



Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 21.II.1968 (P 125 391)

Pierwszeństwo: 22.II.1967 Francja

Opublikowano: 20.XI.1970

Kl. 30 h, 6

MKP C 12 d, 9/14

Właściciel patentu: Rhône — Poulenc S.A., Paryż (Francja)

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania nowego antybiotyku, oznaczonego symbolem 19.402 R.P.

Antybiotyk, wytwarzany sposobem według wynalazku zasługuje na szczególną uwagę ze względu na swą wysoką aktywność bakteriobójczą w stosunku do szczepów gramododatnich.

Antybiotyk 19.402 R.P. można wytwarzać przez hodowlę na podłożach sztucznych, mikroorganizmu należącego do rodzaju *Streptomyces*, określanego jako „*Streptomyces peruviansis*” (NRRL 2757), opisaną w patencie francuskim Nr 1.259.983.

Szczep ten określano początkowo w czasie jego wyodrębniania w laboratorium, przed zdeponowaniem w Międzynarodowej Kolekcji numerem wewnętrznym roboczym „*Streptomyces 6227*”, który to numer może być również podawany w naukowych publikacjach.

Antybiotyk 19.402 R.P. jest kwasem, którego sól sodowa odznacza się podanymi niżej właściwościami fizyko-chemicznymi.

Wygląd: biały bezpostaciowy proszek.

Rozpuszczalność: jest dobrze rozpuszczalna w wodzie, rozpuszczalna w bezwodnym metanolu, wodnych roztworach etanolu, n-propanolu i izopropanolu, słabo rozpuszczalna w bezwodnym etanolu, n-propanolu, izopropanolu i butanolu, a nierozpuszczalna w acetonie, heksanie, benzenie, eterze etylowym, chloroformie i octanie etylu.

2

Widmo w nadfiolecie (badane w roztworach wodnych zawierających w 1 litrze 0,040 mg substancji)

maksimum absorpcji przy 256 m μ : $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 102,5$

minimum absorpcji przy 257 m μ : $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 18,7$

Widmo w podczerwieni (badano próbki substancji sprasowanej z KBr).

Widmo przedstawiono na załączonym wykresie, na którym oznaczono na osi odciętych długości fal wyrażone w mikronach (μ) (skala górna) i liczbę falową — w cm $^{-1}$ (skala dolna), a na osi rzędnych — transmisję wyrażoną w procentach.

W tabeli 1 podano główne pasma absorpcji w podczerwieni badanego produktu.

Tabela 1

	3420 bs	1620 śr	1070 bs	710 p
	3300 p	1530 s	1045 s	605 śr
25	3100 p	1420 śr	972 śr	595 s
	2930 s	1380 śr	955 s	575 s
	2870 śr	1330 śr	883 śr	495 śr
	1720 śr	1240 śr	855 śr	475 p
	1675 s	1155 p	800 s	425 s
30	1645 śr	1100 s	775 s	385 p

oznaczenia: bs — bardzo silna absorpcja
s — silna absorpcja
śr — średnia absorpcja
sł — słaba absorpcja
p — przebieg

Skręcalność optyczna

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1,9 \pm 1^\circ \text{ (C = 0,4; woda)}$$

$$[\alpha]_{436}^{20} = +7,5 \pm 1^\circ \text{ (C = 0,4; woda)}$$

$$[\alpha]_{365}^{20} = +9,0 \pm 1^\circ \text{ (C = 0,4; woda)}$$

Skład elementarny, %

C — 46,25; H — 6,9; O — 36,70; N — 4,1; P — 2,4;
S — 0,6; Na — 3,05

Produkt nie dializuje przez błonę z celulozy regenerowanej (typu folii wiskozowej).

Sól sodową antybiotyku 19.402 R.P. można zidentyfikować metodą migracji elektroforetycznej na żelu agarowym, którego pH utrzymywane jest na poziomie 8 za pomocą kwasu aminooctowego jako substancji buforującej (agarozą jest liniowym, obojętnym polimerem galaktozy); szybkość migracji w kierunku anody wynosi $10 \cdot 10^{-3}$ cm/V/godz.

Sól sodową antybiotyku 19.402 R.P. można także zidentyfikować metodą chromatograficzną, stosując różne nośniki. W tabeli 2 podano wartości R_f przy stosowaniu różnych rozpuszczalników rozwijających (rozwijanie chromatogramu w temperaturze 20°C; wywoływanie metodą mikrobiologiczną przez przyłożenie chromatogramów w ciągu 5 minut do płytek agarowych posianych *Staphylococcus aureus* 209 P, a następnie inkubację w ciągu nocy w temperaturze 37°C).

Tabela 2

Nośnik	Rozpuszczalnik	R_f
żel krzemionkowy G	izopropanol — 2 n roztwór amoniaku (stosunek objętościowy 70:30)	0,37
żel krzemionkowy G + tlenek glinu G (stosunek wagowy 70:30)	izopropanol-n-butanol-woda (stosunek objętościowy 50:40:30)	0,30
żel krzemionkowy H	dioksan — woda stosunek objętościowy 80:20	0,20
papier Arches 302	n-butanol-kwas octowy (stosunek objętościowy 60:40)	0,62
	n-butanol-kwas octowy-woda (stosunek objętościowy 60:40:10)	0,48
	octan etylu-pirydyna-woda (stosunek objętościowy 50:40:30)	0,30

Aktywność bakteriostatyczną antybiotyku 19.402 R.P. w stosunku do różnych szczepów określono metodą rozcieńczeń, należąca do metod powszechnie stosowanych w tym celu. Dla każdego szczepu oznaczano najmniejsze stężenie substancji, które w określonych warunkach hamuje wzrost bakterii na odpowiednim podłożu bulionowym. Wyniki badań zestawiono w tabeli 3, w której minimalne stężenie bakteriostatyczne wyrażone w mikrogramach substancji na 1 cm³ środowiska.

Tabela 3

Badane organizmy	Minimalne stężenie bakteriostatyczne (μg/cm ³)
<i>Staphylococcus aureus</i> -szczep 209P-ATCC 6538P	0,10
<i>Staphylococcus aureus</i> -szczep 132 (Instytut Pasteura)	0,10
<i>Staphylococcus aureus</i> -szczep Smitha	0,25
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	40
<i>Streptococcus faecalis</i> — ATCC 9790	150
<i>Streptococcus viridans</i> (Instytut Pasteura)	0,8
<i>Streptococcus pyogenes hemolyticus</i> (szczep Dig 7, Instytut Pasteura)	0,01
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (A150-Instytut Pasteura)	2,5
<i>Diplococcus pneumoniae</i> (szczep Til, Instytut Pasteura)	0,07
<i>Bacillus subtilis</i> — ATCC 6633	20
<i>Bacillus cereus</i> — ATCC 6630	0,01
<i>Mycobacterium species</i> — ATCC 607	30
<i>Mycobacterium para smegmatis</i> (A75-Lausanne)	40
<i>Escherichia coli</i> — ATCC 9637	30
<i>Shigella dysenteriae</i> — Shiga 1 (Instytut Pasteura)	70
<i>Salmonella paratyphi</i> A (Lacassa, Instytut Pasteura)	90
<i>Salmonella schottmuelleri</i> (paratyphi B) Fougenc (Instytut Pasteura)	60
<i>Proteus vulgaris</i>	125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> — ATCC 10.031	75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (szczep Bass-Instytut Pasteura)	50
<i>Brucella bronchiseptica</i> (CN 387-Wellcome Instytut)	15
<i>Brucella abortus bovis</i> B 19	1
<i>Pasteurella multocida</i> (A 125, Instytut Pasteura)	0,8
<i>Treponema Reitera</i>	10

Wykonane oznaczenia wykazują, że aktywność antybiotyku 19.402 R.P. dotyczy głównie szczepów gramdodatnich; jego aktywność w stosunku do

Streptococcus hemolyticus jest szczególnie wyso-
ka. Jest on natomiast stosunkowo mało aktywny
w stosunku do szczepów gramujemnych, jakkol-
wiek w stosunku do *Neisseria gonorrhoeae* i *Bru-*
cella abortus bovis jego aktywność jest znaczna.
W przypadku tego antybiotyku nie występuje zja-
wisko uodpornienia sprężonego z następującymi
antybiotykami: penicyliną, stropotomycyną, tetracy-
kliną, chloramfenikolem, spiramycyną, karbomy-
cyną, erytromycyną, piristinamycyną i nowobio-
cyną.

Aktywność bakteriobójczą antybiotyku 19.402 R.P. określa-
no w badaniach prowadzonych *in vivo* na
zwierzętach doświadczalnych zarażonych ekspery-
mentalnie szczepami takich mikroorganizmów, jak
streptokoki, pneumokoki, i staphylokoki. Wyka-
zał on szczególną aktywność u myszy przy sto-
sowaniu podskórnym, a także cenne właściwości
profilaktyczne przy zakażeniu myszy staphyloko-
kami lub streptokokami, podskórnym lub dożylnym.

Toksyczność antybiotyku 19.402 R.P. badano
głównie na myszach. Dawkę śmiertelną DL_{50}
oznaczono wprowadzając preparat do otrzewnej.
Wynosi ona 600 mg/kg. Preparat jest więc nisko-
toksyczny.

Sposób według wynalazku wytwarzania anty-
biotyku 19.402 R.P. polega na tym, że hodowlę
aerobową szczepu *Streptomyces peruviansis*
(NRRL 2757) poddaje się procesowi wyodrębniania
i oczyszczania sposobem odpowiednim dla wyoso-
bniania antybiotyku nie dializującego, o charakte-
rze kwaśnym. Sposobem takim może być wy-
dzielanie antybiotyku z brzezki fermentacyjnej
przez filtrację. Proces filtracji korzystnie jest pro-
wadzić przy wartości pH niższej od 5, a najlepiej
wynoszącej około 4. W tych warunkach cała ilość
antybiotyku 19.402 R.P. pozostaje w placku filtra-
cyjnym, z którego można go wyodrębnić przy war-
tości pH 3—7 za pomocą wodnego roztworu alko-
holu o niskim ciężarze cząsteczkowym, na przy-
kład metanolu. Brzeczkę fermentacyjną można
również filtrować przy wartości pH wyższej lub
równiej 5, najlepiej 7—9, lecz znaczna część an-
tybiotyku 19.402 R.P. pozostaje wtedy w placku
filtracyjnym, który musi być także odpowiednio
przerabiany w celu wydobycia z niego tego pro-
duktu. Ponadto wynika wówczas problem oddzie-
lenia antybiotyku 19.402 R.P. od antybiotyku
6.798 R.P., który przechodzi także do przesączu.

Brzeczkę fermentacyjną można także przepuszczać
przez kolumnę wypełnioną żywicą jonitową
o charakterze silnie anionowym i dużej porowa-
tości, a następnie wymywać produkt roztworem
alkoholu, na przykład wodnym roztworem meta-
nolu, zawierającym elektrolit. Niedogodnością tej
metody jest także konieczność rozdzielania anty-
biotyków 19.402 R.P. i 6.798 R.P.

Antybiotyk 19.402 R.P. jako produkt surowy
można wydzielić z wymienionych wyżej roztwo-
rów wodnoalkoholowych przez zatkanie roztworu
do małej objętości. Zatkanie to dogodnie jest pro-
wadzić w temperaturze poniżej 40°C i pod ciśnie-
niem niższym od atmosferycznego. Surowy anty-
biotyk 19.402 R.P. wytrąca się z zatężonego roz-

tworu przez oziębienie lub przez dodanie innego
rozpuszczalnika, w którym jest on źle rozpuszczal-
ny, takiego jak bezwodny etanol lub aceton.

Antybiotyk 19.402 R.P. można następnie oczy-
ścić przez związanie na żywicy jonitowej o cha-
akterze silnie anionowym i dużej porowatości
i następnie wymycie roztworem wodnoalkoholo-
wym zawierającym elektrolit, takim jak chlorek
sodowy, chlorek amonowy, chlorek potasowy, chlo-
rek wapniowy lub chlorek magnezowy, w stę-
żeniu 5 do 50 g/l. Eluat zateża się następnie do ma-
łej objętości w temperaturze poniżej 40°C, pod
obniżonym ciśnieniem; uzyskany koncentrat dia-
lizuje się stosując przepływ wody destylowanej
i membrany z celulozy regenerowanej. Woda uno-
si sole mineralne i różne zanieczyszczenia, a anty-
biotyk 19.402 R.P. pozostaje całkowicie w dializo-
wanym roztworze. Przez liofilizację otrzymuje się
następnie produkt oczyszczony.

Celem otrzymania antybiotyku 19.402 R.P. o wyż-
szej czystości można posłużyć się powszechnie sto-
sowanymi metodami, takimi jak chromatografia na
różnych sorbentach, rozdzielanie w przeciwwprądzie
lub podział pomiędzy dwa różne rozpuszczalniki.
Szczególnie korzystne okazało się stosowanie me-
tody chromatograficznej przy użyciu żelu krzemo-
wego i wodnego roztworu antybiotyku, który wy-
mywa się mieszaniną alkoholu propylowego i amo-
niaku.

Oczyszczony antybiotyk ewentualnie przeprowa-
dza się w sól metalu alkalicznego.

Jest rzeczą oczywistą, że różne metody stoso-
wane do ekstrakcji, wyodrębnienia i oczyszczenia
antybiotyku 19.402 R.P. można powtarzać wiele
razy, zgodnie z reżimem technologicznym produk-
cji, którego celem jest otrzymanie tego antybio-
tyku w postaci odpowiadającej wymaganiom zwią-
zanym z jego przeznaczeniem.

Szczególnie korzystną postacią antybiotyku 19.402
R.P., otrzymywaną w wyniku opisanych zabiegów
technologicznych, jest postać soli metalu alkalicz-
nego. Sól tę — jeżeli jest to niezbędne — można
następnie przeprowadzić w wolny kwas przepuszc-
zając stężony wodny jej roztwór przez żywicę
jonitową o charakterze silnie kationowym.

Podane poniżej przykłady, nie wyczerpujące
wszystkich możliwości stosowania sposobu według
wynalazku, wskazują możliwości jego realizacji
w praktyce. W przykładach tych aktywność ozna-
czano za pomocą testu biologicznego, metodą dy-
fuzji, stosując jako wskaźnik *Bacillus subtilis* i od-
nosząc rezultaty do wzorca czystego preparatu
19.402 R.P. Aktywność tę wyrażono w jednostkach
na mg dla produktów stałych i w jednostkach na
cm³ dla roztworów (jednostkę definiuje się jako
najmniejszą ilość produktu, która rozpuszczona
w 1 cm³ środowiska inhibituje wzrost *Staphylo-*
coccus aureus 209 P w określonych warunkach).

Przykład I. Do kadzi fermentacyjnej o po-
jemności 170 litrów załadowuje się
namok z kukurydzy 4,800 kg
cerelożę 2,400 kg
chlorek sodowy 0,600 kg
siarczan magnezowy 0,120 kg
wodę do pojemności 110 litrów

Po doprowadzeniu pH mieszaniny do wartości 7,40 za pomocą 660 cm³ stężonego (d = 1,33) roztworu wodorotlenku sodowego dodaje się następnie 600 g węglanu wapniowego.

Podłoże wyjaławia się przepuszczając parę o temperaturze 122°C w ciągu 40 minut. Po oziębieniu objętość pożywki wynosi 120 litrów, a jej wartość pH = 6,95. Podłoże to posiewa się 200 cm³ hodowli wytrząsanej w kolbie stożkowej zawierającej szczep „*Streptomyces peruviansis* (NRRL 2757)”. Rozwój kultury zachodzi przy mieszaniu i napowietrzaniu środowiska wysterylizowanym powietrzem, w temperaturze 30°C, w ciągu 26 godzin; w tym stanie jest ona przydatna do posiewania hodowli produkcyjnej.

Hodowlę w skali produkcyjnej prowadzi się w kadzi fermentacyjnej o pojemności 800 l, do której załadunku się następujące substancje:

pulpę kukurydzianą	22 kg
skrobię	8,250 kg
olej sojowy	8,250 l
węglan wapniowy	5,500 kg
fosforan jednopotasowy	1,100 kg
siarczan magnezowy	1,100 kg
chlorek kobaltawy uwodniony	11 g
wodę	do objętości 510 litrów

Podłoże wyjaławia się przepuszczając bełkotkową parę wodną o temperaturze 122°C w ciągu 40 minut. Po ochłodzeniu objętość mieszaniny wynosi 550 l, a jej wartość pH — po uprzednim dodaniu 250 ml stężonego roztworu wodorotlenku sodowego o gęstości 1,33—6,60. Następnie wprowadza się w celu posiania 55 l hodowli ze 170 l kadzi fermentacyjnej. Proces prowadzi się w temperaturze 30°C w ciągu 123 godzin, mieszając środowisko za pomocą mieszadła o szybkości obrotów 285/min. i napowietrzając je wysterylizowanym powietrzem, wprowadzanym w ilości 25 m³/h. Wartość pH środowiska po tym czasie wynosi 8,10, a objętość 520 litrów. Brzeczka fermentacyjna zawiera w 1 cm³ 2420 jednostek antybiotyku.

Przykład II. 520 litrów brzeczki fermentacyjnej zawierającej 2420 jednostek antybiotyku w 1 cm³, o wartości pH = 8,1 (wytworzonej jak opisano wyżej) umieszcza się w kadzi zaopatrzonej w mieszadło i doprowadza pH środowiska do wartości 4 przez dodanie 37 procentowego roztworu kwasu fosforowego. Następnie wprowadza się 15 kg substancji ułatwiającej filtrację. Mieszaninę filtruje się na prasie filtracyjnej, a osad przemycia się 250 l wody wodociągowej.

Przesąc i wody z przemycia osadu (praktycznie nieaktywne) odprowadza się do kanalizacji ściekowej. Placek filtracyjny rozprowadza się, mieszając w 350 l mieszaniny metanolowo-wodnej zawierającej 270 l metanolu. pH mieszaniny doprowadza się do wartości 7 za pomocą 10 n roztworu węglanu sodowego. Całość miesza się w ciągu 1 godziny, a następnie zawiesinę poddaje się filtracji na prasie filtracyjnej. Filtrat odbiera się, a placek przemycia się 100 l mieszaniny metanolowo-wodnej zawierającej 70 procent objętościowych metanolu.

Połączone przesącze, których objętość wynosi łącznie 440 litrów zawierają 2320 jednostek anty-

biotyku w 1 cm³. Placek filtracyjny stanowi odpad produkcyjny.

Przesącze zatęża, się pod obniżonym ciśnieniem (35 mm Hg) w temperaturze 37°C do objętości 6 l. Do skoncentrowanego roztworu dodaje się 3 litry alkoholu etylowego, a następnie wytrąca się osad wprowadzając mieszaninę 30 l alkoholu etylowego i 40 l acetonu. Wytrącony antybiotyk oddziela się przez filtrację, przemycia acetonem i suszy w suszarni pracującej pod ciśnieniem 5 mm Hg. Otrzymuje się 1009 g surowego produktu barwy brązowej o mianie 950 jednostek/mg, stanowiącego sól sodową preparatu 19.402 R.P.

Przykład III. 900 g surowego produktu otrzymanego sposobem opisanym w przykładzie II, o mianie 950 jednostek/mg, rozprowadza się w 10 l wody destylowanej. Roztwór filtruje się i przepuszcza przez kolumnę o średnicy wewnętrznej 9 cm, zawierającej 8 litrów żywicy jonitowej Dowex 1×2 (w cyklu chlorowym); natężenie przepływu wynosi około 2 l/h. Kolumnę przemycia się sukcesywnie:

wodą destylowaną aż do zaniku barwy 8 l po 12 l/h,

mieszaniną kwasu mrówkowego z wodą, zmieszanych w stosunku objętościowym 10 : 90, 24 l po 12 l/h,

mieszaniną kwasu mrówkowego z wodą i metanolem, zmieszanych w stosunku objętościowym 10 : 10 : 80, 24 l po 12 l/h,

mieszaniną metanolu z wodą zmieszanych w stosunku objętościowym 80 : 20, 24 l po 12 l/h.

Antybiotyk wymywa się mieszaniną wody z metanolem zmieszanych w stosunku objętościowym 20 : 80, zawierającej dodatek 10 g/l chlorku potasowego, którą przepuszcza się przez kolumnę z szybkością odpowiadającą przepływowi 10 l/h. Odbiera się oddzielnie frakcje po 10 l. Frakcje oznaczające się najwyższą aktywnością (4—6) łączy się i zatęża pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze poniżej 40°C do objętości 3 litrów.

Koncentrat poddaje się dializie stosując trzykrotnie po 40 l wody destylowanej i błonę z celulozy regenerowanej, uwalniając produkt od soli i innych zanieczyszczeń, a następnie liofilizuje się go.

Otrzymuje się 35 g soli potasowej antybiotyku 19.402 R.P. o postaci bezpostaciowego proszku barwy piaskowej i mianie 13800 jednostek/mg; jego maksimum absorpcji w nadfiolecie występuje przy 257 mμ ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 84$).

Przykład IV. 5 g antybiotyku oczyszczonego sposobem opisanym w przykładzie III rozprowadza się w 20 cm³ wody destylowanej i zarabia z 25 g aktywnej krzemionki. Otrzymaną pastę suszy się w temperaturze otoczenia w ciągu nocy pod ciśnieniem 2 mm Hg, a następnie umieszcza w górnej części kolumny o średnicy wewnętrznej 4 cm wypełnionej 500 g suchej aktywnej krzemionki.

Chromatogram rozwija się za pomocą następujących rozpuszczalników stosowanych sukcesywnie: — mieszanina n-propanolu z 2 n roztworem amoniaku (stosunek objętościowy 100 : 20), 2,4 l.

— mieszanina n-propanolu z 2 n roztworem amoniaku (stosunek objętościowy 80 : 20), 2 l, a następnie eluuje się go mieszaniną n-propanolu z 2 n roztworem amoniaku (stosunek objętościowy 80 : 30), odbierając frakcje po 50 cm³.

Frakcje 1—50 oraz 51—75 łączy się, zateża pod obniżonym ciśnieniem, w temperaturze poniżej 40°C. w celu odpędzenia propanolu, a następnie koncentrat liofilizuje się.

Z frakcji 1—50 otrzymuje się produkt A w ilości 1300 mg o mianie 15.700 jednostek/mg.

Z frakcji 51—75 otrzymuje się produkt B w ilości 1300 mg o mianie 15.700 jednostek/mg.

1200 mg produktu A rozpuszcza się w 20 cm³ wody destylowanej i miesza, wprowadzając mały mi porcjami, z żywicą jonitową Amberlite IR 120 (w cyklu kwasowym) aż do ustalenia się pH. Żywicę odfiltruje się i przemywa 10 cm³ wody destylowanej. Przesącz główny i z przemycia łączy się i dodaje sody aż do uzyskania roztworu o wartości pH = 8. Następnie dializuje się go w ciągu nocy stosując dwukrotnie po 1 l wody destylowanej i błonę z celulozy regenerowanej. Przez liofilizację roztworu, który nie dializuje (nie przeszedł) przez błonę z celulozy regenerowanej otrzymuje się 945 mg soli sodowej antybiotyku 19.402 R.P. w postaci stałej.

Produkt ten zawiera 17.800 jednostek/mg i charakteryzuje się następującym składem elementarnym.

C — 46,25%; H — 6,9%; O — 36,70%; N — 2,1%;
P — 2,4%; S — 0,6%; Na — 3,05%.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku oznaczonego symbolem 19.402 R.P. ewentualnie w postaci soli, **znamienny tym**, że hodowlę aerobową szczepu *Streptomyces Peruviansis* (NRRL 2757) poddaje się procesowi wyodrębniania i oczyszczania sposobem odpowiednim dla wyosobniania antybiotyku nie dializującego o charakterze kwaśnym takim jak filtracja brzezki fermentacyjnej przy wartości pH niższej od 5 i następna ekstrakcja płacka filtracyjnego przy wartości pH = 3—7 wodnym roztworem alkoholu o niskim ciężarze cząsteczkowym lub też przepuszczanie brzezki fermentacyjnej przez kolumnę wypełnioną żywicą jonitową o charakterze silnie anionowym i o dużej porowatości, następne wymywanie roztworem wodnoalkoholowym elektrolitu, następne zateżanie otrzymanego roztworu organicznego w każdym z tych sposobów do małej objętości i wytrącanie z niego antybiotyku przez dodanie innego rozpuszczalnika takiego jak etanol lub aceton, w którym antybiotyk jest źle rozpuszczalny i kolejne oczyszczanie zwykłymi metodami fizykochemicznymi, po czym otrzymany antybiotyk ewentualnie przyprowadza się w sól metalu alkalicznego.

