

*Tolypocladium inflatum*을 이용한 Cyclosporin A 발효에서 아미노산과 유기질소원의 영향

김정근 · 이병규¹ · 장석원² · 박용덕² · 노용택^{2*}

한국산업기술대학교 생명화학공학과, ¹유한양행 중앙연구소, ²영동대학교 Bio RIC 및 의생명과학과

Effect of Amino Acids and Organic Nitrogen Sources on Cyclosporin A Fermentation by *Tolypocladium inflatum*. Kim, Jeong-Keun, Byung-Kyu Lee¹, Seog-Won Chang², Yong-Deok Park², and Yong-Taek Rho^{2*}. Department of Chemical Engineering and Biotechnology, Korea Polytechnic University, Siheung 429-793, Korea, ¹Yuhan Research Institute, Yongin 449-902, Korea, ²Bio RIC and Department of Medico-Life Science, Youngdong University, Yeongdong 370-701, Korea – Cyclosporin, an immunosuppressant, is a representative group of biologically active secondary metabolites produced by the fungus *Tolypocladium inflatum*. The amount and ratio of cyclosporin derivatives in the culture broth are an important factors for the production of cyclosporin A and the purification in the industrial process. Therefore, we studied the effect of amino acids and complex organic nitrogen sources using *Tolypocladium inflatum* mutants on the productivity of cyclosporin A and the ratio of cyclosporin derivatives. Overproducing mutant YHC-004 having seven times higher productivity than mother strain's could be obtained through the artificial mutation by UV irradiation. The concentration and kind of organic nitrogens and amino acids shows the profound effect on the productivity of cyclosporin A and ratio of cyclosporin derivatives. As a result, it was possible to raise the productivity and the ratio of cyclosporin A up to 3,430 mg/L and 93% respectively, but on the other hand the other cyclosporin derivatives decreased less than 2% in the culture broth.

Key words: Cyclosporin A, immunosuppressant, *Tolypocladium inflatum*, nitrogen source.

서 론

Cyclosporin A는 메틸화된 leucine, valine 등 11개의 아미노산으로 구성된 환상형의 올리고펩타이드성 물질로서 신장 등의 장기이식 수술 후 면역 억제제로 널리 사용되고 있다. 또한 약하지만 좁은 항균스펙트럼을 지닌 항진균 활성, 항기생충 활성, 항염증 활성도 갖고 있다[11, 17]. 균사체형 불완전균류인 *Tolypocladium inflatum*(일명 *Tolypocladium niveum*)을 이용한 발효 공정으로 생산되는 cyclosporin 혼합물은 구조적으로 유사한 25 여종의 cyclosporin 유도체들로 이루어졌는데 그 가운데 면역억제제로서 활성이 가장 높은 것이 cyclosporin A이다[2, 5, 7, 12, 15, 18]. 25종의 cyclosporin derivative들 가운데, *Tolypocladium inflatum*을 생산균주로 사용한 최적화된 배양 조건에서는 cyclosporin 유도체들 중 A, B, C, D, G, U 등 6가지 유도체 거의 100%를 조성하며, 그 가운데 cyclosporin A가 거의 70% 이상을 차지한다[11]. Cyclosporin A는 자연계에 흔하지 않은 아미노산인 butenyl dimethyl threonine, 2-amino-butryic

acid 그리고 D-alanine,을 1,2,8번 위치에 각각 지니고 있다[19]. 최적화된 배양 조건에서 주로 생성되는 6가지 cyclosporin 유도체들은 단지 2번째와 6번째 아미노산만이 다른 화학적 구조를 가지고 있다(Fig. 1). Cyclosporin 발효 공정에서 주요 유도체들인 A, B, C, D, G, U 등의 생성 농도와 유도체 구성비율이, 특정 아미노산들의 첨가에 따라 크게 변화된다고 보고 되었다[4, 9, 11, 14].

Cyclosporin A와 그 유도체들은 non-ribosomal 생합성 기작에 의한 11개 아미노산의 순차적인 활성화와 N-methylation, 그리고 cyclosporin synthetase에 의한 최종적인 oligopeptide 형성 등에 의해 생합성 된다[11, 20]. Agathos 등은 *T. inflatum*의 야생형 및 변이주를 사용한 cyclosporin A 생합성에서 질소원인 L-valine 혹은 L-threonine을 첨가할 경우 cyclosporin A 생성량과 구성비율이 변화함을 확인하였다[13, 14]. 탄소원의 경우 야생형은 sorbose, 변이주 M6는 maltose를 사용할 경우 cyclosporin A 생산성이 우수함을 보고하였다[3, 16]. 한편 Issac 등은 접종되는 spore의 농도와 그 형태가 cyclosporin A 역가와 구성비율에 미치는 영향에 대하여 보고하였다[10]. Lee 등은 종균 접종에 사용할 *Tolypocladium niveum*의 포자 형성 최적인 배지 조성 과 cyclosporin A 생산성을 향상 시킬 수 있는 접종량을 보고 하였다[15]. 최근에 통계학적 방법인 factorial experimental

*Corresponding author

Tel: 82-43-740-1113, Fax: 82-43-740-1109

E-mail: rhosong@youngdong.ac.kr

FeSO₄ · 7H₂O 5000 mg을 1 L의 증류수에 용해하여 제조하였다. 플라스크 배양은 NBS-4330 rotary shaker(New Brunswick Scientific, NJ, USA)를 사용하였고, 100 mL의 배양액을 포함한 500 mL baffled flask에서 25°C, 200 rpm의 조건으로 실시하였다.

건조 균체량의 측정

건조 균체량은 10 mL의 배양액을 미리 무게를 측정해 놓은 여과지(Whatman GF/C)에 감압 여과한 후 증류수로 세척한 다음 105°C에서 4시간 동안 건조시켜 측정하였다.

배양액으로부터 cyclosporin A의 추출

50 mL Falcon tube에 배양액 10 mL를 취한 후 10N NaOH 1 mL를 첨가하고 진탕한 후 10 mL의 n-butyl acetate를 첨가하여 27°C, 180 rpm으로 18시간 추출하였다. 추출이 완료되면 원심분리(3,000×g, 10분)하여 n-butyl acetate 층과 배양액층을 분리하였다. 분리된 0.5 mL n-butyl acetate를 drying vial에 옮긴 후 heating block(60°C)에 넣고 multinozzle manifold를 통하여 blowing air를 공급하여 건조하였다. 건조 후 1 mL ethyl alcohol를 최초 농도의 2배 희석이 되도록 첨가한 후 격렬하게 흔들어 남은 cyclosporin A를 용해하였다. 용해된 시료는 0.2 µm filter(Minisart, Sartorius사)로

불순물을 제거한 후 분석을 위한 시료로 사용하였다[2].

HPLC 분석

Cyclosporin A 추출법에 따라 준비된 시료는 HPLC (Jasco, Japan)를 사용하여 Kreuzig 방법을 변형하여 분석하였다[12]. 컬럼은 Nucleosil 5 C₈(4 mm × 250 mm)을 사용하였고, 이동상은 acetonitrile : water = 57 : 43을 사용하였다. 시료주입량 5 µL였고, 유속은 1 mL/min, 컬럼온도는 75°C였으며, 검출기의 파장은 UV 210 nm로 하여 분리하였다. 표준 물질로 cyclosporin A, B, C, D, G, U를 사용하여 정량적으로 비교 분석하였다. Cyclosporin 각 유도체들의 HPLC 분석시 체류시간은 용출 순서대로 cyclosporin C가 10.93분, cyclosporin B가 12.05분 cyclosporin U가 13.76분 cyclosporin A가 15.06분 cyclosporin G가 17.56분, cyclosporin D가 19.75분이었다(Fig. 2).

Ratio of cyclosporin A (%)

$$= \frac{\text{Cyclosporin A}(\mu\text{g/mL})}{\text{Cyclosporin (A+B+C+D+G+U)}(\mu\text{g/mL})} \times 100$$

결과 및 고찰

아미노산의 첨가 효과

Table 1은 Cyclosporin A 분자의 구성 아미노산 가운데 분지 아미노산으로 다른 아미노산에서 turn-over가 어려운 valine, leucine, isoleucine 등의 단독 첨가 효과를 확인한 결과이다. 그리고 대조구로는 아무것도 첨가되지 않은 것과 분자 구성 아미노산이 아닌 arginine을 첨가한 것을 사용하였다. 변형된 SSM 생산배지에 5종의 아미노산을 각각 0.8% (w/v) 첨가하여 비교한 결과, L-valine 첨가구는 비첨가구보다 cyclosporin A 역가는 3.7배, cyclosporin A 구성비율은 약 40% 증가하였다. 다음으로 L-leucine 첨가구는 비첨가구보다 cyclosporin A 역가는 3.4배, cyclosporin A 구성비율은 30% 증가하였다. 세번째로 L-threonine의 첨가구는

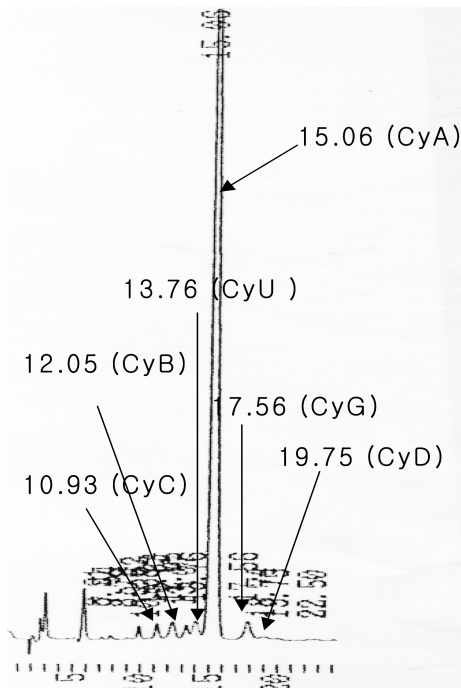


Fig. 2. Chromatogram from HPLC analysis of *T. inflatum* YHC-004 metabolites. Retention time (minutes) : cyclosporin C, 10.93; cyclosporin B, 12.05; cyclosporin U, 13.76; cyclosporin A, 15.06; cyclosporin G, 17.56; cyclosporin D, 19.75. Relative ratios of cyclosporin A : B : C : D : G : U were approximately 94.0 : 1.8 : 1.0 : 0.1 : 1.8 : 1.3.

Table 1. Effect of the addition of various amino acids on the cyclosporin A production.

Amino acid (0.8%,w/v)	Cyclosporin A (mg/L)	Ratio of cyclosporin A (%)
No addition	753	44.9
L-Valine	2,780	85.2
L-leucine	2,597	74.6
L-Isoleucine	776	49.2
L-Arginine	1,059	52.0
L-Threonine	1,846	68.0

*Culture condition : in 100 mL/500 mL flask, at 25°C, in 200 rpm, for 288 hrs, and in modified SSM containing maltose 8% and Bacto-peptone 2%.

cyclosporin A 역가는 2.4배, cyclosporin A 구성비율은 23% 증가한 것으로 나타났다. 그러나 cyclosporin A 분자 구성 성분이 아닌 L-isoleucine과 L-arginine의 첨가구에서는 cyclosporin A 역가와 구성비율의 증가가 거의 확인되지 않았다. 따라서 cyclosporin A 발효에서 생산성 증가 및 구성 비율 향상을 위하여 L-valine의 최적 첨가 농도와 L-valine 및 L-leucine이 혼합 첨가 실험이 추가적으로 필요하였다. Cyclosporin A 구성 아미노산 가운데 변형된 아미노산인 butenyl-dimethyl threonine, 2-amino butyric acid 및 methyl화된 valine과 leucine은 산업적 생산에서 원료로 사용할 수 있는 실효성이 없다고 판단되어 그것들의 전구체인 L-threonine, L-valine, L-leucine에 대해서만 첨가 실험을 실시하였다.

L-Valine의 농도별 첨가 효과

L-Valine의 첨가 변화 농도에 따른 cyclosporin A 역가와 구성비율의 변화를 조사한 결과, cyclosporin A 구성비율은 L-valine 1% 범위 내에서 첨가농도가 증가할수록 지속적으로 증가한 반면, cyclosporin A 역가는 L-valine 첨가 농도 증가에 따라 같이 증가하다가 0.75% L-valine의 첨가시 가장 높았고, 1% 첨가구에서는 다시 감소하였다(Table 2). 0.75% L-valine 첨가구의 cyclosporin A 구성비율은 85.9%로 비첨가구 55.8%와 비교하여 30% 증가하였고, cyclosporin

A 역가는 2,740 mg/L로 비첨가구 912 mg/L와 비교하여 3배 증가하였다. 그러나 측정된 건조균체량을 볼 때 L-valine의 첨가가 성장에는 큰 영향을 미치지 않은 것으로 확인되었다. 고생산성 변이주 *T. inflatum* YHC-004의 모균주인 *T. inflatum* ATCC 34921를 0.75% L-valine이 첨가된 변형 SSM 배지에서 배양한 결과, 총 cyclosporin 역가는 515 mg/L였고, cyclosporin A 구성비율은 83.9%였다. 따라서 L-valine의 첨가 효과는 모균주와 변이주 모두에서 동일한 것으로 확인되었다(Table 2).

L-Valine과 L-leucine의 혼합 첨가 효과

Cyclosporin A 분자의 중요 구성 아미노산이면서, Table 1 실험에서 첨가 효과가 우수한 L-valine과 L-leucine의 아미노산 혼합 첨가효과를 검토하였다(Table 3). Cyclosporin A 역가에서는 L-valine 0.5% 및 L-leucine 0.5% 혼합구가 3,150 mg/L로 가장 우수하였고, cyclosporin A 구성비율에 있어서는 L-valine 1.5%, L-leucine 0.5% 혼합구가 95.8%로 가장 양호 하였다. 전체적인 경향을 볼 때 L-valine과 L-leucine을 혼합할 경우 cyclosporin A 역가가 향상되었으며, 특히 L-leucine이 0.5%첨가될 경우에 비첨가구 또는 다른 농도 첨가구들보다 cyclosporin A 구성비율이 높은 것으로 확인되었다. 그러나 valine은 1% 이상에서는 단독이든, L-leucine과 혼합된 실험구이든 모두 cyclosporin A가 L-valine

Table 2. Effect of L-valine on the productivity of cyclosporin A and the ratio of cyclosporin derivatives in the various concentrations.

L-Valine (%, w/v)	Ratio of cyclosporin A (%)	DCW (g/L)	Concentration of cyclosporin derivatives (mg/L)						
			A	B	C	D	G	U	Total
0.0	55.7	38.4	912	245	378	61	7	33	1,636
0.25	63.9	33.8	932	184	254	53	7	29	1,459
0.50	78.8	39.3	1,726	202	134	70	11	48	2,191
0.75	85.9	38.8	2,740	150	115	89	19	77	3,190
1.00	87.9	33.9	2,074	90	71	61	14	50	2,360

*Culture condition : in 100 mL/500 mL flask, at 25°C, in 200 rpm, for 288 hrs and in modified SSM containing maltose 8% and Bacto-peptone 2%.

*In mother strain *T. inflatum* ATCC 34921, the concentration of total cyclosporin is 515 mg/L, the concentration of cyclosporin A is 432 mg/L and ratio of cyclosporin A is 83.9 % in modified SSM containing 0.75% of L-valine.

Table 3. Effect of the mixture of L-valine and L-leucine on the productivity of cyclosporin A and the ratio of cyclosporin derivatives.

L-Val + L-Leu (%, w/v)	Ratio of cyclosporin A (%)	Concentration of cyclosporin derivatives (mg/L)						
		A	B	C	D	G	U	Total
0.5 + 0	78.7	2,088	244	164	84	13	61	2,654
0.5 + 0.25	88.4	2,681	97	140	30	21	61	3,030
0.5 + 0.5	92.6	3,150	61	82	17	44	61	3,414
1.0 + 0	88.0	2,709	114	95	77	18	65	3,078
1.0 + 0.5	94.4	3,056	45	68	16	32	19	3,236
1.5 + 0.5	95.8	2,882	36	45	15	15	15	3,008
2.0 + 0.5	95.1	2,911	34	43	21	34	18	3,061

*Culture condition : in 100 mL/500 mL flask, at 25°C, in 200 rpm, for 288 hrs, and in modified SSM containing maltose 8%, L-Val 0.5%, and L-Leu 0.5%.

0.5% 첨가구보다 모두 낮았다. 따라서 L-valine 0.5%와 L-leucine 0.5%를 혼합 첨가한 실험구가 cyclosporin A를 산업적으로 생산할 경우 가장 합리적인 것으로 판단되었다. 또한 cyclosporin A의 구성 비율이 높아질수록 낮아지는 유도체들로는 cyclosporin B와 C가 가장 변화 폭이 컸다. 두 번째 아미노산만 서로 다른 유도체들 사이에 구성 비율이 L-valine 및 L-leucine 첨가에 의해 변화되는 것은 구성 아미노산 첨가로 cyclosporin 총 역가도 높아지지만 cyclosporin A 생합성 경로로 물질수지가 기울어지는 것으로 판단되었다.

복합 유기질소원의 첨가 효과

미생물 생장에 필수적인 유기질소원이면서, cyclosporin A 분자 구성을 위한 아미노산 공급원인 복합 유기질소원들에 대해서 그 첨가 효과를 확인하였다(Table 4). L-valine 0.5%와 L-leucine 0.5%가 첨가된 변형 SSM 배지에서 유기질소원들이 cyclosporin A 역가와 구성 비율에 영향을 미치는 영향을 검토한 결과, beef meat 유래의 Bacto-peptone을 첨가할 경우 cyclosporin A 역가는 3,145 mg/L로 비첨가구 1,590 mg/L보다 2배 증가하였고, cyclosporin A 구성비율은 약 13% 증가하였다. 그러나 우유 단백질인 casein 유래의 Merck-peptone, Casitone, Tryptone 그리고 NZ-amine 등의 복합 유기질소원 첨가시에는 비첨가구보다 cyclosporin A 구

성비율은 13% 이상 증가하였으나 cyclosporin A 역가는 비첨가구보다 오히려 약 10-20% 감소하였다. 이러한 현상은 복합유기질소원의 유래가 milk protein보다 meat protein인 경우가 cyclosporin A 생산성에 유리한 것으로 해석되었다. 특히 동일한 우유 유래 영양원이지만 다른 것들에 비하여 유기질소함량이 낮은 whey가 cyclosporin 생산성이 더 높았던 것은 우유 유래 유기질소원이 cyclosporin 생합성을 오히려 억제하는 것으로 해석되었다. 또한 가수분해 정도가 증가하는 Merck-peptone, tryptone, NZ-amine, casitone 순서대로 cyclosporin 총 역가는 감소되어 우유 유래 유기질소원은 이화대사 억제 효과가 있는 것으로 추정되었다.

Bacto-peptone의 농도별 효과

복합유기질소원 가운데 가장 효과가 좋았던 beef meat의 가수 분해물인 Bacto-peptone의 농도별 첨가 효과를 검토한 결과, Bacto-peptone 1% 첨가시 cyclosporin A 역가는 3,144 mg/L로 비첨가구보다 약 1.7배 증가하였고 cyclosporin A 구성비율도 8.3% 향상된 반면에, cyclosporin B와 cyclosporin C는 각각 2.1%, 5.4% 감소되었다(Table 5). 그러나 배지 내에 1.0% 이상의 Bacto-peptone을 첨가할 경우에는 cyclosporin A 역가 및 구성비율에서 큰 차이가 없는 것으로 보아 cyclosporin A 역가 및 구성 비율에 대한 포화

Table 4. Effect of the addition of various organic nitrogen sources on the productivity of cyclosporin A and the ratio of cyclosporin derivatives.

Organic nitrogen source (2%, w/v)	Ratio of cyclosporin A (%)	Final pH	Concentration of cyclosporin derivatives (mg/L)						
			A	B	C	D	G	U	Total
No addition	79.7	3.1	1,590	140	194	2	22	48	1,996
Bacto-peptone	92.7	6.2	3,145	75	78	7	20	68	3,393
Merck-peptone	94.2	6.9	1,579	44	20	2	5	27	1,677
Tryptone	93.0	6.8	1,460	49	27	2	8	24	1,570
NZ-amine	93.0	6.7	1,245	46	25	1	5	16	1,338
Casitone	92.8	6.7	959	32	27	1	1	13	1,033
Whey	94.0	2.9	1,725	42	40	2	2	24	1,835

*Culture condition : in 100 mL/500 mL flask, at 25°C, in 200 rpm, for 288 hrs, and in modified SSM containing maltose 8%, L-Val 0.5%, and L-Leu 0.5%.

Table 5. Effect of Bacto-peptone on the productivity of cyclosporin A and the ratio of cyclosporin derivatives in the various concentrations.

Bactopeptone (% w/v)	Final pH	DCW (g/L)	Ratio of cyclosporin A (%)	Concentration of cyclosporin derivatives (mg/L)						
				A	B	C	D	G	U	Total
0.0	2.6	30.0	85.0	1,797	82	137	40	15	42	2,113
0.5	5.7	28.0	92.9	2,379	44	16	41	21	59	2,560
1.0	5.7	30.1	93.4	3,144	50	27	27	27	91	3,366
1.5	5.8	33.5	92.7	3,128	61	37	28	28	91	3,373
2.0	5.9	31.3	93.3	3,124	60	36	16	29	84	3,349
3.0	5.9	33.7	92.0	3,181	69	59	17	35	97	3,458

*Culture condition : in 100 mL/500 mL flask, at 25°C, in 200 rpm, for 288 hrs, and in modified SSM containing maltose 8%, L-Val 0.5%, and L-Leu 0.5%.

Table 6. Comparison of the productivity of cyclosporin A and its ratio in various *T. inflatum* mutants.

Strain	Ratio of cyclosporin A (%)	Concentration of cyclosporin derivatives (mg/L)						
		A	B	C	D	G	U	Total
ATCC 34921	92.9	483	11	12	2	3	9	520
YHC-001	93.1	1,134	28	22	5	7	22	1,218
YHC-002	92.9	1,372	31	35	4	7	28	1,477
YHC-003	93.5	2,018	43	41	4	17	35	2,158
YHC-004	94.0	3,430	66	36	4	66	47	3,649

*Culture condition : in 100 mL/500 mL flask, at 25°C, in 200 rpm, for 288 hrs and in modified SSM containing maltose 8%, Bacto-peptone 1%, L-Val 0.5%, and L-Leu 0.5%.

농도가 1%인 것으로 확인되었다.

변이주들의 역가 및 구성비를 비교

T. inflatum ATCC 34921의 UV 돌연변이체를 agar piece 배양한 후 *Aspergillus niger*를 피검균주로 하여 cyclosporin A 고생산 변이주 4종을 선별하였다. Table 6은 본 연구에서 확립된 최적화 배지 조건에서 모균주인 *T. inflatum* ATCC 34921과 선별된 변이주 4종의 cyclosporin A 역가 및 유도 체 구성 비율을 비교한 결과이다. 고생산 변이주 YHC-004의 cyclosporin A 역가는 3,430 mg/L로, 모균주인 ATCC 34921보다는 약 7.1배, YHC-002보다는 약 2.5배, YHC-003보다는 약 1.6배 증가한 값을 나타내었다. 그러나 모균주와 변이주 4종의 cyclosporin A 구성비율은 약 93-94% 범위에서 비슷한 값을 나타내었으며, YHC-004의 경우 cyclosporin B는 1.8%, C는 1.0%, D는 0.1%, G는 1.8%, U는 1.3%로서 모두 2% 미만을 나타내었다(Fig. 2).

요 약

Cyclosporin A 분자의 구성 아미노산 가운데 분지 아미노산인 valine, leucine, isoleucine, threonine 등에 대한 첨가 효과를 확인한 결과, L-valine 첨가구는 비첨가구보다 cyclosporin A 역가는 3.7배, cyclosporin A 구성비율은 약 40%로 가장 크게 증가하였다. 그리고 L-valine의 최적 농도는 0.75%로서 비첨가구에 비하여 cyclosporin A 역가는 3배, cyclosporin A 구성비율은 30% 증가하였다. 그러나 L-valine 1% 단독 첨가구보다 L-valine 0.5%, L-leucine 0.5% 혼합구가 cyclosporin A 역가에서는 약 16% 우수하였고, cyclosporin A 구성비율에서는 약 5% 증가하였다. 또한 다양한 유기질소원의 첨가 효과를 확인한 결과, meat peptone인 Bacto-peptone 첨가구는 유기질소원 비첨가구보다 cyclosporin A의 역가는 약 2배, cyclosporin A 구성비율은 약 13% 증가하였고, Bacto-peptone의 최적농도는 1%인 것으로 확인되었다. 그러나 Casiton, Tryptone, NZ-amine 등 우유 유래 유기질소원 첨가구의 경우, 비첨가구보다 cyclosporin A 역가가 오히려 약 10-20% 감소하는 현상을

보여 cyclosporin A 생합성을 억제하는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 최적화된 배지 조건에서, 모균주인 *T. inflatum* ATCC 34921과 UV 조사로 얻어진 4종의 cyclosporin A 고생산 변이주 4종의 생산성을 비교한 결과, 변이주 YHC-004의 cyclosporin A 역가는 3,430 mg/L로 모균주인 ATCC 34921보다 약 7.1배로 증가하였지만, 모균주와 변이주 4종의 cyclosporin A 구성비율은 약 93-94% 범위에서 비슷한 값을 보였다.

감사의 글

본 연구는 영동대학교 바이오지역혁신센터(Bio RIC)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Abdel-Fattah, Y. R., H. E. Enshasy, M. Anwar, H. Omar, E. Abolmagd, and R. A. Zahra. 2007. Application of factorial experimental designs for optimization of cyclosporin A production by *Tolypocladium inflatum* in submerged culture. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 1930-1936.
2. Agathos, S. N., J. W. Marshall, C. Moratiti, R. Parekh, and C. Madhosingh. 1986. Physiological and genetic factors for process development of cyclosporine fermentations. *J. Ind. Microbiol.* **1**: 39-47.
3. Agathos, S. N., C. Madhosingh, J. W. Marshall, and J. Lee. 1987. The fungal production of cyclosporin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **506**: 657-662.
4. Billich, A. and R. Zocher. 1987. Enzymatic synthesis of cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **262**: 17258-17259.
5. Borel, J. F. 1986. Cyclosporin and its future. pp 9-18. *In Cyclosporins, Progress in allergy*, vol. 38, Karger, Basel.
6. Chun, G-T. and S. N. Agathos. 1991. Comparative studies of physiological and environmental effects on the production of cyclosporin A in suspended and immobilized cells of *Tolypocladium inflatum*. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 256-265.
7. Dreyfuss, M., E. Harri, H. Hofmann, H. Kobel, W. Pacheand, and H. Tschertter. 1976. Cyclosporin A and C - New metabolites from *Trichoderma polysporum*. *Eur. J.*

- Appl. Microbiol.* **3**: 125-133.
8. El Enshasy H., Y. Abdel-Fattah, A. Atta, H. Omar, S. Abou, El Magd, R. A. Zahra, M. Anwar. 2008. Kinetics of cell growth and cyclosporin A production by *Tolypocladium inflatum* when scaling up from shake flask to bioreactor. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 128-134.
 9. Fang, J. R., X. D. Tang, L. Y. Ren, Q. Lin, and X. Z. Huang. 1990. The effect on the biosynthesis of cyclosporin A by the addition of amino acids. *Clin. J. Antibiot.* **15**: 140-141.
 10. Issac, C. E., A. Johnes, and M. A. Pickard. 1990. The production of cyclosporins by *Tolypocladium niveum* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 121-127.
 11. Kobel, H. and R. Traber. 1982. Directed biosynthesis of cyclosporins. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 237-240.
 12. Kreuzig, F. 1984. High speed liquid chromatography with conventional instruments for the determination of cyclosporin A, B, C, and D in fermentation broth. *J. Chromatogr.* **290**: 181-186.
 13. Lee, J. and S. N. Agathos. 1989. Effect of amino acids on the production of cyclosporin A by *Tolypocladium inflatum*. *Biotechnol. Lett.* **11**: 77-82.
 14. Lee, J. and S. N. Agathos. 1991. Dynamics of L-valine in relation to the production of cyclosporin A by *Tolypocladium inflatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 513-517.
 15. Lee, M. J., H. N. Lee, K. Han, and E. S. Kim. 2008. Spore inoculum optimization to maximize cyclosporin A production in *Tolypocladium niveum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 913-917.
 16. Margaritis, A. and P. S. Chahal. 1989. Development of a fructose based medium for biosynthesis of cyclosporin A by *Beauveria nivea*. *Biotechnol. Lett.* **11**: 765-768.
 17. Sekar, C. and K. Balaraman. 1998. Optimization studies on the production of cyclosporin A by solid state fermentation. *Bioprocess Eng.* **18**: 293-296.
 18. Traber, R., H. Hofmann, and H. Kobel. 1988. Cyclosporins - new analogs by precursor directed biosynthesis. *J. Antibiot.* **42**: 591-596.
 19. Wenger, R. M. 1984. Synthesis of cyclosporin. *Helv. Chim. Acta* **67**: 502-506.
 20. Zocher, R., N. Madry, H. Peeters, and H. Kleinkauf. 1984. Biosynthesis of cyclosporin A. *Phytochemistry* **23**: 549-551.

(Received July 30, 2008/Accepted May 17, 2009)