

鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium* sp.) JCR5 降解 17 α -乙炔基雌二醇的代谢途径

任海燕, 纪淑兰*, 崔成武, 王道

(北京工业大学环境与能源工程学院, 北京 100022)

摘要: 从北京某避孕药厂污水处理站曝气池的活性污泥中分离得到 1 株能够以 17 α -乙炔基雌二醇 (17 α -ethynylestradiol, EE2) 为唯一碳源和能源生长的菌株 JCR5. 通过对其形态特征、生理生化以及 16S rDNA 序列分析, 鉴定该菌株为鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium* sp.). 菌株 JCR5 在 10d 内对初始底物浓度为 30 mg·L⁻¹ EE2 的降解率可达 87%. 该菌株能够利用甾体雌激素 (甾酮、17 β -雌二醇、雌三醇以及炔雌醇甲醚)、避孕药生产中间体以及一些芳烃化合物为唯一碳源生长. 对 EE2 降解中间产物进行质谱分析推测, EE2 在降解过程中首先被氧化为雌酮 (estrone, E1), 后经过一系列生物催化作用生成 2-羟基-2, 4-二烯-戊酸和 2-羟基-2, 4-二烯-1, 6-己二酸 2 种中间代谢产物. 前者是与 *Comamonas testosteroni* TA441 代谢甾酮的途径类似的产物, 而后者是 3-羟基-4, 5-9, 10-二断雌甾烷-1(10), 2-二烯-5, 9, 17-三酮基-4-酸不同于前者断键位置的另一产物.

关键词: 17 α -乙炔基雌二醇; 鞘氨醇杆菌属; 代谢途径; 生物降解

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)09-1835-06

Degradation pathway of 17 α -Ethinylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5

REN Hai-yan, JI Shu-lan, CUI Cheng-wu, WANG Dao

(College of Environment and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100022, China)

Abstract: A bacterial strain, JCR5, which degrades 17 α -ethinylestradiol (EE2), was isolated from activated sludge of wastewater treatment plant treating wastewater from pharmacy factory mainly producing contraceptive medicine in Beijing, China. Based on its morphology, physiology biochemical properties and 16S rDNA sequence analysis, this strain was identified as *Sphingobacterium* sp. JCR5. Strain JCR5 can grow on EE2 as sole carbon and energy source. The degradation process for EE2 with initial concentration of 30 mg·L⁻¹ was studied, and the result indicated that the degradation rate of EE2 within 10 days was 87%. Experiments of different substrates showed that strain JCR5 can grow on many substrates other than EE2 such as several steroidal estrogens (estrone, 17 β -estradiol, estriol and mestranol), the intermediates in contraceptive medicine processing and some aromatic compounds. Mass spectrum analysis demonstrated that EE2 was oxygenized to estrone (E1) firstly, and 2-hydroxy-2, 4-dienevaleric acid and 2-hydroxy-2, 4-diene-1, 6-dioic acid were the main catabolic intermediates during EE2 degradation. The former adopted a pathway that was analogical to the pathway of the previously reported testosterone-degrading *Comamonas testosteroni* TA441, and the latter was a metabolite with a different cleavage position of 3-hydroxy-4, 5-9, 10-disicoestrane-1(10), 2-diene-5, 9, 17-trione-4-oic acid from the former.

Key words: *Sphingobacterium* sp.; 17 α -ethinylestradiol; biodegradation; degradation pathway

合成 17 α -乙炔基雌二醇 (ethinylestradiol, EE2) 是口服避孕药及激素补充用药的主要成分, 主要由女性和雌性动物经尿液排出, 经污水处理厂处理后进入水体^[1]. EE2 属甾体雌激素, 是生物活性较强的环境内分泌干扰物之一. 即使在很低的浓度下, 也能显示出较强的内分泌干扰作用. 例如, 1 ng·L⁻¹ 的 EE2 就能够导致雄性虹鳟鱼体内产生卵黄蛋白原, 而正常情况下, 卵黄蛋白原只在成年雌性动物体内产生^[2]; 4 ng·L⁻¹ 的 EE2 就能够导致黑头呆鱼难以形成正常的第二性特征^[3]. 许多国家的污水处理厂出水中, 如英国^[2, 4~8]、德国^[9]、意大利^[10]、荷兰^[10, 11]、瑞典^[12]以及美国^[13]、加拿大^[9, 14]和以色列^[15]都监测到了包括 EE2 在内的 ng·L⁻¹ 浓

度范围的甾体雌激素. 由于 EE2 具有潜在的内分泌干扰作用, 并且普通水处理方法难以有效地去除水中 EE2^[13], 利用微生物降解该类化合物逐渐引起人们的重视. 迄今为止, 获得能够降解 EE2 的微生物菌种资源十分有限. 目前已知的仅为 Takashi Makino 等从污水处理厂分离得到的 *Rhodococcus zopfii* 和 *Rhodococcus equi* 能够快速降解 100 mg·L⁻¹ 的 EE2^[16]; Shi 等从粪肥中分离得到的降解 EE2 的真菌 *Fusarium proliferatum*^[17], 15d 内对初

收稿日期: 2005-10-31 修订日期: 2005-12-17

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (8042007)

作者简介: 任海燕 (1977~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境微生物及水污染控制, E-mail: r_h_y@126.com

* 通讯联系人, E-mail: jshl@bjut.edu.cn

始浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EE2 的降解率可达 97%。另外, Fujii 等从活性污泥中分离到 1 株能够降解 17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2) 的菌株 *Novosphingobium* sp.^[18]。Shi 等同时报道了 EE2 代谢产物的存在, 但并未对产物进行鉴定。Horinouchi 等提出了含有甾烷基因和 3-酮甾脱氢酶基因的 *Comamonas testosteroni* TA441 代谢甾酮的可能途径^[19]。本研究从避孕药厂废水处理系统曝气池的活性污泥中分离得到 1 株能够利用 EE2 为唯一碳源和能源的菌株 JCR5, 并鉴定该菌株为鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium* sp.)。结合文献报道, 并利用质谱分析发现, EE2 最初被氧化为雌酮(estrone, E1), 2-羟基-2, 4-二烯-戊酸和 2-羟基-2, 4-二烯-1, 6-己二酸是代谢过程中的 2 种主要中间产物。前者是与 *Comamonas testosteroni* TA441 代谢甾酮的途径类似的产物, 而后者是不同于前者断键位置的另一产物。

1 材料与方法

1.1 样品来源和菌种分离

污泥样品采自北京某计划生育用药制药企业污水处理站的曝气池, 污泥样品按照 10% 的接种量接种于培养基中, 于 30℃、200 r/min 摇床上振荡培养 1 周左右后, 按 1% 的接种量转接到新鲜培养基中培养 1 周左右, 如此重复 4 次。然后在琼脂平板上反复划线分离, 直到得到纯的单菌落。基础无机盐培养基组成为 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 2.0g, KH_2PO_4 : 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 1.0g, 酵母粉 0.05g, 微量元素溶液 5.0mL^[20], 蒸馏水 1 000 mL, 用 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调节 pH 至 7.5。EE2 溶于丙酮后抽滤灭菌, 加到预先灭菌的锥形瓶中, 待丙酮挥发后倒入灭过菌的新鲜无机盐培养基。底物利用范围试验中, 按上述方法加入溶于丙酮后抽滤灭菌的甾体雌激素和避孕药生产中间体。苯、二甲苯则直接加入培养基中一起常规湿热灭菌, 以不加底物为对照。菌株培养温度为 30℃, 摇床转速为 200 r/min 振荡培养。

1.2 菌株鉴定

利用扫描电镜和透射电镜对菌株 JCR5 进行形态学观察。生理生化特性包括硝酸盐还原、碳源利用等分析参照文献[21]进行。利用通用引物 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 1514R(5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CT-3') 对菌株 JCR5 的 16S rDNA 进行 PCR 扩增。PCR 产物的纯

化和测序由上海基康生物技术公司完成, 利用 Blast 程序进行序列同源性检索。

1.3 底物浓度和菌体生长测定

培养液中 EE2 的浓度通过高效液相色谱(HPLC)测定。Thermo Finnigan Surveyor 高效液相色谱仪, 配有自动进样器。色谱柱: Reliasil C18, 5 μm , 150mm $\times$ 2mm。UV 检测器, 检测波长 280nm, 流动相为乙腈: 水 = 60: 40(体积分数), 流速为 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, 进样量为 10 μL 。菌体生长以吸光度值 D_{600} 表示。

1.4 质谱分析

用甲酸酸化培养物至 pH4.0, 乙酸乙酯等体积萃取, 萃取液氮气吹干后溶于甲醇, 进行质谱分析。质谱条件: LCQ Advantage Thermo Finnigan 质谱仪, ESI 源, 负离子扫描, 蒸气温度 450℃, 毛细管温度 250℃, 以无底物培养液为对照。

2 结果与分析

2.1 菌株分离和鉴定

经过反复筛选和驯化, 获得了降解效果相对较优的菌株 JCR5。该菌株在 LB 平板培养基上生长时菌落呈圆形, $\phi 1.5 \sim 2.5 \text{ mm}$, 麦秆黄, 不透明, 表面光滑, 湿润, 低凸起, 边缘裂叶状。革兰氏染色阴性。电镜下, JCR5 呈杆状, 无鞭毛, 不运动, 大小约为 $(0.50 \sim 0.60) \mu\text{m} \times (0.90 \sim 2.10) \mu\text{m}$ 。氧化酶和接触酶阳性, 好氧, 无内生芽孢。生理生化反应测定结果表明, 菌株 JCR5 能够利用包括果糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖、蜜二糖、淀粉、棉子糖和纤维二糖在内的各种碳源, 但不能分离鼠李糖、阿拉伯糖、木糖醇、甘露醇、核糖醇等。

扩增菌株 JCR5 的 16S rDNA 部分基因(1463bp), 序列测定后进行同源性分析, 结果表明该菌株与多株嗜热鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium thalpophilum*)的相似性为 99% 以上, 与多食鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium multivorum*)的相似性为 96.8%。结合菌株的形态和生理生化特征, 菌株 JCR5 鉴定为鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium* sp.)。

2.2 菌株 JCR5 对 EE2 的降解性能

菌株 JCR5 可利用 EE2 为唯一碳源和能源生长。EE2 的降解和细胞生长的相关性见图 1。

由图 1 可见, 细胞生长在培养初期(约 2d)存在一个短暂的滞后期, 表明菌株对培养环境有一个适应的过程。由图 1 还可以看出, 菌株 JCR5 对 EE2 有

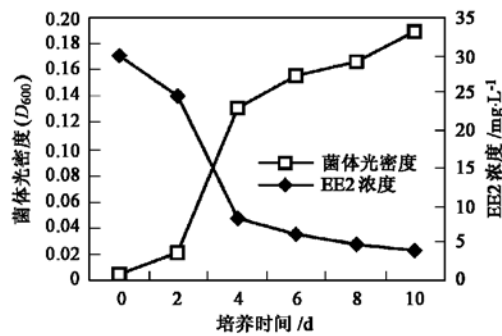


图 1 菌株 JCR5 的生长与 EE2 降解关系

Fig. 1 Relationship between the growth of JCR5 and Degradation of EE2

较好的降解能力,在最佳培养条件下,培养 10d 时的降解率可达到 87%.

2.3 菌株 JCR5 的底物利用范围

液体培养基中加入甾体雌激素 E1, E2, 雌三醇 (estriol, E3) 和炔雌醇甲醚 (mestranol, MeEE2) 以及避孕药生产中间体 (氢化物, 甲基锂氨物, 水解物和氧桥物) 和几种芳烃化合物. 以不加底物为对照, 培养 7d 后观察细胞生长. 结果表明, 菌株 JCR5 能利用 50 mg·L⁻¹ 的几种甾体雌激素和避孕药生产中间体, 能够在以 100 mg·L⁻¹ 的芳烃化合物如苾、菲、甲苯和二甲苯为唯一碳源的情况下生长良好, 但不能利用对氯苯胺、蒽酮和蒽, 如表 1 所示.

表 1 菌株 JCR5 降解的底物范围

Table 1 Range of degradable substrates by the strain JCR5

成分	底物	浓度 / mg·L ⁻¹	D ₆₀₀
甾体雌激素	空白 (无底物)	0	0.004
	甾酮	50	0.165
	17β-雌二醇		0.136
	雌三醇		0.178
	炔雌醇甲醚		0.126
避孕药生产中间体	氢化物	50	0.116
	甲基锂氨物		0.044
	水解物		0.104
	氧桥物		0.128
芳香化合物	蒽	100	0.011
	苾		0.112
	菲		0.104
	蒽酮		0.009
	甲苯		0.085
	对氯苯胺		0.010
	二甲苯		0.119

2.4 代谢产物的鉴定

HPLC 分析发现 (图 2), 降解液中 EE2 浓度较代谢产物浓度高, 这样 EE2 在质谱图中的响应值也会过高, 从而掩盖代谢产物的质谱响应, 因此, 在质

谱分析前将萃取的降解液进行色谱分离, 分别收集代谢产物 (0~ 10min) 和未被降解的 EE2 (10~ 22min).

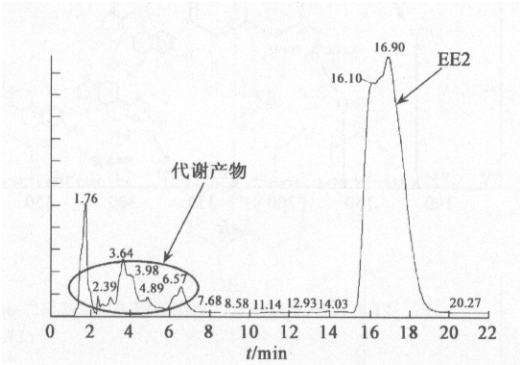


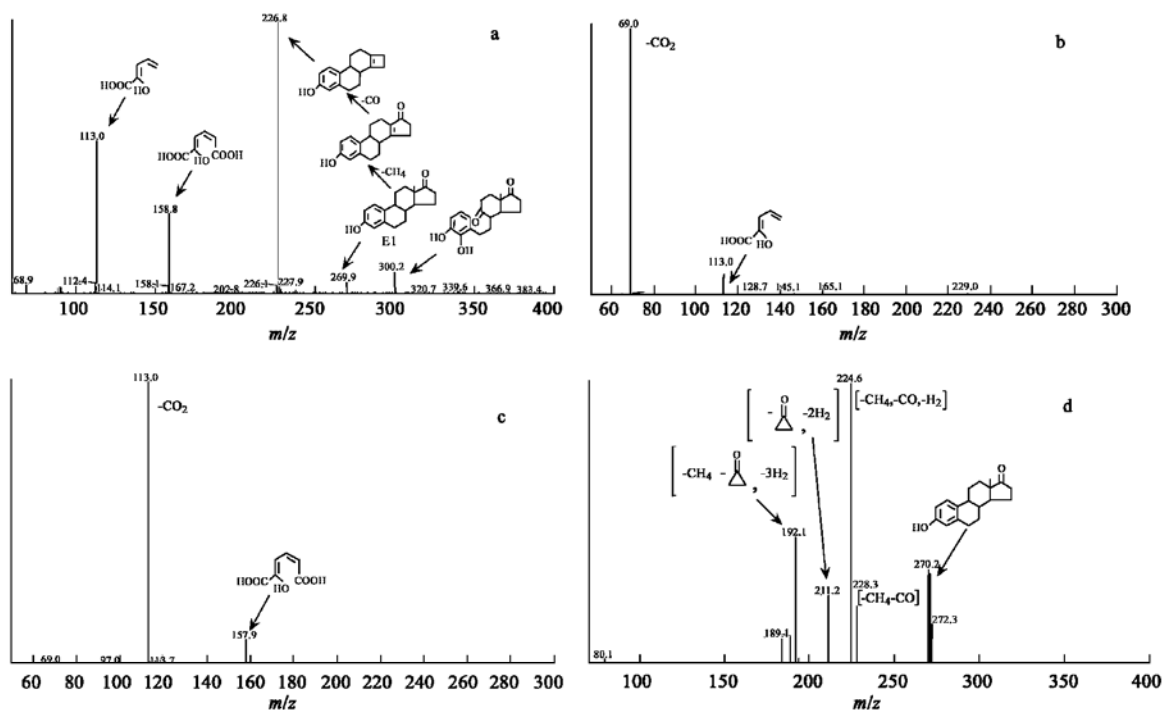
图 2 EE2 降解液的 HPLC 谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of EE2 sample after degradation by strain JCR5

利用质谱对菌株 JCR5 降解 EE2 过程中的中间代谢产物进行了定性分析 (图 3). 发现共有 3 种稳定的代谢产物. 通过对分离的中间代谢产物的一级质谱分析和参考相关的研究报道^[19, 22~ 25], 对质谱图中与 EE2 降解相关的化合物进行了初步鉴定 (图 3a), 发现 2-羟基-2, 4-二烯-戊酸 (m/z 113) 和 2-羟基-2, 4-二烯-1, 6-己二酸 (m/z 158) 2 种代谢产物. 对这 2 种中间代谢产物进行二级质谱鉴定 (图 3b, 图 3c), 二级质谱的结果进一步肯定了 2 种代谢产物的结构. 同时, m/z 300 为中间代谢产物 3, 4-二羟基-9, 10-断雌甾烷-1, 3, 5(10)-三烯-9, 17-二酮. 结合文献推测 EE2 最初被氧化为 E1. 为鉴定 E1 的存在, 对一级质谱图中 m/z 270 (E1 的分子量) 进行二级质谱分析 (正扫描) 发现, 结果与文献^[22] 报道的碎片形式吻合的很好 (图 3d). 一级质谱图 (图 3a) 中 m/z 226.8 峰推测为 m/z 270 (E1) 峰掉下碎片 CH₄ 和 CO 的结果, 也可能是进一步代谢的产物. 图 4 为 E1 可能碎裂途径^[22].

3 讨论

鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium* sp.) JCR5 能够利用合成甾体雌激素 EE2 为唯一碳源和能源生长. 根据生物催化反应的特点以及利用质谱分析, 对菌株 JCR5 降解 EE2 的代谢途径进行了推测 (图 5). 这一途径中的代谢产物 2-羟基-2, 4-二烯-戊酸是与 *Comamonas testosteroni* TA441 的代谢甾酮的途径类似的产物 (图 5 反应 R5a), 而代谢产物 2-羟基-2, 4-二烯-1, 6-己二酸 (图 5 反应 R5b) 是 3-羟基-4,



a. 混合中间代谢产物的一级质谱图; b. 中间代谢产物 2-羟基-2,4-二烯-戊酸(失去 CO_2 , 残余结构为 m/z 69)的二级质谱图;
c. 中间代谢产物 2-羟基-2,4-二烯-1,6-己二酸(失去 CO_2 , 残余结构为 m/z 113)的二级质谱图; d. E1 (m/z 270)的二级质谱图

图 3 EE2 降解中间代谢产物的质谱分析

Fig. 3 Mass spectrum analysis of catabolic intermediates during EE2 degraded by strain JCR5

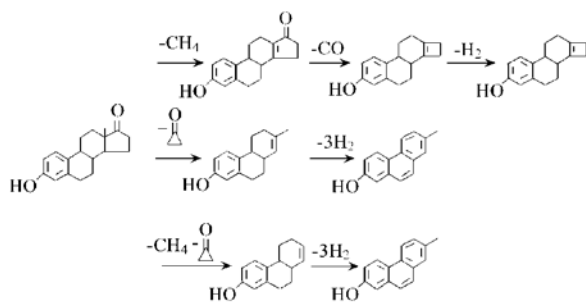


图 4 E1 质谱分析过程中可能碎裂途径

Fig. 4 Proposed fragmentation pathways of E1

5-9, 10-二断雌甾烷-1(10), 2-二烯-5, 9, 17-三酮基-4-酸不同于反应 R5a 断键位置的产物。

甾核的微生物降解在上世纪 60 年代引起了许多研究者的关注。Sih 等报道, 3,4-二羟基-9,10-断雌甾烷-1,3,5(10)-三烯-9,17-二酮是 *Nocardia restrictus* 降解 4-烯, 3,17-雄甾二酮的产物^[23]。Coombe 等利用 *Nocardia restrictus* 细胞抽提物研究了 A 环 3,4-邻苯二酚的氧化过程, 提出了 A 环开环途径^[24], 并且认为 4-烯, 3,17-雄甾二酮在被微生物利用的过程中首先进行 A 环的芳构化。Horinouchi 等提出了与 Coombe 类似的代谢途径^[19]。微生物氧

化甾体化合物的羟基成酮基主要发生在 C-3 α 或 C-3 β 羟基转化为 C-3 位酮基和 C-17 位羟基转化为 C-17 位酮基^[25]。结合文献报道以及利用质谱分析了 *Sphingobacterium* sp. JCR5 降解甾体雌激素 EE2 的代谢途径, EE2 先后经过 C-17 位羟基氧化为酮基, C-9 α 位羟化、酮化, B 环开裂, A 环羟化为 3,4-邻苯二酚, A 环 C4 与 C5 之间经双加氧酶氧化断键后加入 1 分子氧生成 3-羟基-4,5-9,10-二断雌甾烷-1(10), 2-二烯-5,9,17-三酮基-4-酸, 接下来 C5 和 C10 或 C5 和 C6 之间水解开裂加入 1mol 水, 分别生成 2-羟基-2,4-二烯-戊酸(反应 R5a)和 2-羟基-2,4-二烯-1,6-己二酸(反应 R5b), 以及 9,17-二酮-1,2,3,4,10-五降雌甾烷-5-酸和 9,17-二酮-1,2,3,4,5,10-六降雌甾烷, 最终进入三羧酸循环, 生成水和二氧化碳。

4 结论

(1) 从避孕药厂污水处理站曝气池的活性污泥中分离得到 1 株能够以 17 α 乙炔基雌二醇 (17 α ethynylestradiol, EE2) 为唯一碳源和能源生长的菌株 JCR5, 并鉴定为鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium* sp.)。

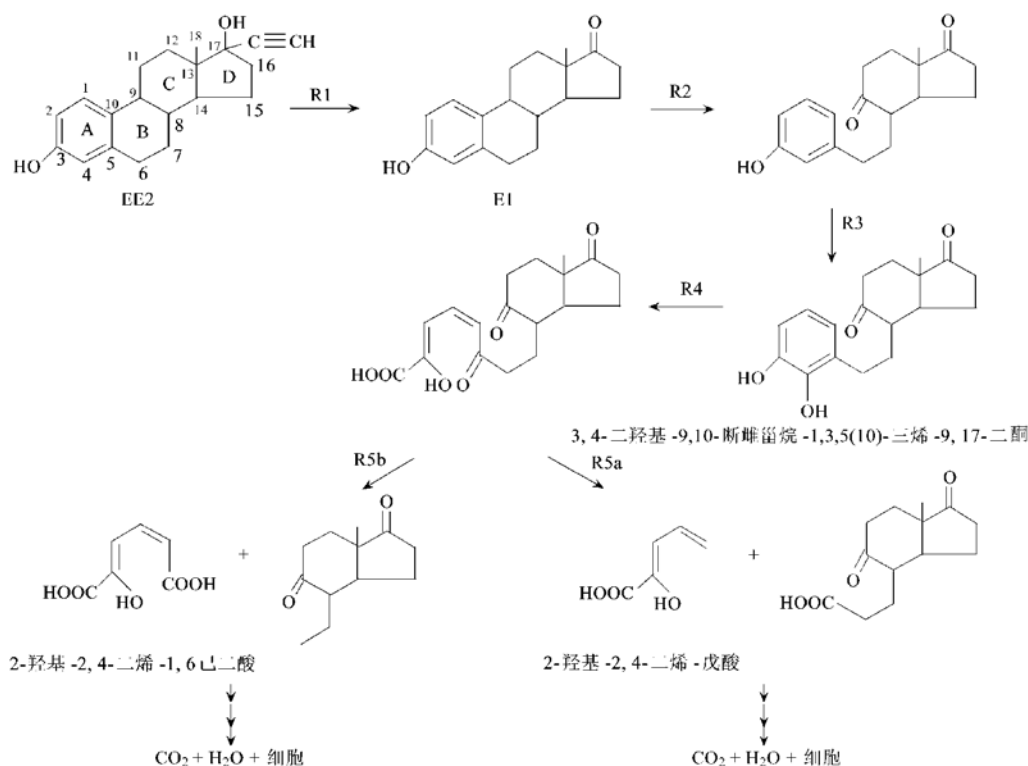


图 5 *Spingobacterium* sp. JCR5 降解 EE2 的代谢途径

Fig. 5 Proposed catabolic pathway for EE2 degradation by strain JCR5

该菌株能够利用甾体雌激素(甾酮、17β-雌二醇、雌三醇以及炔雌醇甲醚)、避孕药生产中间体以及一些芳烃化合物为唯一碳源生长。

(2) 利用质谱对 EE2 降解中间产物进行分析。根据分析结果推测: EE2 经过一系列生物催化作用生成 2-羟基-2,4-二烯-戊酸和 2-羟基-2,4-二烯-1,6-己二酸 2 种中间代谢产物。前者是与报道过的 *Comamonas testosteroni* TA441 代谢甾酮的途径类似的产物,而后者是 3-羟基-4,5-9,10-二断雌甾烷-1(10),2-二烯-5,9,17-三酮基-4-酸不同于前者断键位置的另一产物。

参考文献:

- [1] Ternes, T A, Kreckel P, Müller J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—II. Aerobic batch experiments with activated sludge[J]. Sci. Total Environ., 1999a, **225**(1-2): 91~ 99.
- [2] Purdom C E, Hardiman P A, Bye V J, et al. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works [J]. Chem. Ecol., 1994, **8**(4): 275~ 285.
- [3] Länge R, Hutchinson T H, Croudace C P, et al. Effects of the synthetic estrogen 17 α-ethinylestradiol on the life cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. Environ. Toxicol. Chem., 2001, **20**: 1216~ 1227.
- [4] Harries J E, Sheahan D A, Jobling S, et al. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters [J]. Environ. Toxicol. Chem., 1996, **15**: 1993~ 2002.
- [5] Harries J E, Sheahan D A, Jobling S, et al. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout [J]. Environ. Toxicol. Chem., 1997, **16**: 534~ 542.
- [6] Desbrow C, Routledge E J, Brighty G C, et al. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent: 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening [J]. Environ. Sci. Technol., 1998, **32**(11): 1549~ 1558.
- [7] Aherne G W, Briggs R. The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment [J]. J. Pharm. Pharmacol., 1989, **41**(10): 735~ 736.
- [8] Montagnani D B, Puddefoot J, Davie T J A, et al. Environmentally persistent oestrogen-like substances in UK river systems[J]. Journal of the Chartered Institute of Water and Environmental Management, 1996, **10**(6): 399~ 406.
- [9] Ternes T A, Stumpf M, Mueller J, et al. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany, Canada and Brazil [J]. Sci. Total Environ., 1999a, **225**: 81~ 90.
- [10] Johnson A C, Belfroid A, Di Corcia A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent [J]. Sci. Total Environ., 2000, **256**: 163~ 173.

- [11] Belfroid A C, Van der Horst A, Vethaak A D, *et al.* Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands [J]. *Sci. Total Environ.*, 1999, **225**: 101~ 108.
- [12] Larsson D G J, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, *et al.* Ethinylestradiol—an undesired fish contraceptive? [J]. *Aquat. Toxicol.*, 1999, **45**: 91~ 97.
- [13] Snyder S A, Keith T L, Verbrugge D A, *et al.* Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33**: 2814~ 2820.
- [14] Lee H B, Peart T E. Determination of 17 β -estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography mass spectrometry [J]. *J. AOAC Int.*, 1998, **81**: 1209~ 1216.
- [15] Shore L S, Gurevitz M and Shemesh M. Estrogen as an environmental pollutant [J]. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1993, **51**: 361~ 366.
- [16] Yoshimoto T, Nagai F, Fujimoto J, *et al.* Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus eaii* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants [J]. *Appl. Microbil. Biotechnol.*, 2004, **70**(9): 5283~ 5289.
- [17] Shi J H, Suzuki Y, Lee B D, *et al.* Isolation and characterization of the ethinylestradiol biodegradation microorganism *Fusarium proliferatum* strain HNS-1 [J]. *Wat. Sci. Technol.*, 2002, **45**(12): 175~ 179.
- [18] Fujii K, Kikuchi S, Satomi M, *et al.* Degradation of 17 - estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan [J]. *Appl. Microbil. Biotechnol.*, 2002, **68**: 2057~ 2060.
- [19] Horinouchi M, Hayashi T, Yamamoto T, *et al.* A new bacterial steroid degradation gene cluster in *Comamonas testosteroni* TA441 which consist of aromatic compound degradation genes for secosteroids and 3-ketosteroid dehydrogenase genes [J]. *Appl. Microbil. Biotechnol.*, 2003, **69**(8): 4421~ 4430.
- [20] Kaminski U, Janke D, Prauser H, *et al.* Degradation of aniline and monochloroanilines by *Rhodococcus* sp. An117 and a *pseudomonad*: a comparative study [J]. *Z. Allg. Microbial.*, 1983, **23**: 235~ 246.
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [22] Sun Y K, Gu C, Liu X, *et al.* Ultrafiltration tandem mass spectrometry of estrogens for characterization of structure and affinity for human estrogen receptors [J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, **16**: 271~ 279.
- [23] Sih C J, Lee S S, Tsong Y Y, *et al.* Mechanism of steroid oxidation by microorganisms: 3, 4-dihydroxy-9, 10-secoandrosta-1, 3, 5(10)-triene-9, 17-dione, an intermediate in the microbiological degradation of ring A of androst-4-ene-3, 17-dione [J]. *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**: 540~ 550.
- [24] Coombe R G, Tsong Y Y, Hamilton P B, *et al.* Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms [J]. *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**: 1587~ 1595.
- [25] 周维善, 庄治平. 甾体化学进展[M]. 北京: 科学出版社, 2002.