



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 95116851.7

[51]Int.Cl⁶

C12P 17/18

[43]公开日 1996年8月28日

[22]申请日 95.9.13

[30]优先权

[32]94.9.14 [33]US[31]305,625

[71]申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72]发明人 D·E·布劳克 T·E·赫曼

J·H·希 N·S·麦塔

V·R·拉

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 黄革生

//(C12P17/18,C12R1:465)

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 一种生产抗生素的方法

[57]摘要

一种生产脱氧富伦菌素，可选择地，和富伦菌素 B 的方法，包括在需氧条件下将含有能生成富伦菌素的微生物的培养基发酵以生产富伦菌素，然后在同一培养基中在厌氧条件下使富伦菌素转化为脱氧富伦菌素，并且如需要可在随后的回收和纯化步骤中将脱氧富伦菌素转化为富伦菌素 B。已知这三种富伦菌素的每一种都是有用的抗生素，特别是动物用药。

权 利 要 求 书

1. 一种生产脱氧富伦菌素和, 如需要, 富伦菌素 B 的方法, 此方法的特征是: a), 在需氧条件下将含有能生成富伦菌素的微生物的培养基发酵以生产富伦菌素, 然后 b), 在同一培养基中在厌氧条件下使富伦菌素转化为脱氧富伦菌素, 并且如需要, c), 在随后的回收和纯化步骤中再将脱氧富伦菌素转化为富伦菌素 B。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中的微生物是玫瑰暗黄链霉菌突变菌株。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中的微生物是保存于美国典型培养物保藏中心 (ACTT) 且其编号为 No. 55598 的玫瑰暗黄链霉菌突变菌株 (*Streplomyces roseofulvus*)。

4. 根据权利要求 1~3 中任何一项的方法, 其中 b) 步骤中包括当富伦菌素的滴度达到或几乎达到其最大值时向发酵液中通入氮气以除去氧气。

5. 根据权利要求 4 的方法, 其中 b) 步骤中进一步包括将发酵液在厌氧条件下放置约 2~8 小时, pH 约为 7.0~9.0。

6. 根据权利要求 5 的方法, 其中 pH 约为 7.5~8.4。

7. 根据权利要求 4~6 中任何一项的方法, 其中转化完全后, 加入适量的一种碱调节发酵液的 pH 至约为 10~11.5, 再于厌氧条件下放置 0.5~1 小时。

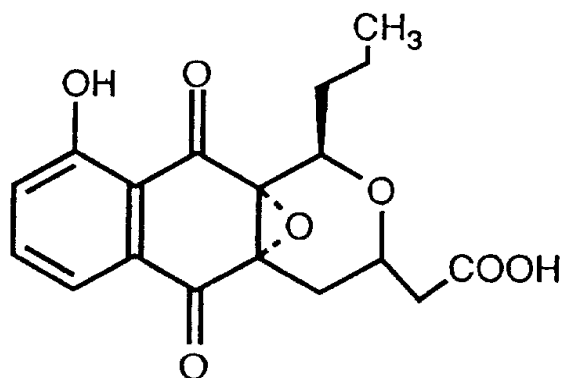
8. 根据权利要求 1~7 中任何一项的方法, 其中 c) 步骤中包括加热脱氧富伦菌素至温度最高约为 45°C。

9. 根据权利要求 8 的方法, 其中加热是在压力约比大气压高 $0.35\sim 0.70\text{kg/cm}^2$ 的条件下进行。

说明书

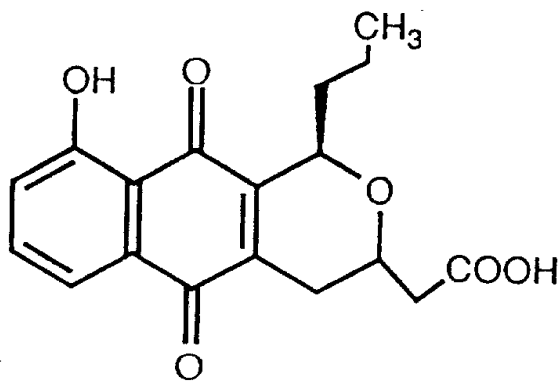
一种生产抗生素的方法

本发明涉及已知抗生素的新生产方法，特别是从富伦菌素生产脱氧富伦菌素以及从中间体脱氧富伦菌素生产富伦菌素 B 的方法。
生物合成具有抗生素活性的富伦菌素，即下式化合物



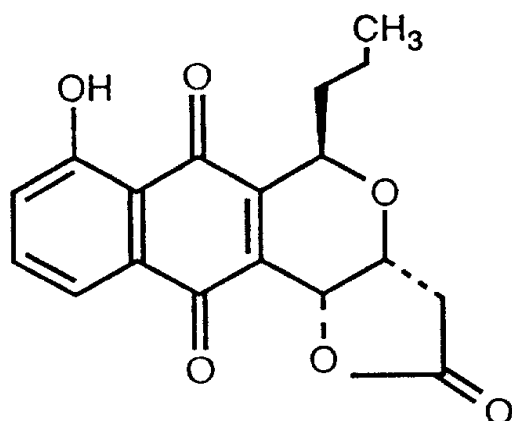
首次报道于 Antimicrob. Ag. Ann. 1960. 77-88 (1961)。将从土壤中分离的弗氏链霉菌在搅拌和通气条件下进行培养，生成了富伦菌素。

此后报道了可用多种试剂还原富伦菌素，化学转化为脱氧富伦菌素，即下式化合物



[参见 J. A. C. S. 88, 4109 (1966); J. A. C. S. 99, 1325 (1968); 及美国专利说明书 3, 452, 051]。

生物合成脱氧富伦菌素首次报道于美国专利说明书 4, 199, 514 及 J. Antibiot. 31, 959-965 (1978)。这些文献公开了在通气和需氧条件下发酵含有玫瑰暗黄链霉菌菌株 AM-3867 (FERM-P No. 4359 和 ATCC No. 31476) 的培养基。发酵后的培养基中含有富伦菌素、脱氧富伦菌素及另一种抗生素，具有下式的富伦菌素 B



发酵结束后，将培养液分离为菌细胞和滤液。可用常规方法处理链霉菌属微生物发酵产生的发酵液的滤液，如改变 pH 或温度 (参见 Belter 等人的 *Bioseparations - Downstream processing for Biotechnology*, J. Wiley & Sons, New York 1988, pp. 17, 25, 99 和 105)。但是，现有方法是公开于美国专利说明书 4, 199, 514 和 J. Antibiot. 31, 959-965 (1978) 的发酵结束后再分离和回收抗生素，以致富伦菌素 B 的回收率低于 50%。

从本质上来讲，本发明目的在于提供一种生产脱氧富伦菌素，

如需要，随后生产富伦菌素 B 的方法，此方法包括下列步骤：在需氧条件下将一培养基（营养培养基）发酵以产生富伦菌素，此培养基中含有能产生富伦菌素的微生物。然后，在同一培养基（含有微生物）中在厌氧条件下使富伦菌素转化为脱氧富伦菌素。如需要，在随后的回收和纯化步骤中再将脱氧富伦菌素转化为富伦菌素 B。

令人惊奇地发现，发酵生成富伦菌素后，在无氧气存在（厌氧条件）下和在先前所用的微生物（细菌）细胞存在下在同一培养基中使富伦菌素转化为脱氧富伦菌素，与原先获得的富伦菌素 B 相比，可使其最终产率提高。另外，此方法节省了处理时间、原料和设备，并简化了回收步骤。特别是，可以用生产富伦菌素的同一发酵设备将富伦菌素转化为脱氧富伦菌素。

因此，本发明涉及一种生产脱氧富伦菌素和，如需要，生产富伦菌素 B 的方法，此方法的特征是：a)，在需氧条件下将含有能生成富伦菌素的微生物的培养基发酵以产生富伦菌素，然后 b)，在同一培养基中在厌氧条件下使富伦菌素转化为脱氧富伦菌素，并且如需要，c)，在随后的回收和纯化步骤中再将脱氧富伦菌素转化为富伦菌素 B。

在本发明中，可使用任何能产生化合物富伦菌素的微生物。优选将玫瑰暗黄链霉菌进行诱变处理获得的玫瑰暗黄链霉菌突变菌株。美国专利说明书 4, 199, 514 非常具体地公开了一种优选突变菌株，玫瑰暗黄链霉菌 AM—3867。最优选的突变菌株是 1994 年 7 月 15 日保存在美国典型培养物保藏中心（ATCC，美国马里兰）的玫瑰暗黄链霉菌突变菌株，ATCC No. 55598，。可用于本发明

的其他微生物包括弗氏链霉菌 [Antimicrob. Ag. Ann. 1960, 77 - 80 (1961), ATCC No. 10745] 和保藏在 ATCC (其编号为 No. 19921) 的玫瑰暗黄链霉菌突变菌株。

可按任何常规方法进行微生物的制备和富伦菌素的实际发酵。例如, 微生物可冻干贮存或用 5% 乳糖和 10% 甘油在液氮中保存。冻干贮存的可融化并用无菌去离子水再水化。将培养物连续稀释并涂布在琼脂斜面和/或平面上, 以便在培养箱中生长并生产孢子。将孢子从斜面或平面上刮下来, 接种到锥形烧瓶中的种子培养基里, 或冷冻于 5% 乳糖和 10% 甘油中用作以后接种。种子培养基中含有, 例如, 淀粉、葡萄糖、Bacto 胰蛋白胨、酵母浸膏和碳酸钙。将接种后的种子培养基进行培养后, 例如在旋转振荡器中培养, 将生长的微生物再接种到营养培养基中进行发酵。根据本发明, 在生产富伦菌素的第一步骤 (a) 中典型的营养培养基中含有玉米油、糊精、玉米浸膏、蔗糖糖蜜、豆粉、甲酸钠或柠檬酸钠、酵母浸膏、硫酸镁、磷酸二氢钠、碳酸钙和一种消沫剂例如聚丙二醇单丁基醚。

发酵温度通常约为 25°C 至 34°C。经过适宜时间后, 判定富伦菌素的滴度 (浓度) 已经达到了它的最高值, 即富伦菌素的产率不再随着时间的延长增加, 则发酵结束。可以用, 例如, 高效液相色谱法 (HPLC), 测定富伦菌素的滴度。通常发酵时间约为 160 至 240 小时。

发酵培养基中形成并富集了富伦菌素和少量脱氧富伦菌素。随后对发酵液进行厌氧处理 [步骤 b] 促进富伦菌素在原处转化为脱氧富伦菌素。此处理优选包括在富伦菌素的滴度达到或几乎达到其

最大值时向发酵液中通入氮气以除去氧气。当发酵液中除去氧气时，其 pH 应约为 7.0~9.0，优选约 7.5~8.4，最优选约为 7.9。如需要，可加入适量菌细胞可生理接受的酸调节 pH 至约 7.9，优选磷酸。然后，将发酵液在厌氧条件下放置约 2~8 小时，具体时间决定于培养基的组成和富伦菌素的浓度。转化完全后（通常用 HPLC 法测定）加入适量的任何一种碱调节发酵液的 pH 至约为 10~11.5，优选氢氧化钠或氢氧化氨，再于厌氧条件下放置 0.5~1 小时。此 pH 调节是为了消除细胞的活性。厌氧处理期间发酵液的温度不是一个苛刻的参数，只要此温度不致高到破坏了微生物，通常所用的温度范围约为 15℃~27℃。在此范围的上限区时效果最好。

优选的转化和回收富伦菌素 B 的方法示于图 1 的流程图中（其中标出了优选的溶剂）。

转化完全后（优选用 HPLC 法测定），从发酵液中分离并搜集所得的脱氧富伦菌素。优选加入适量的任何一种酸调节发酵液的 pH 至约为 2~5.5，优选用硫酸或盐酸 (1)，然后在 pH3 与约为其体积 0.5~2 倍的低级烷基乙酸酯，优选乙酸乙酯溶剂混合 (2)。将所有发酵液和溶剂的混合物离心，得到上层溶剂相，优选乙酸乙酯 (3)。比重大的下层相中包括提取过的发酵液、细胞和固形物，将下层相分出并弃去。然后将保留的溶剂提取液浓缩，得到脱氧富伦菌素的浓缩液，约为 15~20g/L (4)。

为了除去杂质，可在转化为富伦菌素 B 之前进一步处理所收集的脱氧富伦菌素。优选将上述溶剂的浓缩液用约为其体积 0.3~1 倍的去离子水洗涤 (5)。调节 pH 至约为 5.5~6.3，优选加入适

量的氢氧化铵作为碱，将溶剂浓缩液/水混合物混合约 0.25~0.75 小时，放置，使两相分离 (6)。分离上层的溶剂浓缩液，加入适量的任何一种酸调节其 pH 至约为 2.8~3.5，优选用硫酸或盐酸 (7)。将溶剂浓缩液层与约为其体积 0.12~0.17 倍的去离子水混合以便于调节 pH (8)。将含有脱氧富伦菌素的溶剂浓缩层与水层分离 (9)，将水洗过的溶剂提取浓缩液进一步浓缩，至形成油状膏体或不再产生馏分为止 (10)。

然后，将脱氧富伦菌素经下列回收纯化步骤转化成富伦菌素 B：加热脱氧富伦菌素至温度不超过约 45℃，优选在比大气压力约高 0.35~0.70kg/cm² 的压力下进行（大气压力本身约为 1.033kg/cm²）。将油状膏体浓缩物用约为其体积 12~18 倍的低级链烷醇，如甲醇或乙醇，优选甲醇提取（具体用量决定于所得发酵液中渣油的含量），直至链烷醇提取液中脱氧富伦菌素的浓度约为 7~12g/L (11)。收集上层链烷醇相 (12)，加入适量的氢氧化铵调节 pH 至约 6.0~6.2，混合约 0.2~0.5 小时 (13)。然后将链烷醇提取液加热（反应）约 9~16 小时，温度约为 36℃~45℃，气压约为 5~10psig [以磅每平方英寸计，超出常压（空气）14.7psi 的压力]，将脱氧富伦菌素转化为富伦菌素 B (14)。5—10psig 约等同于 0.35—0.7kg/cm²。加入适量的任何一种酸调节链烷醇提取液的 pH 至约 2.8~3.4，使反应停止，优选硫酸或盐酸 (15)。

然后将富伦菌素 B 结晶。将链烷醇（优选甲醇）提取液浓缩至富伦菌素 B 的浓度约为 45~60g/L (16)。将所得的浓缩浆液在 0℃~4℃ 冷却约 16~24 小时，过滤浆液，将所得的湿滤饼用等体积冷的（例如在温度约为 1—15℃ 范围内，优选约为 4℃）低级链

烷醇（优选甲醇）洗涤，pH 约为 2，然后干燥（17）。将干燥的富伦菌素 B 在约为其体积 10 倍的低级（特别是 C₅₋₁₀）烷烃（优选正己烷）中再形成浆液，约 10—15 分钟后过滤浆液，将所得滤饼干燥（18）。可将链烷醇母液浓缩，二次回收其中的富伦菌素 B。

另一种转化和回收富伦菌素 B 的方法示于图 2 的流程图中（其中标出了优选的溶剂）。

此种将脱氧富伦菌素转化为富伦菌素 B 的方法省去了前述方法中的水洗步骤和链烷醇（优选甲醇）提取步骤。此方法包括下列步骤：将脱氧富伦菌素浓度约为 15~20g/L 的低级烷基乙酸酯（优选乙酸乙酯）提取浓缩液进一步浓缩至形成油状膏体或不再产生馏分为止（5'）。将油状膏体浓缩物与约为其体积 1~3 倍的低级烷烃（优选正己烷）混合 0.25~0.5 小时以溶解此油状物（6'）。将脱氧富伦菌素的烷烃浆液过滤，将滤饼用约为其体积 2~3 倍的低级（特别是 C₅₋₁₀）烷烃（优选正己烷）洗涤，然后干燥（7'）。将此固体再次溶解于低级烷基（优选乙基）乙酸酯中，使脱氧富伦菌素浓度约为 30~50g/L（8'）。加入适量氢氧化铵调节此溶液的 pH 至约为 5.9~6.8（9'）。然后将低级烷基乙酸酯溶液加热（反应）约 16~36 小时，温度约为 36℃~45℃，气压约为 5~10psig，将脱氧富伦菌素转化为富伦菌素（B（10'））。将溶液中转化的富伦菌素 B 浓缩成不含溶剂的富伦菌素 B 浆液（11'）。此浆液与约为其体积 1~2 倍的低级烷烃（优选正己烷）混合（12'），然后过滤，将所得滤饼干燥（13'）。

在任一种方法中，优选将干燥的滤饼再结晶，如图 3 的流程图中所示（其中标出了优选的溶剂）。

在室温下将干燥的滤饼溶于低级烷基（优选乙基）乙酸酯中，浓度约为 70~100g/L。将溶液过滤，在氮气及真空条件下浓缩滤液，温度范围经为 25—40℃，优选约 35℃，直至富伦菌素 B 的浓度为约 275—350g/L。在已滤过的氮气中将浓缩液冷却，在低温条件下过滤浆液，温度范围约为 1—15℃，优选约为 4℃。将滤饼用冷（例如上述温度范围，优选 4℃）25/75（v/v%）~50/50（v/v%）低级烷基乙酸酯/低级烷烃溶液洗涤，然后用低级烷烃洗涤。优选的溶剂混合物是乙酸乙酯/正己烷，最优选 50/50v/v% 此种混合物，随后所用的低级烷烃优选是正己烷。然后将富伦菌素 B 晶体干燥。

下列实施例说明了本发明。

实施例

各种富伦菌素的测定

在本发明方法的下列实施例中，用下述 HPLC 法分析富伦菌素、脱氧富伦菌素和富伦菌素 B。所用的 Hewlett Packard (HP) HPLC 系统中包括 HP1050 系列多波长检测器、泵系统和 HP3396 系列 II 积分仪，用 Waters HPLC 柱 Nova - Pak^RC18 (3.9 × 150mm)，并带有预柱 C18 Guard - PAKS。在室温 (20~25℃) 使用柱子，操作压力为每平方英寸 1, 800 磅 (psi) /126. 5kg/cm²。流动相溶液是 60% 的 2% 乙酸溶液和 40% 乙腈 (v/v) 的混合液，经 0.2 微米滤膜过滤并用氮气脱气。

将发酵液试样用酸化甲醇 (1:500HCl: 甲醇) 稀释 10 倍，注入 HPLC 柱前用 0.45 微米滤膜过滤。对于回收和纯化步骤中取出的试样，用 HPLC 分析之前，加适量甲醇稀释。将样品备置于 2ml

小瓶中，盖上瓶帽并以 350 微升/分钟的牵伸速度自动注入 HPLC 柱，进样体积为 20 微升，流速为 1.2ml/min，检测器波长为 276nm。用纯化的富伦菌素制备校正曲线。富伦菌素、脱氧富伦菌素和富伦菌素 B 的保留时间分别为 5.7、8.1 和 11.6 分钟，检测器反映因子 (g/L 样品浓度/峰面积) 分别为 $3.40 \times 10E-8$ 、 $8.47 \times 10E-9$ 和 $9.28 \times 10E-9$ 。

实施例 1

用于发酵的微生物是玫瑰暗黄链霉菌突变菌株，保存于美国典型培养物保藏中心，(美国，马里兰)，ATCC No. 55598。量取 5ml 用 5% 乳糖和 10% 甘油冷冻于 -70°C 的贮存孢子等分试样，融化，连续稀释并涂布在琼脂平面培养基上，培养基中含有 0.5g/L 酵母浸膏 (Amberex1003, Red Star^R, Universal Foods), 0.5g/L 天冬酰胺 (Sigma), 39g/L 土豆葡糖琼脂培养基 (Difco) 和 10g/L 琼脂 (Difco)，溶于去离子水，在 27°C 培养箱中放置 7 天，使孢子生长。用 5g/L 无菌琼脂溶液将孢子从平面上刮下来。将 10^8 个孢子接种于含 1L 种子培养基的 6L 锥形烧瓶中。种子培养基中含有 1.5g 酵母浸膏 (Amberex1003, Red Star^R, Universal Foods), 5g Bacto 胰蛋白胨 (Difco), 10g 葡萄糖, 20g 玉米淀粉 (Eclipse^RN, Staley) 和 4g 碳酸钙 (Whittaker Clark Daniel)，溶于去离子水。将烧瓶在 27°C 旋转振荡器中保温 48 小时，转速为每分钟 220 转 (rpm)。将 0.8L 生长在种子培养基中的微生物接种到 40L 的发酵培养基中。将 60L 种子发酵液接种到发酵液工作体积为 1325L 的 2000L 发酵罐中。初始发酵培养基 (1325L) 中，每升含有 50g 玉米油 (Welch, Holme and Clark), 20g 糊精 (Sigma type IV), 15g

玉米浸膏 (Roquette), 10g 蔗糖糖蜜 (Mid-Eastern), 7.5g 甲酸钠 (Fisher), 3g 玉米浸膏 (Amberex1003), 4g 七水硫酸镁 (Fisher), 0.44g 七水磷酸二氢钠 (Fisher), 4g 碳酸钙 (Pfizer) 和 0.3ml 消沫剂 (Union Carbide, UCON^R LB—625, 聚丙二醇单丁酯)。

发酵 27℃ 进行, 背压为 5psig, 搅拌速度控制在 160~280rpm, 通气量控制在 336~672min, 以保持溶解氧高于 30%。不用控制发酵液的 pH 值, 测定 pH 值为 6.5~8.4。

发酵结束后 (186 小时, 1325L, pH8.2, 富伦菌素 3.8g/L, 脱氧富伦菌素 0.1g/L), 停止向发酵罐中通氧气, 并通入氮气排除其中的氧, 发酵罐搅拌速度从 280rpm 降至 100rpm。

用冷水将发酵液的温度从 27℃ 降至 10℃, 放置 7 小时, 使富伦菌素转化为脱氧富伦菌素。向转化后的发酵液 (1325L, pH7.7, 富伦菌素 0.2g/L, 脱氧富伦菌素 2.9g/L) 中加入 12.9L 50% 氢氧化钠水溶液, 调节 pH 至 11.5, 在氮气条件下混匀 30 分钟。然后加入 14L 浓硫酸调节发酵液的 pH 至 2.5, 立即用乙酸乙酯 (1325L) 萃取 30 分钟。

将所有发酵液和乙酸乙酯提取混合物用 Westfalia 盘型分离器 (SA—7—06—076 型) 离心, 流速为 280L/h。将分离出的乙酸乙酯提取液 (轻相, 1298L, pH2.7, 富伦菌素 0.12g/L, 脱氧富伦菌素 2.91g/L) 用转膜蒸发器浓缩, 温度为 50℃, 真空度为 28" (绝对压力为 1.9 英寸/48.3mm 汞柱), 进料流速为 52L/h。将乙酸乙酯提取浓缩液 (190L, pH3.0, 脱氧富伦菌素 19.5g/L, 富伦菌素 0.83g/L) 用 93L 去离子水洗涤, 用浓氢氧化铵调节 pH 至

6.1, 混匀 30 分钟。用相分离法分离洗过的乙酸乙酯浓缩液, 与 32L 去离子水混合, 用浓盐酸调节 pH 至 3。

将水洗并分离出的乙酸乙酯提取浓缩液层 (224L, pH3, 脱氧富伦菌素 16.3g/L) 用旋转蒸发器 (50L, 容量 30L, Buchi Rotavapor Model 185 Ex, EVP-454) 进一步浓缩成油状膏体, 温度为 40℃, 真空度为 28"。用 430L 甲醇提取油状膏体 (28L)。分离上层甲醇提取相 (426L, pH3.2, 脱氧富伦菌素 8.28g/L), 用 1M 氢氧化铵调节 pH 至 6.1。将调过 pH 的甲醇提取液在 10psig 压力下于 38℃ 加热 (反应) 12 小时, 使脱氧富伦菌素转化为富伦菌素 B。用 1M 盐酸调节甲醇提取液的 pH 至 3.0, 使反应停止。

将停止反应的甲醇提取液 (426L, 富伦菌素 B 7.35g/L, 脱氧富伦菌素 0.2g/L) 用转膜蒸发器浓缩, 温度为 45℃, 真空度为 28", 进料流速为 20L/h。将浓缩的甲醇提出液浆液 (66L, 富伦菌素 B 46.4g/L) 于 0℃ 放冷过夜, 使富伦菌素 B 结晶, 过滤 (Whatman No. 1 滤器)。用冷的酸化甲醇 (pH2) 洗涤富伦菌素 B 湿滤饼, 于 30℃ 真空干燥过夜 (真空度为 25", 等同于绝对压力 4.9 英寸/124.5mm 汞柱)。将干燥的富伦菌素 B 固体粗品在正己烷 (37L) 中再形成浆液, 以除去油, 过滤。将正己烷洗过的固体再真空干燥, 得到 3060g 富伦菌素 B, 纯度为 90%。

为进一步纯化纯度为 90% 的富伦菌素 B, 将固体富伦菌素 B 溶于乙酸乙酯中, 浓度为 80g/L。过滤 (Whatman No. 1 滤器) 富伦菌素 B 的乙酸乙酯溶液, 并在氮气条件下及真空度为 25"、温度为 35℃ 的条件下, 在结晶器中浓缩至富伦菌素 B 的浓度为 300g/L, 程序降温冷却浓缩液, 速率为每小时降温 2.1℃, 16 小时后降

至 0℃。过滤富伦菌素 B 结晶，用冷 (4℃) 55/50 (v/v)% 乙酸乙酯和正己烷洗涤，真空干燥，得到 2640g 富伦菌素 B，纯度为 98.5%。

实施例 2

按实施例 1 所述的方法制备玫瑰暗黄链霉菌种子接种物，进行菌丝体发酵，在发酵液中将富伦菌素转化为脱氧富伦菌素，用乙酸乙酯提取全部发酵液，离心并浓缩乙酸乙酯提取液。在旋转蒸发器中进一步浓缩乙酸乙酯提取浓缩液 (26L, 脱氧富伦菌素 19.8g/L, 富伦菌素 1.4g/L)，温度为 40℃，真空度为 28" (绝对压力为 1.9 英寸/48.3mm 汞柱)，蒸去残留的乙酸乙酯至呈油状膏体。向油状膏体中 (12L, 脱氧富伦菌素 42g/L) 加入 18L 正己烷，充分混匀 0.5 小时使油状物溶解。用 Whatman 滤纸在 25" 真空度 (绝对压力 4.9 英寸/124.5mm 汞柱) 下过滤脱富伦菌素己烷浆液。将脱氧富伦菌素粗品滤饼 (816g, 纯度 56%) 用 3L 正己烷洗涤，于 30℃ 真空 (25") 干燥箱中过夜干燥。过滤后的混合液和己烷洗涤液 (32L, 脱氧富伦菌素 1.4g/L) 可浓缩并再回收。

将过滤并干燥的脱氧富伦菌素粗品固体 (816g, 纯度 56%) 再溶于乙酸乙酯 (10L) 中，使脱氧富伦菌素的浓度为 45g/L。用氢氧化铵调节脱氧富伦菌素乙酸乙酯溶液的 pH 至 6.1。将溶液加热至 45℃，搅拌并将乙酸乙酯回流。用压力为 5~10psig 的空气填充混合容器。反应过程中用氢氧化铵维持溶液的 pH 于 5.9~6.1。24 小时后脱氧富伦菌素转化为富伦菌素 B，转化率为 92%。将转化的富伦菌素 B 乙酸乙酯溶液 (9.5L, 富伦菌素 B 43g/L) 在旋转蒸发器中浓缩，蒸去乙酸乙酯，温度为 40℃，真空度为 28"。将不

含溶剂的粗品富伦菌素 B 固体浆液 (1.2L) 与 2.4L 正己烷混合, 在 25" 真空度下用 Whatman 滤纸过滤, 用正己烷洗涤, 于 30℃ 真空 (25") 干燥箱中过夜。富伦菌素 B 固体 (445g, 纯度 87%) 可按实施例 1 中所述的重结晶方法进一步纯化。

说明书附图

图 1

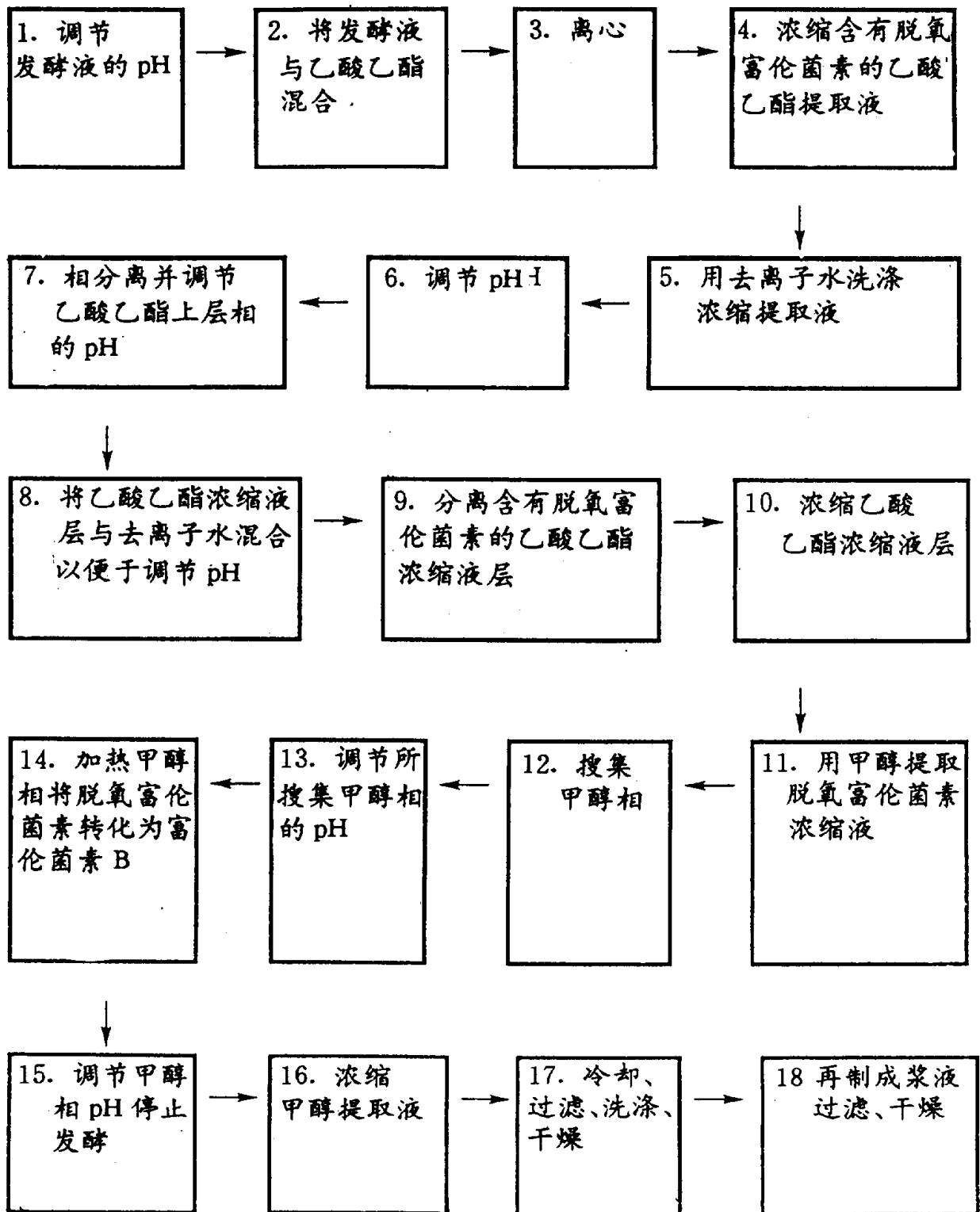


图 2

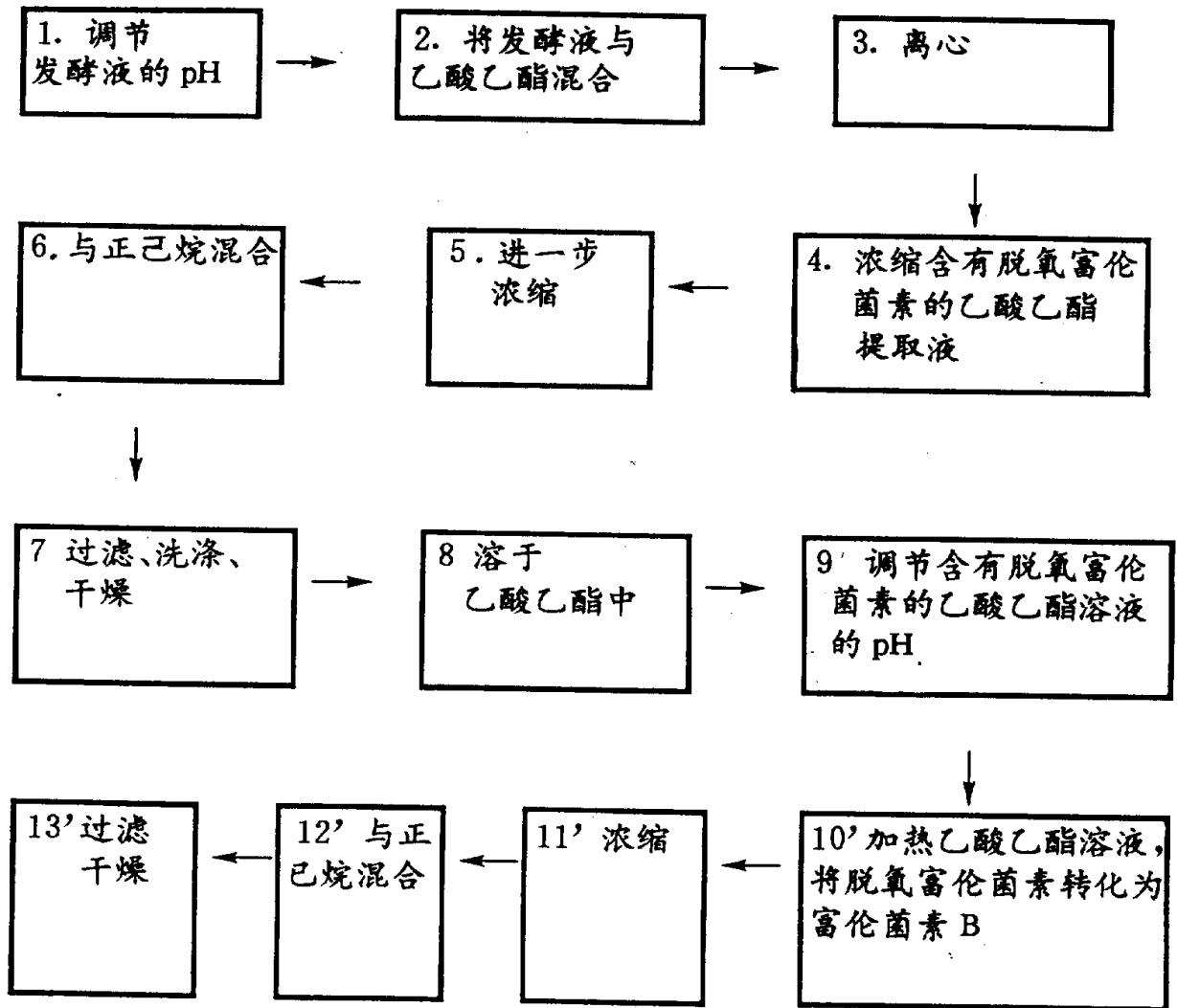


图 3

