製備級 HPLC 分析 NDAs 之圖譜。將圖譜上的 NDA1 與 NDA2 之波峰分別收集，經減壓濃縮，將濃縮液以 HPLC 幫浦通過 LH-20 管柱，可將雜質與 NDA1、NDA2 分開，收得 NDA1 與 NDA2，圖 28 為 NDA1 與 NDA2 過 LH-20 後之 HPLC 分析圖譜。

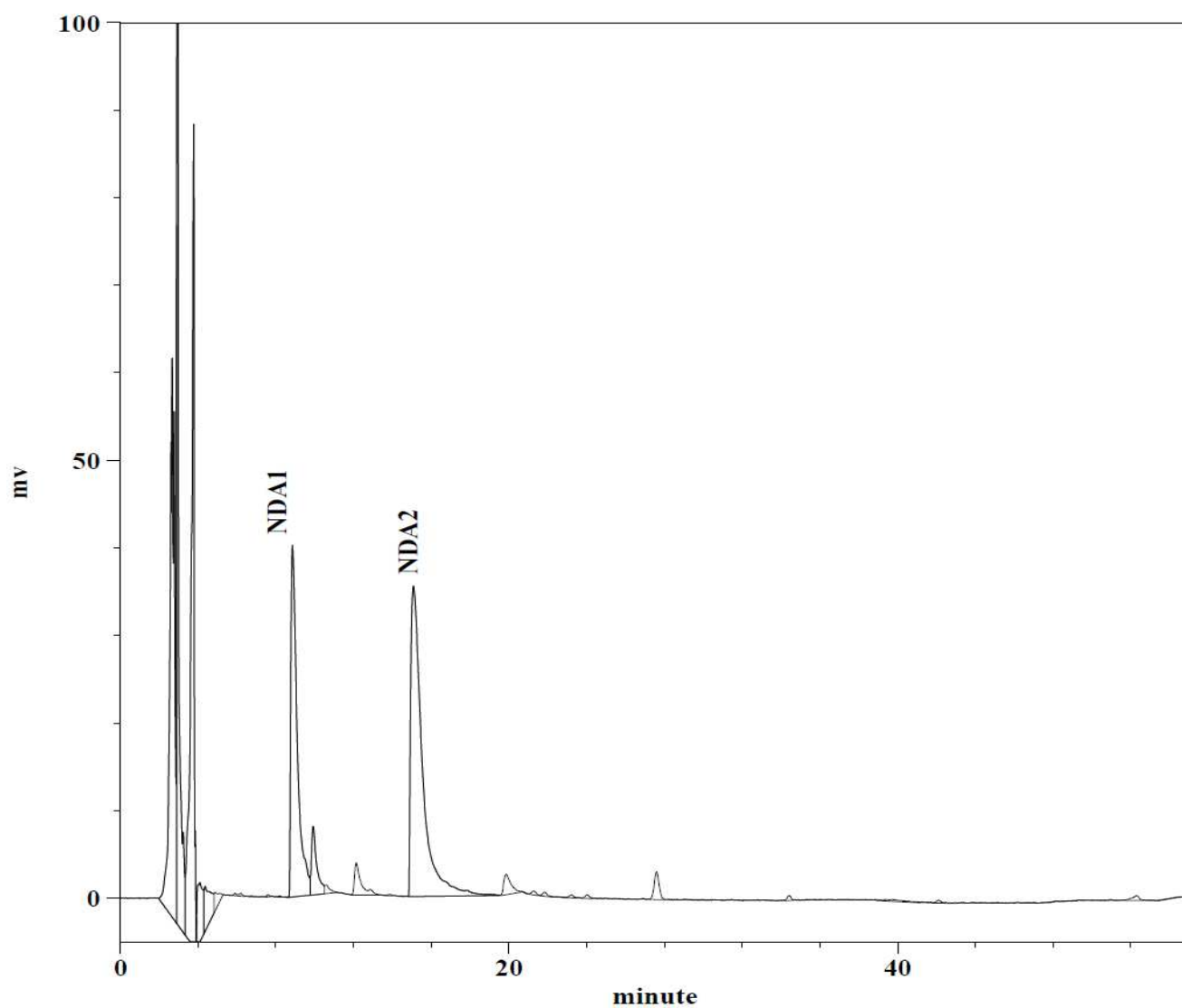


Fig 25. The fraction of fermentation broth through the HP-20.

圖 25. 發酵液通過 HP-20 之濾液之 HPLC 分析圖譜

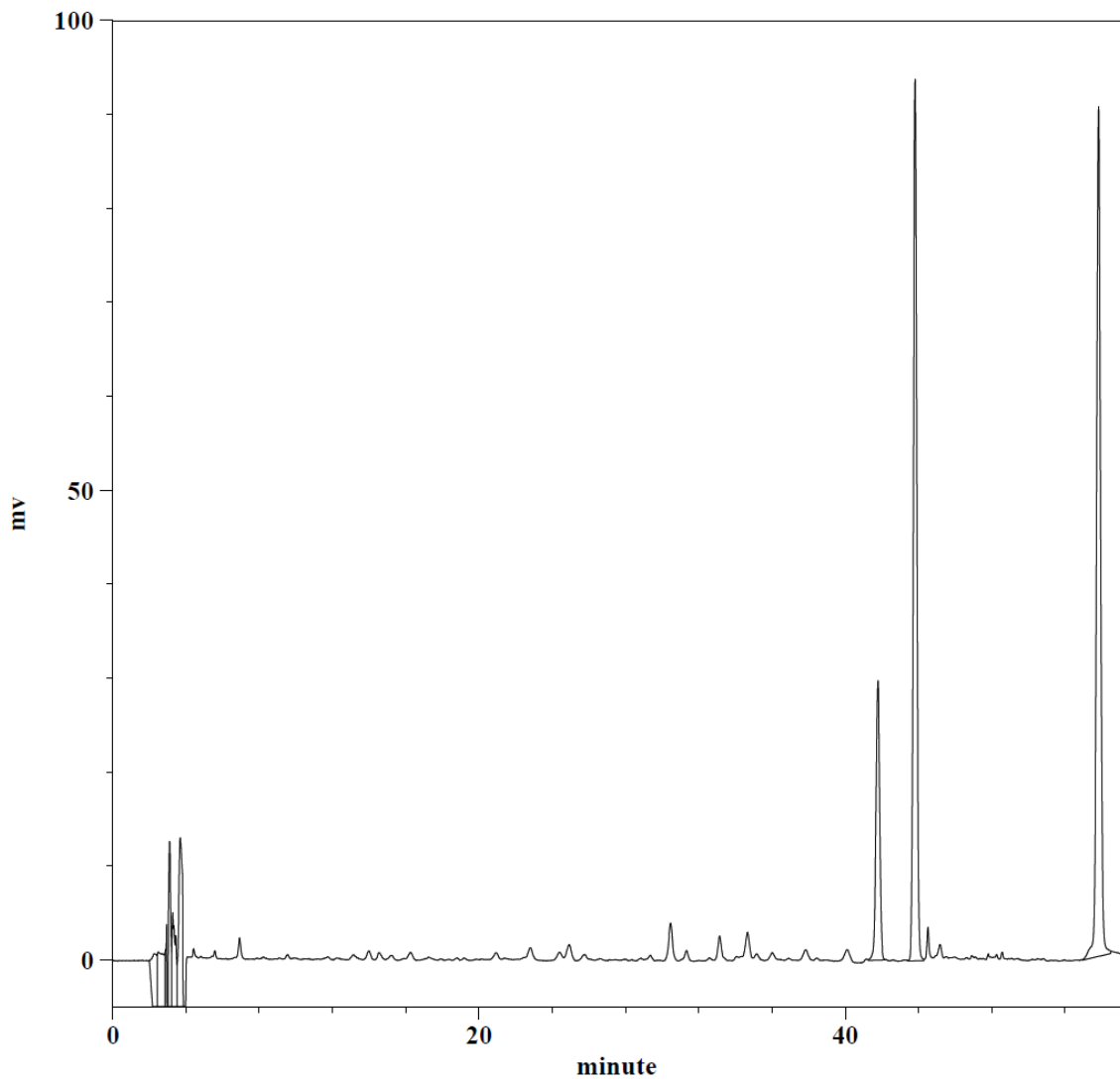


Fig 26. The fraction of 100% MeOH eluate from fermentation broth through the HP-20 column.

圖 26. 以 100% 甲醇流洗發酵液通過 HP-20 管柱之洗出液之 HPLC 分析圖譜

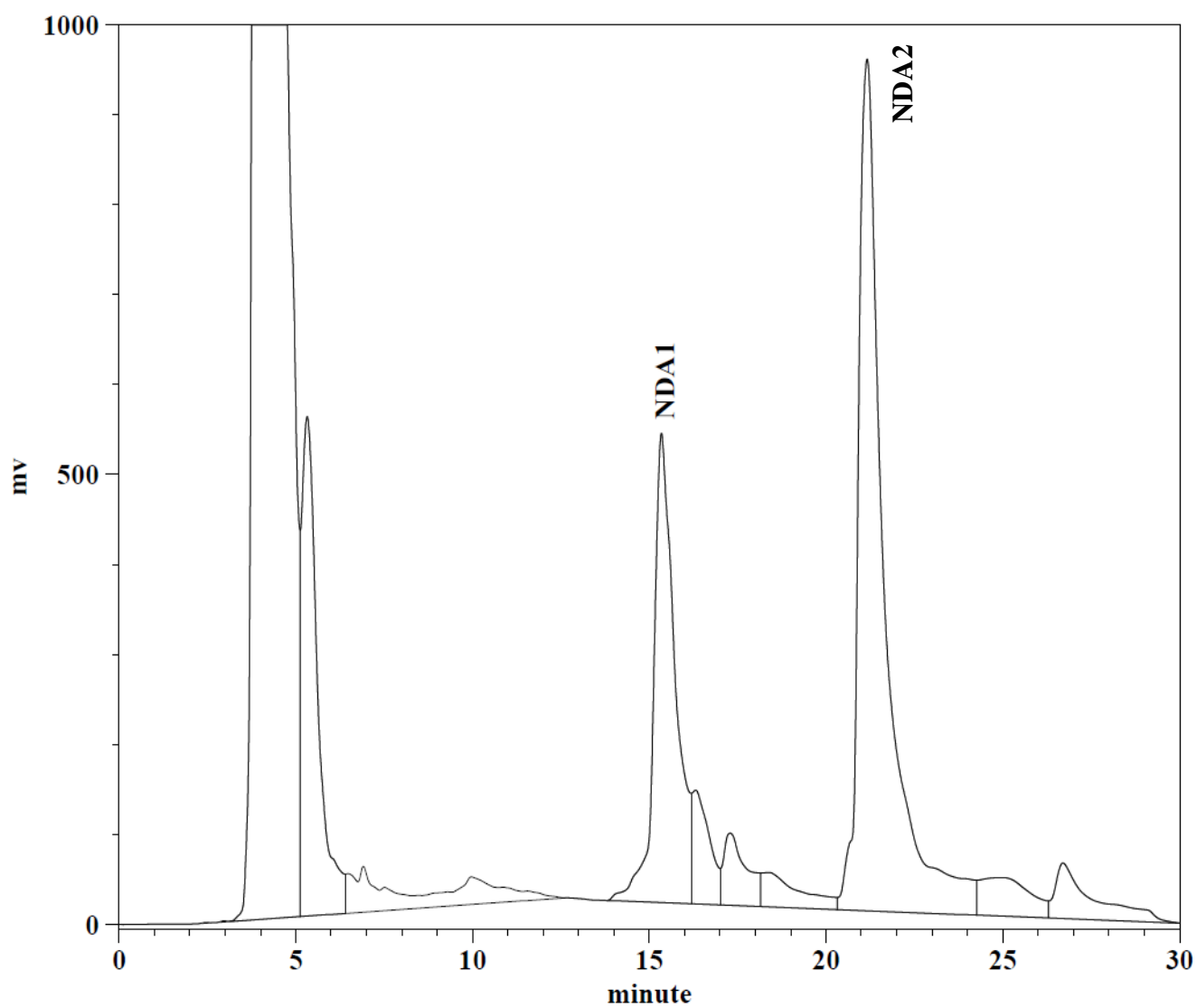


Fig 27. HPLC chromatogram of NDAs from preparation HPLC system.

圖 27. 以半製備級 HPLC 分析 NDAs 之圖譜

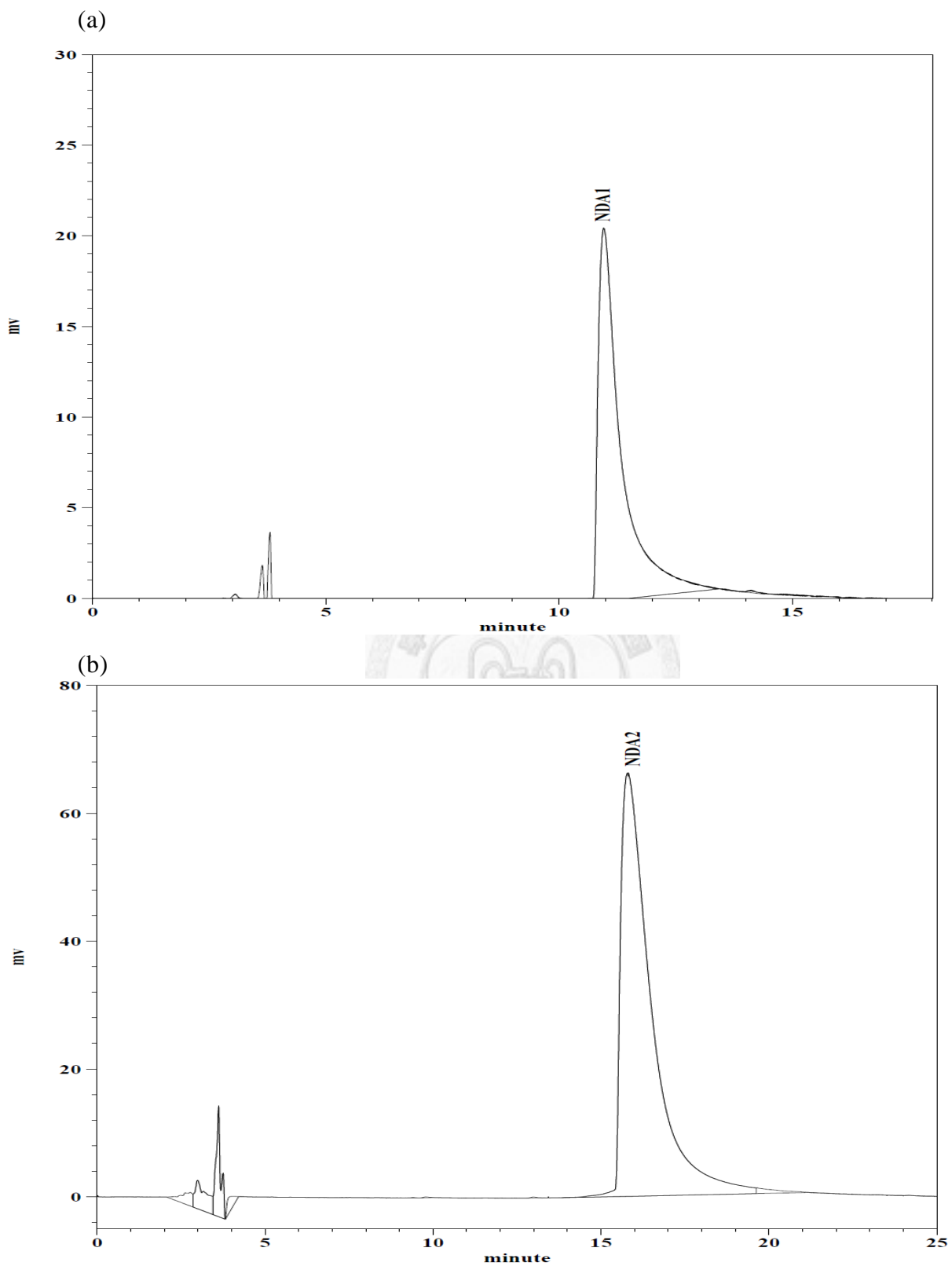


Fig 28. HPLC chromatogram of NDAs through LH-20 column, (a) NDA1 ; (b)

NDA2

圖 28. NDAs 通過 LH-20 管柱後之 HPLC 分析圖譜 (a) NDA1 ; (b) NDA2

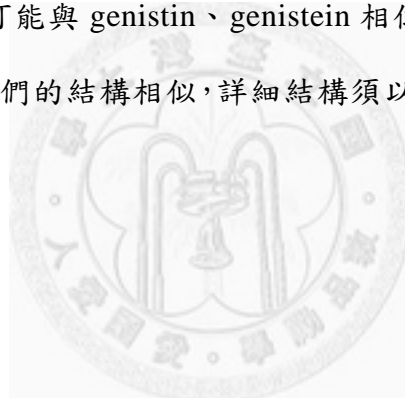
4. NDA1 與 NDA2 之結構鑑定

4.1 UV 吸收光譜

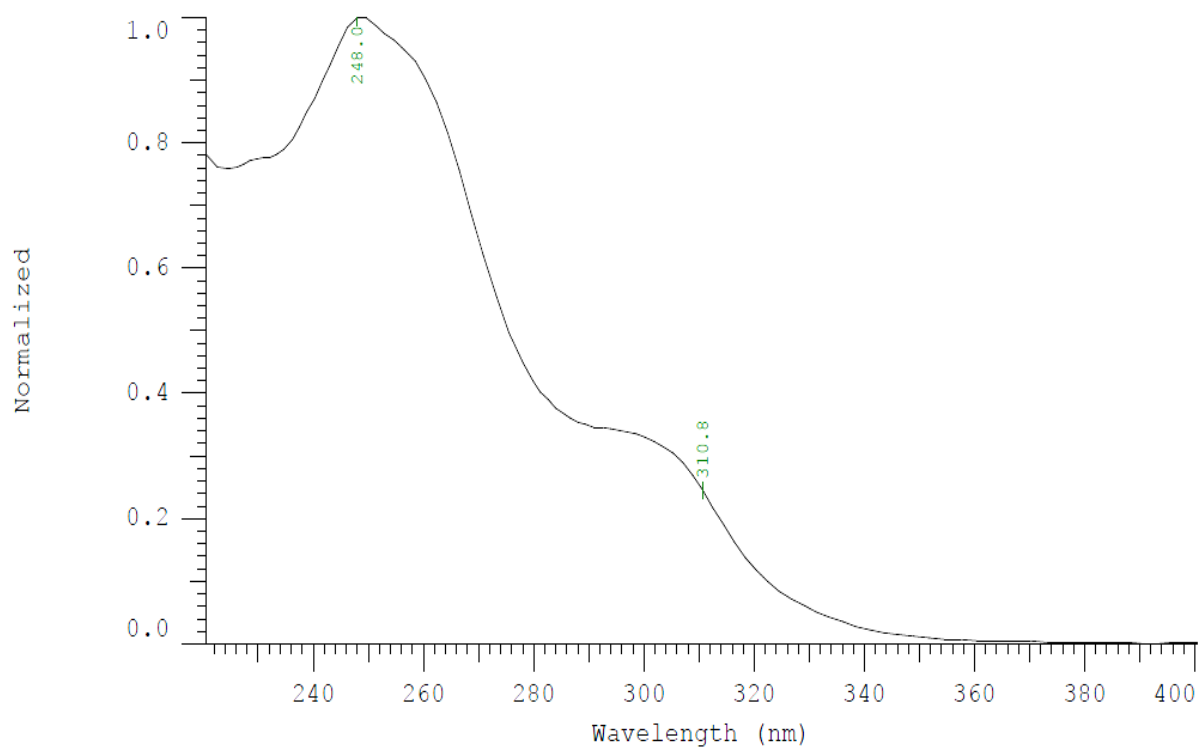
圖 29~圖 30 為 daidzin、daidzein 與 NDA1 之 UV 吸收光譜，daidzin 在 248.0 nm 與 310.8 nm 有吸收波峰，daidzein 在 248.0 nm 與 300.3 nm 有吸收波峰，NDA1 在 249.0 nm 與 310.3 nm 有吸收波峰，以上三者的吸收波長非常相近，且波形相似，說明 NDA1 的結構可能與 daidzin、daidzein 相似。

圖 31~圖 32 為 genistin、genistein 與 NDA2 之 UV 吸收光譜，genistin 在 258.6 nm 與 310.8 nm 有吸收波峰，genistein 在 258.6 nm 與 310.8 nm 有吸收波峰，NDA2 在 257.9 nm 與 310.3 nm 有吸收波峰，以上三者的吸收波長非常相近，波形相似，說明 NDA2 的結構可能與 genistin、genistein 相似。

UV 吸收只能判定它們的結構相似，詳細結構須以 LC-MS 以及 NMR 鑑定。



(a)



(b)

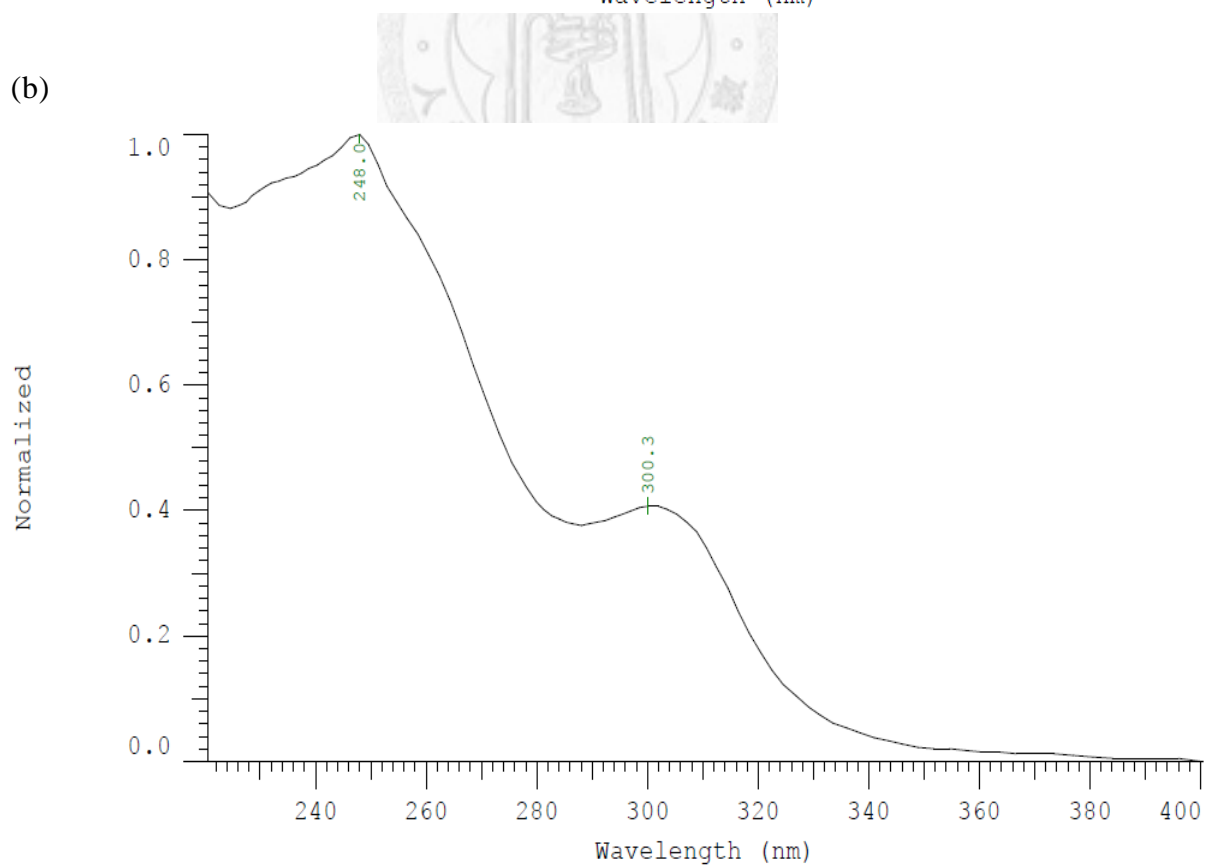


Fig 29. UV absorbance spectra of Isoflavone, (a) daidzin ; (b) daidzein

圖 29. 大豆異黃酮之 UV 吸收光譜 (a) daidzin ; (b) daidzein

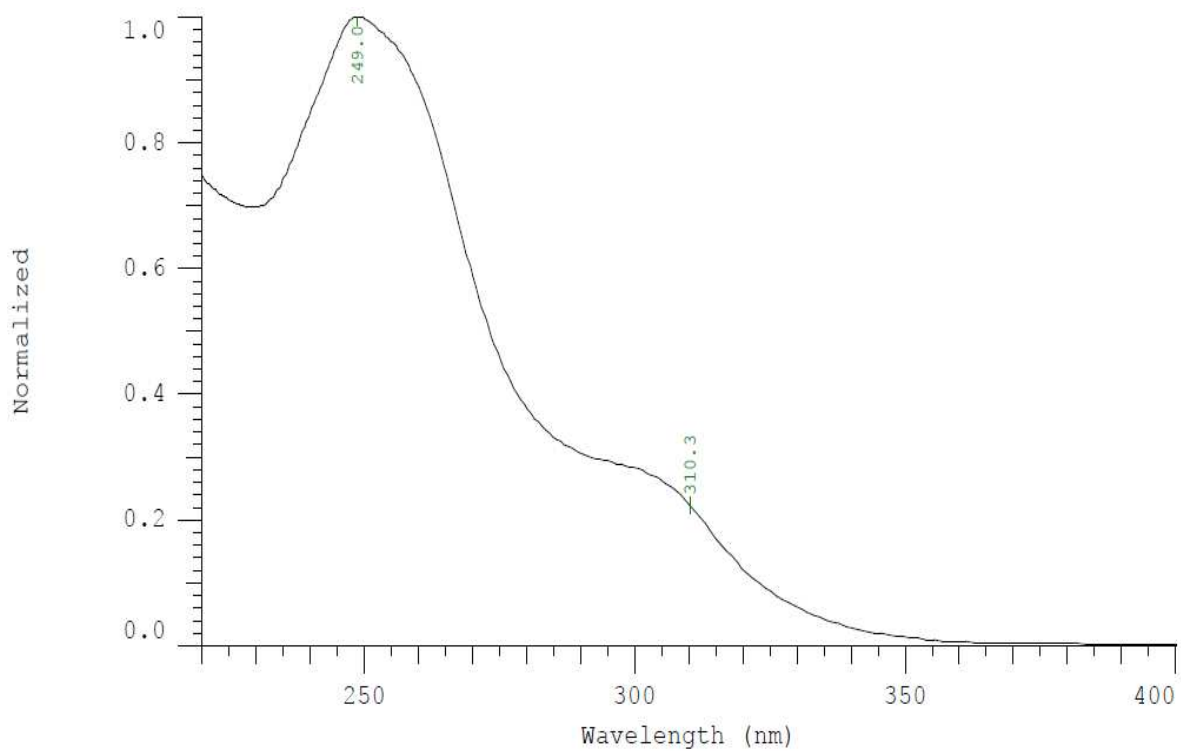


Fig 30. UV absorbance spectra of NDA1.

圖 30. NDA1 之 UV 吸收光譜



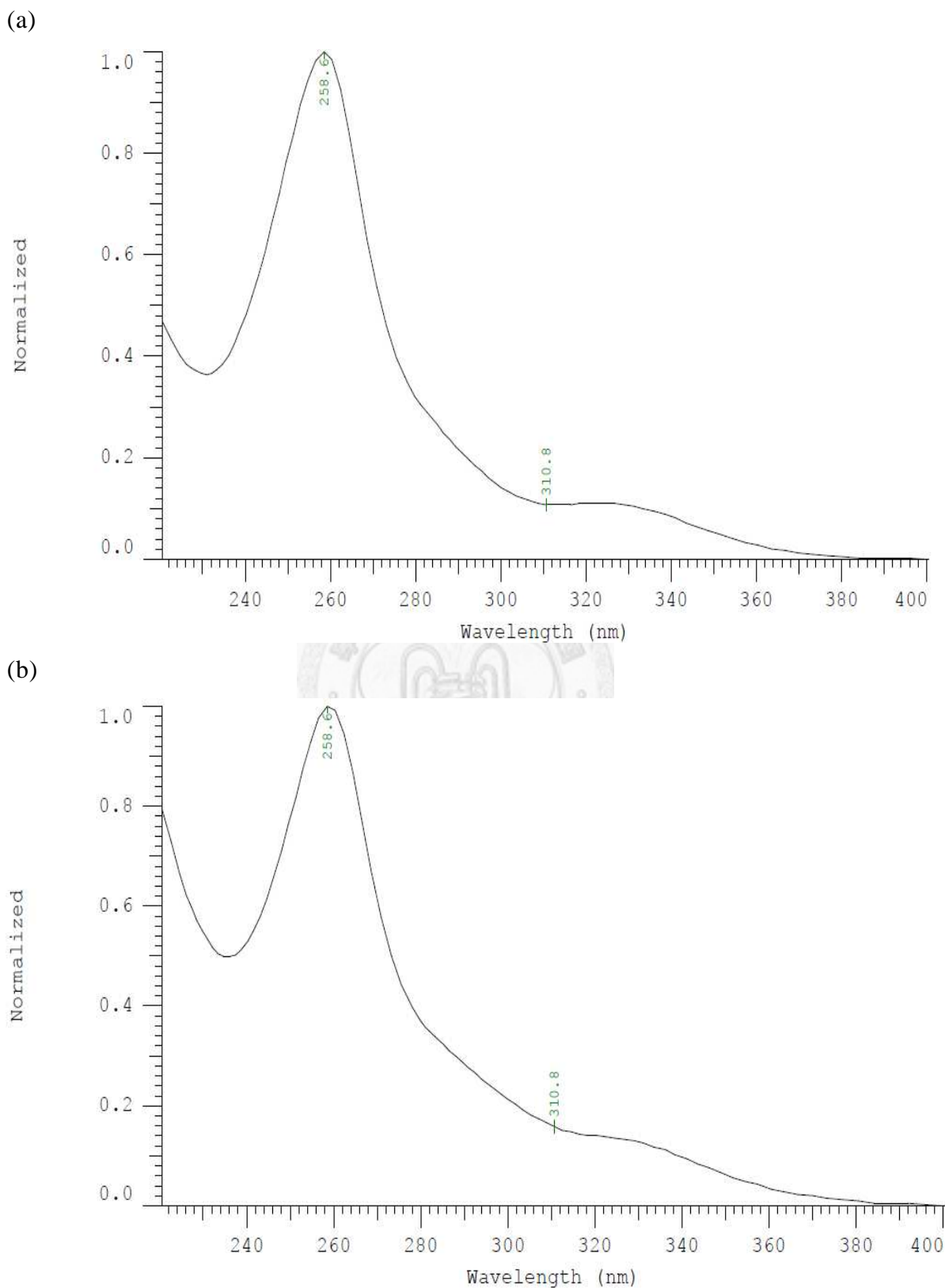


Fig 31. UV absorbance spectra of Isoflavone, (a) genistin ; (b) genistein

圖 31. 大豆異黃酮之 UV 吸收光譜 (a) genistin ; (b) genistein

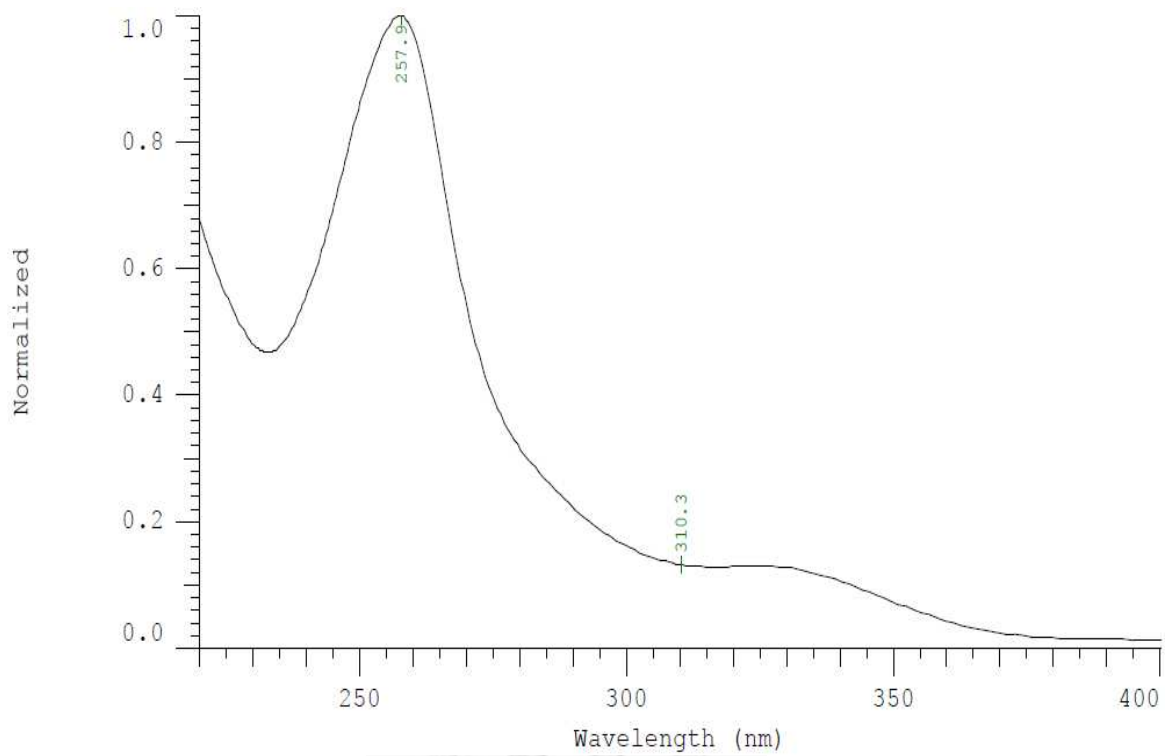
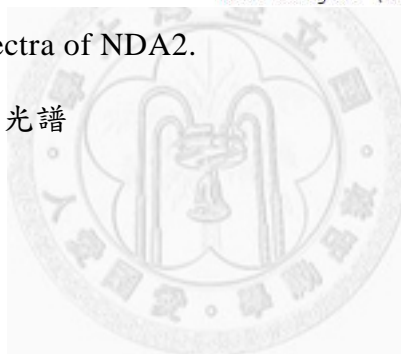


Fig 32. UV absorbance spectra of NDA2.

圖 32. NDA2 之 UV 吸收光譜



4.2 LC-MS/MS 分析

本實驗將 daidzein 與 genistein 之標準品以及 NDA1、NDA2 進行 LC-MS/MS 分析，鑑定其結構之相關性。圖 33 為 daidzein 之 ESI-MS 圖譜，daidzein 之母離子峰為 m/z 255 $[M+H]^+$ ，而 daidzein 經由 ESI-MS 之高溫及電壓的能量，形成 benzopyrone 碎片有 m/z 119 和 m/z 137。圖 34 為 NDA1 之 Full MS 圖譜，NDA1 之母離子峰為 m/z 335 $[M+H]^+$ ，圖 35 為 NDA1 之 ESI-MS 圖譜，其子離子峰為 daidzein m/z 255，得知 NDA1 $m/z = (\text{daidzein} + 80)$ 。

圖 36 為 genistein 之 ESI-MS 圖譜，genistein 之母離子峰為 m/z 271 $[M+H]^+$ ，由圖可看出 genistein 經由 ESI-MS 之高溫及電壓的能量，形成 benzopyrone 碎片有 m/z 153。圖 37 為 NDA2 之 Full MS 圖譜，NDA2 之母離子峰為 m/z 351 $[M+H]^+$ ，圖 38 為 NDA2 之 ESI-MS 圖譜，其子離子峰為 genistein m/z 271，得知 NDA2 $m/z = (\text{genistein} + 80)$ ，並且在圖譜中有 m/z 233 的子離子峰，推測此分子量 80 的物質可能接於 A 環 C-7 的 OH group 上。

一般推斷分子量為 80 的分子可能為 $-\text{SO}_3\text{H}$ 或 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ ，在 MS 圖譜上發現 NDAs 出現同位素峰，NDA1： m/z (%)，335.13 (M^+ ，100)，336.13 ($M+1$ ，17.83)，337.27 ($M+2$ ，2.28)；NDA2： m/z (%)，351.13 (M^+ ，100)，352.13 ($M+1$ ，16.03)，與附錄二計算後對照，若為含硫物質，則 $M+2$ 應大於 4.26%，所以排除 NDAs 為含硫物質之可能。

daidzeinMS2_255_35 #1-34 RT: 0.03-1.00 AV: 34 NL: 4.15E4
T: + p ESI Full ms2 255.50@35.00 [80.00-300.00]

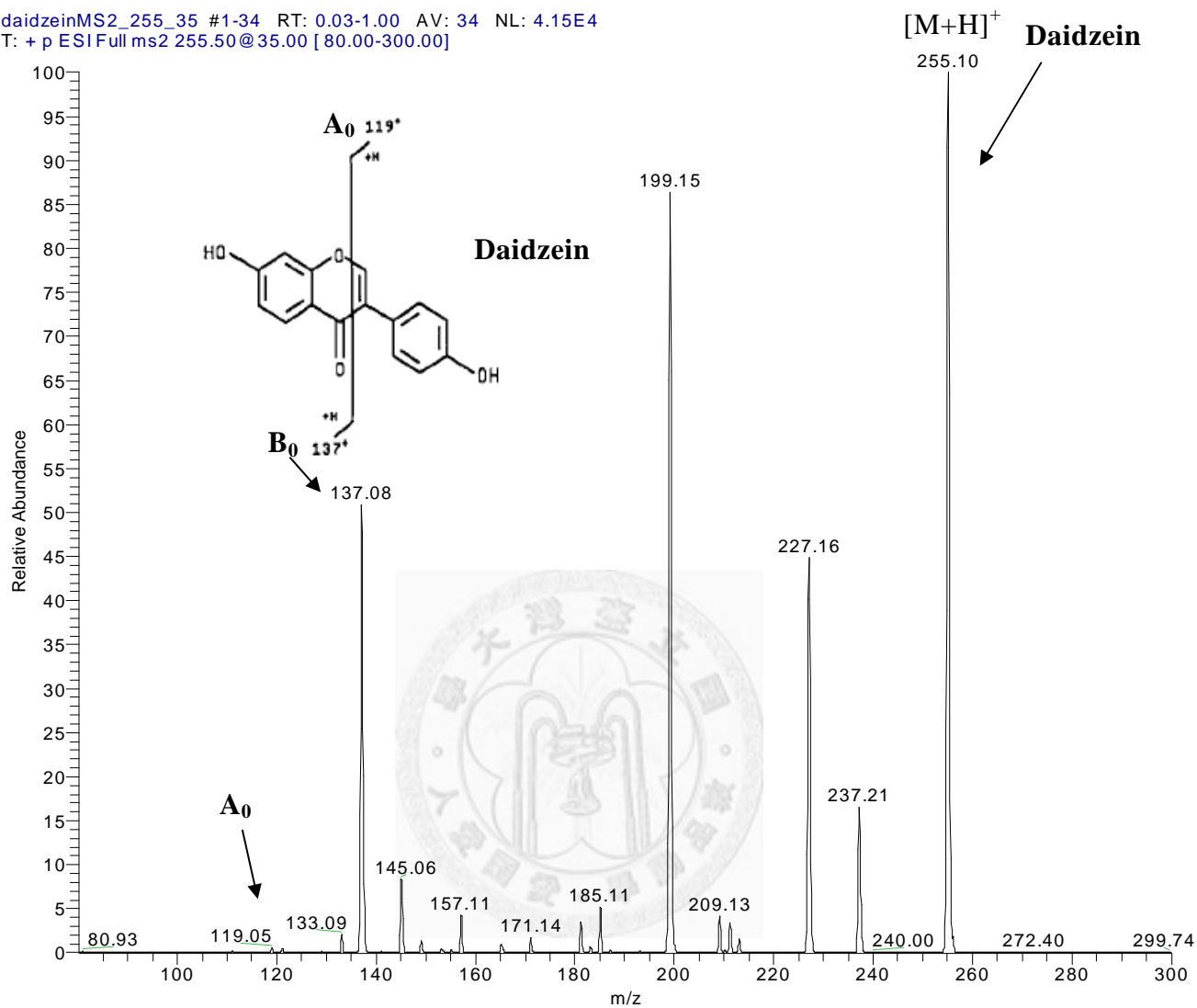


Fig 33. ESI-MS/MS of daidzein standard.

圖 33. Daidzein 標準品之 ESI-MS/MS 圖譜

20110603_NDA1_POSITIVE200_1000_32 #289 RT: 9.07 AV: 1 NL: 2.09E5
T: +p ESI Full ms [200.00-1000.00]

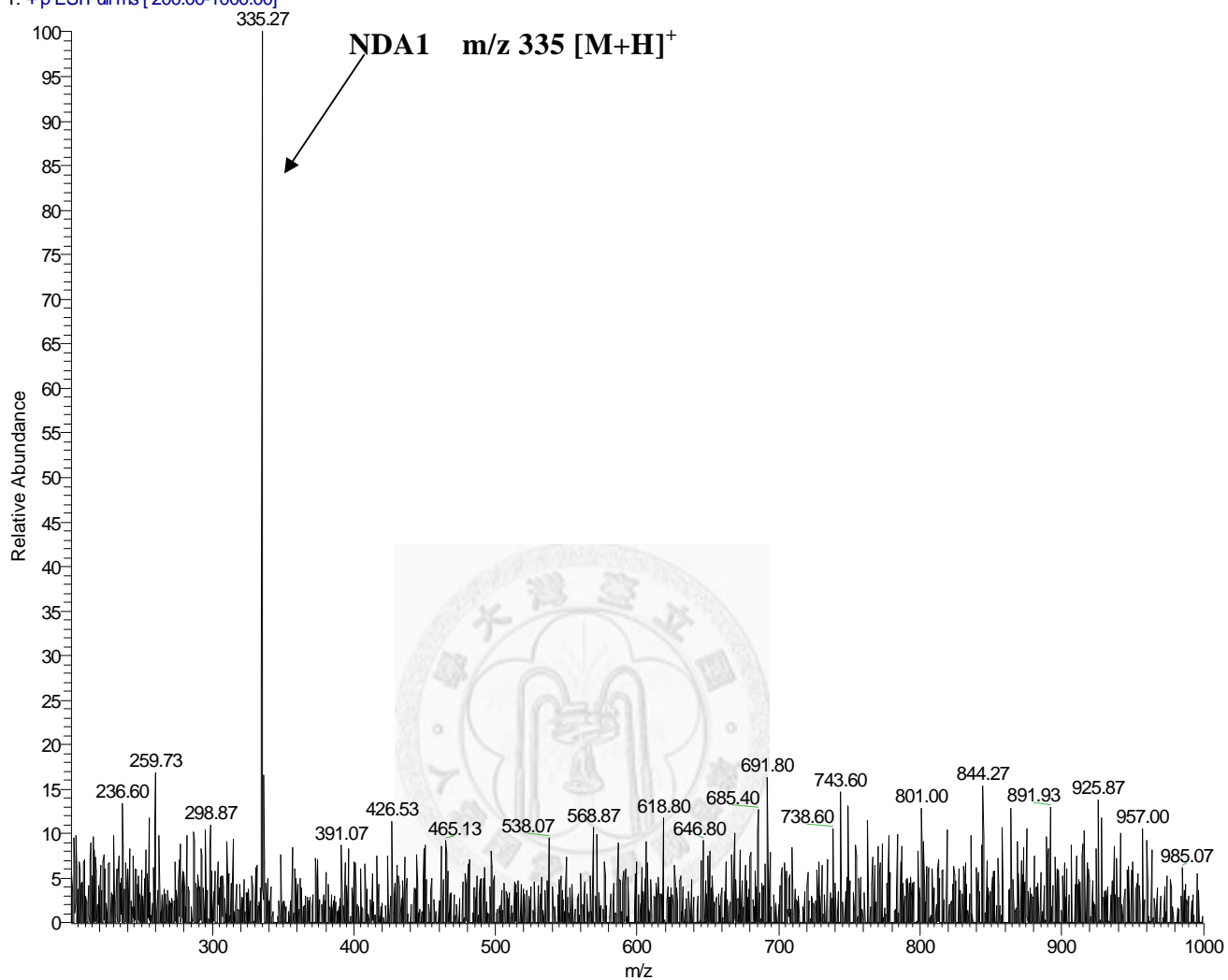


Fig 34. Full MS of NDA1 solution.

圖 34. NDA1 之 Full MS 圖譜

NDA1335_35 #1-26 RT: 0.01-0.97 AV: 26 NL: 2.87E3
T: + p ESI Full ms2 335.00 @ 35.00 [90.00-500.00]

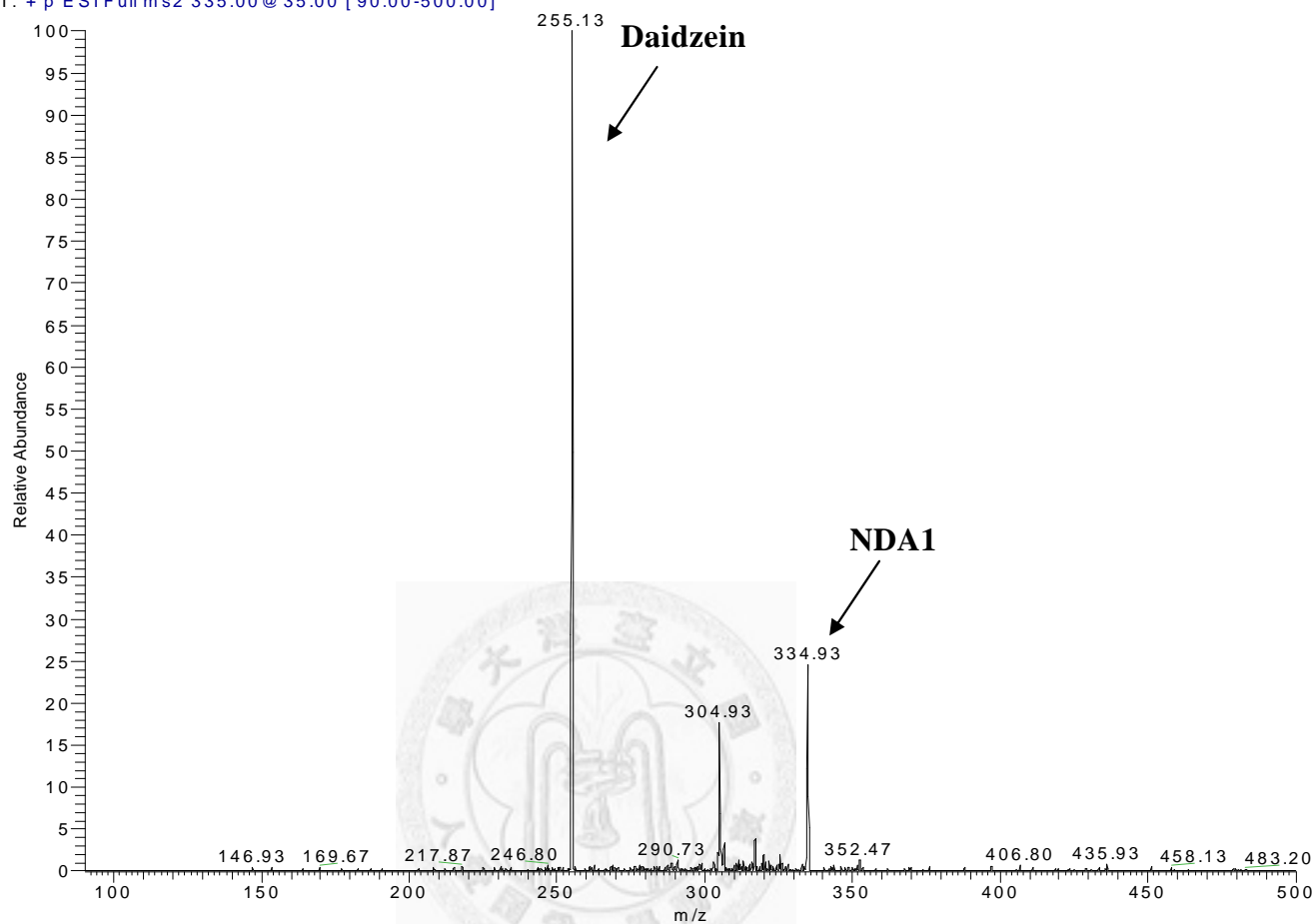


Fig 35. ESI-MS/MS of m/z 335 ($M+H^+$) of NDA1.

圖 35. NDA1 之 ESI-MS/MS 圖譜

20110801-genistein #1177-1268 RT: 47.96-51.63 AV: 46 NL: 4.38E3
F: + p ESI Full ms2 271.00@35.00 [70.00-500.00]

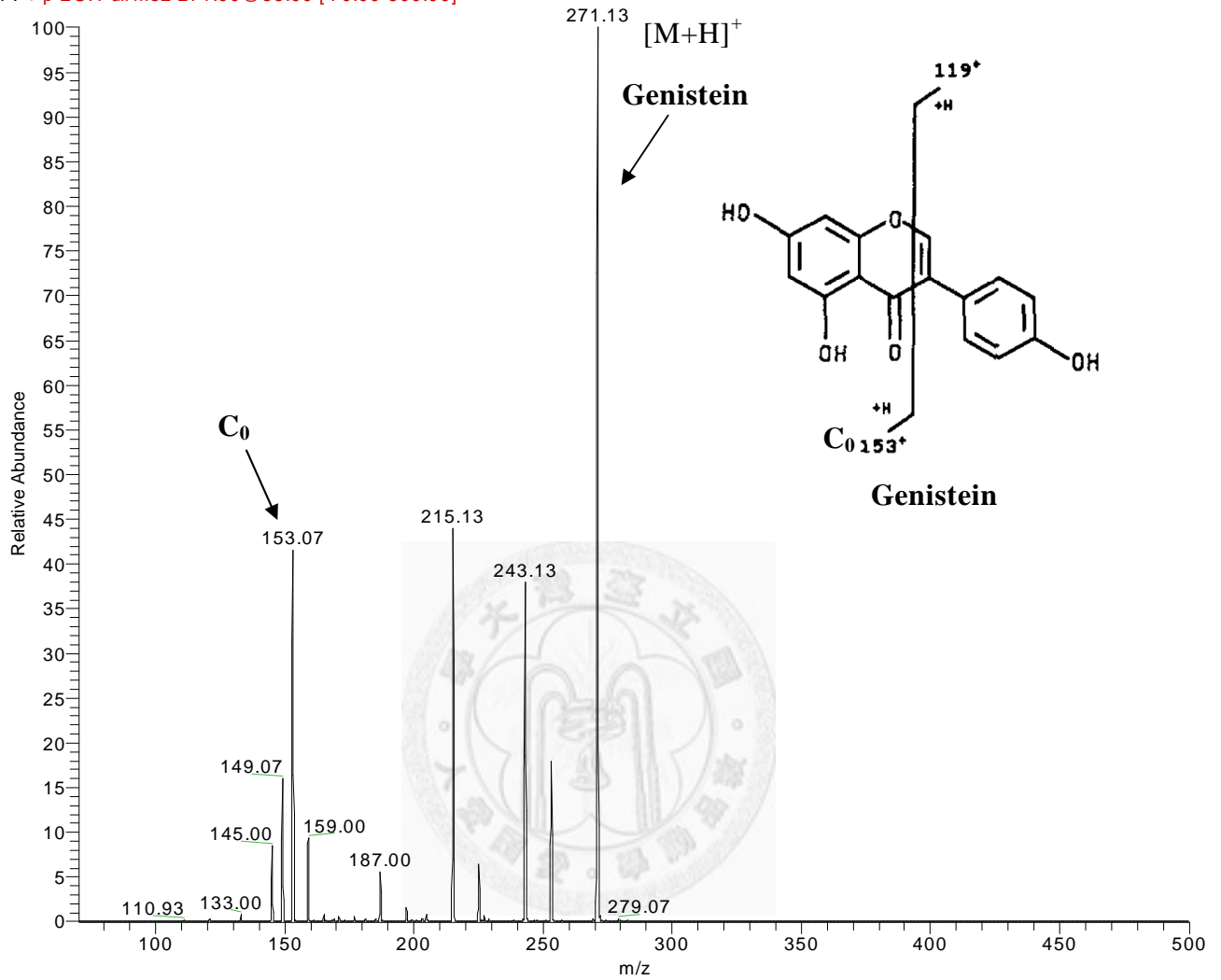


Fig 36. ESI-MS/MS of genistein standard.

圖 36. Genistein 標準品之 ESI-MS/MS 圖譜

20110603_NDA2_POSITIVE200_100032 #476-489 RT: 15.19-15.62 AV: 8 NL: 3.23E4
T: +p ESI Full ms [200.00-1000.00]

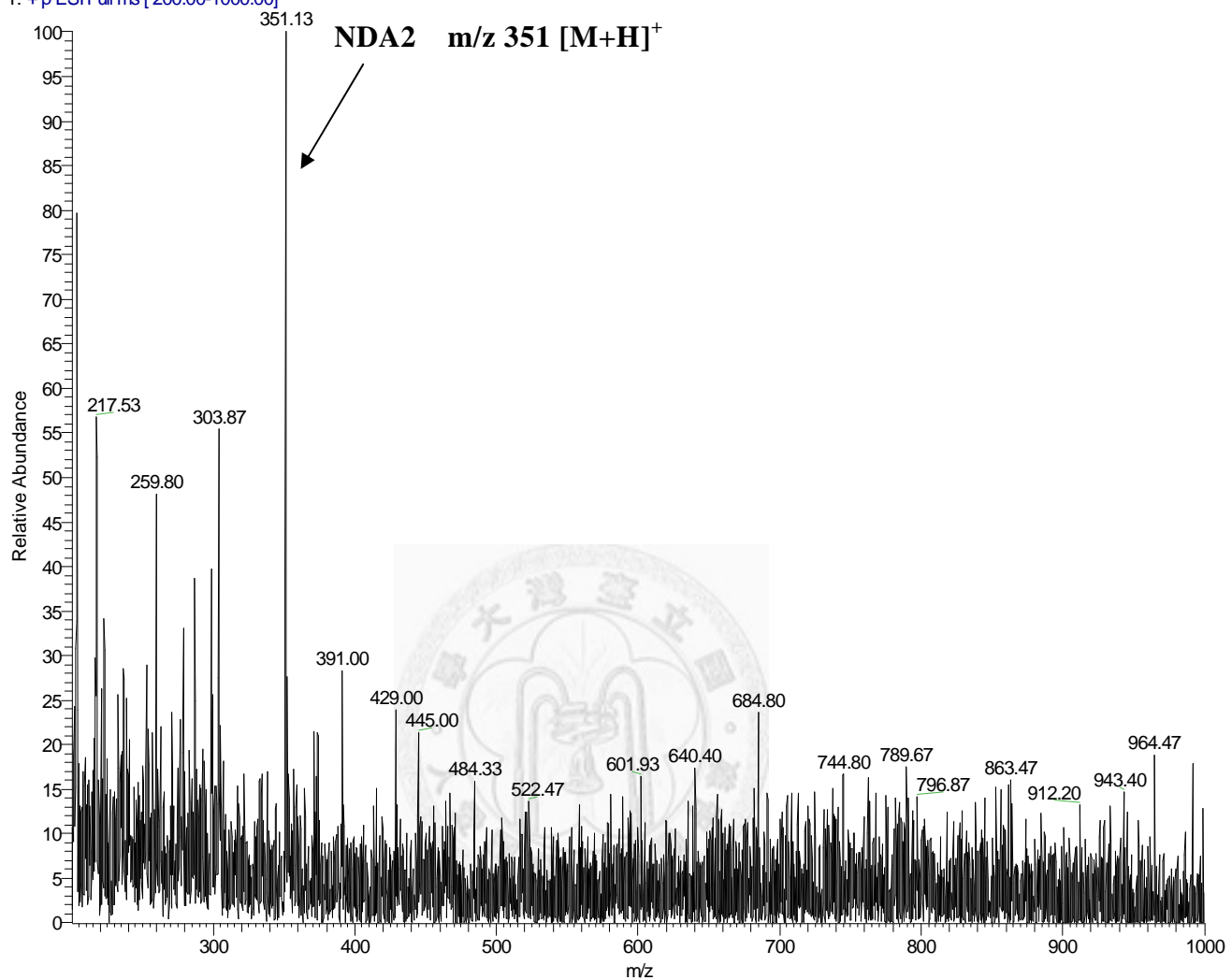


Fig 37. Full MS of NDA2 solution.

圖 37. NDA2 之 Full MS 圖譜

20110802-NDA2 #252-446 RT: 10.19-17.94 AV: 97 NL: 3.06E2
F: + p ESI Full ms2 351.00@35.00 [95.00-500.00]

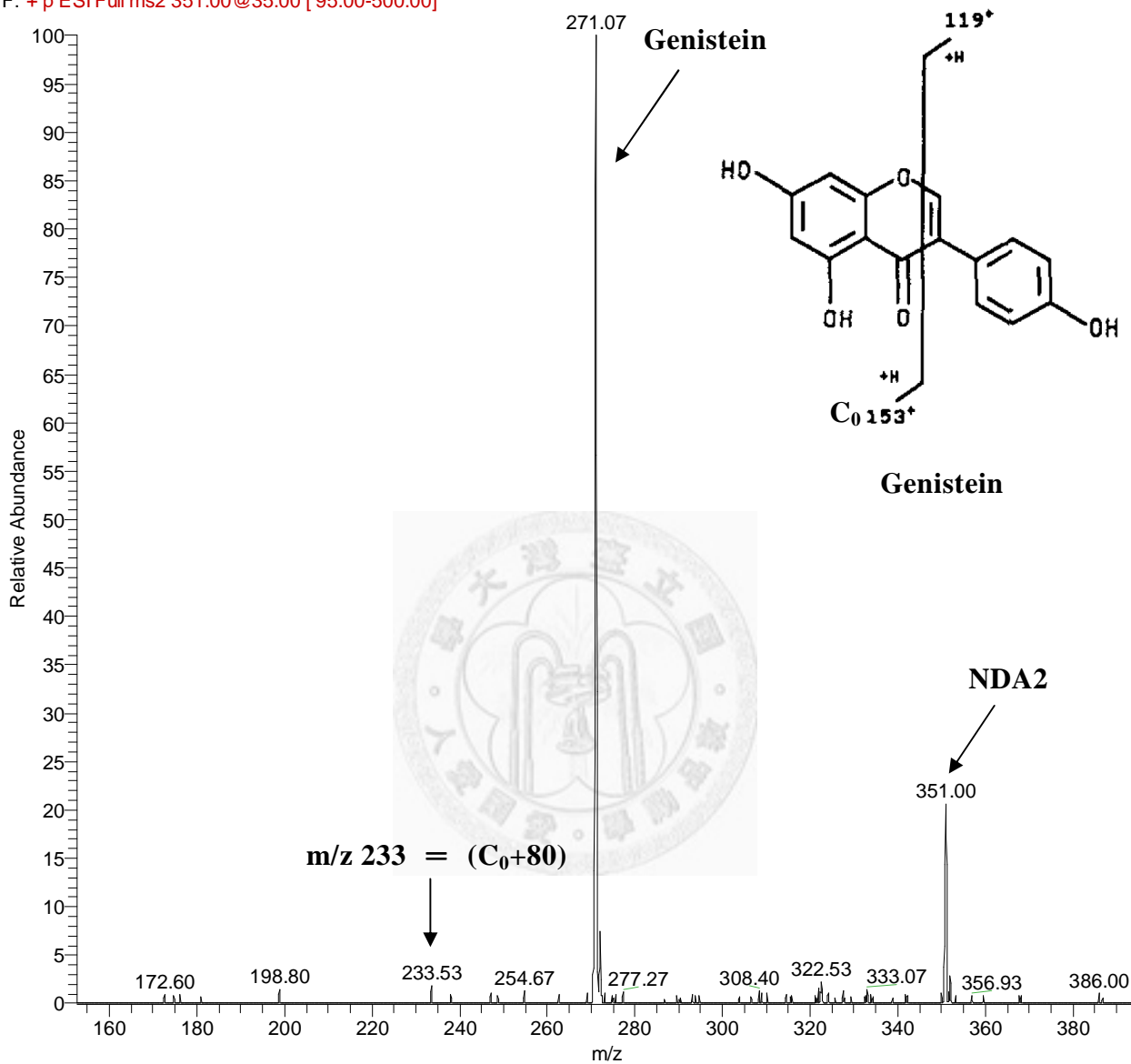


Fig 38. ESI-MS/MS of m/z 351 ($M+H^+$) of NDA2.

圖 38. NDA2 之 ESI-MS/MS 圖譜

4.3 NMR 光譜鑑定

NDA1 之 ^1H -NNR，如圖 39 所示， ^1H -NNR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.89 (2H, H-3', 5'), δ 7.33 (1H, H-6), δ 7.47 (2H, H-2', 6'), δ 7.51 (1H, H-8), δ 8.11 (1H, H-5), δ 8.45 (1H, H-2)。由圖 40. NDA1 之 ^{13}C - ^1H (COSY, HSQC) 光譜，得知 7 與 4' 的位置是接上非 C-H 之官能基。NDA1 之 ^{13}C - ^{31}P coupling 如圖 41 所示， ^{13}C -NNR (150 MHz): δ 108.2 ($J=5.12$ Hz, C-8), δ 114.8 (C-3', 5'), δ 118.4 ($J=6.15$ Hz, C-6)。NDA1 之 ^{31}P -NNR 如圖 42 所示，在 -6.851 ppm 有訊號，表示為含磷之化合物，經由以上數據分析，NDA1 為 Daidzein-7-*O*-phosphate。

NDA2 之 ^1H -NNR，如圖 43 所示， ^1H -NNR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.62 (1H, H-6), δ 6.82 (2H, H-3', 5'), δ 6.88 (1H, H-8), δ 7.39 (2H, H-2', 6'), δ 8.39 (1H, H-2)。由圖 44. NDA2 之 ^{13}C - ^1H (COSY, HSQC) 光譜，得知 5、7 與 4' 的位置是接上非 C-H 之官能基。NDA2 之 ^{13}C - ^{31}P coupling 如圖 45 所示， ^{13}C -NNR (150 MHz): δ 98.8 ($J=5.39$ Hz, C-8), δ 103.4 ($J=5.86$ Hz, C-6), δ 115.6 (C-3', 5')。NDA2 之 ^{31}P -NNR 如圖 46 所示，在 -6.2794 ppm 有訊號，表示為含磷之化合物，經由以上數據分析，NDA2 為 Genistein-7-*O*-phosphate。圖 47. Daidzein-7-*O*-phosphate 與 genistein-7-*O*-phosphate 之化學結構。

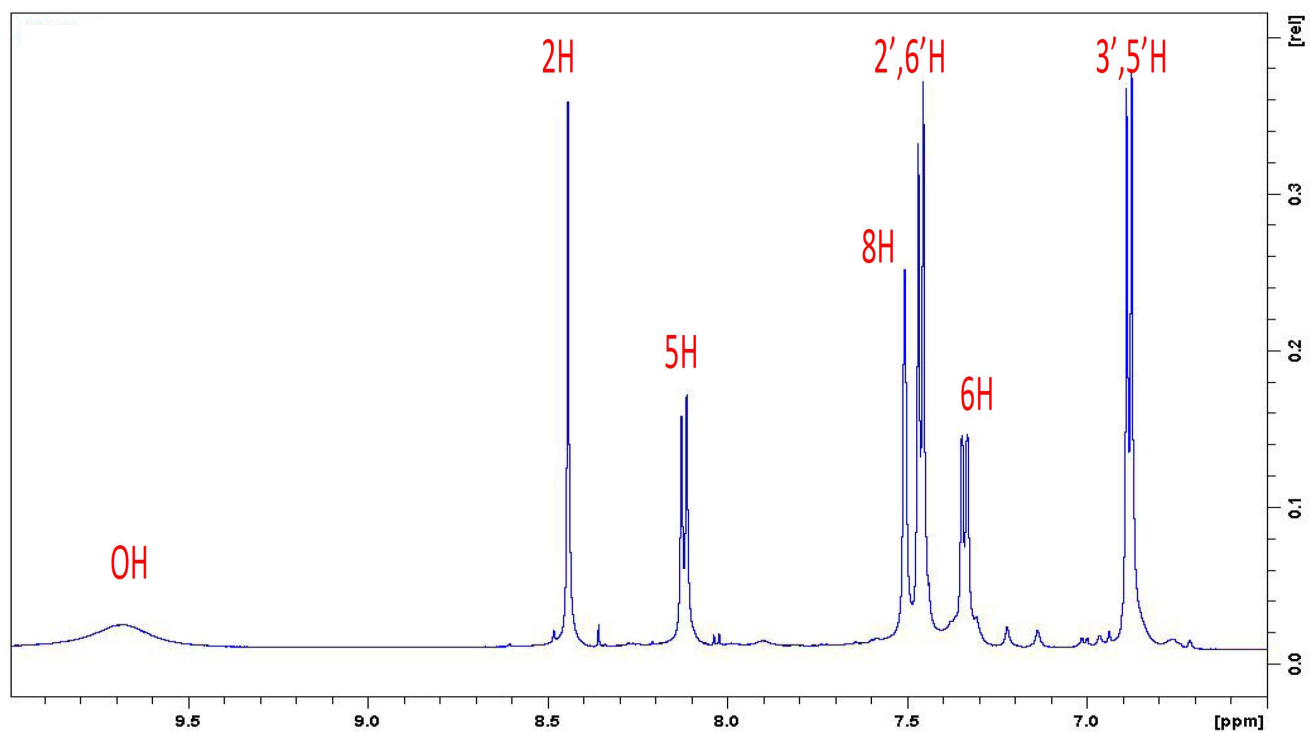


Fig 39. $^1\text{H-NMR}$ of NDA1.

圖 39. NDA1 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖



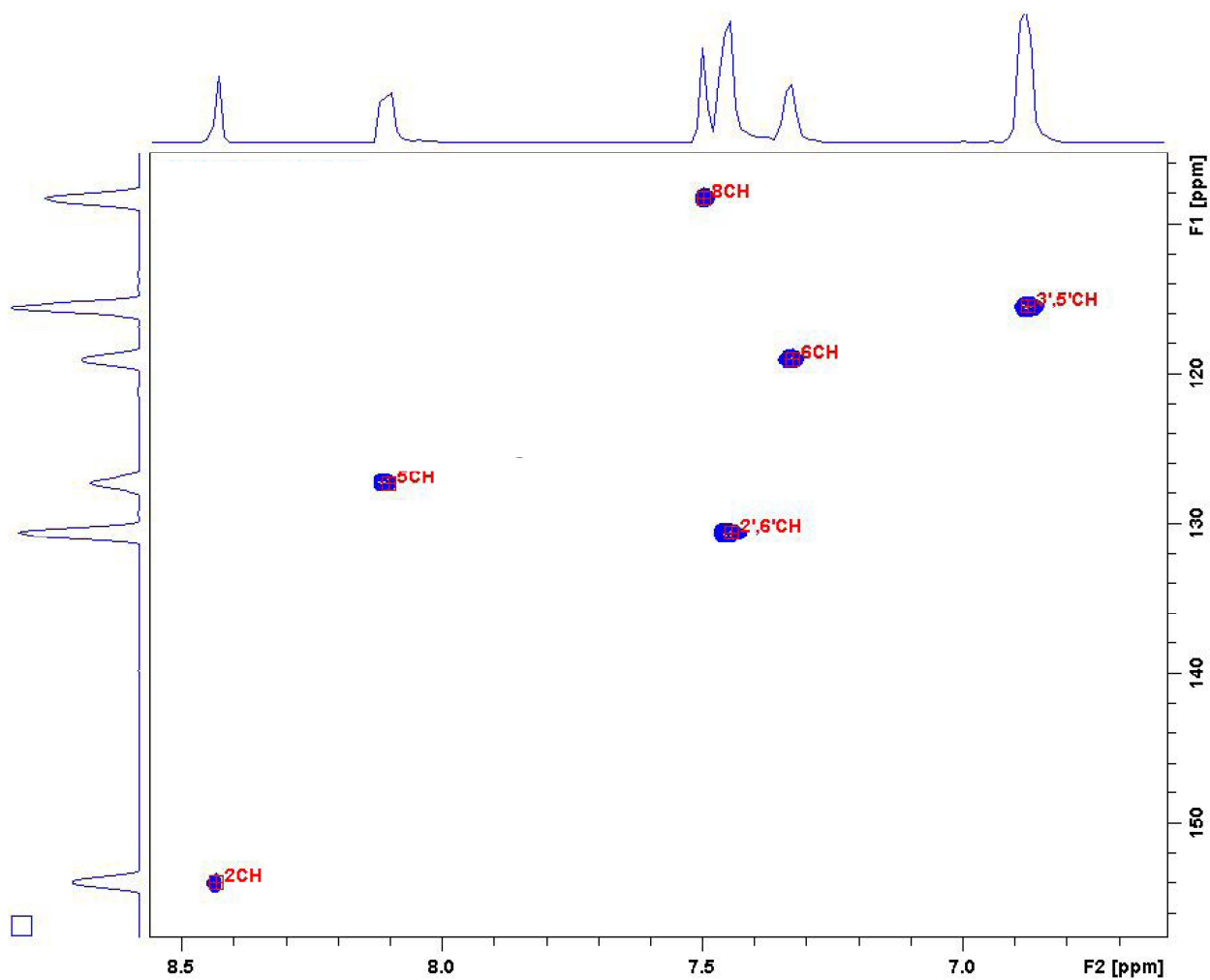


Fig 40. The two-dimensional NMR spectra (^{13}C - ^1H COSY, HSQC) of NDA1.

圖 40. NDA1 之二維 NMR(^{13}C - ^1H COSY, HSQC)光譜圖

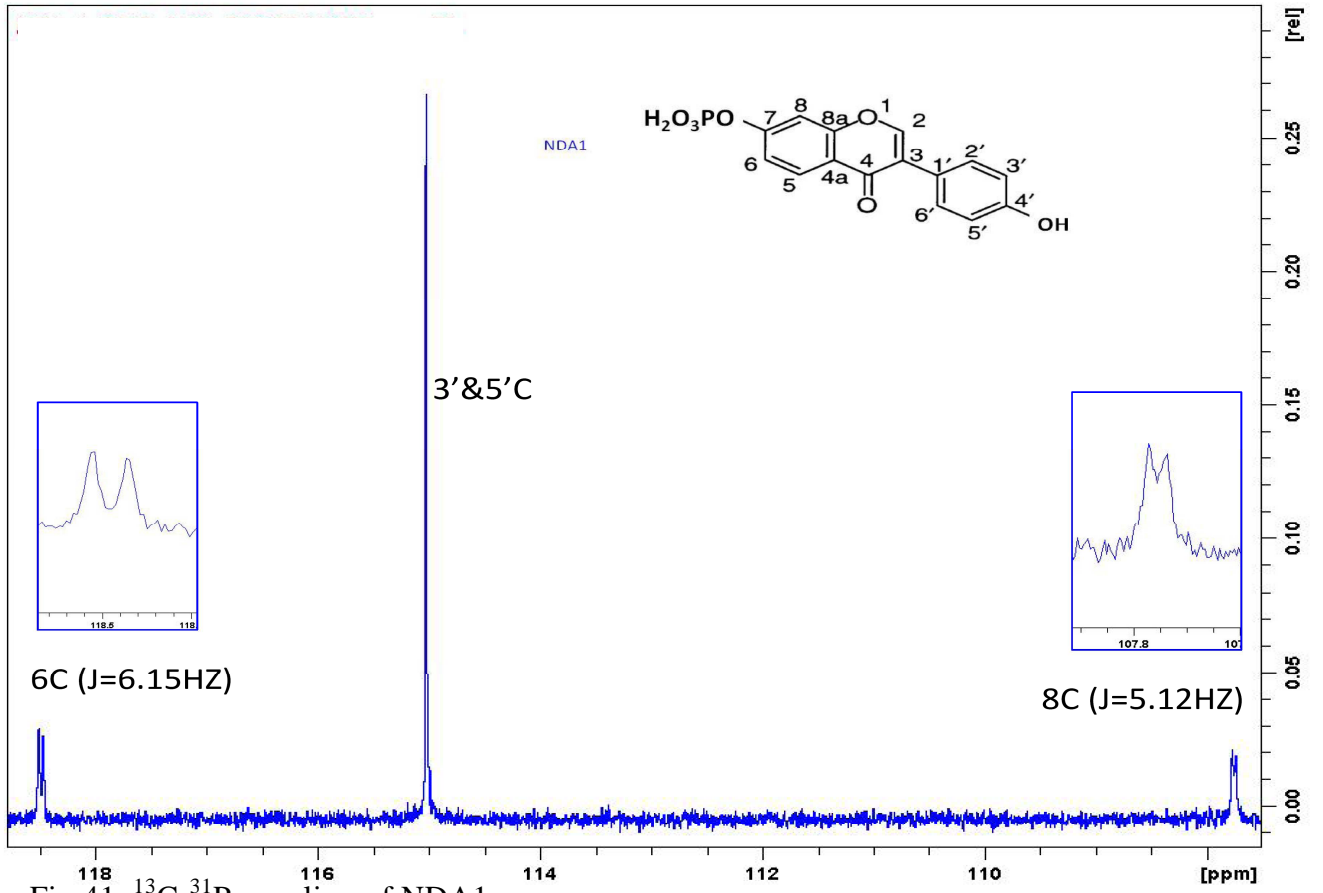


Fig 41. ^{13}C - ^{31}P coupling of NDA1.

圖 41. NDA1 之 ^{13}C - ^{31}P 耦合光譜圖

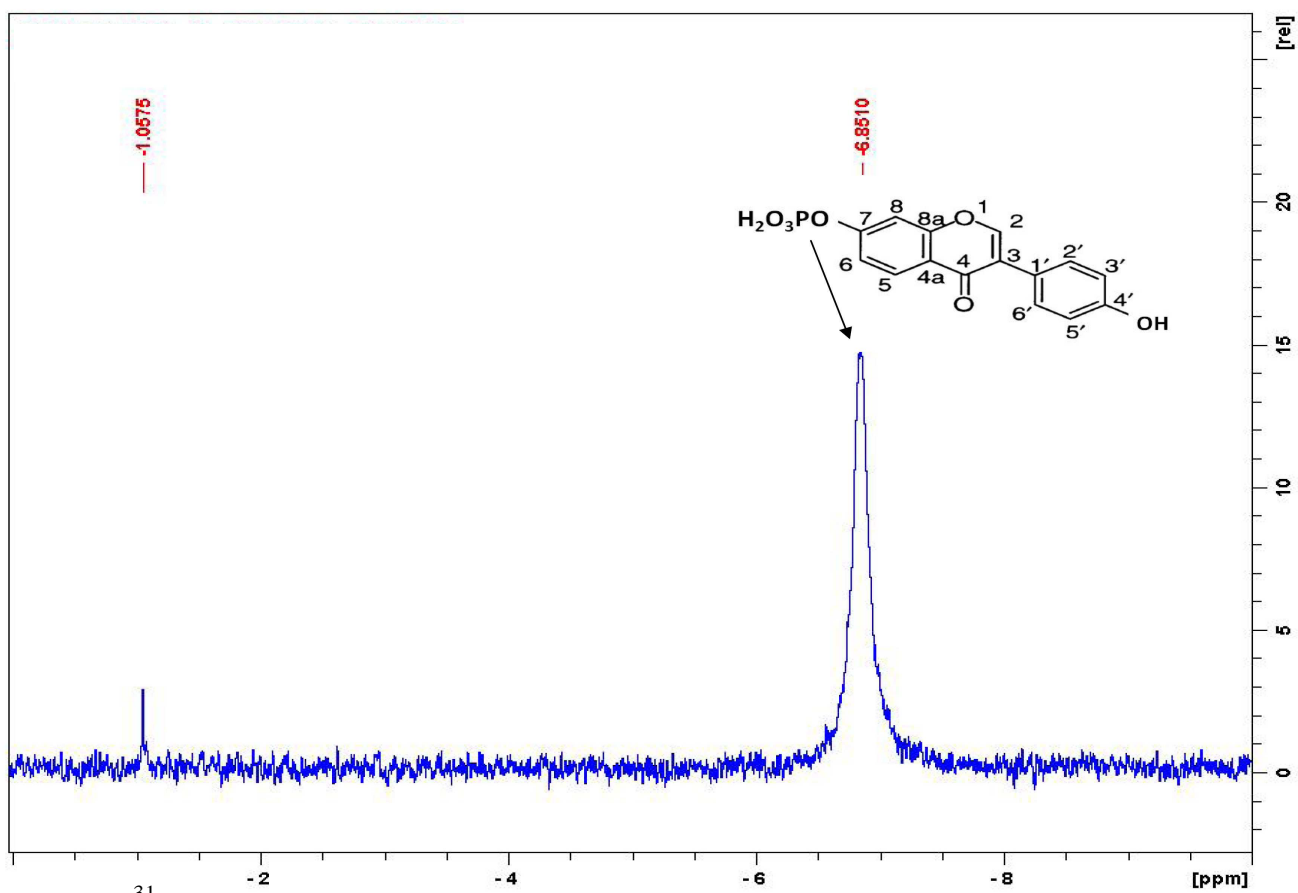


Fig 42. ^{31}P -NMR of NDA1.

圖 42. NDA1 之 ^{31}P -NMR 光譜圖

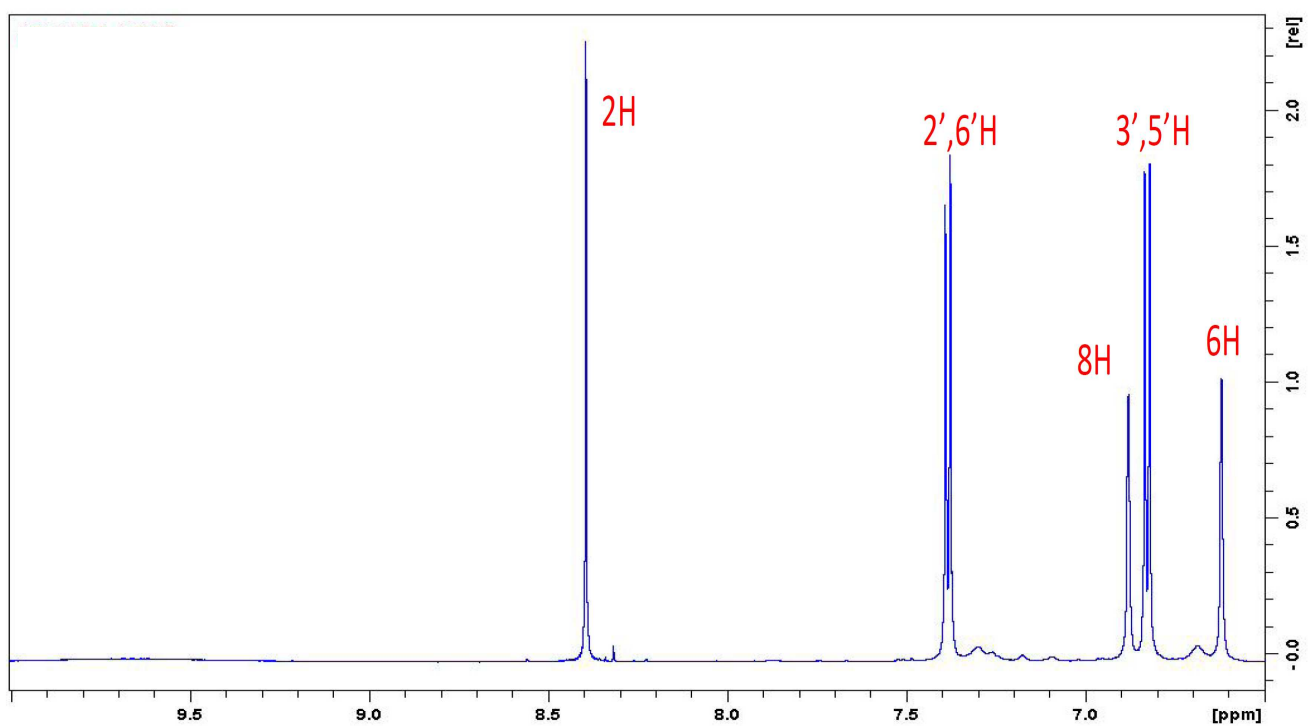


Fig 43. $^1\text{H-NMR}$ of NDA2.

圖 43. NDA2 之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜圖



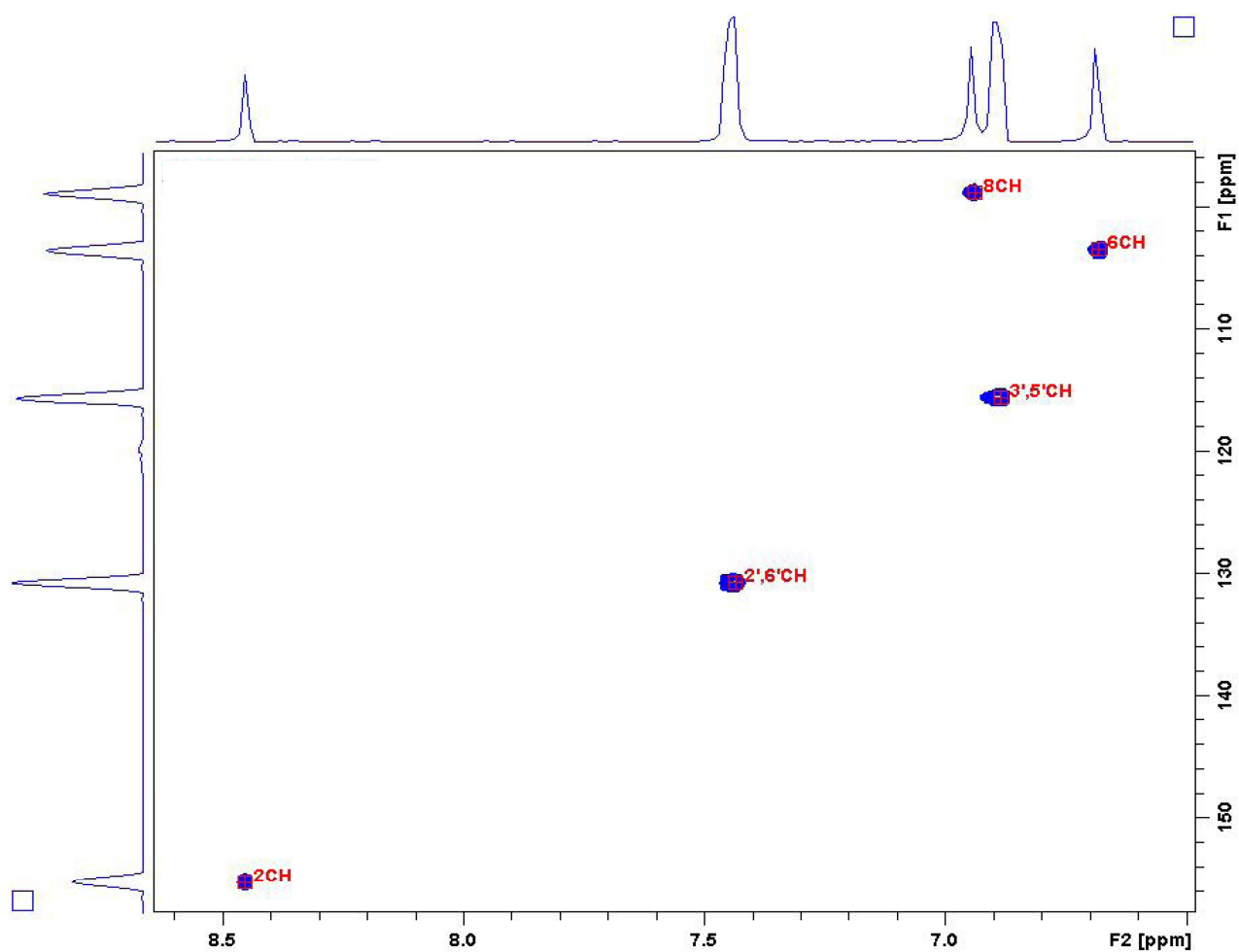


Fig 44. The two-dimensional NMR spectra (^{13}C - ^1H COSY, HSQC) of NDA2.

圖 44. NDA2 之二維 NMR(^{13}C - ^1H COSY, HSQC)光譜圖

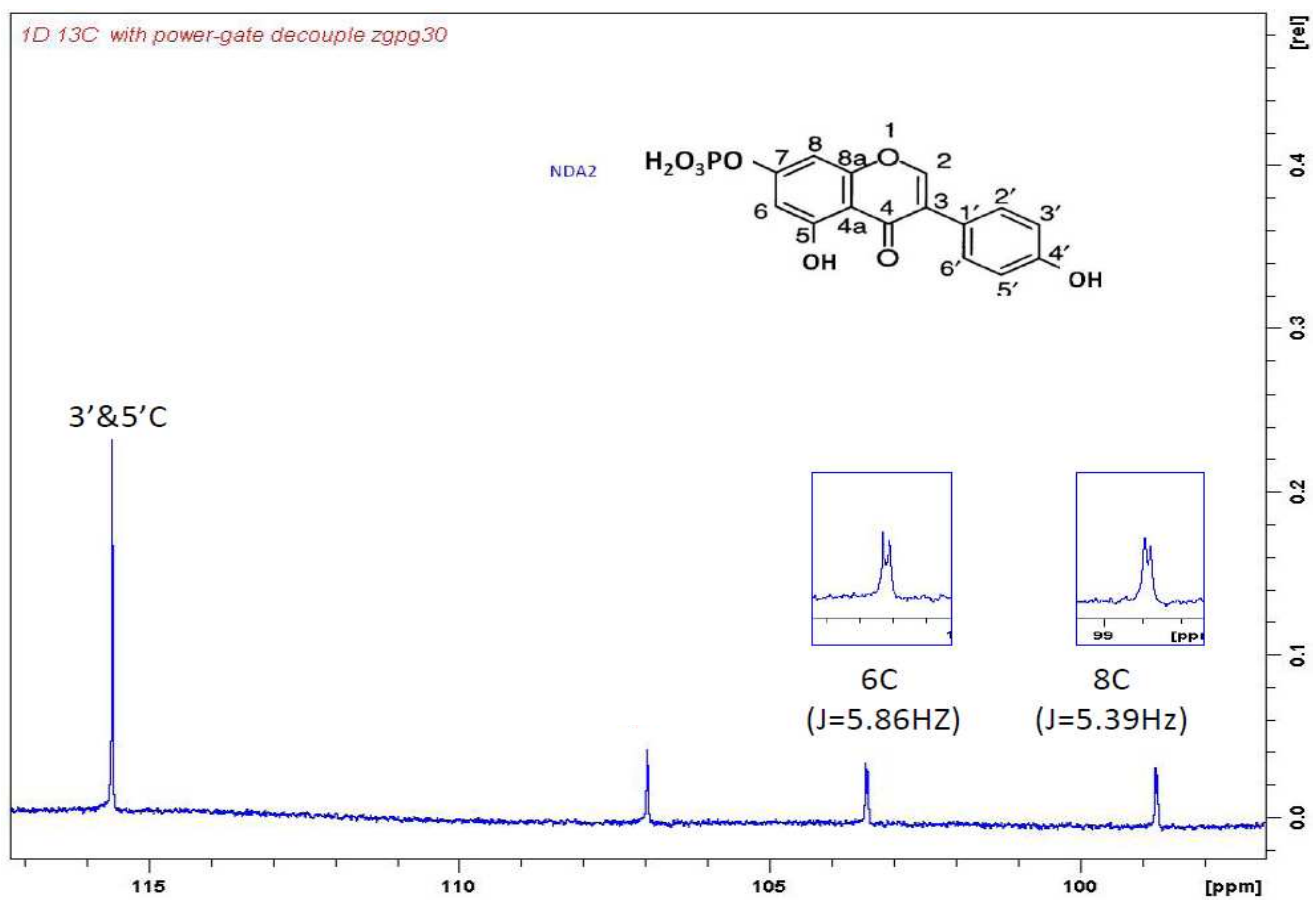


Fig 45. ^{13}C - ^{31}P coupling of NDA2.

圖 45. NDA2 之 ^{13}C - ^{31}P 耦合光譜圖

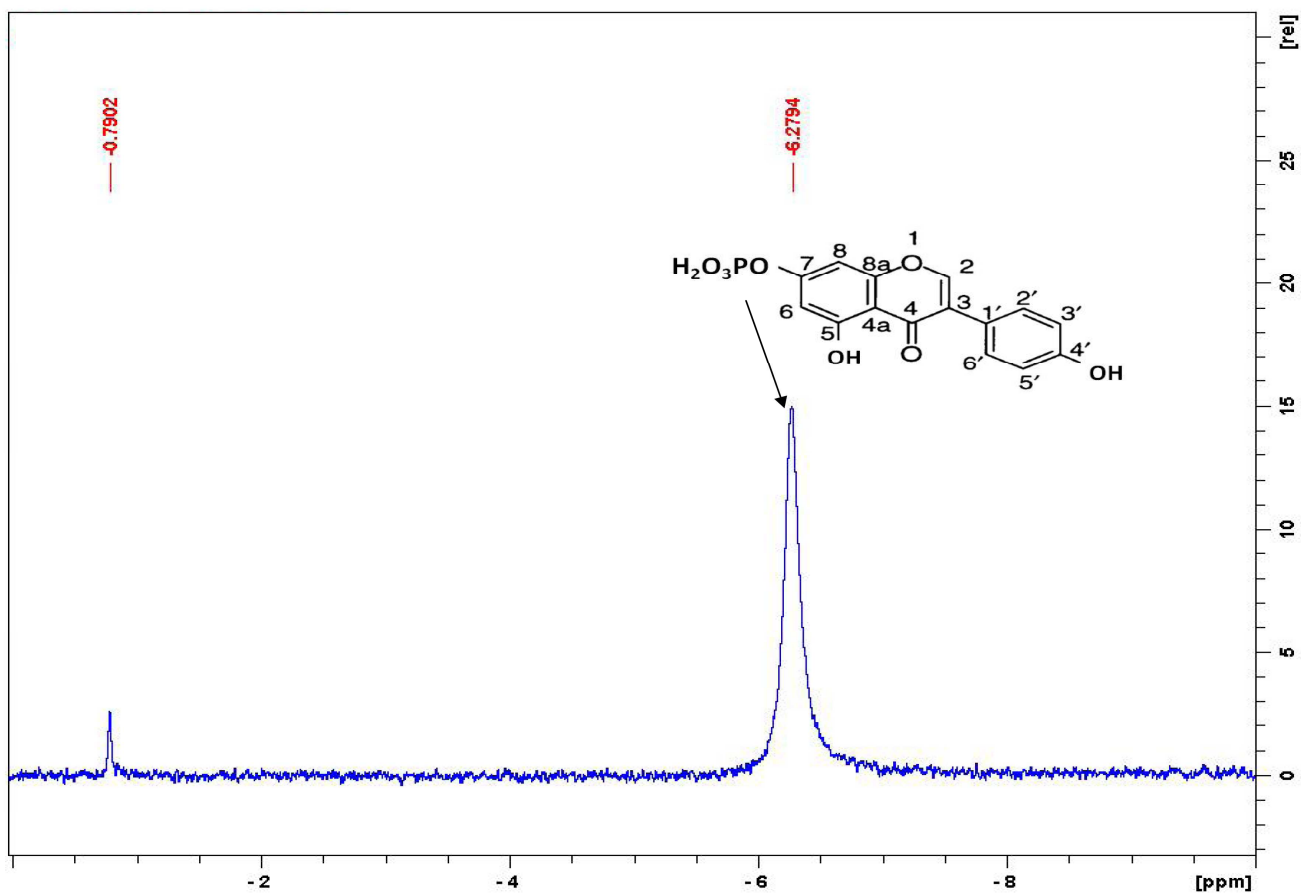
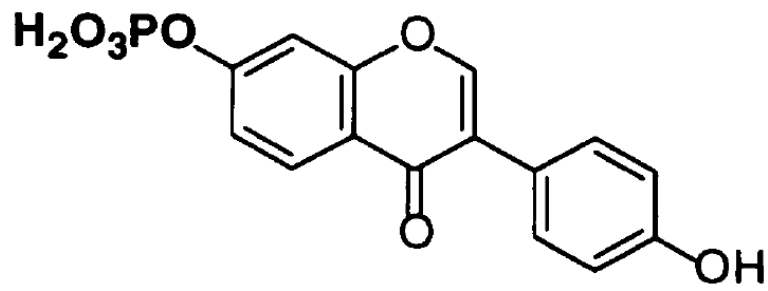
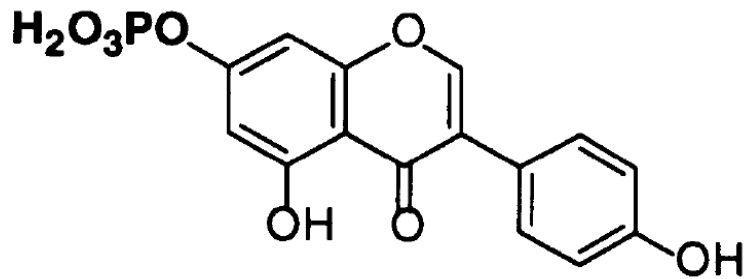


Fig 46. ^{31}P -NMR of NDA1.

圖 46. NDA1 之 ^{31}P -NMR 光譜圖



Daidzein-7-O-phosphate



Genistein-7-O-phosphate

Fig 47. The chemical structures of daidzein-7-O-phosphate and genistein-7-O-phosphate.

圖 47. Daidzein-7-O-phosphate 與 genistein-7-O-phosphate 之化學結構

第五章 結論

1. 以 60% 甲醇萃取大豆之異黃酮，此萃取液經由 HP-20 疏水性管柱，分別以 40%、70%、100% 之甲醇流洗，可分別獲得 malonylglucosides、glucosides、aglycones 之異黃酮。分離到的含有部份 malonylglucosidic isoflavones 之 glucosidic isoflavones 流洗液採用高溫 121°C 加熱 30 分鐘而將 malonylglucosidic isoflavones 轉變為 glucosidic isoflavones。
2. 經由 UV、LC-MS/MS、以及 NMR 鑑定 NDAs 之結構，NDA1 為 daidzein 之衍生物 Daidzein-7-*O*-phosphate，分子量為 334；NDA2 為 genistein 之衍生物 Genistein-7-*O*-phosphate，分子量為 350。
3. 大部份 *Bacillus subtilis* natto strain 具有將 glucosides 之異黃酮轉化為 aglycones 再轉化為 aglycones-7-*O*-phosphate 之能力，其中以 *B. subtilis* FC-10 的轉化能力最佳。
4. 由 *B. subtilis* FC-10 分別轉化三大類大豆異黃酮，發現 aglycones 之異黃酮為 aglycones-7-*O*-phosphate 之前驅物。Glucosides 之異黃酮會先被轉化為 aglycones 再轉化為 aglycones-7-*O*-phosphate。而 Malonylglucosides 之異黃酮只能被 *B. subtilis* FC-10 轉化為 aglycones，卻不能再轉化為 aglycones-7-*O*-phosphate。
5. Daidzein-7-*O*-phosphate 與 Genistein-7-*O*-phosphate 的水溶性比 aglycones 佳。

第六章 參考文獻

- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Lampe, J., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G., & Hase, T. (1993). Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 215, 5-18.
- Adlercreutz, H., & Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med*, 29, 95-120.
- Anthony, M. S., Clarkson, T. B., Bullock, B. C. & Wagner, J. D. (1997). Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 17, 2524-2531.
- Arjmandi, B. H., Alekel, L., Hollis, B. W., Amin, D., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Guo, P., & Kukreja, S. C. (1996). Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutrition.*, 126, 161-167.
- Axelson, M., Sjoval, J., Gustafsson, B. E., & Setchell, K. D. (1984). Soya--a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J Endocrinol*, 102, 49-56.
- Baumann, U. (1992). Changes of amino acid content during tempe fermentation and possibilities of optimization. *Bio. Conferences*, 533-536.
- Chien, H. L., Huang, H. Y., & Chou, C. C. (2006). Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbil.*, 23, 772-778.
- Chiou, T. Y., Lin, Y. H., Su, N. W., & Lee, M. H. (2010). Beta-glucosidase isolated from soybean okara shows specificity toward glucosyl isoflavones. *J Agric Food Chem*, 58, 8872-8878.

Clarkson, T. B., Anthony, M. S., & Hughes, C. L., Jr. (1995). Estrogenic soybean isoflavones and chronic disease Risks and benefits. *Trends Endocrinol Metab*, 6, 11-16.

Cotterchio, M., Boucher, B.A., Manno, M., Gallinger, S., Okey, A., Harper, P. (2006). Dietary phytoestrogen intake is associated with reduced colorectal cancer risk. *J Nutrition*, 136, 3046-3053.

Doerge, D. R., Chang, H. C., Churchwell, M. I., & Holder, C. L. (2000). Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*, 28, 298-307.

Ebata J, F. Y., Hirai K, Murata K. (1972). β -Glucosidase involved in the antioxidant formation in tempe, fermented soybeans. *J Agric Chem Society of Japan*, 323-329.

Farmakalidis, E., Hathcock, J. N., & Murphy, P. A. (1985). Oestrogenic potency of genistin and daidzin in mice. *Food Chem Toxicol*, 23, 741-745.

Genant, H. K., Baylink, D. J., & Gallagher, J. C. (1989). Estrogens in the prevention of osteoporosis in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*, 161, 1842-1846.

Gruber HE, I. J., Baylink DJ, Matthews M, Nelp WB, Sisom K, Chesnut CH (1984). Long-term calcitonin therapy in postmenopausal osteoporosis. *Metabolism.*, 33, 295-303.

György, P., Murata, K., Ikehata H. (1964). Antioxidants isolated from Fermented Soybeans (Tempeh). *Nature*(203), 870 - 872

H. Esaki, H. Onozaki, and , Toshihiko Osawa (1994). Antioxidative Activity of Fermented Soybean Products. *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I*, 546, 353-360.

Hays, W. S., Jenison, S. A., Yamada, T., Pastuszyn, A., & Glew, R. H. (1996). Primary structure of the cytosolic beta-glucosidase of guinea pig liver. *J Biochem*,

319, 829-837.

Hideo Esaki, H. O., Yasujiro Morimitsu, Shunro Kawakishi, Toshihiko Osawa (1997). Potent Antioxidative isoflavones isolated from soybeans fermented with *Aspergillus saitoi*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 62, 740-746.

Hsieh, M. C., & Graham, T. L. (2001). Partial purification and characterization of a soybean beta-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. *Phytochemistry*, 58, 995-1005.

Hur, H. G., Lay, J. O., Jr., Beger, R. D., Freeman, J. P., & Rafii, F. (2000). Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol*, 174, 422-428.

Ioku, K., Pongpiriyadacha, Y., Konishi, Y., Takei, Y., Nakatani, N., & Terao, J. (1998). beta-Glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Biosci Biotechnol Biochem*, 62, 1428-1431.

Ishida, H., Uesugi, T., Hirai, K., Toda, T., Nukaya, H., Yokotsuka, K., & Tsuji, K. (1998). Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. *Biol Pharm Bull*, 21, 62-66.

Joannou, G. E., Kelly, G. E., Reeder, A. Y., Waring, M., & Nelson, C. (1995). A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 54, 167-184.

Jou, H. J., Ling, P. Y., & Wu, S. C. (2005). Comparison of 70 mg and 35 mg isoflavone soya supplement for menopause symptoms. *Int J Gynaecol Obstet*, 90, 159-160.

Kannel, W. B. (1987). Metabolic risk factors for coronary heart disease in women: perspective from The Framingham Study. *J Am Heart*, 114, 413-419.

King, R. A., Broadbent, J. L., & Head, R. J. (1996). Absorption and excretion of the

- soy isoflavone genistein in rats. *J Nutr*, 126, 176-182.
- Klaus Klusa, G. B.P. a. W. B. (1993). Formation of 6,7,4'-trihydroxyisoflavone (factor 2) from soybean seed isoflavones by bacteria isolated from tempe. *Phytochemistry*, 34, 979-981.
- Kuo, L. C., Cheng, W. Y., Wu, R. Y., Huang, C. J., & Lee, K. T. (2006). Hydrolysis of black soybean isoflavone glycosides by *Bacillus subtilis* natto. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73, 314-320.
- Lin, C. H., Wei, Y. T., & Chou, C. C. (2006). Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. *Food Microbiol*, 23, 628-633.
- Malathi, P., & Crane, R. K. (1969). Phlorizin hydrolase: a beta-glucosidase of hamster intestinal brush border membrane. *Biochim Biophys Acta*, 173, 245-256.
- Marie Lof, E. W. (2006). Epidemiologic evidence suggests that dietary phytoestrogen intake is associated with reduced risk of breast, endometrial, and prostate cancers. *Nutrition Research*, 26, 609-619.
- Masaru Matsuura, A. O. (1993). β -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *Food Science*, 58, 144-147.
- Matsuura M., O. A. & Fukushima D. (1989). Objectionable flavor of soy milk Developed during the soaking of soybeans and its control. *Food Science*, 54, 602-605.
- Miksicek, R. J. (1995). Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208, 44-50.
- Murphy, H. j. W. a. P. A. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric. Food Chem.*, 42, 1666-1673.
- Mykkanen, H., Tikka, J., Pitkanen, T., & Hanninen, O. (1997). Fecal bacterial enzyme activities in infants increase with age and adoption of adult-type diet. *J*

Pediatr Gastroenterol Nutr, 25, 312-316.

Omi, N., Aoi, S., Murata, K., & Ezawa, I. (1994). Evaluation of the effect of soybean milk and soybean milk peptide on bone metabolism in the rat model with ovariectomized osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 40, 201-211.

Park, C. U., Jeong, M. K., Park, M. H., Yeu, J., Park, M. S., Kim, M. J., Ahn, S. M., Chang, P. S., & Lee, J. (2010). Formation of succinyl genistin and succinyl daidzin by *Bacillus species*. *J Food Sci*, 75, C128-133.

Piskula, M. K., Yamakoshi, J., & Iwai, Y. (1999). Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett*, 447(2-3), 287-291.

Ravnikar, V. A. (1987). Compliance with hormone therapy. *Am J Obstet Gynecol*, 156, 1332-1334.

Record, I. R., Jannes, M., Dreosti, I. E., & King, R. A. (1995). Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein in vitro but not in vivo. *Food Chem Toxicol*, 33, 919-922.

Roberfroid, M. B., & Buc Calderon, P. (1995). Free radicals and oxidation phenomena in biological systems. *Marcel Dekker, New York*.

Rosenberg L, H. C., Rosner, B., Belanger, C., Rothman, K.J., Speizer, F.E. (1981). Early menopause and the risk of myocardial infarction. *Am J Obstet Gynecol*, 139, 47-51.

Russo, A., Cardile, V., Lombardo, L., Vanella, L., & Acquaviva, R. (2006). Genistin inhibits UV light-induced plasmid DNA damage and cell growth in human melanoma cells. *J Nutr Biochem*, 17, 103-108.

Setchell, K. D., Borriello, S. P., Hulme, P., Kirk, D. N., & Axelson, M. (1984). Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr*, 40, 569-578.

Setchell, K. D., Brown, N. M., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S., & Heubi, J. E. (2002). Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 76, 447-453.

Setchell, K. D., & Cassidy, A. (1999). Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr*, 129, 758-767.

Setchell, K. D., Lawson, A. M., Borriello, S. P., Harkness, R., Gordon, H., Morgan, D. M., Kirk, D. N., Adlercreutz, H., Anderson, L. C., & Axelson, M. (1981). Lignan formation in man--microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet*, 2, 4-7.

Setlow, B., Cabrera-Hernandez, A., Cabrera-Martinez, R. M., & Setlow, P. (2004). Identification of aryl-phospho-beta-D-glucosidases in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol*, 181, 60-67.

Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., & Barnes, S. (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J Nutr*, 127, 1260-1268.

Shelnutt, S. R., Cimino, C. O., Wiggins, P. A., & Badger, T. M. (2000). Urinary pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9, 413-419.

Kudou Shigemitsu, Y. F., Welti Dieter, Magnolato Daniele, Uchida Teiji, Kitamura Keisuke and Okubo Kazuyoshi (1991). Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* MERILL). *Agric and Biol Chemi*, 55, 2227-2233.

Song, T., Barua, K., Buseman, G., & Murphy, P. A. (1998). Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *Am J Clin Nutr*, 68, 1474-1479.

Potter, J Susan M. A. B., Teng Hongyu, Stillman Rachel J, Shay Neil F, Erdman Jr John W (1998). Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone

density in postmenopausal women. *Amer J Clin Nutr*, 68, 1375-1379.

Tepavcevic, V., Atanackovic, M., Miladinovic, J., Malencic, D., Popovic, J., & Cvejić, J. (2010). Isoflavone composition, total polyphenolic content, and antioxidant activity in soybeans of different origin. *J Med Food*, 13, 657-664.

Toda, T., Uesugi, T., Hirai, K., Nukaya, H., Tsuji, K., & Ishida, H. (1999). New 6-O-acyl isoflavone glycosides from soybeans fermented with *Bacillus subtilis* (natto). I. 6-O-succinylated isoflavone glycosides and their preventive effects on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. *Biol Pharm Bull*, 22, 1193-1201.

Wang, X. L., Hur, H. G., Lee, J. H., Kim, K. T., & Kim, S. I. (2005).

Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 71, 214-219.

Zhuo, X. G., Melby, M. K., & Watanabe, S. (2004). Soy isoflavone intake lowers serum LDL cholesterol: a meta-analysis of 8 randomized controlled trials in humans. *J Nutr*, 134, 2395-2400.

林宜璇 (2008). 大豆之 isoflavone conjugates 及其相關水解酵素之研究. 國立台灣大學碩士論文.

常致綱 (2006). 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. 國立台灣大學碩士論文.

附錄 一

菌種鑑定

Date: 04/28/2011 02:37:00 bioMerieux Vitek
WSVTK-R10.01 Automatic Vitek Lab Report

Page: 1

Vitek ID: 427003-1 (A1-03) Mesophile
Type: Bacillus Card (BACIL)
Status: Final
Elapsed Time: 15 hours
Organism: Bacillus subtilis
Bionumber: 62216767250

NEG -	SUC +	TZR +	TAG -	GLU +	INO -
GAL -	ARA +	XYL -	MAN +	RAF -	SAL -
AGA -	INU +	RIB +	MLT +	TRE +	PLA +
SOR -	NAG +	AMY +	KCN +	NCL +	MEN +
OLD -	NAA +	ARB -	PAS +	NAE -	ESC +
THRM -					

96 % Bacillus subtilis
See Technical Bulletin, note 2.
3 % Bacillus amyloliquefaciens
See Technical Bulletin, note 2.

Date: 04/28/2011 02:37:00 bioMerieux Vitek
WSVTK-R10.01 Automatic Vitek Lab Report

Page: 1

Vitek ID: 427003-2 (A1-02) Mesophile
Type: Bacillus Card (BACIL)
Status: Final
Elapsed Time: 15 hours
Organism: Bacillus subtilis
Bionumber: 62216767250

NEG -	SUC +	TZR +	TAG -	GLU +	INO -
GAL -	ARA +	XYL -	MAN +	RAF -	SAL -
AGA -	INU +	RIB +	MLT +	TRE +	PLA +
SOR -	NAG +	AMY +	KCN +	NCL +	MEN +
OLD -	NAA +	ARB -	PAS +	NAE -	ESC +
THRM -					

96 % Bacillus subtilis
See Technical Bulletin, note 2.
3 % Bacillus amyloliquefaciens
See Technical Bulletin, note 2.

附錄 二

Table of Isotopic Masses and Natural Abundances

This table lists the mass and percent natural abundance for the stable nuclides. The mass of the longest live isotope is given for elements without a stable nuclide. Nuclides marked with an asterisk (*) in the abundance column indicate that it is not present in nature or that a meaningful natural abundance cannot be given. The isotopic mass data is from G. Audi, A. H. Wapstra *Nucl. Phys A.* **1993**, 565, 1-65 and G. Audi, A. H. Wapstra *Nucl. Phys A.* **1993**, 595, 409-480. The percent natural abundance data is from the 1997 report of the IUPAC Subcommittee for Isotopic Abundance Measurements by K.J.R. Rosman, P.D.P. Taylor *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71, 1593-1607.

Z	Name	Symbol	Mass of Atom (u)	% Abundance	Z	Name	Symbol	Mass of Atom (u)	% Abundance
1	Hydrogen	¹ H	1.007825	99.9885	15	Phosphorus	³¹ P	30.973762	100
	Deuterium	² H	2.014102	0.115	16	Sulphur	³² S	31.972071	94.93
	Tritium	³ H	3.016049	*			³³ S	32.971458	0.76
2	Helium	³ He	3.016029	0.000137			³⁴ S	33.967867	4.29
		⁴ He	4.002603	99.999863			³⁶ S	35.967081	0.02
3	Lithium	⁶ Li	6.015122	7.59	17	Chlorine	³⁵ Cl	34.968853	75.78
		⁷ Li	7.016004	92.41			³⁷ Cl	36.965903	24.22
4	Beryllium	⁹ Be	9.012182	100	18	Argon	³⁶ Ar	35.967546	0.3365
5	Boron	¹⁰ B	10.012937	19.9			³⁸ Ar	37.962732	0.0632
		¹¹ B	11.009305	80.1			⁴⁰ Ar	39.962383	99.6003
6	Carbon	¹² C	12.000000	98.93	19	Potassium	³⁹ K	38.963707	93.2581
		¹³ C	13.003355	1.07			⁴⁰ K	39.963999	0.0117
		¹⁴ C	14.003242	*			⁴¹ K	40.961826	6.7302
7	Nitrogen	¹⁴ N	14.003074	99.632	20	Calcium	⁴⁰ Ca	39.962591	96.941
		¹⁵ N	15.000109	0.368			⁴² Ca	41.958618	0.647
8	Oxygen	¹⁶ O	15.994915	99.757			⁴³ Ca	42.958767	0.135
		¹⁷ O	16.999132	0.038			⁴⁴ Ca	43.955481	2.086
		¹⁸ O	17.999160	0.205			⁴⁶ Ca	45.953693	0.004
9	Fluorine	¹⁹ F	18.998403	100			⁴⁸ Ca	47.952534	0.187
10	Neon	²⁰ Ne	19.992440	90.48	21	Scandium	⁴⁵ Sc	44.955910	100
		²¹ Ne	20.993847	0.27	22	Titanium	⁴⁶ Ti	45.952629	8.25
		²² Ne	21.991386	9.25			⁴⁷ Ti	46.951764	7.44
11	Sodium	²³ Na	22.989770	100			⁴⁸ Ti	47.947947	73.72
12	Magnesium	²⁴ Mg	23.985042	78.99			⁴⁹ Ti	48.947871	5.41
		²⁵ Mg	24.985837	10.00			⁵⁰ Ti	49.944792	5.18
		²⁶ Mg	25.982593	11.01	23	Vanadium	⁵⁰ V	49.947163	0.250
13	Aluminum	²⁷ Al	26.981538	100			⁵¹ V	50.943964	99.750
14	Silicon	²⁸ Si	27.976927	92.2297	24	Chromium	⁵⁰ Cr	49.946050	4.345
		²⁹ Si	28.976495	4.6832			⁵² Cr	51.940512	83.789
		³⁰ Si	29.973770	3.0872			⁵³ Cr	52.940654	9.501
							⁵⁴ Cr	53.938885	2.365
					25	Manganese	⁵⁵ Mn	54.938050	100
					26	Iron	⁵⁴ Fe	53.939615	5.845
							⁵⁶ Fe	55.934942	91.754