

## بررسی تخمیر، جدا سازی و شناسایی سیکلوسپورین A با کاربرد ژل کروماتوگرافی، روش ضد قارچی و طیف سنجی

سید منوچهر غروی<sup>۱\*</sup> (Ph.D)، ناصر خدائی<sup>۲</sup> (Ph.D)، رحیم بحری نجفی<sup>۳</sup> (Ph.D)

۱ - دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۲ - انستیتو پاستور ایران، تهران

۳ - دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

### خلاصه

سابقه و هدف: قارچ ناقص *T. Inflatum* مولد سیکلوسپورین A از طریق کونیدیوم تولید می‌کند. اسپوره‌های آن در محیط‌های مناسب مرطوب یا جامد محتوی عصاره مالت و در حرارت بین  $30^{\circ}\text{C}$  -  $6^{\circ}\text{C}$  رشد می‌نمایند. سیکلوسپورین‌ها از متابولیت‌های قارچ ماکرولیدی می‌باشند. مهم‌ترین اثر درمانی سیکلوسپورین A، تضعیف سیستم ایمنی و تشکیل آنتی‌بادی در رد کردن پیوند اعضا می‌باشد. هدف این تحقیق، افزایش تولید سیکلوسپورین A به روش جهش، توسط اشعه ماورای بنفش و فراهم کردن محیط کشت برای آگزوتروف‌های به دست آمده است.

مواد و روش‌ها: *Tolypocladium (915 DSM)*، محیط کشت عصاره مالت و سابورد دکستروز ۴ درصد، با کتوپیتامین، کازئین هیدرولاز و عصاره مخمر دهیدراته شدند. قارچ روی محیط جامد محتوی ۲٪ عصاره مالت، ۴٪ عصاره مخمر و ۲٪ آگار دکستروز در  $\text{pH}=7/5$  کشت و در حرارت  $24^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. استخراج سیکلوسپورین‌ها پس از سونیکیت کردن توسط ژل کروماتوگرافی انجام گرفت. برای افزایش تولید سیکلوسپورین A جهش با اشعه فرابنفش و برای ردیابی، از روش اسپکتروفتومتری فرابنفش، تحت قرمز و روش ضدقارچی استفاده گردید. یافته‌ها: حاصل کشت روی محیط آگار - عصاره مالت در حرارت  $24^{\circ}\text{C}$ ، کلنی‌های سفید مخملی بود. نمونه‌ها و فراکسیون‌های جدا شده با ژل کروماتوگرافی دارای اثر ضدقارچی روی *آسپرژیلوس نیجر* بودند. طیف سنجی با اشعه فرابنفش مرئی، حداکثر جذب (مطابق  $220-230\text{nm}$   $\lambda_{\text{Max}}$ ) مشابه استاندارد نشان داد و طیف فروقرمز نیز مطابق با طیف استاندارد سیکلوسپورین A بود.

نتیجه‌گیری: آگزوتروف‌های حاصل از موتاسیون قارچ، در محیط‌های صنعتی و محیط خام کشت شدند. بهترین کشت و تولید با استفاده از عصاره مالت همراه با پس‌آب کارخانه روغن‌کشی از ذرت در تاریکی امکان پذیر است.

کلمات کلیدی: سیکلوسپورین A، تخمیر، کروماتوگرافی، جهش، اثرات ضدقارچی

### مقدمه

طبقه‌بندی جدید آن را *Tolypocladium inflatum* *gams* می‌نامند که کد آن NRRL 8044 است [۷]. این قارچ‌ها از طریق اسپوره‌های غیرجنسی (کونیدیوم) تولید می‌نمایند [۱۲]. اسپورها در محیط‌های

در سال ۱۹۷۰ سوش‌های جدیدی از قارچ ناقص که دارای مرحله کونیدی بود از خاک‌های تروژ *Wisconsin* آمریکا و *Hardanger vidda* به دست آمد. در

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۷۹۲۲۵۸۲-۰۳۱۱، نمابر: ۶۶۸۰۰۱۱-۰۳۱۱

Bactopectamin از کارخانه Difico آمریکا، کازئین هیدرولیز شده از کارخانه Gibco آمریکا، عصاره دهیدراته مخمر از آمریکا، عصاره مالت و ساپورد ۴٪ آگار دکستروز از کارخانه مرک آلمان و ملاس چغندر از ایران (کارخانه قند) تهیه شد. مواد اضافه شده به محیط کشت از جمله اسید آمینوبوتیریک، آگار خالص، دکستروز، مالتوز، اوره، سولفات آهن، هیدروژن فسفات پتاسیم، سولفات منیزیم و نیترات سدیم از کارخانه مرک آلمان، سیکلوسپورین A و D از کارخانه ساندوز سوئیس و سایر مواد شیمیایی از کارخانه مرک آلمان تهیه شدند. محیط کشت کامل جامد برای جهش میکروارگانسیم و به صورت مایع (بدون آگار) برای تخمیر استفاده شد. این محیط شامل دکستروز (۴۰ گرم) با کوپتون (۵ گرم)، کازئین هیدرولیز شده اسیدی (۵ گرم)، عصاره مخمر (۲/۵ گرم)، آگار (۲۰ گرم)، آب مقطر تا ۱۰۰۰ میلی لیتر و  $pH = 5/6$  است. به محیط فوق، پس از سرد شدن، ۸ گرم در لیتر آلفا آمینوبوتیریک که از طریق فیلتراسیون استریل شده بود اضافه گردید.

محیط کشت ملاس (۳٪). این محیط شامل ملاس کارخانه (۳۰ میلی لیتر)، نیترات سدیم (۳ گرم)، آلفا آمینوبوتیریک اسید (۸ گرم)، آب مقطر تا ۱۰۰۰ میلی لیتر و  $pH = 5/3$  است.

روش تهیه کشت اولیه. آمپول پئوفیلز اولیه (Preculture میکروارگانسیم) را در لامینار ایرفلو که قبلاً ضد عفونی شده با احتیاط باز کرده، با مقدار کمی از آن سوسپانسیون تهیه شده سوسپانسیون روی محیط کشت آگار محتوی ۲٪ عصاره مالت و ۴٪ عصاره مخمر به صورت خطی کشت شد و برای ۱۵ روز در انکوباتور  $24^{\circ}C$  قرار داده شد.

روش کشت روی محیط جامد. از قارچ *T. Inflatum* به صورت خطی روی پلیت محتوی ۲٪ عصاره مالت و ۴٪ عصاره مخمر و ۳۰٪ آگار در  $pH = 5/7$  کشت تهیه و برای مدت ۱۳ روز در حرارت  $24^{\circ}C$  انکوبه گردید. میسلیموم های روی محیط جامد به وسیله سرم فیزیولوژی و میله شیشه ای استریل برداشته

مناسب از جمله مالت، اسیدهای آمینه و ترکیبات آلی و غیر آلی ازت دار و املاح معدنی رشد می نمایند [۴]. سیکلوسپورین A و C دارای اثر ضدقارچی قوی به ویژه برای آسپرژیلوس نیجر می باشند که از روش های شناسایی این ماده به شمار می آید [۱۱].

از خواص درمانی سیکلوسپورین A تضعیف پاسخ ایمنی و تشکیل آنتی بادی در رد کردن پیوند اعضا است [۱۲]. علاوه بر آن اثرات ضداحتقان [۱۳]، مصرف ذر آرتريت و پسوریازیس است [۱۱]. در سال های اخیر پیشرفت های قابل ملاحظه ای در فن آوری تخمیر روی داده است که اثرات آن در صنایع غذایی، شیمیایی و دارویی به ویژه آنزیم ها، واکسن ها و آنتی بیوتیک ها چشمگیر است. در این فرایند میکروارگانسیم ها به عنوان بهترین بیوکاتالیزور از مؤثرترین عوامل تغییر دهنده مواد آلی در طبیعت می باشند؛ چون در مقایسه، از قدرت تکثیر سریعی برخوردارند، به علاوه در شرایط ساده، درجه حرارت کم و مواد غذایی ارزان، قادر به تولید مقادیر زیادی از مواد مورد نظر می باشند [۱]. امروزه فرآیند تخمیر روی محیط های جامد از روش های متداول است و افزایش تولید سلول ها با استفاده از جهش سلولی (به کمک اشعه فرابنفش، باکتریوفاژ و جابجایی قطعات DNA از روش های شناخته شده می باشد [۳]. کاربرد اشعه UV برای جهش سلولی در مقایسه با استفاده از مواد شیمیایی اثرات مرگ آور کمتری دارد. روش های کروماتوگرافی (ژل کروماتوگرافی و کروماتوگرافی جذبی) با به کار بردن آلومینا، سیلیکاژل و یا زغال فعال از بهترین راه های جداسازی و جستجوی ترکیبات بیوسنتز می باشد. برای جداسازی و شناسایی سیکلوسپورین از قسمت های جدا شده از ستون کروماتوگرافی، از روش بیولوژی (سیلندر و پلیت) بر علیه آسپرژیلوس نیجر استفاده می گردد.

## مواد و روش ها

مواد. از مجموعه میکروبی DSM آلمان، *Tolypocladium* (915 DSM)، محیط های کشت

گرم خانه  $25^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. زمانی که کلنی قارچ روی پلیت‌ها تشکیل می‌شد، پلیت‌ها را از انکوباتور خارج کرده و با توجه به هاله‌های ایجاد شده در اطراف سیلندرها، فراکسیون‌های محتوی سیکلوسپورین مشخص می‌گردید. USP، این روش را برای تعیین مقدار آنتی بیوتیک‌ها نیز پیشنهاد کرده است [۹].

روشهای طیف سنجی. علاوه بر روش میکروبی برای شناسایی، از روش‌های طیف‌سنجی و کروماتوگرافی برای شناسایی و تأیید وجود سیکلوسپورین استفاده گردید:

الف - طیف Uv/vis: برای گرفتن طیف، ابتدا سیکلوسپورین A استاندارد با غلظت  $100\mu\text{g/ml}$  در متانول تهیه شد که با دستگاه اسپکتروفومتر Uv/vis در محدوده  $200-400$  نانومتر طیف آن تهیه و سپس از عصاره‌های مختلف و قسمت‌های جدا شده از ستون‌های جذبی و ژل سفادکس LH20 طیف Uv تهیه گردید.

ب - طیف IR: برای تهیه طیف IR، سیکلوسپورین A استاندارد؛ ابتدا مطابق با توصیه USP پودر را به مدت ۳ ساعت در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  خشک کرده و سپس با پودر BrK آن را صلایه و دیسک تهیه شد. از سیکلوسپورین D استاندارد به همین ترتیب طیف تهیه و به عنوان طیف شاخص نگهداری شد. برای مقایسه، از کریستال‌های حاصله در برخی از نمونه‌ها با استفاده از BrK طیف تهیه شد.

## نتایج

- تولید کلنی. محصول کشت T.Inflatum روی محیط کشت آگار - عصاره مالت در انکوباتور  $24^{\circ}\text{C}$  پس از ۴ روز ایجاد کلنی‌های سفید مخملی روی سطح پلیت نمود که پس از ده روز قطر آنها به ۴۵ میلی‌متر رسید.
- ردیابی سیکلوسپورین A در عصاره‌ها و فراکسیون‌ها. نمونه‌هایی که دارای اثر ضدقارچی بودند در اطراف سیلندر هاله‌ای از عدم رشد ایجاد نمودند (شکل A-۱). برخی از فراکسیون‌های جدا شده از ستون نیز دارای اثر ضدقارچی بودند که معمولاً پشت سر هم از ستون خارج می‌گردیدند. برای مثال هاله ایجاد شده

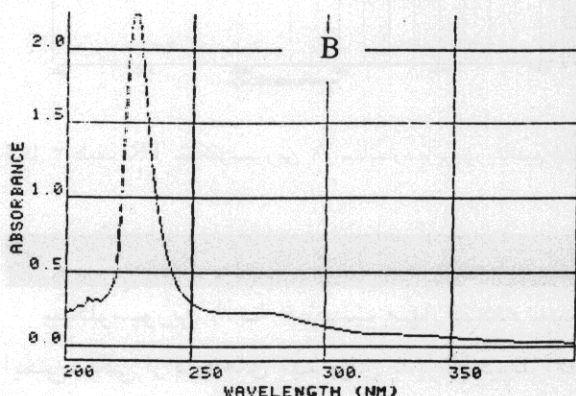
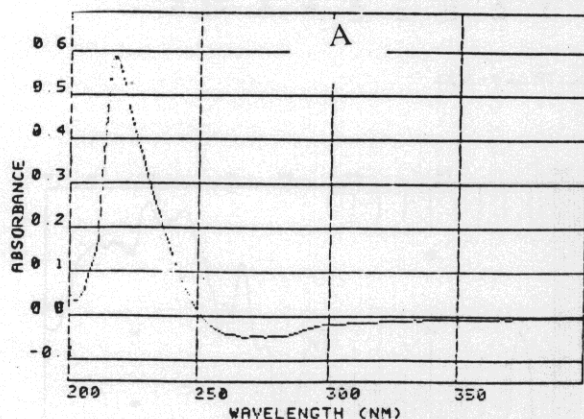
شده و به محیط تخمیر در ارلن منتقل گردید.

روش استخراج سیکلوسپورین A. محیط تخمیر پس از ۱۳ روز کشت، ابتدا به وسیله سانتریفوژ سرعت ۲-۵ هزار دور در دقیقه خوب به هم زده شد و میسلیم‌ها با صاف کردن به وسیله قیف بوختر از محیط کشت جدا شده، پس از خروج آب از آنها، وزن میسلیم اندازه‌گیری شد. ابتدا میسلیم‌های جدا شده در متانول ۹۰٪ با سونیکیت، خرد و له شد که پس از خروج محتویات آنها [۸] با متانول در روتاری  $30-40^{\circ}\text{C}$  تغلیظ گردید و چربی عصاره توسط پترولتوم اتر گرفته شد.

روش ژل فیلتراسیون. برای جداسازی سیکلوسپورین A از قسمت‌های جدا شده از ستون‌های جذبی از سایر سیکلوسپورین‌ها و ترکیبات مشابه، ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون به کار گرفته شد. برای تهیه ستون از پودر نرم سفادکس LH20 استفاده (سوسپانسیون در متانول) و در ستون با ابعاد  $1 \times 30$  سانتی‌متر ریخته شد، پس از ایجاد یک ستون ۲۵ سانتی‌متری، فراکسیون‌های جذبی اکسید آلومینیوم به کمک شوینده محتوی ۲۵٪ اتیل استات عبور داده شد. حجم فراکسیون‌های جدا شده ۳ میلی‌لیتر بود که در آن سیکلوسپورین A ردیابی گردید.

روش ردیابی سیکلوسپورین A (روش ضدقارچی). برای تشخیص وجود سیکلوسپورین در محلول‌های آزمایش از روش میکروبی و انتشار در آگار استفاده گردید. در این روش از سیلندرها با ابعاد  $10 \pm 1$  میلی‌متر طول و  $6 \pm 1$  میلی‌متر قطر داخلی،  $8 \pm 1$  میلی‌متر قطر خارجی به عنوان مخزن استفاده شد. ابتدا یک لایه آگار مغذی در پلیت‌های استریل با ضخامت یکسان ریخته شد و بعد سوسپانسیونی از اسپور قارچ اسپرژیلوس نیجر در آگار مذاب به مقدار ۱۰۸ml اسپور تهیه گردید، سوسپانسیون به صورت یک لایه نازک و یکنواخت روی آگار در پلیت ریخته شد، پس از سفت شدن لایه محتوی میکروارگانیسم، سیلندرها در عمق یک میلی‌متری قرار گرفت، سپس قسمت‌های جدا شده از ستون داخل سیلندرها وارد گردید، بعد پلیت‌ها در

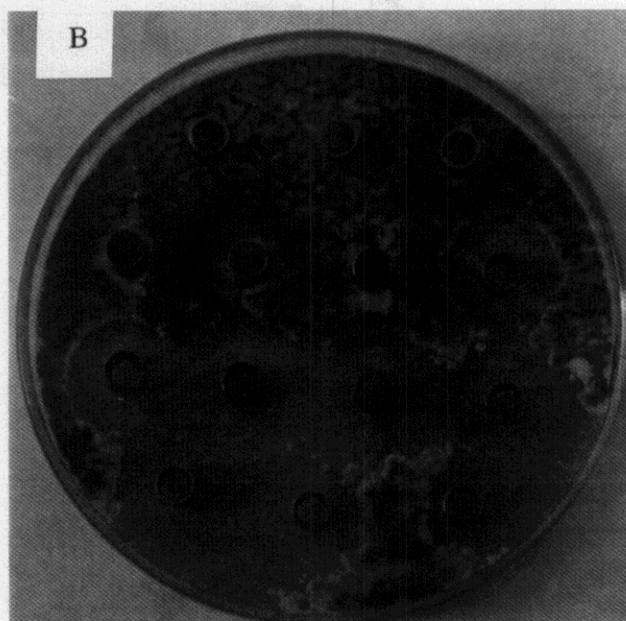
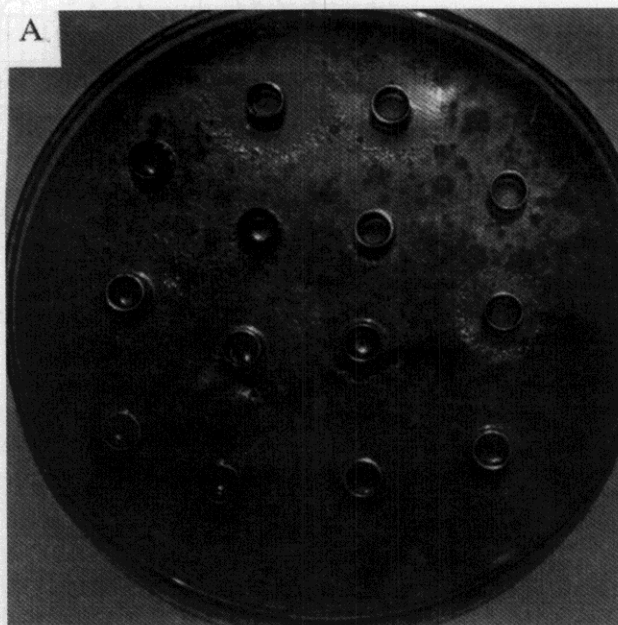
آن  $\lambda_{max} = 220-192$  نانومتر بود (شکل A-۲). از سیکلوسپورین D، با غلظت  $80 \mu\text{g/ml}$  در طیف تهیه شد که کاملاً مشابه با سیکلوسپورین A (حداکثر جذب  $\lambda_{max} = 220-192$  نانومتر) بود. از عصاره تام  $60 \mu\text{g/ml}$  در متانول نیز منحنی تهیه شد که حداکثر جذب  $\lambda_{max} = 220-230$  نانومتر بود. طیف فراکسیون جدا شده از ستون نیز در شکل B-۲ ملاحظه می‌گردد.



شکل ۲. A: طیف UV/vis سیکلوسپورین A با غلظت  $80 \mu\text{g/ml}$  در متانول. B: طیف UV/vis فراکسیون جدا شده از ستون کروماتوگرافی.

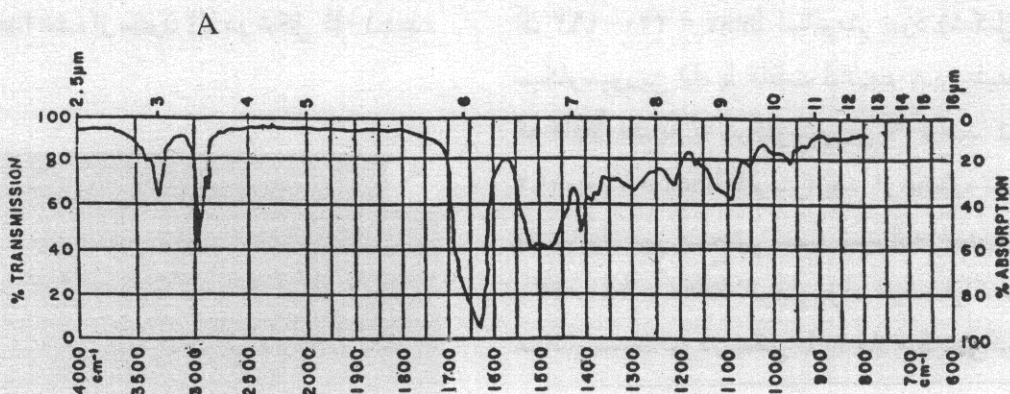
ب - نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز (IR): ابتدا از سیکلوسپورین A استاندارد با Brk دیسک تهیه گردید و طیف آن در محدوده IR گرفته شد (شکل A-۳). برای مقایسه، از کریستال‌های به دست آمده از استخراج و جداسازی نیز طیف IR تهیه شد (شکل B-۳). ایجاد کریستال سیکلوسپورین A بسیار دشوار بود، چون نیاز به نگهداری در استون در حرارت  $150^\circ\text{C}$  داشت (کریستال‌های سوزنی شکل حاصل می‌گردید).

فراکسیون‌های جدا شده از ستون ژل در شکل B-۱ دیده می‌شوند.

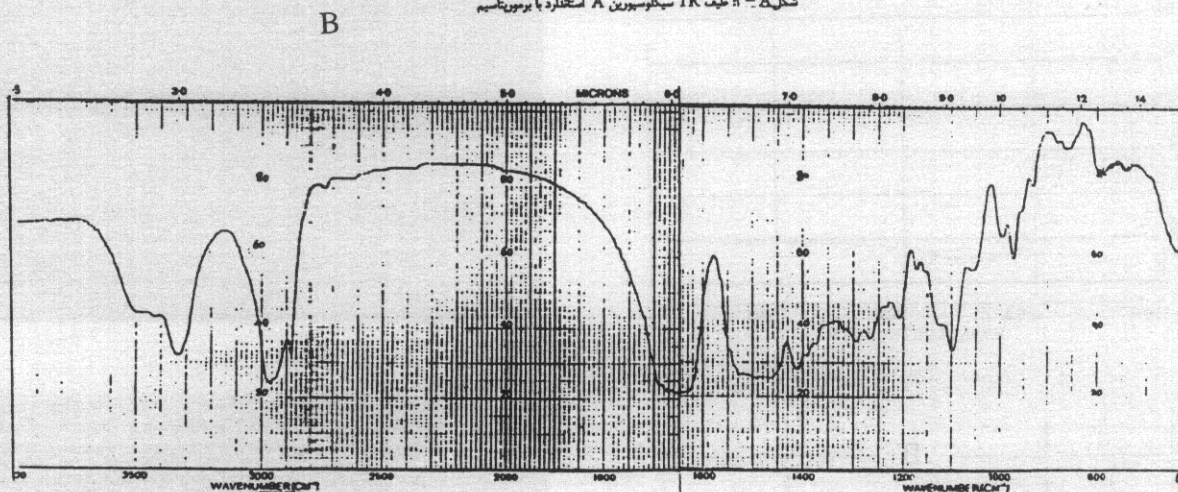


شکل ۱. A: تصویر هاله عدم رشد قارچ اسپرژیلوس نیجر در اثر عصاره‌های استخراج شده از *T. inflatum*. B: تصویر هاله عدم رشد قارچ اسپرژیلوس نیجر در اثر فراکسیون‌های جدا شده از ستون‌های جذب.

۳ - طیف‌سنجی، ردیابی و شناسایی سیکلوسپورین A.  
الف - نتایج طیف‌سنجی فرابنفش و مرئی: ابتدا طیف UV/vis با غلظت  $100 \mu\text{g/ml}$  در متانول در محدوده  $200-400$  نانومتر تهیه شد که حداکثر جذب



شکل ۲- طیف TR سیکلوسپورین A استاندارد با برموریتاسیم



شکل ۳- طیف TR سیکلوسپورین A استاندارد با برموریتاسیم غلظت. B: طیف TR کریستال‌های سیکلوسپورین A از بیوسنتز قارچ *T. inflatum*.

همانند سایر روش‌ها، از جمله استفاده از نیتروژگوانیدین خطر ابتلاء به سرطان را ندارد. در محیط کشت، اسید آمینه به کار رفته آلفا آمینوبوتیریک اسید می‌باشد که بیشتر متابولیسم قارچ را به سمت تولید بیشتر سیکلوسپورین سوق می‌دهد [۱]. سه آگزوتروف A، B و C به دست آمد که دارای میزان میسلیم متفاوتی در محیط‌های تخمیر بودند که براساس میسلیم خشک آنها طبق جدول شماره ۱ به ترتیب A از همه بیشتر و B از همه کمتر بود ولی در عین حال هر سه آگزوتروف از سوش اصلی T بهتر بودند.

از سوش‌های جهشی، کشت اولیه تهیه شد [۵]، که از محیط کشت سابورد دکستروز آگار و هم از محیط آگار همراه با مخمر و عصاره مالت بودند. چنین به نظر می‌رسد که محیط کشت محتوی مخمر و عصاره مالت

## بحث

سیکلوسپورین A با خاصیت مهارکننده سیستم ایمنی، یکی از داروهای مهم برای پذیرش پیوند اعضا است. این دارو در بیماران برای پیوند مغز استخوان یا بیماری‌های خودایمنی، پسوریازیس و آرتریت روماتوئید مصرف می‌گردد. هدف از تحقیق حاضر بررسی بیوسنتز سیکلوسپورین A پس از موتاسیون *T. inflatum* با اشعه UV می‌باشد. در اغلب مطالعات برای تولید سیکلوسپورین A از قارچ ناقص *Tolypocladium inflatum* برای تخمیر استفاده می‌گردد [۱۴]. برای تکثیر و اطلاع از چگونگی راندمان تولید سیکلوسپورین از روش کشت جامد استفاده می‌شود و برای افزایش تولید از روش جهش با اشعه UV کمک گرفته می‌شود، که آگزوتروف‌های مطلوب به دست می‌دهد [۸]. اشعه UV

طیف‌سنجی مرئی و فرابنفش کمک گرفته شد، که در این مورد از طیف فرابنفش سیکلوسپورین A در متانول با حداکثر جذب ۲۱۹ - ۲۲۰ نانومتر استفاده شد، که با مقایسه جزئیات طیف (حداکثر، حداقل و نقاط عطف) می‌توان مشخصات ترکیب خالص را تعیین کرد. البته باید توجه داشت که کاربرد طیف جذبی در نواحی فرابنفش و مرئی در آنالیزهای کیفی محدودتر از سایر روش‌ها می‌باشد، چون ممکن است در مواردی به علت گستردگی نوارهای جذبی احتمالاً تمام جزئیات را مشخص نکند، به همین علت از طیف مادون قرمز سیکلوسپورین نیز کمک گرفته شد، چون به علت داشتن ساختمان‌های ظریف برای مقاصد کیفی مناسب‌تر از طیف UV می‌باشد. با توجه به این واقعیت که هیچ‌گاه دو ملکول با ساختمان‌های شیمیایی متفاوت، دارای طیف مادون قرمز مشابه نخواهند بود، شاید دلیل استفاده از طیف IR برای شناسایی ملکول‌ها باشد. مهم‌ترین شاخص در قله جذب در ناحیه ۱۶۰۰ تا ۱۶۶۰  $\text{Cm}^{-1}$  بود، که نشان دهنده میزان تقریباً بالای ازت با پیوند  $\text{C}=\text{O}$  آمیدی است. به هر صورت طیف IR نمونه که از کریستال‌های جدا شده با BrK تهیه گردیده بود، با طیف استاندارد کاملاً انطباق داشت.

بنابراین به طور خلاصه می‌توان نتیجه این تحقیق را یکی از موارد پیشنهادی برای تولید، جداسازی و شناسایی سیکلوسپورین A مورد مطالعه دقیق‌تر قرار داده و با سایر روش‌های دیگر مقایسه کرد.

### منابع

[۱] معظمی، نسرین. شجاع‌الساداتی. عباس، مقدمه‌ای بر بیوتکنولوژی، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، سال ۱۳۷۴.

[2] Badsgard, O., Fisher, G., Voorhees, J. and Cooper, K.D., The role of the immune system in the pathogenesis of psoriasis, J. Invest. Dermatol., 95 (1990) 32-40.

[3] Feutren, G. and Graffenried, B.V.,

برای بیوسنتز سیکلوسپورین ضروری است. استفاده از آگار برای ایجاد کنیدی و تکثیر قارچ ناقص، ضروری به نظر می‌رسد [۲]. بیشترین کنیدی در دمای  $24^{\circ}\text{C}$  و مدت زمان ۱۳ روز حاصل شد. برای تکثیر اینوکولوم و تخمیر از محیط‌های کشت صنعتی و خام استفاده می‌شود [۲]؛ در این مطالعه نیز از محیط‌های کشت صنعتی مالتوز، گلوکز و محیط کامل استفاده گردیده است. محیط خام ملاس برای تأمین هیدرات‌های کربن [۱۳] و از کازین - پیتون (کازین هیدرولیز شده اسیدی همراه با کوپیتون)، عصاره مخمر و مخلوط متیونین و والین برای غنی سازی محیط کشت استفاده شد [۲]. وجود پیروکسیدین هم در محیط ضروری بود [۱۵]. مدت زمان تخمیر، درجه حرارت و pH از عوامل مهم برای دستیابی به حداکثر تولید سیکلوسپورین بود. در این مطالعه زمان انکوبه کردن ۱۳ روز در حرارت  $27^{\circ}\text{C}$  و میزان هوادهی توسط شیکر با ۱۱۷rpm توصیه می‌گردد. استفاده از سونیکیت برای تهیه سوسپانسیون میسلیم با متانول و بعد اتیل استات و دی‌کلرواتان پیشنهاد می‌گردد [۱۲]. ولی قبل از استخراج، باید بقیه متانول موجود در محیط حذف گردد، چون موجب تشکیل امولسیون و عدم جداسازی فازها خواهد شد. عصاره حاصل از استخراج، احتمالاً محتوی سیکلوسپورین A و سایر سیکلوسپورین‌ها از Z-A می‌باشد و بنابراین باید برای جداسازی، از ژل فیلتراسیون استفاده گردد [۱۴]. در این مطالعه از سفادکس LH2O و متانول برای جداسازی و خالص کردن استفاده گردید. برای ردیابی سیکلوسپورین روش ضدقارچی مناسب بود [۱۱]، زیرا با این روش می‌توان حجم زیادی از نمونه حدود یک میلی‌لیتر را در داخل سیلندر ریخته و کوچک‌ترین اثرات ضدقارچی را مشاهده کرد. این روش، ساده و ارزان است و به وسایل پیچیده‌ای نیاز ندارد. فقط باید توجه داشت که علاوه بر سیکلوسپورین A، سیکلوسپورین C نیز دارای اثر ضدقارچی می‌باشد [۸]. به هر صورت یکی از روش‌های متداول جداسازی و ردیابی می‌باشد.

برای شناسایی و تأیید روش ضدقارچی از

- J. Am. Chem. Soc., 15(1991) 653-658.
- [10] The united states pharmacopeia XXIII-National Formulary XVIII Mack, Pub. Co. Easton, PA. 1995, pp:443-446.
- [11] Wang, D.P., Yilin, C. and Chu, D., Effect of various physical/chemical properties on the transdermal delivery of cyclosporin through topical application D.D.I.P., 23 (1997) 99-106.
- [12] Wartburg, A.V. and Traber, R., Cyclosporins. Fungal metabolites with immunosuppressive activities In: G.P. Ellis, G.B. West (Eds.), Progress in mechanical chemistry. Vol.25. Elsevier Science Pub, 1988, p.1032.
- [13] Wartburg, A.V. and Traber, R., Cyclosporin In : J.F. Borel (Ed.), Progress in allergy, S. Karger, Basel, 1986, pp: 28-45.
- [14] Zocher, R., Nohira, T., Paul, E., Madry N. and Peeters, H., Biosynthesis of cyclosporin A: partial purification and properties of a multifunctional enzyme from *Tolypocladium inflatum*, Biochemistry, 25 (1986) 550-553.
- [15] Zocher, R., Madry, N., Peeters, H. and Klemkauf, H., Biosynthesis of cyclosporin A, Phytochemistry, 23 (1984) 549-551.
- Pharmacology of cyclosporin A (sandimmune) and clinical experience in inflammatory bowel diseases, Schweiz. Med. Wschr., 121 (1991) 748-753.
- [4] Harr, E. and Ruegger, A., United states patent and trademark office, 1979, pp. 4, 117, 118.
- [5] Kobel, H., Loosli, R. and Voges, R., Contribution to knowledge of the biosynthesis of cyclosporin A, Experientia. 39 (1983) 873-876.
- [6] Olive, C. and Richard, L.H., The preparation and some properties of crystalline glucose 6-phosphate dehydrogenase from *leuconostoc mesenteroids*, Biochemistry, 5 (1967) 730-750.
- [7] Petcher, T.J., Weber, H.P. and Ruegger A., Crystal and molecular structure of an iodo-derivative of cyclic undecapeptide cyclosporin A. Chim. Acta., 59 (1976) 1480-1489.
- [8] Rehm, H.J. and Feed. G., Biotechnology, Vol.1, VCH, Germany, 1986, pp: 401-403.
- [9] Senn, H., Weber, C., Kobel, H. and Traber, R., Selective <sup>13</sup>C-labeling of cyclosporin A,