# بررسی تولید پنیسیلین و خالص سازی محصول

**ایران عالم زاده*، مهزاد میرزایی، اخترکاظمی**
دانشکده مهندسی شیمی و نفت دانشگاه صنعتی شریف
پست الکترونیکی: alemzade@sharif.edu

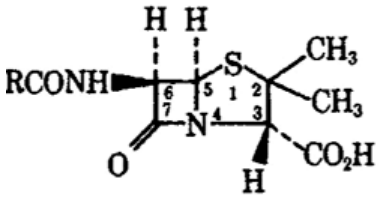
**چکیده**

رشد و بیوسنتز پنی‌سیلین توسط دو گونه پنی سیلیوم کریسوژنوم PTCC ۵۰۳۱ و PTCC ۵۰۳۳ در محیط کشت سنتزی بررسی شد. آزمایش‌هایی به منظور تعیین توده سلولی و مقدار پنی‌سیلین تولید شده در فلاسک‌های گردان و فرمانتور با گلوکز و لاکتوز به عنوان منبع کربن انجام گرفت. لاکتوز با سرعت پایین‌تری تخمیر می‌شود اما برای تولید پنی‌سیلین قند مناسب‌تری است. محیط کشت بهینه نسبت ۳:۱ لاکتوز به گلوکز تعیین گردید. مقدار تولید پنی‌سیلین در فلاسک‌های گردان بیشتر از مقدار تولید در فرمانتور بود. گونه PTCC ۵۰۳۱ حدود ۴ برابر گونه دیگر پنی سیلین تولید کرد بنابراین به عنوان گونه مناسب‌تر از لحاظ تولید پنی‌سیلین تعیین شد. روش جدید سیستم استخراج سه فازی مایع شامل بوتیل استات، پلی اتیلن گلیکول، سولفات آمونیوم و آب مورد مطالعه قرار گرفت. در این مرحله حدود ۸۰ درصد از پنی سیلین موجود در نمونه بازیابی شد. به منظور بهینه‌کردن فرآیند، عوامل مؤثر بر آن از قبیل غلظت اولیه اجزای تشکیل دهنده فاز، وزن مولکولی پلی اتیلن گلیکول، $pH$ و غلظت اولیه پنی‌سیلین بررسی شد. با افزایش غلظت اولیه اجزای تشکیل دهنده فاز در این سیستم، پنی‌سیلین در فاز میانی جدا می‌شود. مطلوب است که پنی‌سیلین به فاز بالایی منتقل شود که با کاهش $pH$ امکان‌پذیر است.

**واژگان کلیدی: پنی سیلیوم کریسوژنوم، پنیسیلین، تولید، استخراج، بهینه‌سازی**

**مقدمه**

پنی سیلین‌ها آنتی بیوتیک‌های پپتیدی با ساختمان منحصر به فردی می‌باشند که در زمره مؤثرترین آنتی بیوتیک‌ها برای مقابله با بیماری‌های عفونی محسوب می‌شوند. پنی‌سیلین‌ها توسط تعداد زیادی از قارچ‌ها به خصوص گونه‌های پنی سیلیوم تولید می‌شوند. پنی سیلین‌های طبیعی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت مؤثر بوده و در مقابل اسید حساس‌اند. تمامی پنی‌سیلین‌ها دارای ساختمان مشترکی هستند. ساختمان اصلی آن‌ها، ۶- آمینوپنی سیلانیک اسید (6-APA) است که مرکب از یک حلقه تیازولیدین ادغام شده با یک حلقه بتالاکتام می‌باشد. در شکل ۱ ساختمان پنی‌سیلین‌ها نشان داده شده است.




**شکل ۱- ساختمان پنی‌سیلین‌ها**

چنانچه تخمیر پنی‌سیلین بدون افزودن پیش‌سازهای زنجیر جانبی انجام شود، پنی‌سیلین‌های طبیعی تولید می‌شوند. از این مخلوط، بنزیل پنی‌سیلین یا پنی‌سیلین G به لحاظ تجاری و پزشکی مفید است و از آن به عنوان ماده اولیه برای ساخت آنتی بیوتیک‌های نیمه سنتزی

استفاده می‌شود. به منظور تولید پنی‌سیلین G از فنیل استیک اسید به عنوان پیش‌ساز استفاده می‌شود[۱-۴].

تولید آنتی بیوتیک‌ها یکی از زمینه‌های مهم در بیوتکنولوژی است و تلاش‌های بسیاری جهت بهینه‌سازی این فرآیند صورت گرفته است. به منظور تسهیل و توسعه فرآیند در مقیاس صنعتی، تولید پنی‌سیلین در قسمت بالا دست و تولید پنی‌سیلین‌های نیمه سنتزی در قسمت پایین دست انجام می‌شود. بنابراین جداسازی محصول از مایع تخمیری یکی از مهم‌ترین مراحل درتولید پنی‌سیلین محسوب می شود. استخراج با حلال یک روش مناسب با قابلیت انتخاب بالا و بازده مطلوب برای پنی‌سیلین می‌باشد. باکاهش pH در این سیستم، پنی‌سیلین در فاز آلی تجمع می‌یابد اما هم زمان سایر ناخالصی‌ها نیز به این فاز کشیده می‌شوند. به همین علت استخراج پنی‌سیلین مشکل شده و به مراحل دیگری از جمله رنگ‌زدایی و... نیاز است.

به منظور غلبه بر نقص‌ها و معایب موجود، روش جدیدی برای استخراج پیشنهاد شد. در این روش، استخراج توسط سه فاز مایع انجام می‌شود و محصول هدف به طور انتخابی به درون یکی از فازها کشیده می‌شود. عملیات جداسازی در یک مرحله انجام می‌گیرد و همین عامل، تأثیر بسزایی درهزینه عملیات دارد.

از مزایای این روش می توان به موارد زیر اشاره کرد[۶و۹]:

- ساده شدن فرآیند
- کاهش هزینه‌ها
- افزایش کیفیت محصول
- کاهش مراحل (حذف مراحل تشکیل امولسیون، رنگ زدایی و خشک‌کردن )
- امکان پذیر شدن جداسازی دو یا چند جزء یاگروه در یک مرحله استخراج
- امکان استفاده مجدد از حلال

## مواد و روش‌ها:

**مرحله تولید-** از دو سویه PTCC ۵۰۳۱ و PTCC ۵۰۳۳ برای تولید پنی‌سیلین استفاده شد. این دوسوش از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت آمپول لیوفیلیزه تهیه شد. پس از تهیه نسل اول و دوم هر دو گونه، اسلنت‌ها در یخچال نگهداری شدند. بهترین محیط کشت ذکرشده در مراجع برای گونه‌های کپک پنی سیلیوم کریسوژنوم ۵۰۳۱ و۵۰۳۳، محیط کشت شماره ۲۲ است که شامل موارد زیر می‌باشد (گرم در لیتر آب مقطر):

| | |
|---|---|
| عصاره مالت | ۲۰گرم |
| گلوکز | ۲۰گرم |
| پپتون | ۱ گرم |

آزمایش‌ها و تحقیقات بسیاری در مورد ترکیب محیط کشت این کپک انجام شده و پیشنهاد شده است که استفاده از لاکتوز نیز به عنوان منبع کربن، به طور قابل توجهی تولید پنی‌سیلین را زیاد می‌کند. هرچه در محیط نسبت گلوکز به لاکتوز بیشتر باشد، راندمان توده سلولی به مصرف سوبسترا بالاتر است و تولید بهینه در نسبت ۳:۱ ازگلوکز: لاکتوز به دست می‌آید. پس از تهیه محیط کشت (۶۰۰ میلی لیتر)، ۶ ارلن ۵۰۰ میلی لیتری تهیه و مقدار ۱۰۰ میلی لیتر (جهت ایجاد شرایط هوادهی مناسب) از محیط کشت در هر ارلن ریخته شد. پس از انجام اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه ودمای ۱۲۱°C، در شرایط استریل اسپورهای گونه ۵۰۳۱ به سه ارلن و اسپورهای گونه ۵۰۳۳ به سه ارلن دیگر منتقل شده وسپس در دستگاه شیکر با دور ۲۰۰rpm و دمای ۲۵°C قرارداده شدند. به منظور تهیه منحنی رشد در زمان‌های مختلف و شرایط استریل از ارلن‌ها (دوگونه میکروبی) نمونه‌گیری شد. ۱۰ میلی لیتر از نمونه به دستگاه فیلتراسیون منتقل شد. سپس مسیلیوم یا توده سلولی باقی‌مانده روی کاغذ فیلتر پس از خشک شدن در اون با ترازوی دیجیتالی (دقت۰/۰۰۱گرم) وزن شد و فیلتریت برای انجام آزمایش اندازه‌گیری پنی‌سیلین مهیا شد.

به منظور تولید پنی‌سیلین در فرمانتور ابتدا پیش کشت تهیه گردید. پس ازگذشت حدود ۴۰ ساعت، محیط پیش‌کشت پر از طیف‌های رویشی شده‌که به طور طبیعی تمام آنزیم‌هایی راکه لازمه رشد در محیط سنتزی هستند را دارا بوده و برای انتقال به محیط کشت آمادگی داشتند. محیط کشت در یک ارلن ۵ لیتری تهیه و سپس به فرمانتور منتقل شد. فرمانتور توسط دیگ بخار به مدت ۴۰ دقیقه با دمای ۱۲۱°C استریل شده و پس از سرد شدن رسیدن به دمای محیط، دو ارلن محتوی محیط پیش‌کشت سوش ۵۰۳۱ درکنار شعله و در شرایط استریل به فرمانتور شیشه ای ۵ لیتری ( مقدار تلقیح (v/v)۱۰ درصد) منتقل شد. برای تولید پنی‌سیلین در فرمانتور توسط سوش ۵۰۳۳ نیز همین مراحل طی شد. فرمانتور مجهز به سیستمی با توانایی تنظیم چرخش همزن وکنترل دمای خودکار است. در طول دوره رشد و تولید دور همزن روی ۶۰۰rpm و دما روی ۲۵°C تنظیم گردید.

**مرحله اندازه گیری پنی‌سیلین-** روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلفی برای اندازه‌گیری پنی‌سیلین وجود دارد. روش هیدروکسیل آمین که در این تحقیق مورد استفاده قرارگرفته یکی ازکاربردی‌ترین وکلی‌ترین روش‌ها برای اندازه‌گیری پنی‌سیلین بوده که برای نمونه‌های ناخالص حتی بدون احتیاج به تخلیص اولیه نیز به کار می‌رود. پنی‌سیلین با هیدروکسیل آمین واکنش داده و اسید هیدروکسامیک تشکیل می‌شود. این اسید با یون فریک، یک کمپلکس ارغوانی رنگ تشکیل می‌دهدکه رنگ آن با غلظت پنی‌سیلین متناسب است[۵].

**مواد مورد استفاده عبارتند از:**

هیدروکسیل آمین هیدروکلراید (۵ مولار)، محلول هیدروکسیل سدیم (۱نرمال)، فریک آمونیوم سولفات، اسید سولفوریک غلیظ،بافر

هیدروکسیل آمین (یک حجم از محلول ۵ مولار هیدروکسیل آمین با یک حجم از محلول هیدروکسید سدیم مخلوط ۴ حجم آب و ۴ حجم اتیل الکل ۹۵ درصد به آن اضافه می‌شود)

دو لوله آزمایش تهیه و به هرکدام ۱ میلی لیتر از نمونه اضافه شد. به یکی از لوله‌ها چند قطره اسید سولفوریک غلیظ افزوده شد و پس از ۱۰ دقیقه پنی‌سیلین موجود در لوله اول تجزیه شده ومحلول شاهد به دست می‌آید. سپس ۵ میلی لیتر محلول بافر هیدروکسیل آمین به هر لوله اضافه می‌شود. پس ازگذشت ۱۵ دقیقه به سرعت ۱ میلی لیتر واکنشگر آهن به هر دو لوله اضافه‌کرده و در یک زمان مشخص توسط دستگاه اسپکتروفتومتر عدد جذب در ۴۹۰ نانومتر خوانده شد (تا قبل از یک دقیقه). زمان واکنش بین پنی‌سیلین و بافر هیدروکسیل آمین باید برای نمونه و استاندارد یکی باشد. با استفاده از منحنی استاندارد می‌توان مقدار پنی‌سیلین موجود در یک نمونه را به دست آورد. برای رسم منحنی استاندارد، چند نمونه با غلظت‌های مختلف از محلول پنی‌سیلین و یک نمونه بدون پنی‌سیلین (بلانک) تهیه‌کرده سپس با استفاده از روش هیدروکسیل آمین‌که توضیح داده شد و با استفاده از فریک آمونیوم سولفات، جذب نمونه‌های رنگی در ۴۹۰ متر خوانده می‌شود. نمودار شامل عدد جذب بر حسب غلظت پنی‌سیلین به دست می‌آید.

**مرحله استخراج** - حلال‌های استفاده شده در این قسمت عبارتند از: نمک پتاسیم پنی‌سیلین G،سولفات آمونیوم، بوتیل استات وپلی اتیلن گلیکول

PEG ۶۰۰۰(Mw =۵۵۰۰~۷۰۰۰)

PEG ۴۰۰۰(Mw =۳۵۰۰~۴۵۰۰)

PEG ۱۵۰۰(Mw =۱۴۰۰~۱۷۰۰)

روش استفاده شده برای استخراج پنی‌سیلین، استخراج با حلال سه فازی شامل یک فاز آلی و دوفاز آبی است. فاز آلی شامل ۴۰ میلی لیتر بوتیل استات و دو فاز آبی دیگر شامل پلی اتیلن گلیکول ۳۴٪-۱۳٪ (w) و سولفات آمونیوم ۳۴٪ ~۱۰٪ (w) و آب دی یونیزه می‌باشد. وزن کل فاز آبی (شامل پنی‌سیلین به عنوان محصول هدف)، ۸۰ گرم بوده و درصد وزنی تمام اجزاء دراین‌کار آزمایشگاهی بر اساس وزن کل فاز آبی محاسبه شده است. این سیستم سه فازی مایع، با توجه به دانستیه فازها با فاز بالایی، وسطی و پایینی مشخص می‌شود. فاز بالایی شامل بوتیل استات، فاز وسطی شامل پلی اتیلن گلیکول و فاز پایینی شامل سولفات آمونیوم می‌باشد. پلی اتیلن گلیکول ۱۵۰۰ و ۴۰۰۰ به صورت محلول‌های ۵۰٪ (w) و پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ به صورت محلول ۳۰٪ (w) تهیه شدند. پتاسیم پنی‌سیلین و سولفات آمونیوم به طور مستقیم به صورت پودر جامد، مورد استفاده قرارگرفتند. درصد وزنی PEG در محلول ساخته شده، بر اساس کل محلولی آبی می‌باشد. غلظت اولیه پتاسیم پنی‌سیلین در فاز آبی ۳٪ (w) و غلظت‌های اولیه PEG و سولفات آمونیوم در فاز آبی در نتایج هر آزمایش ذکر شده است. ابتدا ۴۰ میلی لیتر بوتیل استات به وسیله استوانه مدرج اندازه‌گیری شده و بقیه اجزاء فاز ATPS از جمله PEG، سولفات آمونیوم، آب دی یونیزه و مقدار مشخصی پنی‌سیلین توسط ترازوی دیجیتالی وزن می‌شوند. تمامی مواد به یک بشر ۱۵۰ میلی لیتری منتقل شده و توسط همزن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه، به صورت ملایم هم زده می‌شوند تا تمامی اجزاءکاملاً با هم مخلوط شوند. در مدت هم زدن، با اسید سولفوریک رقیق، کنترل pH صورت می‌گیرد. پس از طی شدن این زمان، تمامی مواد درون بشر به یک فونل ۲۵۰ میلی لیتری منتقل شده و حدود ۴ تا ۶ ساعت بدون حرکت، توسط گیره و پایه نگهداری می‌شود تا فازهاکاملاً از هم جدا شوند. حجم هر فاز به طور جداگانه در استوانه مدرج اندازه‌گیری شده و نمونه ای از هر فاز برای تعیین مقدار پنی‌سیلین آماده می‌گردد. سپس ضریب جداسازی Di/j و کسر جرمی Ei، محاسبه می‌شود.

$$D_{i/j} = \frac{C_i}{C_j} \quad \text{و} \quad E_i = \frac{C_i V_i}{C_u V_u + C_m V_m + C_L V_L}$$

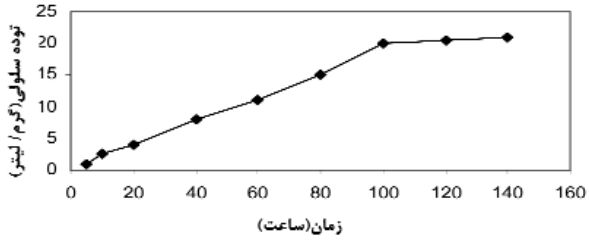
Ei:کسر جرمی پنی‌سیلین در فاز i

Ci: غلظت پنی‌سیلین در فاز i

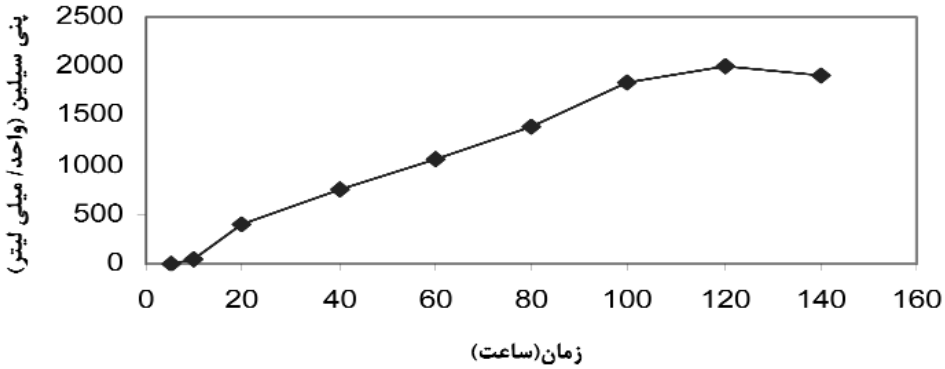
Vi: حجم فاز i

برای تعیین مقدار استخراج پنی‌سیلین از مایع تخمیری، به جای پنی‌سیلین در آزمایشات فوق از فیلتریت حاوی پنی‌سیلین استفاده می‌شود. به منظور بهینه‌سازی مرحله استخراج، عوامل مؤثر در این مرحله از جمله تأثیر غلظت اجزاء تشکیل دهندهٔ فاز (پلی اتیلن گلیکول و سولفات آمونیوم)، تأثیر غلظت پنی‌سیلین، تأثیر pH و تأثیر جرم مولکولی پلی اتیلن گلیکول مورد بررسی قرارگرفتند[۷و۸و۱۰و۱۱].

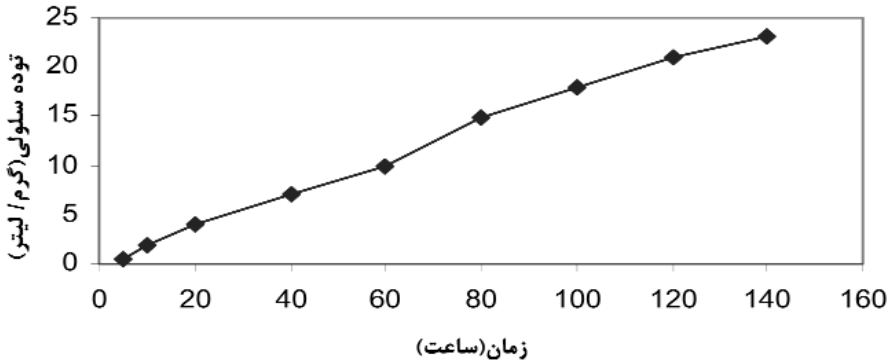
**نتایج تجربی** - آزمایش‌ها در دو مرحله‌کلی انجام شده اند. مرحله اول شامل بررسی رشدکپک و تولید پنی‌سیلین توسط دوگونه‌کپک ۵۰۳۱ و ۵۰۳۳ در ارلن و فرمانتور و مقایسه آن‌ها با یکدیگر و مرحله دوم شامل جداسازی پنی‌سیلین تولید شده با استفاده از روش جدید و مؤثر استخراج سه فازی حلال می باشد. پس از آن بهینه‌سازی فرآیند استخراج مورد بررسی قرارگرفته است. در شکل‌های ۲و۳ رشد وتولید پنی‌سیلین توسط‌گونه ۵۰۳۱ در ارلن و شکل‌های ۴و۵ رشد و تولید پنی‌سیلین را برای گونه ۵۰۳۳ نشان داده شده است.



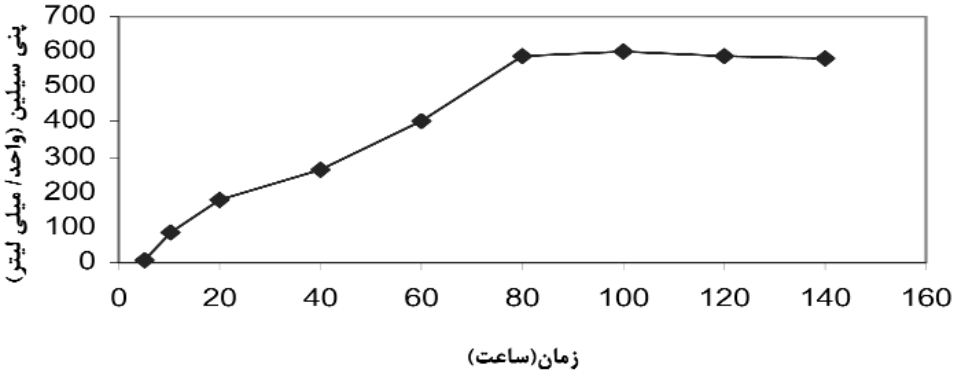

**شکل۲- جزییات رشد و تولید پنی‌سیلین برای‌گونه ۵۰۳۱ در ارلن (گلوکز: لاکتوز، ۱:۳)**




**شکل۳- جزییات رشد و تولید پنی‌سیلین برای گونه ۵۰۳۱ در ارلن (گلوکز: لاکتوز، ۱:۳)**

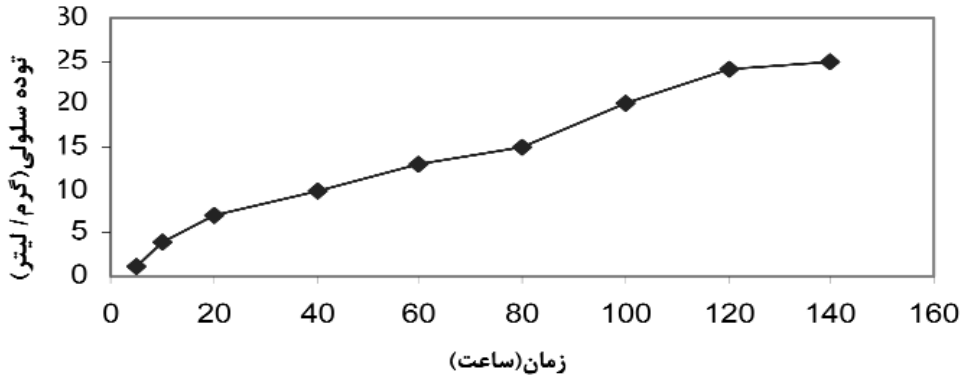



**شکل۴-جزییات رشد و تولید پنی‌سیلین برای گونه ۵۰۳۳ در ارلن(گلوکز: لاکتوز، ۱:۳)**

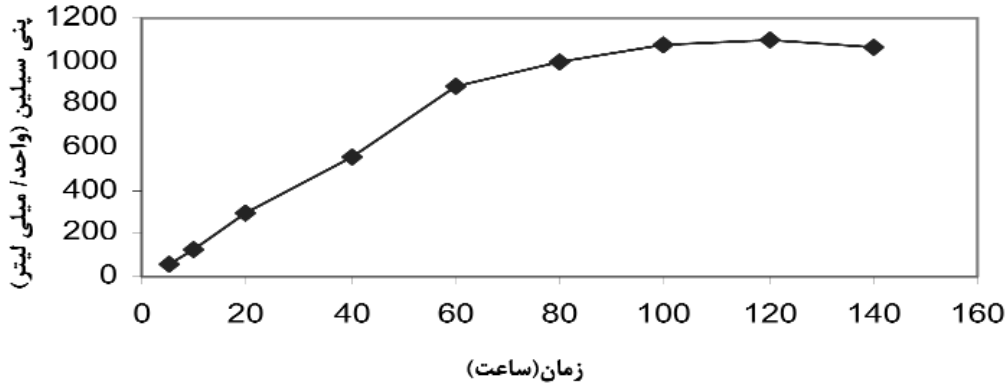



**شکل۵- جزییات رشد و تولید پنی‌سیلین برای گونه ۵۰۳۳ در ارلن(گلوکز: لاکتوز، ۱:۳)**

همان‌طورکه در نمودارها نشان داده شده است گونه ۵۰۳۱ سریع‌تر رشد کرده و توده سلولی بیشتری به وجود می‌آورد. همچنین پنی‌سیلین تولید شده توسط ۵۰۳۱ بیشتر (تقریباً ۲ برابر) می‌باشد. به منظورتولید پنی‌سیلین در فرمانتور پس از تهیه محیط پیش کشت و تلقیح هر دو سوش، ارلن‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شیکر قرارداده می‌شوند. محیط کشت فرمانتور، در شرایط استریل به آن اضافه می‌شود. در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری از فرمانتور صورت گرفته، pH محیط تهیه، عکس میکروسکوپی از نمونه‌ها، اندازه گیری پنی‌سیلین و تعیین وزن توده سلولی انجام می‌گیرد. رشدگونه ۵۰۳۳ در فرمانتور و ارلن، از لحاظ ظاهری کمی با هم تفاوت دارد. در فرمانتور دانه‌های کپک به اندازه وقتی‌که در ارلن رشد می‌کردند، بزرگ نمی‌شوند. دلیل آن وجود اختلاط و هوادهی و همزن می‌باشد. pH اولیه محیط کشت معادل ۷ بوده و هر ۲۴ ساعت یک بار به منظور تنظیم pH، فنیل استیک اسید به فرمانتور اضافه می‌شود. شکل‌های ۶و۷ جزییات رشد و تولید پنی‌سیلین را برای گونه ۵۰۳۳ در فرمانتور نشان می‌دهند.



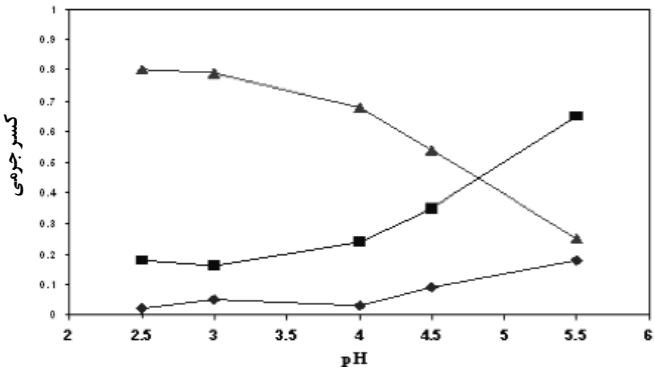

**شکل۶- جزییات رشد و تولید پنی‌سیلین برای گونه ۵۰۳۳ در فرمانتور (گلوکز: لاکتوز، ۱:۳)**




**شکل۷-جزییات رشد و تولید پنی‌سیلین برای گونه ۵۰۳۳ در فرمانتور (گلوکز: لاکتوز، ۱:۳)**

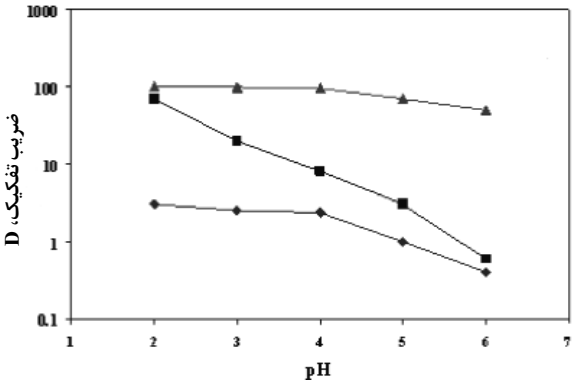
با توجه به نمودارهای فوق و مقایسه آن‌ها با نمودارهای ۴و۵ مشخص می‌شود که میزان تولید توده سلولی درفرمانتور بیشتر و سریع‌تر بوده و هم‌چنین مقدار تولید پنی‌سیلین نیز تا حدود ۲ برابر افزایش می‌یابد.

مرحله دوم آزمایش‌ها شامل جداسازی پنی‌سیلین تولید شده با استفاده از روش جدید و مؤثر استخراج سه فازی حلال بود. در شکل‌های ۸و۹اثر pH برکسر جرمی و ضریب تفکیک پنی‌سیلین نشان داده شده است.




**شکل ۸- اثر pH برکسر جرمی پنی‌سیلین در فیلتریت**

**▲ فاز بالایی، ■ فاز میانی، ◆ فاز پایینی**




**شکل ۹- اثر pH بر ضریب تفکیک پنی‌سیلین در فیلتریت**

**▲ ضریب تفکیک میانی به پایینی، ■ ضریب بالایی به پایینی، ◆ ضریب بالایی به میانی**

Du/l, Du/m با شیب تندی در اثرکم‌کردن pH زیاد می‌شود. m/l Dبا شیب‌کمتری افزایش می‌یابد. در pH=۳/۵ باکاهش pH، پنی‌سیلین به تدریج در فاز بالا غنی می‌شود. تمایل پنی‌سیلین به دیگر فازها به طور قابل قبولی کاهش می‌یابد، ابتدا فاز بالا و سپس فاز میانی. هنگامی که پنی‌سیلین G در pHهای بالاتر در فاز میانی جمع می‌شود. در pH بالای ۵/۵ مقدار پنی‌سیلین G در فاز بالا بسیار ناچیز می‌شود. وقتی که pH کاهش می‌یابد پنی‌سیلین موجود در فاز میانی به فاز بالا منتقل می‌شود.در pH حدود ۲/۵، حدود ۹۰٪ وزنی پنی‌سیلین در فاز بالا جمع می‌شود وکمتر از ۰/۱٪ wt در فاز پایین.

## نتیجه‌گیری

هنگامی که از محیط کشت لاکتوز ـ گلوکز به عنوان منبع کربن برای تولید پنی‌سیلین استفاده می‌کنیم، تولید پنی‌سیلین بیشتر می‌شود. گونه PTCC ۵۰۳۱ حدود ۴ برابر گونه دیگر پنی‌سیلین تولیدکرده وگونه مناسب‌تر تشخیص داده می‌شود. این گونه توانایی تولید تا ۲۰۰۰U/ml دارد.مقدار تولید در فرمانتور از ارلن‌کمتر است. در مرحله استخراج حدود ۸۰ درصد از پنی‌سیلین موجود در نمونه بازیابی شد.

با توجه به این‌که در مقیاس صنعتی مشکل آلودگی محیط زیستی در اثر استفاده از حلال فراری مثل بوتیل استات وجود دارد، پیشنهاد می‌شود با یک سیستم برگشتی، این حلال بازیابی و برگشت داده شود. هم‌چنین پیشنهاد می‌شودکه با روش‌هایی درصد استخراج افزایش یابد به عنوان مثال استفاده از پلیمرهای دیگر به جای پلی اتیلن گلیکول. جزییات سیستم سه فازی پیچیده است و نیاز به آزمایشات و تحقیقات بیشتری برای بهتر درک کردن خصوصیات تفکیک‌پذیری اجزاء وجود دارد. بهترین حالت این است‌که پنی‌سیلین در فاز بالایی جمع شودکه این کار باکاهش pH و استفاده از پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی کمتر (ویسکوزیته کمتر) امکان‌پذیر است. علاوه بر این باعث کاهش هزینه و راحت‌تر شدن عملیات استخراج نیز می‌شود.

## مراجع


[1] Demain Al, Elander R, the B- lactam antibiotics: past, present and future,5-14,1999

[2] www.TomvolkFungi.net

[3] Raper K, the penicillin saga remembered, American society for microbiology news 44 (12): 645-65,1978

[4] Shuler M,bioprocess engineering basic concepts ; 3-8, 527-530,2005

[5] Boxer G,colorimetric determination of benzylpenicillin, Analitical chemistry: 670- 673,1976

[6] Moo-Young, comprehensive biotechnology, the principles, application & regulation of biotechnology in industry and medicine,157-170,1993

[7] Jauregi P, recovery of small bioparticles interfacial partitioning, biotechnology and bioengineering, 355-364,2001

[8] Van Bochore, two and three liquid phase equillibria in the system water 2-heptone + carloctam + ammonia sulfate: experiments and modeling, fluid phase equilibria.1029-1044,2002

[9] Shen S, process integration for production of 6-aminopenicillanic acid from penicillin G fermentation broth, process biochemistry, 571-574,2005

[10] Xinghua S., Zhidong C., Huizhou L.recovery of butyl acetate in wastewater of penicillin plant by solvent sublation,2005

[11] Matsumoto m, ohtani t, kondo k, comparison of solvent extraction and supported liquid membrane permeation using an ionic liqid for concentrating penicillin g, journal of membrane science,1-21,2006