

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12P 13/00 (2006.01)

C12R 1/39 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510061363.7

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1325655C

[22] 申请日 2005.11.1

[21] 申请号 200510061363.7

[73] 专利权人 浙江工业大学

地址 310014 浙江省杭州市朝晖六区浙江
工业大学

[72] 发明人 郑裕国 薛亚平 王远山 陈小龙
沈寅初

[56] 参考文献

JP58152496A 1983.9.10

JP3586684B1 2004.11.10

JP5754593A 1982.4.1

JP62181793A 1987.8.10

CN1563397A 2005.1.12

微生物转化法裂解井冈霉素生产井冈霉亚
基胺 A 张宪锋等,中国抗生素杂志,第 29 卷
第 4 期 2004

审查员 高雁

[74] 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有限
公司

代理人 吴巧玲

权利要求书 1 页 说明书 10 页

[54] 发明名称

微生物裂解有效霉素生产有效霉烯胺和有效
霉胺

[57] 摘要

本发明公开了一种新的具有裂解有效霉素为有效霉烯胺和有效霉胺的微生物,该微生物属于假单胞菌属(Pseudomonas)的荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescence) CCTCC No. M 205098,还公开了利用该微生物裂解有效霉素制备有效霉烯胺和有效霉胺的方法。所述荧光假单胞菌 Pseudomonas fluorescence, CCTCC No. M 205098,经种子培养基培养后接入含底物有效霉素的发酵培养基中进行发酵,分解底物,或种子培养基培养后分离得到菌体,将得到的菌体加入含底物有效霉素的溶液中进行反应,利用菌体分解底物,然后对分解液进行分离、提纯,得到有效霉烯胺和有效霉胺。

1. 一种利用微生物荧光假单孢菌裂解有效霉素制备有效霉烯胺和有效霉胺的方法，其特征是所述的微生物属于假单孢菌属 (*Pseudomonas*) 的荧光假单孢菌 (*Pseudomonas fluorescence*)，CCTCC No. M 205098；所述荧光假单孢菌 (*Pseudomonas fluorescence*)，CCTCC No. M 205098，经种子培养基培养后接入含底物有效霉素的发酵培养基中进行发酵分解底物，或种子培养基培养后分离得到菌体，将得到的菌体加入含有效霉素的溶液中进行反应分解底物，然后对分解液进行分离、提纯，得到有效霉烯胺和有效霉胺。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征是所述的种子培养基，各组成的重量体积之比，即 g/L 为：葡萄糖 10~40，蛋白胨 5~20，酵母膏 1~10，MgSO₄ 0.1~1，自来水配制。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征是所述的发酵培养基，各组成的重量体积之比，即 g/L 为：有效霉素 5~50，葡萄糖 1~20，蛋白胨 1~10，酵母粉 1~10，MgSO₄ 0.1~1，以自来水配制。

4. 根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的方法，其特征是在种子培养基中接入微生物 CCTCC No. M 205098 进行培养，培养温度 25℃~37℃，pH6.0~8.0，培养时间 24h~48h，得到种子液；种子液接入含底物有效霉素的发酵培养基中进行发酵，其发酵条件是：发酵温度 25℃~37℃，pH6.0~8.0，发酵时间为 72h~192h。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征是在种子培养基中接入微生物 CCTCC No. M 205098 进行培养，培养温度 25℃~37℃，pH6.0~8.0，培养菌体到对数生长期，然后离心分离，得到菌体；将分离得到的菌体，加入含底物有效霉素的水溶液中进行反应，利用菌体分解底物，反应温度 25℃~37℃，反应时间 4h~96h。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征是底物有效霉素水溶液的浓度为 1.0%~10.0%，反应温度 25℃~37℃，反应时间 4h~96h。

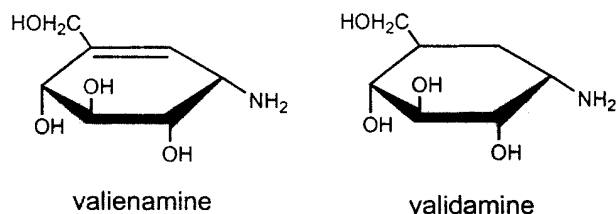
微生物裂解有效霉素生产有效霉烯胺和有效霉胺

技术领域

本发明涉及从土壤中筛选到的新的微生物荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescence*), 还涉及利用该新菌株裂解有效霉素 (又称井冈霉素) 生产有效霉烯胺和有效霉胺的方法。

背景技术

本发明涉及的有效霉烯胺 (valienamine) 和有效霉胺 (validamine) 结构式如下 (Chem. Rev. 2003, 103:1955~1977) :



有效霉烯胺, 又称井冈霉烯胺, 分子式为 $C_7H_{13}NO_4$, 重要的基团有: 一个伯氨基(-NH₂), 一个碳碳双键(C=C), 一个羟甲基(-CH₂OH), 三个羟基(-OH)。其盐酸盐($C_7H_{13}NO_4 \cdot HCl$)的 $[\alpha]_D^{23}$ 为 $+68.6^\circ$ (1N-HCl), 五乙酸盐($C_{17}H_{23}NO_9$)的熔点为 $95^\circ C$, $[\alpha]_D^{23}$ 为 $+30.2^\circ$ ($CHCl_3$), 遇茚三酮显色反应。

有效霉胺, 又称井冈霉胺, 分子式为 $C_7H_{15}NO_4$, 重要的基团有: 一个伯氨基(-NH₂), 一个羟甲基(-CH₂OH), 三个羟基(-OH), 其盐酸盐($C_7H_{13}NO_4 \cdot HCl$)的 $[\alpha]_D^{23}$ 为 $+57.4^\circ$ (1N-HCl), 熔点为 $229^\circ C$ - $232^\circ C$, $[\alpha]_D^{21}$ 为 $+60.6^\circ$ (H_2O), 遇茚三酮显色反应。

有效霉烯胺和有效霉胺是两种较强的糖苷酶抑制剂, 同时也是很多其它糖苷酶抑制剂的核心结构, 可以用于合成有效霉醇胺(valiolamine)和伏格列波糖(voglibose)。

有关有效霉烯胺和有效霉胺的生产方法的研究已经有 30 多年的历史, 日本人龟田等人曾经采用过脱硝假单胞菌的菌体降解有效霉素 A 或

有效霉亚基胺 A，再进行分离得到有效霉烯胺和有效霉胺，可是不能在仅以有效霉素类物质为唯一碳源的培养基上生长；而且对有效霉素的分解能力很弱，不适用于有效霉烯胺和有效霉胺的大量生产。

日本人龟田等在土壤中分离到一株能将有效霉素分解为有效霉烯胺和有效霉胺的菌株嗜糖黄杆菌 (*Flavobacterium saccharophilum*) IFO13948 (公开特许: JP57-54593)。

日本人龟田等采用噬细胞菌属产酶微生物 (*Cytophaga heparina*) IFO12017 (ATCC13125) 和 IFO14087 株降解有效霉素或有效霉亚基胺生产有效霉烯胺和有效霉胺[特许公报 (B2): 平 2-26957]。

日本人龟田等发现了土壤菌属 (*Agrobacterium*) 或者气单胞菌属 (*Aeromonas*) 的微生物以及它们的变异株能分解有效霉素或有效霉亚基胺生产有效霉烯胺和有效霉胺。比如土壤菌属 (*Agrobacterium*) 微生物, 有 *Agrobacterium Radiobacter* IFO 12664 (ATCC 4718)株, IFO 13258 (ATCC 13332)株, IFO 13259 (ATCC 13333)株, IFO 13532 (ATCC 19358)株, IFO 13533 (ATCC 25235)株, 以及 *Agrobacterium tumefaciens* IFO 3058 株等; 气单胞菌属 (*Aeromonas*) 微生物, 有 *Aeromonas hydrophila* subsp. *Anaerogenes* IFO 13282, 同亚种 subsp.*hydrophila* IFO 13286, subsp. *proteolytica* IFO 13287, *Aeromonas punctata* subsp.*cavice* IFO 13288, 以及 *Aeromonas salmonicida* subsp.*salmonicida* IFO 12659 等 [特许公报 (B2): 平 6-69380]。

根据文献及专利查阅结果, 已报道的能降解有效霉素的专利菌种包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*, 1 个种, *Pseudomonas denitrificans*, 反硝化假单胞菌)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*, 3 个种)、嗜纤维菌属 (*Cytophaga* 1 个种, 3 个菌株)、土壤菌属 (*Agrobacterium*, 2 个种, 其中 *Agrobacterium radiobacter* 有 5 个菌株, *Agrobacterium tumefaciens*, 1 个种)、气单胞菌属 (*Aeromonas*, 5 个种)。具体结果见附表 1。

表 1 降解有效霉素专利[特许公报 (B2)]菌种汇总

菌 种	专 利
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	平 2-26957(1982)、平 2-2598
<i>Flavobacterium saccharophilum</i> IFO 13984	平 2-26957、平 2-2598

<i>Flavobacterium heparinum</i>	平 2-26957
<i>Flavobacterium keratolyticus</i>	平 2-26957
<i>Cytophaga heparina</i> IFO 12017	平 2-26957
<i>Cytophaga heparina</i> ATCC 13125	平 2-26957
<i>Cytophaga heparina</i> IFO 14087	平 2-26957
<i>Flavobacterium saccharophilum</i> n.sp.	平 2-2598
<i>Flavobacterium saccharophilum</i> FERM-P	平 2-2598
<i>Flavobacterium saccharophilum</i> NO.5707	平 2-2598
<i>Agrobacterium Radiobacter</i> IFO 12664 (ATCC 4718)	平 6-69380
<i>Agrobacterium Radiobacter</i> IFO 13258 (ATCC 13332)	平 6-69380
<i>Agrobacterium Radiobacter</i> IFO 13259 (ATCC 13333)	平 6-69380
<i>Agrobacterium Radiobacter</i> IFO 13532 (ATCC 19358)	平 6-69380
<i>Agrobacterium Radiobacter</i> IFO 13533 (ATCC 25235)	平 6-69380
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IFO 3058	平 6-69380
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>anaerogenes</i> IFO 13282	平 6-69380
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> IFO 13286	平 6-69380
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>proteolytica</i> IFO13287	平 6-69380
<i>Aeromonas punctata</i> subsp. <i>cavice</i> IFO 13288	平 6-69380
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> IFO 12659	平 6-69380

另外，2004年4月，浙江工业大学郑裕国等人已经筛选到了嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)(CN 1563397)，该菌可以用于有效霉烯胺和有效霉胺的生产。2004年，日本还报道了利用*Paenibacillus*制备有效霉胺和有效霉烯胺的生产技术(JP 3586684 B1)。

发明内容

本发明提供一种从土壤中筛选到的能将有效霉素裂解为有效霉烯胺和有效霉胺的新的微生物菌株；其次是提供一种利用该新的微生物裂解有效霉素生产有效霉烯胺和有效霉胺的方法。

本发明提供的新的微生物菌株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescence*)，该菌株已于2005年9月2日保藏于中国典型培养物保藏中心，简称 CCTCC，保藏编号为 CCTCC No. M 205098。

本发明从土壤中筛选到的新的菌株特性如下：

细胞形态：杆状，大小 $0.7\sim 0.8\mu\text{m}\times 2.0\sim 2.8\mu\text{m}$ ，有鞭毛。

菌落形态：好氧，在牛肉膏蛋白胨平板上能分泌水溶性绿色色素；

生理生化特征：氧化酶阳性，接触酶阳性。能利用 N-乙酰葡萄糖胺、核糖、蔗糖、衣康酸、丙二酸盐、乙酸盐、DL-乳酸盐、5-酮基-葡萄糖酸盐、甘露醇、D-葡萄糖、D-山梨醇、L-阿拉伯糖、丙酸盐、癸酸盐、戊酸盐、柠檬酸盐、2-酮基-葡萄糖酸盐、3-羟基-丁酸盐、4-羟基-苯甲酸盐，能以组氨酸、L-丝氨酸和 L-脯氨酸为氮源，不能利用肌醇、辛二酸盐、3-羟基-苯甲酸盐、糖原、D-蜜二糖、L-岩藻糖等。

根据以上细菌学特征，该新的菌株被鉴定属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)，该微生物具有裂解有效霉素生产有效霉烯胺和有效霉胺的能力。

本发明筛选到的新的菌株荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 不属于上述已公开专利菌种的任何一种。

本发明所用到的原料是一种广泛应用的农用抗生素——有效霉素，即井冈霉素，它是一种高效、安全的农用抗生素，不污染环境，对人畜无害，目前已经成为我国使用面积较广、亩用成本最低、安全、无公害农药，是农药工业的一个重要品种。有效霉素是氨基糖苷类农用抗生素，主要组分有 A、B、C、D、E、F 等，从有效霉素的结构中可以发现，有效霉素是由有效霉烯胺、有效霉胺和 β -D-葡萄糖等结构组成。

本发明的新的微生物是从土壤中筛选得到的，该新的菌株荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)，CCTCC No. M 205098 在 20°C~40°C 培养温度下均能生长，最适的生长温度为 25°C~37°C，培养条件：pH 值 6.0~8.0，最适的生长 pH 值为中性或接近中性。该新的菌种具有裂解有效霉素制备有效霉烯胺和有效霉胺的能力。

用于本发明菌种 CCTCC No. M 205098 的培养基是一些含有可以被上述菌株利用营养物质，如碳源、氮源、无机盐等，作为碳源的除了有效霉素外，还可以有：葡萄糖、乳糖、麦芽糖、糊精、淀粉、甘油、甘露醇、山梨醇、油脂类（豆油、猪油等）；作为氮源的有：肉汁、酵母膏、干酵母、大豆粉、玉米浆、蛋白胨、尿素、氨盐（硫酸铵、氯化铵、硝酸铵、醋酸铵等），肽类（二肽、三肽等）；无机盐类有：Na、K、Ca、Mg、Fe、

Mn、Zn、Co、Ni 等金属盐类和磷酸盐、醋酸盐等有机酸盐类；另外，还可少量添加的物质有：氨基酸类（如谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸等）、微生素（ V_{B1} 、 V_{B2} 、 V_{B12} 、 V_C 、 V_E 、烟酸等）、核酸类（如嘌呤、嘧啶及其衍生物等）。用无机酸或有机酸、碱类调节培养基的 pH 值，还可加入适量的消泡剂，如泡敌等。液体培养、固体培养均可，但是大量工业化生产时，液体培养基较为合适。可采用培养方式有：静置培养、摇动培养或通风搅拌培养等，大量生产有效霉烯胺和有效霉胺时宜采用深层通风搅拌培养。

本发明的新的微生物假单胞菌属（*Pseudomonas*）的荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*），CCTCC No. M 205098，与含碳源、氮源、无机盐的培养基，底物为抗生素有效霉素，进行发酵，然后对分解发酵液进行分离有效霉烯胺和有效霉胺，并进行提纯。

本发明的种子培养基重量体积之比如下(g/L)：葡萄糖 10~40，蛋白胨 5~20，酵母膏 1~10， $MgSO_4$ 0.1~1，自来水配制。

发酵培养基中主要成分为有效霉素，其他组分为可以被本发明的新的微生物利用的碳源、氮源、无机盐等，本发明的发酵培养基组成各重量体积之比如下(g/L)：有效霉素 5~50，葡萄糖 1~20，蛋白胨 1~10，酵母粉 1~10， $MgSO_4$ 0.1~1，用自来水配制。

用本发明的新的菌株荧光假单胞菌 CCTCC No. M 205098 分解底物有效霉素生产有效霉烯胺和有效霉胺，其方法有：

(1) 利用该新的微生物发酵分解底物有效霉素制备有效霉烯胺和有效霉胺：菌种 CCTCC No. M 205098 经过活化，接入上述灭菌的种子培养基培养制成种子液，再将种子液接入到上述配制灭菌后的发酵培养基中培养发酵。

种子培养的控制条件如下：培养温度 $25^{\circ}C$ ~ $37^{\circ}C$ ，pH6.0~8.0，培养时间 24h~48h，pH 值接近中性为好，在通风搅拌或振荡条件下进行为佳；

发酵培养的控制条件：温度 $25^{\circ}C$ ~ $37^{\circ}C$ ，pH 为 6.0~8.0，发酵时间为 72h~192h，pH 值接近中性为好，在通风搅拌或振荡条件下进行为佳。该方法中培养基组成中的有效霉素既是微生物利用的碳源，又是被微生物裂

解的底物；底物有效霉素裂解为有效霉亚基胺，有效霉亚基胺再经过裂解，生成有效霉烯胺（valienamine）和有效霉胺（validamine）。

（2）利用该新的微生物细胞催化裂解底物有效霉素制备有效霉烯胺和有效霉胺：菌种 CCTCC No. M 205098 经过活化，接入灭菌的种子培养基中培养，培养温度 25℃~37℃，pH6.0~8.0，pH 值接近中性为好，培养菌体到对数生长期后离心，收集菌体；将得到的菌体加入底物有效霉素溶液中，利用菌体裂解底物有效霉素生产有效霉烯胺和有效霉胺；溶液中有有效霉素浓度，用重量体积之比表示(kg/L, %)：1.0%~10.0%；反应温度 25℃~37℃，反应时间 4h~96h，在通风搅拌或振荡的条件下进行为佳。

在裂解有效霉素过程中 pH 值用无机酸或有机酸、碱类调节控制。

有效霉烯胺和有效霉胺为易溶于水的碱性物质，因而可以采用水溶性碱性物质的分离、精制方法，例如离子交换树脂、活性炭、多孔高聚物，葡聚糖凝胶、离子交换剂等进行吸附后解吸、层析等。

分离过程如下：将含有有效霉烯胺和有效霉胺的发酵液或细胞催化反应液离心或过滤除去菌体，再将上清液或滤液用大孔弱酸阳离子交换树脂进行离子交换，用氨水溶液洗脱，收集洗脱液，减压浓缩，浓缩液用强碱性层析树脂进行层析，用水作为洗脱剂，收集只含有有效霉烯胺或有效霉胺的部分。冷冻干燥，得到成品。用薄层层析和气相分析的方法对生产的有效霉烯胺和有效霉胺进行分析，操作过程和实验条件按文献 J.Antibiot, 1984, 37: 1301~1305 和专利文献 EP0063456 的方法进行，所得到的结果与它们完全一致。由此可见，利用本发明的微生物能裂解有效霉素生产有效霉烯胺和有效霉胺。

具体实施方案

下面的实施例可以使本专业技术人员更全面地理解本发明，但不以任何方式限制本发明。

实施例 1

种子培养基(g/L)：葡萄糖 20，蛋白胨 10，酵母膏 5，MgSO₄ 0.2，自

来水配制，灭菌备用。

发酵培养基(g/L): 有效霉素 15, 葡萄糖 5, 蛋白胨 10, 酵母粉 10, MgSO_4 0.2, 以自来水配制, 灭菌备用。

种子液的制备: 取 500mL 种子培养基, 平均分装在 10 个 250mL 三角瓶中, 灭菌。接入斜面 CCTCC No. M 205098 进行培养, 摇床转速 200r/min, 在 30℃摇床培养 36h 作为种子液。

发酵: 在 15L 发酵罐中装入 10L 发酵培养基, 灭菌。然后, 接入种子液进行发酵, 接种量 5% (即接入 0.5L 种子液), 发酵温度 30℃, pH7.0, 通风量 3.5vvm, 发酵时间 96 h。

产物的分离: 收集上述发酵液 10L, 离心分离除去菌体, 上清液上柱 (D113 树脂, NH_4^+), 进行离子交换, 用蒸馏水洗涤后, 再用 0.5mol/L 的氨水洗脱, 减压浓缩, 再将浓缩液上柱层析 (Dowex 1×2, OH^-), 用蒸馏水洗脱, 用薄层层析方法进行分析 (硅胶板 G: 青岛海洋化工厂; 层析剂, 正丙醇/乙酸/水=4 : 1 : 1; 0.5%茚三酮显色, 有效霉烯胺 $R_f=0.45$, 有效霉胺的 $R_f=0.39$), 分段收集洗脱液, 收集只含有有效霉烯胺或有效霉胺的部分, 然后进行真空冷冻干燥。得到 7.5 克有效霉烯胺和 4.1 克有效霉胺。

实施例 2

种子培养基(g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 20, 酵母膏 1, MgSO_4 0.1, 自来水配制, 灭菌备用。

发酵培养基(g/L): 有效霉素 20, 葡萄糖 5, 蛋白胨 10, 酵母粉 10, MgSO_4 0.2, 以自来水配制, 灭菌备用。

种子液的制备: 取 150mL 种子培养基, 平均分装在 3 个 250mL 三角瓶中, 灭菌。接入斜面 CCTCC No. M 205098 进行培养, 摇床转速 200r/min, 在 25℃摇床培养 48h 作为种子液。

发酵: 20 个 500mL 的三角瓶中, 每瓶装入 100mL 发酵培养基, 灭菌, 然后接入种子液进行发酵, 接种量 5% (即每瓶接入 5mL 种子液), 发酵温度 28℃, pH7.0, 摇床转速 200r/min, 发酵时间 144h。

收集上述发酵液 1.8L，进行分离、纯化，步骤同实施例 1。得到 1.4 克有效霉烯胺和 0.9 克有效霉胺。

实施例 3

种子培养基(g/L): 葡萄糖 40, 蛋白胨 5, 酵母膏 10, $MgSO_4$ 1, 自来水配制, 灭菌备用。

发酵培养基(g/L): 有效霉素 30, 葡萄糖 5, 蛋白胨 10, 酵母粉 10, $MgSO_4$ 0.2, 以自来水配制, 灭菌备用。

种子液的制备: 取 150mL 种子培养基, 平均分装在 3 个 250mL 三角瓶中, 灭菌。接入斜面 CCTCC No. M 205098 进行培养, 摇床转速 200r/min, 在 37°C 摇床培养 24h 作为种子液。

发酵: 20 个 500mL 的三角瓶中, 每瓶装入 100mL 发酵培养基, 灭菌, 然后接入种子液进行发酵, 接种量 5% (即每瓶接入 5mL 种子液), 发酵温度 35°C, pH7.2, 摇床转速 200r/min, 发酵时间 144h。

收集上述发酵液 1.8L, 进行分离、纯化, 步骤同实施例 1, 得到 1.4 克有效霉烯胺和 1.1 克有效霉胺。

实施例 4

种子培养基(g/L): 葡萄糖 25, 蛋白胨 15, 酵母膏 5, $MgSO_4$ 0.4, 自来水配制, 灭菌备用。

种子液的制备同实施例 1。

发酵培养基(g/L): 有效霉素 50, 葡萄糖 1, 蛋白胨 10, 酵母粉 1, $MgSO_4$ 1, 以自来水配制, 灭菌备用。

发酵: 20 个 500mL 的三角瓶中, 每瓶装入 100mL 发酵培养基, 灭菌, 然后接入种子液进行发酵, 接种量 5% (即接入 5mL 种子液), 发酵温度 25°C, pH6.0, 摇床转速 200r/min, 发酵时间 192 h。

收集上述发酵液 1.8L, 进行分离、纯化, 步骤同实施例 1, 得到 1.5 克有效霉烯胺和 1.2 克有效霉胺。

实施例 5

种子培养基(g/L): 葡萄糖 30, 蛋白胨 8, 酵母膏 6, $MgSO_4$ 0.5, 自来水配制, 灭菌备用。

种子液的制备同实施例 1。

发酵培养基(g/L): 有效霉素 5, 葡萄糖 20, 蛋白胨 1, 酵母粉 10, $MgSO_4$ 0.1, 以自来水配制, 灭菌备用。

发酵: 20 个 500mL 的三角瓶中, 每瓶装入 100mL 发酵培养基, 灭菌, 然后接入种子液进行发酵, 接种量 5% (即接入 5mL 种子液), 发酵温度 37°C, pH8.0, 摇床转速 200r/min, 发酵时间 72 h。

收集上述发酵液 1.8L, 进行分离、纯化, 步骤同实施例 1, 得到 0.5 克有效霉烯胺和 0.3 克有效霉胺。

实施例 6

种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母膏 5, $MgSO_4$ 0.2, 自来水配制, 灭菌备用。

菌体的制备: 取 500mL 种子培养基, 平均分装在 10 个 250mL 三角瓶中, 灭菌。接入斜面 CCTCC No. M 205098 进行培养, 摇床转速 200r/min, 在 30°C 摇床培养菌体到对数生长期, 离心, 收集菌体。

细胞催化反应: 将收集得到的菌体加入到 100mL 含 5.0% 的有效霉素水溶液中, 反应温度 30°C, 反应时间 48h。

收集上述发酵液 100mL, 进行分离、纯化, 步骤同实施例 1, 得到 0.25 克有效霉烯胺和 0.2 克有效霉胺。

实施例 7

种子培养基(g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 20, 酵母膏 10, $MgSO_4$ 0.1, 自来水配制, 灭菌备用。

菌体的制备同实施例 6。

细胞催化反应: 将收集得到的菌体加入到 100mL 1.0% 的有效霉素水溶液中, 反应温度 37°C, 反应时间 4h。

收集上述发酵液 100mL，进行分离、纯化，步骤同实施例 1，得到 0.08 克有效霉烯胺和 0.07 克有效霉胺。

实施例 8

种子培养基(g/L): 葡萄糖 40, 蛋白胨 5, 酵母膏 1, $MgSO_4$ 1, 自来水配制, 灭菌备用。

菌体的制备同实施例 6。

细胞催化反应: 将收集得到的菌体加入到 100mL 10.0%的有效霉素水溶液中, 反应温度 25℃, 反应时间 96h。

收集上述发酵液 100mL，进行分离、纯化，步骤同实施例 1，得到 0.63 克有效霉烯胺和 0.41 克有效霉胺。