

研究报告

## 米曲霉 M-4 降解己烯雌酚的条件优化

胡凯弟<sup>1</sup> 柴先杜<sup>1</sup> 陈树平<sup>1</sup> 邓维琴<sup>1</sup> 周康<sup>1,2</sup> 刘书亮<sup>1,2\*</sup>

(1. 四川农业大学食品学院 四川 雅安 625014)

(2. 四川农业大学 食品加工与安全研究所 四川 雅安 625014)

**摘要:** 【目的】以米曲霉(*Aspergillus oryzae*) M-4 对己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)的降解率为响应值,对其降解条件进行优化。【方法】采用 Plackett-Burman 法对培养基组分和降解条件筛选显著性影响因素,并通过 Box-Bohnken 设计试验优化降解条件。【结果】最优培养基配方为:蛋白胨 1.3%, CaCl<sub>2</sub> 0.045%, 葡萄糖 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%, NaCl 0.05%, Tween 80 0.2%, DES 质量浓度 44 mg/L;最优培养条件为:初始 pH 7.5, 种龄 72 h, 转速 140 r/min, 培养温度 28 °C, 培养时间 72 h。【结论】在最优条件下菌株 M-4 对 DES 降解率为 83.89%,比优化前(60.98%)提高 1.38 倍,差异极显著( $P<0.01$ )。

**关键词:** 己烯雌酚, 米曲霉, 降解条件, 优化

## Optimization of diethylstilbestrol degradation by *Aspergillus oryzae* M-4

HU Kai-Di<sup>1</sup> CHAI Xian-Du<sup>1</sup> CHEN Shu-Ping<sup>1</sup> DENG Wei-Qin<sup>1</sup>

ZHOU Kang<sup>1,2</sup> LIU Shu-Liang<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

(2. Research Institute of Food Processing and Security, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

**Abstract:** [Objective] We optimized degradation conditions for diethylstilbestrol (DES) by *Aspergillus oryzae* M-4. [Methods] Medium components and culture conditions were screened by using Plackett-Burman method. The degradation conditions were then optimized through Box-Bohnken design. [Results] The optimal medium was composed of 1.3% peptone, 0.045% CaCl<sub>2</sub>, 0.5% glucose, 0.15% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% NaCl, 0.2% Tween 80 and 44 mg/L diethylstilbestrol. The optimal culture conditions were as follows: initial pH 7.5, inoculum age 72 h, rotation rate 140 r/min, culture temperature 28 °C, culture time 72 h. [Conclusion] Under the optimal conditions, the degradation rate of diethylstilbestrol was 83.89%, 1.38-fold over the value before optimization

**Foundation item:** Agriculture Science Technology Achievement Transformation Fund Project of Sichuan Province (No. 14NZ0012)

\*Corresponding author: Tel: 86-835-28823111; E-mail: lsliang999@163.com

Received: March 23, 2016; Accepted: May 30, 2016; Published online (www.cnki.net): June 08, 2016

基金项目: 四川省农业科技成果转化资金项目(No. 14NZ0012)

\*通讯作者: Tel: 86-835-28823111; E-mail: lsliang999@163.com

收稿日期: 2016-03-23; 接受日期: 2016-05-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-06-08

(60.98%), showing a significant difference ( $P < 0.01$ ).

**Keywords:** Diethylstilbestrol, *Aspergillus oryzae*, Degradation, Optimization

己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)又名乙萘酚, 是一种人工合成的非甾体类雌激素, 于1938年被制造出来; 由于具有与天然雌素酮、雌二醇等同样的生物特性且成本低廉, 被广泛用于临床上保胎、避孕、内分泌失调治疗以及畜牧业中促进牲畜生长、催情等<sup>[1-3]</sup>。研究发现 DES 同大多数环境雌激素(Environmental estrogens, EEs)一样, 具有生殖毒性和神经毒性<sup>[4-5]</sup>, 会导致生物体肥胖<sup>[6]</sup>、内分泌失调<sup>[7]</sup>, 甚至诱发流产、乳腺癌、前列腺癌、生殖畸形等恶性病症<sup>[1,8]</sup>, 许多国家已禁止使用。但是环境中仍有大量 DES 残留<sup>[9]</sup>, 并会通过食物链传播而形成生物富集<sup>[10]</sup>, 如在肉<sup>[11-12]</sup>、奶<sup>[13]</sup>、蛋<sup>[14]</sup>等动物源食品中均检出 DES, 情况不容乐观。如何消除环境中的 DES 已成为亟需解决的问题。

目前消除 DES 或 EEs 的方法有氧化降解法、吸附法和生物降解法<sup>[15-16]</sup>。生物降解由于其高效、廉价、绿色、简便等优点而受到广泛关注。米曲霉(*Aspergillus oryzae*) M-4 是一株可降解 DES 的丝状真菌, 其在 MM 培养基中培养 5 d 对 25 mg/L 的 DES 降解率为 53.38%<sup>[17]</sup>。本试验采用 Plackett-Burman 设计确定影响 M-4 降解 DES 的主要因素, 利用响应面分析法优化其降解条件, 旨在为更好地利用该菌株进行生物修复应用提供数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养基

**1.1.1 菌株:** 米曲霉(*Aspergillus oryzae*) M-4, 由四川农业大学食品学院微生物实验室从酱油曲中分离鉴定并保存<sup>[18]</sup>。

**1.1.2 培养基:** 基础无机盐培养基(MM, g/L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5, NaCl 0.5,  $\text{MgSO}_4$  0.2, Tween 80 2.0, 超纯水溶解并定容至 1.0 L, pH 7.5, 作为初始培养基。

葡萄糖马铃薯琼脂培养基(PDA, g/L): 新鲜去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, Tween 80 2.0, 琼脂 20.0, 蒸馏水定容至 1.0 L, pH 7.0。

孢子洗脱液: Tween 80 0.2 g, 琼脂 0.01 g, 蒸馏水 100 mL;

以上培养基和洗脱液均  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 15 min。

### 1.2 主要试剂和仪器

己烯雌酚(DES, 纯度为 99.5%), 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司; 甲醇(HPLC), 瑞典 Oceanpak 公司。

DES 母液配制: 准确称取适量 DES, 用无水乙醇溶解并定容, 配制成 5 g/L 母液备用。

LC-10A2010C HT 型液相色谱仪, LC-Solution 工作站, 日本 Shimadzu 公司; Milli-Q 超纯水仪, 美国 Millipore 公司; AS10200A 超声波清洗器, 天津奥特赛恩斯公司; Sorvall ST 16R 冷冻离心机, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 培养液的制备:** 取菌株 M-4 划线于 PDA 斜面, 28 °C 培养 72 h 进行活化。挑取活化好的菌株连续两次划线于含 DES 的 PDA 斜面(DES 质量浓度: 50 mg/L)进行驯化(28 °C, 72 h); 用 5 mL 孢子洗脱液洗下菌体并调整孢子浓度为  $10^8$  CFU/mL, 制成种子液。

将种子液按 5% (体积比)接种于 DES 浓度为 100 mg/L 的 MM 培养基中, 28 °C、120 r/min 振荡培养 72 h。

**1.3.2 DES 的提取及测定:** 取整瓶培养液加入等体积甲醇, 超声(40 kHz, 300 W)辅助提取 30 min, 摇匀后取 2 mL 至刻度试管, 甲醇定容至 10 mL; 取 1.5 mL 离心(12 000 r/min, 15 min); 吸取上清过 0.45  $\mu\text{m}$  有机相滤膜, 弃去初滤液, 取续滤液供 HPLC 分析用<sup>[17]</sup>。

HPLC 检测条件<sup>[17]</sup>: 色谱柱为 Sepax GP-C18

柱(150 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 流动相为甲醇:超纯水=70:30 (体积比), 流速 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL; 紫外检测器波长: 242 nm。

$$\text{降解率计算公式: 降解率(\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100$$

$C_0$  为 0 h 培养液中 DES 质量浓度(mg/L);  $C$  为 3 d 培养液中 DES 残留质量浓度(mg/L)。

**1.3.3 培养基组分单因素优化:** (1) 最适氮源: 在初始培养基中将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分别替换成 1% (质量比) 的蛋白胨、胰蛋白胨、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  进行最适氮源的筛选<sup>[19]</sup>。采用 1.3.2 方法测定 DES 残留量, 计算 DES 的最大降解率, 选择最适氮源进行下一步试验。每组试验重复 3 次, 取平均值, 下同。

(2) 最适碳源: 在初始培养基中将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 替换为最适氮源后, 将初始培养基中 DES 减少为原来的 50% (100 mg/L 减少为 50 mg/L, 下同), 添加 0.5% (质量比) 淀粉、葡萄糖, 进行最适外加碳源筛选, 以未添加作对照<sup>[20]</sup>。采用 1.3.2 方法测定 DES 残留量, 计算 DES 的最大降解率, 选择最适碳源进行下一步试验。

(3) 最适无机盐: 将初始培养基中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 替换为最适氮源并添加最适碳源后, 分别添加 0.05% (质量比)  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{MgSO}_4$  进行最适无机盐筛选<sup>[21]</sup>, 同时以初始培养基(DES 质量浓度 50 mg/L)为对照, 考察培养基组分优化效果。采用 1.3.2 方法测定 DES 残留量, 计算 DES 的最大降解率, 根据降解率分析得出最适无机盐, 并将初始培养基中 DES 降解率作为初始降解率。

**1.3.4 Plackett-Burman 设计筛选影响米曲霉 M-4 对 DES 降解的显著影响因素:** 采用 Plackett-Burman 设计, 以最少的试验次数快速筛选影响菌株 M-4 降解 DES 的显著影响因素。运用 Minitab 软件进行数据处理, 对各因素进行  $t$  检验, 通过比较各因素的  $P$  值, 选择置信度高的因素作为显著影响因素<sup>[22]</sup>。

**1.3.5 响应面优化发酵条件:** 利用最陡爬坡试验设计快速逼近最优区域, 确定响应面设计的中心点。根据 Box-Bohnken 中心组合设计原理, 采用

Design-Expert V8.05 软件对数据进行统计和分析, 进而确定各显著影响因素的最优水平<sup>[23]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 确定降解 DES 培养基组分单因素

**最适氮源。**在初始培养基中将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  替换成 1% (质量比) 的不同氮源, 结果如图 1 所示。由图 1 可知, 相比于初始培养基中的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 供试菌株更倾向于利用有机氮源<sup>[24]</sup>, 当替换为无机氮源  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  时米曲霉 M-4 对 DES 降解能力略有下降。使用蛋白胨时菌株降解率最高, 可能是培养体系更为丰富, 菌丝生长更好, 进而 DES 降解能力提高, 因此选择蛋白胨为最适氮源进行下一步试验。

**最适碳源。**根据试验分析可知, DES 在培养基中不仅作为底物, 也可作为碳源和能源物质。因此, 在初始培养基中将氮源替换成 1% (质量比) 的蛋白胨后将 DES 减半, 同时分别添加其他碳源物质 0.1% (质量比), 考察外加碳源对发酵条件的影响。结果如图 2 所示, 相比于对照组, 在培养体系中添加葡萄糖时 DES 降解率有所提高, 添加淀粉时略下降, 这与李建龙等<sup>[25]</sup>的结果相类似; 因此确定葡萄糖为最适外加碳源。

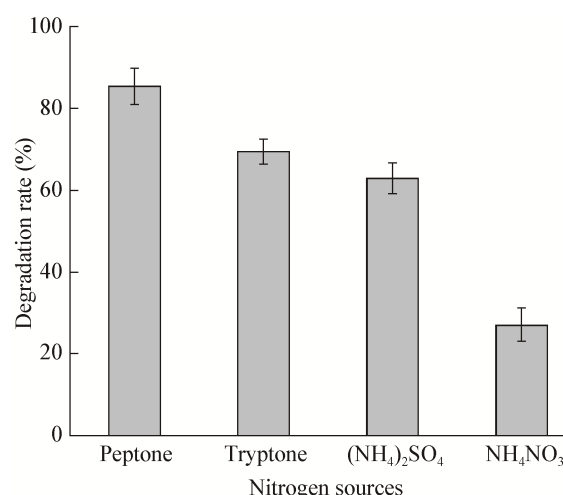


图 1 不同氮源对米曲霉 M-4 降解 DES 的影响

Figure 1 Effects of different nitrogen sources on the degradation of DES by *Aspergillus oryzae* M-4

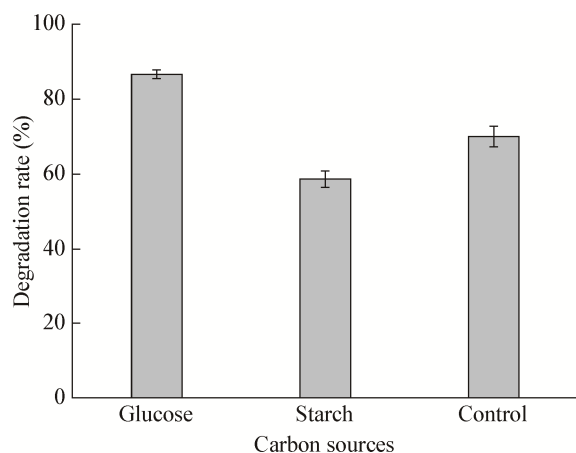


图2 不同碳源对米曲霉 M-4 降解 DES 的影响

Figure 2 Effects of different carbon sources on the degradation of DES by *Aspergillus oryzae* M-4

最适无机盐。在初始培养基中将替换成最适氮碳源蛋白胨 1% (质量比)、葡萄糖 0.1% (质量比) 后, 分别添加无机盐 0.05% (质量比), 结果见图 3。可以看出,  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  对菌株降解 DES 均有一定的促进作用; 而  $\text{Mn}^{2+}$  相反; 添加  $\text{CaCl}_2$  时 DES 降解率最高, 为 83.44%, 因此选择  $\text{CaCl}_2$  作为最适无机盐; 同时该降解率远高于初始降解率(图 3 中 Control) 60.98%, 表明培养基组分优化效果明显。

## 2.2 Plackett-Burman 设计筛选影响米曲霉 M-4 对 DES 降解的显著因素

根据试验结果, 对可能影响菌株 M-4 降解 DES 的 7 个因素(培养基中 DES、蛋白胨、葡萄

糖、 $\text{CaCl}_2$  的含量及培养基初始 pH 值、摇床转速、种龄)进行快速筛选。以 M-4 对 DES 的降解率为响应值(Y), 各因素分别取两水平, 选用  $N=12$  的 Plackett-Burman 设计, 并设计 5 个空白作为误差分析项, 各水平因素的效应值和显著性分析结果见表 1。可以看出, 培养基中 DES、蛋白胨及  $\text{CaCl}_2$  含量 3 个因素对降解率影响显著( $P<0.05$ ), 选择这 3 个因素做后续试验。

## 2.3 显著影响因素最优水平的确定

2.3.1 响应面实验中心点的确定——最陡爬坡法: 由 Plackett-Burman 设计得到 3 个显著影响因素(DES、蛋白胨以及  $\text{CaCl}_2$  含量)。DES 和  $\text{CaCl}_2$  含量

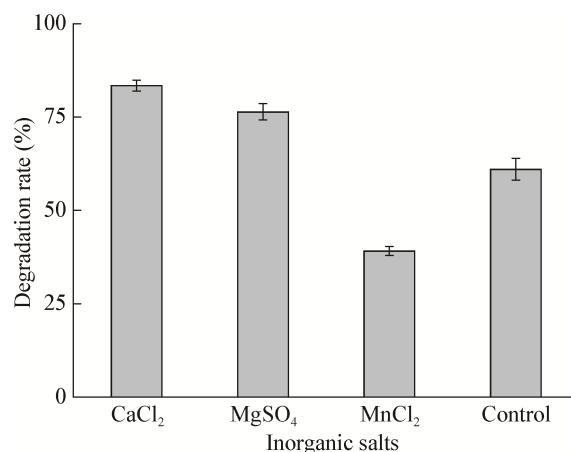


图3 不同无机盐对米曲霉 M-4 降解 DES 的影响

Figure 3 Effects of different inorganic salts on the degradation of DES by *Aspergillus oryzae* M-4

表 1 Plackett-Burman 设计的各因素水平及效应评价  
Table 1 Factors, levels and effect evaluation of Plackett-Burman design

因素 Factors	水平 Levels		效应 Effects	显著性检验 Test of significance	
	Low (+1)	High (-1)		t value	P value
DES (mg/L)	50.00	60.00	-0.020 00	-1.49	0.007**
蛋白胨 Peptone (%)	1.00	1.20	1.126 00	1.64	0.003**
葡萄糖 Glucose (%)	0.50	0.60	-1.030 00	-0.79	0.169
$\text{CaCl}_2$ (%)	0.05	0.06	-17.230 00	-1.26	0.022*
摇床转速 Shaker speed (r/min)	120.00	140.00	0.000 27	0.17	0.943
种龄 Inoculum age (h)	72.00	96.00	0.067 10	0.48	0.373
初始 pH Initial pH	7.00	7.50	0.113 00	0.52	0.454

注: \*\*: 极显著,  $P<0.01$ ; \*: 显著,  $P<0.05$ .

Note: \*\*: Highly significant,  $P<0.01$ ; \*: Significant,  $P<0.05$ .

有显著负效应, 应减少; 蛋白胨含量有显著正效应, 应增加。最陡爬坡试验结果见表 2。由表 2 可知, 各因素的最优值在第 2 组附近, 因此确定响应面中心点取值为 DES 含量 45 mg/L, 蛋白胨含量为 1.25%,  $\text{CaCl}_2$  为 0.045%。而其他非显著因素根据其效应值判定取值方向, 取值如下: 葡萄糖 0.5%, 初始 pH 7.5, 转速 140 r/min, 种龄 72 h, 培养温度 28 °C, 培养时间 72 h。

**2.3.2 响应面优化实验:** 根据 Plackett-Burman 设计和最陡爬坡试验结果, 选择 DES 和蛋白胨以及  $\text{CaCl}_2$  含量 3 个显著影响因素进行 3 因素 5 水平的 Box-Bohnken 响应面优化试验。因素水平编码见表 3, 结果见表 4。

利用 Design-Expert V8.05 对表 4 中试验数据进行多元回归拟合, 得到  $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_3$  的三元二次回归方程如下, 分析结果见表 5。

$$Y=86.02 - 6.45X_1 + 8.57X_2 + 3.64X_3 + 1.56X_1X_2 + 2.53X_1X_3 + 9.11X_2X_3 - 11.30X_1^2 - 17.60X_2^2 - 4.62X_3^2。$$

表 2 最陡爬坡试验结果 Table 2 The results of steep hills				
组号 Group No.	DES (mg/L)	蛋白胨 Peptone (%)	$\text{CaCl}_2$ (%)	降解率 Degradation rate (%)
1	50	1.20	0.050	74.59
2	45	1.25	0.045	85.54
3	40	1.30	0.040	81.53
4	35	1.35	0.035	80.35
5	30	1.40	0.030	71.94

表 3 响应面分析实验因素水平表 Table 3 The levels of the factors for the response surface analysis				
因素 Factors	符号代码 Symbol code	水平 Levels		
		-1	0	1
DES (mg/L)	$X_1$	40.000	45.000	50.000
蛋白胨 Peptone (%)	$X_2$	1.100	1.250	1.400
$\text{CaCl}_2$ (%)	$X_3$	0.040	0.045	0.050

表 4 Box-Behnken 响应面设计及结果 Table 4 The results of the response surface analysis				
试验号 Run order	$X_1$	$X_2$	$X_3$	降解率 Degradation rate (%)
1	-1	-1	0	56.19
2	-1	0	1	72.70
3	-1	0	-1	78.37
4	-1	1	0	72.96
5	0	0	0	89.56
6	0	0	0	85.16
7	0	-1	1	55.06
8	0	0	0	83.34
9	0	1	-1	54.31
10	1	-1	0	38.17
11	1	0	-1	62.44
12	1	0	1	66.89
13	1	1	0	61.16
14	0	-1	-1	58.12
15	0	1	1	87.71

由表 5 可知, 该二次模型显著( $P<0.05$ ), 且失拟项不显著( $P>0.05$ ); 经计算该模型决定系数  $R^2$  为 0.945 8, 说明该回归方程拟合程度较好; 校正决定系数  $R^2_{adj}$  为 0.848 1, 说明 84.81% 的变异能由该模型解释。拟合方程一次项  $X_1$  对降解率影响显著( $P<0.05$ ),  $X_2$  极显著( $P<0.01$ ); 二次项  $X_1^2$  对降解率影响显著( $P<0.05$ ),  $X_2^2$  极显著( $P<0.01$ ), 说明 DES 和蛋白胨含量均对降解率影响显著且后者较前者影响程度大。此外交互项  $X_2X_3$  对降解率影响显著( $P<0.05$ ),  $X_1X_2$  和  $X_1X_3$  均不显著, 如图 4-6 所示。

**2.3.3 最佳降解条件的确定:** 结合回归模型, 在模型预测的条件(培养基中 DES 含量为 43.84 mg/L、蛋白胨含量为 1.270%和  $\text{CaCl}_2$  含量为 0.045 4%)结合其他确定条件(葡萄糖 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.15%, Tween 80 0.2%,  $\text{NaCl}$  0.05%, pH 7.5, 转速 140 r/min, 28 °C 培养 72 h), 米曲霉 M-4 对 DES 理论最大降解率为 85.05%。在此条件下, 验证试验结果为 83.89%, 预测值和实测值拟合性较好。

表 5 回归分析表  
Table 5 The regression analysis form

变异来源 Sources of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	2 929.71	9	325.52	9.69	0.011 1*
$X_1$	332.30	1	332.30	9.89	0.025 5*
$X_2$	588.24	1	588.24	17.50	0.008 6**
$X_3$	106.00	1	106.00	3.15	0.135 9
$X_1X_2$	9.67	1	9.67	0.29	0.614 6
$X_1X_3$	25.60	1	25.60	0.76	0.422 7
$X_2X_3$	332.33	1	332.33	9.89	0.025 5*
$X_1^2$	471.47	1	471.47	14.03	0.013 4*
$X_2^2$	1 143.73	1	1 143.73	34.03	0.002 1**
$X_3^2$	78.81	1	78.81	2.35	0.186 2
残差 Residual	168.02	5	33.60		
失拟项 Lack of fit	147.57	3	49.19	4.81	0.176 9
纯误差 Pure error	20.45	2	10.23		
总和 Cor total	3 097.73	14			
$R^2=0.945\ 8$			$R^2_{adj}=0.848\ 1$		

注：\*\*：极显著， $P<0.01$ ；\*：显著， $P<0.05$ 。

Note: \*\*: Highly significant,  $P<0.01$ ; \*: Significant,  $P<0.05$ .

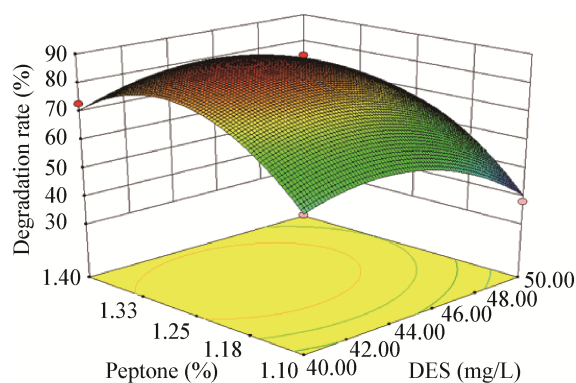


图 4 DES 和蛋白胨含量对降解率的响应面分析  
Figure 4 Response surface plots for the effects of DES and peptone content on degradation rate

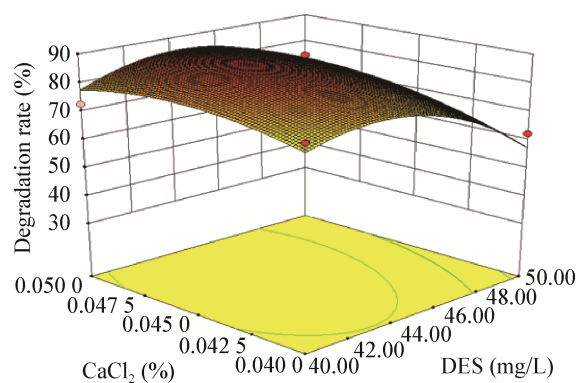


图 5 DES 和  $\text{CaCl}_2$  含量对降解率的响应面分析  
Figure 5 Response surface plots for the effects of DES and  $\text{CaCl}_2$  content on degradation rate



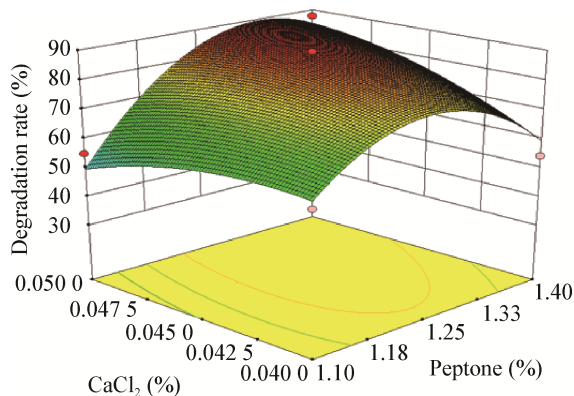


图 6 蛋白胨和  $\text{CaCl}_2$  含量对降解率的响应面分析

Figure 6 Response surface plots for the effects of peptone and  $\text{CaCl}_2$  content on degradation rate

### 3 结论与讨论

米曲霉在食品工业中发挥着不可替代的作用<sup>[26]</sup>, 也可在畜牧养殖中作为饲料添加剂<sup>[27]</sup>。已见报道的 DES 降解菌来源于被污染地区, 且均为细菌<sup>[28-29]</sup>, 分离自食品并可降解 DES 的益生真菌还鲜见报道, 米曲霉 M-4 的来源和安全性使其可以应用于食品环境。适当地改变培养体系中氮源成分或浓度, 有助于提高微生物对异生物质的降解能力<sup>[30]</sup>。本试验中菌株 M-4 更倾向于有机氮源, 这与周波等<sup>[24]</sup>的报道相一致。Polymenakou 等<sup>[31]</sup>在苯酚降解菌的培养基中使用外加碳源时发现, 苯酚降解率下降明显, 推测是外加碳源与底物发生竞争抑制性作用的结果。有学者发现在可利用碳源浓度低时, 外加生长基质并不抑制反而会加速微生物对异生物质的降解<sup>[20]</sup>, 本试验结果也是如此。通常逐因子法优化发酵条件存在工作量大、耗时长等不足之处, 后期结合正交试验也未能有效利用实验数据。本试验先采用单因素试验筛选最佳氮源、碳源和无机盐; 其次通过 Plackett-Burman 设计结合最陡爬坡法, 以较少的试验次数从较多因素中快速筛选影响菌株 M-4 降解 DES 的关键因素; 最后利用 Box-Behnken 响应面优化了 DES 的降解条件, 达到了快速、有效的目的, 为 M-4 的实际应用提供了数据参考。

经过优化后培养基配方为: 蛋白胨 1.3%,  $\text{CaCl}_2$  0.045%, 葡萄糖 0.5%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.15%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%,  $\text{NaCl}$  0.05%, Tween 80 0.2%, DES 质量浓度 44 mg/L。最佳培养条件为: 初始 pH 7.5, 种龄 72 h, 转速 140 r/min, 培养温度 28 °C, 培养时间 72 h。在此条件下菌株 M-4 对 DES 降解率为 83.89%, 比优化前(初始降解率 60.98%)提高 1.38 倍, 经 SPSS V22 软件分析, 差异极显著( $P < 0.01$ )。

### 参考文献

- [1] Giusti RM, Iwamoto K, Hatch EE. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects[J]. *Annals of Internal Medicine*, 1995, 122(10): 778-788
- [2] Huang F, Ye SH, Gong ZM. The development of diethylstilbestrol[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2007, 34(2): 51-54 (in Chinese)  
黄芳, 叶绍辉, 龚振明. 己烯雌酚的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(2): 51-54
- [3] Ariazi EA, Ariazi JL, Cordera F, et al. Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2006, 6(3): 181-202
- [4] Safe S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem[J]. *Toxicology*, 2004, 205(1/2): 3-10
- [5] Ryan BC, Vandenberg JG. Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice[J]. *Hormones and Behavior*, 2006, 50(1): 85-93
- [6] Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. Environmental estrogens and obesity[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 304(1/2): 84-89
- [7] Tokumoto T, Tokumoto M, Horiguchi R, et al. Diethylstilbestrol induces fish oocyte maturation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(10): 3686-3690
- [8] Qin LQ, Wang PY, Kaneko T, et al. Estrogen: one of the risk factors in milk for prostate cancer[J]. *Medical Hypotheses*, 2004, 62(1): 133-142
- [9] Hernando MD, Mezcuca M, Fernández-Alba AR, et al. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments[J]. *Talanta*, 2006, 69(2): 334-342
- [10] Katagi T. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms[A]//Whitacre DM. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*[M]. New York: Springer, 2010: 1-132
- [11] Nazli B, Çolak H, Aydın A, et al. The presence of some anabolic residues in meat and meat products sold in Istanbul[J]. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2005, 29(3): 691-699
- [12] Xu CL, Chu XG, Peng CF, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of diethylstilbestrol residues in chicken and liver tissues[J]. *Biomedical Chromatography*, 2006, 20(10): 1056-1064
- [13] Wang L, Zhang Y, Gao X, et al. Determination of chloramphenicol residues in milk by enzyme-linked immunosorbent assay: improvement by biotin-streptavidin-amplified system[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(6): 3265-3270
- [14] Xu CL, Wang HT, Peng CF, et al. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of diethylstilbestrol residues[J]. *Biomedical Chromatography*, 2006, 20(12):

- 1390-1394
- [15] Zhang QS, Tang XS, Sun YY, et al. Degradation of diethylstilbestrol in aqueous solution by US-Fenton[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(21): 215-218,223 (in Chinese)  
张秋香, 唐晓妹, 孙媛媛, 等. US-Fenton法降解水中的己烯雌酚[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 215-218,223
- [16] Wei J, He YX, Wang S. Removal of diethylstilbestrol in environmental waters by dispersive solid-phase extraction using Graphene/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanocomposite as adsorbent[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2012, 31(10): 1223-1228 (in Chinese)  
危晶, 何奕轩, 王遂. 石墨烯/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米材料分散固相萃取环境水样中的己烯雌酚[J]. 分析测试学报, 2012, 31(10): 1223-1228
- [17] Deng WQ, Li AS, Peng X, et al. Determination of diethylstilbestrol in microbial degradation systems by HPLC-UV[J]. Food & Machinery, 2016, 32(1): 51-55 (in Chinese)  
邓维琴, 李阿霜, 彭贤, 等. 高效液相色谱-紫外检测法测定微生物降解体系中己烯雌酚含量[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 51-55
- [18] Yu ZQ, Chi YL, Gao H, et al. Condition of 3-phenylboronic acid degradation enzyme produced by *Aspergillus oryzae* and character of the enzyme[J]. Food Science and Technology, 2014, 39(6): 17-20 (in Chinese)  
喻志强, 迟原龙, 高涵, 等. 米曲霉产 3-苯氧基苯甲酸降解酶条件及酶性质的研究[J]. 食品科技, 2014, 39(6): 17-20
- [19] Zhou MZ, Liu YY, Li QY, et al. Effects of additional nutritional sources on degradation of cypermethrin by strain GF31[J]. Environmental Protection of Chemical Industry, 2009, 29(5): 398-401 (in Chinese)  
周茂钟, 刘幽燕, 李青云, 等. 外加营养源对氯氰菊酯降解菌 GF31 降解特性的影响[J]. 化工环保, 2009, 29(5): 398-401
- [20] Grant RJ, Betts WB. Mineral and carbon usage of two synthetic pyrethroid degrading bacterial isolates[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 97(3): 656-662
- [21] Deng WQ, Liu SL, Yao K, et al. Study on the influence of environmental conditions and intermediates of phenol degradation by a 3-phenoxybenzoic acid degrading strain *Sphingomonas* sp. SC-1[J]. Microbiology China, 2015, 42(3): 497-503 (in Chinese)  
邓维琴, 刘书亮, 姚开, 等. 3-苯氧基苯甲酸降解菌 *Sphingomonas* sp. SC-1 降解苯酚环境条件及其降解中间产物的研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(3): 497-503
- [22] Yue K, Chen ZM, Kai L, et al. Response surface methodology to optimize lipase production fermentation conditions by *Candida lipolytica*[J]. Bulletin of Science and Technology, 2008, 24(6): 810-814,831 (in Chinese)  
岳珂, 陈振明, 开雷, 等. 响应面法优化解酯假丝酵母 *Candida lipolytica* 产脂肪酶发酵条件[J]. 科技通报, 2008, 24(6): 810-814,831
- [23] Tang J, Yao K, Jia DY, et al. Isolation and characterization of beta-cypermethrin degrading strain and its condition optimization[J]. Journal of Sichuan University (Engineering Science Edition), 2013, 45(4): 176-180 (in Chinese)  
唐洁, 姚开, 贾冬英, 等. 高效氯氰菊酯降解菌的分离与鉴定及其降解条件优化[J]. 四川大学学报: 工程科学版, 2013, 45(4): 176-180
- [24] Zhou B, Pu YW, Zhu MJ, et al. Effects of nitrogen sources on *Monascus* pigment production by *Monascus* mutant[J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(2): 123-127 (in Chinese)  
周波, 浦跃武, 朱明军, 等. 氮源对红曲霉突变株产黄色素的影响[J]. 现代食品科技, 2008, 24(2): 123-127
- [25] Li JL, Wang ZL, Liu SL, et al. Optimization of fermentation conditions for production of 3-phenoxyzoic acid-degrading enzyme by *Sphingomonas* sp.[J]. Food Science, 2014, 35(19): 138-143 (in Chinese)  
李建龙, 王志龙, 刘书亮, 等. 鞘氨醇单胞菌产 3-苯氧基苯甲酸降解酶发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 138-143
- [26] Couto SR, Sanromán MÁ. Application of solid-state fermentation to food industry-a review[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 76(3): 291-302
- [27] Lee KW, Lee SK, Lee BD. *Aspergillus oryzae* as probiotic in poultry-a review[J]. International Journal of Poultry Science, 2006, 5(1): 1-3
- [28] Xu RF, Sun MX, Liu J, et al. Isolation, identification and characterization of a diethylstilbestrol-degrading bacterial strain *Serratia* sp.[J]. Environmental Science, 2014, 35(8): 3169-3174 (in Chinese)  
徐冉芳, 孙敏霞, 刘娟, 等. 己烯雌酚降解菌株沙雷氏菌的分离鉴定及其降解特性[J]. 环境科学, 2014, 35(8): 3169-3174
- [29] Zhang WW, Niu ZL, Liao CY, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain capable of degrading diethylstilbestrol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 4095-4104
- [30] Xie WJ, Zhou JM, Wang HY, et al. Effect of nitrogen on the degradation of cypermethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid in soil[J]. Pedosphere, 2008, 18(5): 638-644
- [31] Polymenakou PN, Stephanou EG. Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil *Pseudomonas*[J]. Biodegradation, 2005, 16(5): 403-413