

*Penicillium brevi-compactum*을 이용한 면역억제제 Mycophenolic Acid 발효에서 탄소원 및 질소원의 영향

노용택

영동대학교 보건산업대학 의생명과학과

Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Immunosuppressant Mycophenolic Acid Fermentation by *Penicillium brevi-compactum*

Yong-Taek Rho

Department of Biomedical Science, College of Health and Industry, Youngdong University, Chungbuk 370-701,
Republic of Korea

(Received September 14, 2011 / Accepted September 27, 2011)

Mycophenolic acid blocking the synthesis of xanthosine monophosphate is a nonnucleoside inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase. Therefore mycophenolic acid is a drug currently used as immunosuppressive agent in transplantation of heart, kidney and liver. Mycophenolic acid has been industrially produced through fermentation process by fungus *Penicillium brevi-compactum*. In this study, the profile of mycophenolic acid fermentation was observed in 5L-jar fermentor to investigate the utilization of carbon and nitrogen sources and the production of mycophenolic acid. It was investigated that what kind of carbon sources was better to cell growth and mycophenolic acid production. Fructose was the best carbon source for mycophenolic acid fermentation, but it is the most expensive one. Thereafter molasses containing sucrose as the supply source of fructose was confirmed to be the best carbon source for the industrial production. Use of molasses increased the fermentation yield of mycophenolic acid more than two times higher than glucose. It was confirmed that urea was the best inorganic nitrogen source, which did not give rise to sudden drop of culture pH. Addition of urea increased the fermentation yield of mycophenolic acid about 3.6 times higher than addition of ammonium nitrate as control. Casein, peptone and casamino acid originated from milk protein increased the fermentation yield of mycophenolic acid about 3.4 times higher than control. Peptone and casamino acid, which are casein hydrolysates, increased cell growth considerably as well.

Keywords: *Penicillium brevi-compactum*, fermentation, immunosuppressant, mycophenolic acid

Mycophenolic acid (MPA)는 동종 심장, 신장 이식 거부 반응을 막기 위하여 사용되는 면역억제제로 1995년 미국 FDA 승인을 받았고, 1998년에는 국내 신약으로 허가하여 장기이식 환자들에게 임상적으로 사용되고 있다(4, 6, 11, 14). 또한 간 이식과 자가 면역성 또는 면역에 의한 염증성 질환인 용혈성 빈혈, 수포성 천포창, 염증성 장염, 중증 근무력증, 신장병증, 건선, 류머티스성 관절염, 복막후 섬유화증, 전신성 홍반성 루푸스 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어서 임상 응용 연

구가 계속 진행되고 있다(13). Mycophenolic acid는 미생물을 이용한 이차대사산물 발효 공정을 통해서 생산 되는데, 실제 경우용으로 사용될 경우에는 약물 이행을 위하여 mycophenolate mofetil (MMF)로 에스테르화 시킨 prodrug으로 만들어져 사용되고, 체내로 신속히 흡수된 후에는 효소에 의해 다시 활성형인 MPA로 가수분해되어 약물학적 효능을 나타낸다(1, 6). MPA는 선택적, 가역적, 비경쟁적으로 inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) 활성을 저해함으로써 퓨린 생합성의 *de novo* 경로를 차단하여, guanosine monophosphate (GMP) 합성을 억제한다(7, 16, 19). 림프구들은 다른 세포들과 달리 GMP 합성에 있어서 *de novo* 생합성 경로에 의존적이므로,

* For correspondence. E-mail: rhosong@yd.ac.kr; Tel.: +82-43-740-1371; Fax: +82-43-740-1299

MPA는 T 립프구, B 립프구의 증식을 억제하고 B 립프구에 의한 체액성 면역 반응을 억제한다(11). MPA는 면역억제 활성 외에 항바이러스제, 항암제 활성도 지니고 있고, 자가 면역성 또는 면역에 의한 염증성 질환에도 효과가 있는 것으로 알려진 다기능성 면역억제제이다(2, 19).

MPA 발효 생산에 사용되는 *Penicillium brevi-compactum* Dierckx ATCC46514는 자낭균류에 속하는 푸른곰팡이다. 진균류인 푸른곰팡이를 산업 균주로 사용할 경우, 유전체 크기가 원핵세포 미생물인 세균이나 방선균과 비교할 때 매우 크고 복잡하다. 또한 독특한 균사형태의 생장, 포자형성 등의 세포 분화 과정 및 이차대사산물의 생합성 등 복잡한 대사과정을 갖고 있어, 생산성 향상을 위한 배양 조건 최적화 또는 배지 조성 최적화가 어려운 편이다(8, 17). 본 연구에서는 배지 조성 최적화를 통하여 MPA 발효생산성을 높이고자 하였는데, 특히 에너지/탄소원의 영향, 유기질소원 및 무기질소원의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

ATCC에 보존중인 MPA 발효 균주는 4가지가 있는데 그 가운데 가장 역가가 높게 보고된(15) *Penicillium brevi-compactum* Dierckx ATCC46514를 국내 ATCC 위탁회사인 코람바이오텍(주)를 통하여 구입하였다.

배지 조성

보존 및 계대를 위한 포자형성배지로 Czapeck-Dox 한천배지(8)를 사용하였고, MPA 발효를 위한 종균배양 배지로는 YM 배지(3)를 사용하였는데, yeast extract 3 g, malt extract 3 g, peptone 5 g, glucose 10 g을 DW 1 L에 녹여 살균 후 pH가 6.0-6.3이 되도록 pH를 조절하였다. MPA 생산 배지는 glucose 160 g, NH_4NO_3 5.2 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.56 g, yeast extract 1 g, trace element 용액 2 ml를 DW 1 L에 녹여 사용하였다. Trace element 용액은 $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.7 g, Boric acid 0.056 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 g, ammonium molybdate 0.01 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g를 DW 1 L에 녹인 것이다(5, 8, 17).

배양 조건

Penicillium brevi-compactum ATCC46514를 보존 및 계대를 위해 포자형성배지에 접종하여 28°C 항온기에서 7일간 배양한 다음 형성된 포자를 40 ml 종균배지가 들어 있는 250 ml baffled 삼각 flask에 1 ml당 1×10^6 cfu/ml가 되도록 접종하고 28°C에서 24시간 동안 shaking incubator (SI-4000R, 제이오텍)에서 150 rpm으로 배양을 실시하였다(9). 배지 조성 최적화 실험을 위해서는 생산배지 25 ml가 담긴 250 ml Erlenmeyer flask에 5% (v/v) 접종량으로 종균배양액을 접종한 후 진탕배양기에서 28°C, 150 rpm으로 교반하며, MPA 생산이 정체될 때까지 7일간 배양하였다. 발효조 배양은 5 L 발효조(한국발

효기)에 2 L의 배지를 넣고 10% (v/v)의 종균배양액을 접종하여 배양온도 28°C, 교반속도 300 rpm, 통기량 0.8 vvm으로 고정하여 10일간 배양하였다.

균체량 측정

부피균체량은 배양액 10 ml을 취하여 15 ml의 원심분리관 (Falcon)에 넣어 3000×g에서 15분간 원심분리한 다음 packed mycelia volume (PMV, %)를 측정하였다(10). 건조균사체량 [dry mycelium weight (DMW), g/L]은 미리 건조시켜 무게를 잰 Whatman GF/C filter paper에 배양액 5 ml를 감압 여과시키고, dry oven에서 105°C, 2시간 건조시킨 후 무게를 달아 DMW를 측정하였다.

Glucose 농도 측정 및 암모늄성, 질산성 질소농도 측정

배양액 내의 포도당 농도는 배양시간 경과에 따라 채취한 배양액을 원심분리한 후 상등액을 증류수로 10-100배 희석하고, glucose oxidase electrode를 이용하는 YSI 2700 Biochemistry Analyzer 효소전극(YSI Life Science, Ohio, USA)을 이용하여 포도당의 농도를 측정하였다. 배양액의 무기질소원인 암모늄성 질소농도(NH_4^+ -N)와 질산성 질소농도(NO_3^- -N)는 원심분리 상등액을 시료로 하여 이온측정기(EA940 Ion-specific ISE-Meter, Orion, USA) 본체, 암모니아선택전극(95-12 Ammonia electrode, Orion, USA) 및 질산선택전극(9707 Ionplus Nitrate electrode, Orion, USA)을 이용하여 측정하였다.

Mycophenolic acid의 정량

배양액 5 ml를 취하여 15 ml 원심분리관에 넣고, methanol 5ml를 첨가한 후, 회전형 시험관 혼합기로 30분간 진탕시켜 균체내외의 mycophenolic acid를 추출 용해시킨 다음, 원심분리하여 균체 및 고형분을 침전 시킨 후, 상등액을 0.45 μm 주사기 여과막으로 여과하여 HPLC 시료로 사용하였다. 배양액 내 mycophenolic acid의 농도를 정량하기 위한 HPLC의 분석 조건은 다음과 같았다. 분석에 사용된 컬럼은 C18 column (150×4.6 mm, 5 μm , Phenomenex)이었으며, 컬럼오븐의 온도는 실온으로 하였고, 이동상 용매는 0.1M KH_2PO_4 : acetonitrile (60:40)로 혼합하여 기포를 제거한 후 사용하였다. 용매의 유속은 1.0 ml/min, 검출파장은 305 nm였다(12, 17). 표준 용액은 MPA (Sigma, USA)를 500 mg/L가 되도록 메탄올 용액에 녹여서 사용하였다. HPLC 분석에 사용된 모든 시약은 Sigma사, 용매는 Merck사의 것을 각각 사용하였다.

결과 및 고찰

Penicillium brevi-compactum ATCC46514에 의한 MPA 발효

아직까지 문헌에 *Penicillium brevi-compactum* 의한 MPA 발효과정이 보고된 바가 전혀 없어서, mycophenolic acid 발효 생산 균주인 *Penicillium brevi-compactum* Dierckx ATCC 46514의 발효 패턴을 확인하기 위하여 우선 5 L 발효조에서

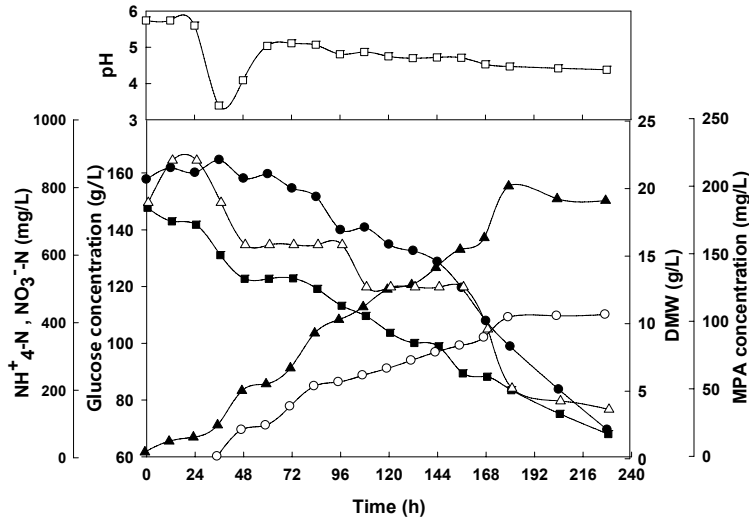


Fig. 1. Time course of the growth and MPA production by *Penicillium brevi-compactum* in the batch culture of 5 L-jar fermentor. □-: pH, ▲-: DMW, ●-: Glucose, ■-: NH₄⁺-N, △-: NO₃⁻-N, ○-: MPA

배양을 실시하였다(Fig. 1). 5L-발효조를 10일간 배양하면서 12시간마다 배양액을 시료로 채취하여 pH, 건조균사체량, 탄소원인 포도당, 무기질소원인 암모늄성질소(NH₄⁺-N), 질산성 질소(NO₃⁻-N) 및 발효산물인 mycophenolic acid를 정량분석하였다. 10일간 배양한 후에도 탄소원인 포도당은 69 g/L 남아 있었고 NH₄⁺-N은 70 mg/L, NO₃⁻-N은 310 mg/L 남아 있어서 탄소원과 무기질소원의 비율이 아직은 최적화 되어있지 않은 것으로 확인되었다. 처음 3일간의 포도당 이용속도와 NH₄⁺-N의 이용속도를 분석해 보면, 초기 pH의 급강하는 포도당 이용에 따른 유기산 축적보다는 NH₄⁺-N의 빠른 이용으로 수소이온이 배양액에 축적되기 때문인 것으로 해석되었다. 따라서 초기 2-3일에만 알칼리 용액으로 pH 조절이 이루어진다면 발효 생산성이 증가할 것으로 예측되었다. 배양 3일 이후에는 다시 pH가 5.0정도로 복귀되어 유지되는 것을 볼 수 있었다. 무기질소원인 NH₄⁺-N이 빠르게 지속적으로 이용되는 반면 그것의 counter ion인 NO₃⁻-N은 서서히 조금씩 이용되다가 180시간 이후에 급격히 사용된 것으로 보아 NH₄⁺-N이 어

느 농도 이상 존재하는 경우에는 이용되지 않다가 NH₄⁺-N가 고갈되면 이용되는 것으로 해석되었다.

*Penicillium brevi-compactum*의 생장은 지속적으로 일어나서 균사체 농도와 점도가 상당히 증가하여 교반 혼합에 어려움이 있었다. MPA 생합성은 배양 2일째 시작되어 배양 8일째 종료되었으며, 이후에는 변화가 없었다. 포도당이 계속 소모되는 동안에 균사체량은 지속적으로 증가하지만 MPA 생합성은 일정 기간 내에서만 이루어지므로, MPA의 산업적 생산을 위해서는 배지 조성에 대한 최적화와 더불어 배양시간의 최적화를 통하여 생산성을 높여야 한다.

탄소원이 생장과 MPA 생산에 미치는 영향

탄소원은 각종 발효에서 가장 많이 사용되면서 배지 비용 가운데 가장 높은 비율을 차지하고, 질소원과 함께 생산성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 지금까지 보고된 MPA 배지의 탄소원들은 모두 포도당이었는데, *Penicillium brevi-compactum*에 의한 MPA의 산업적 생산에 가장 적합한 탄소원을 결정하기 위한 실험 결과를 Table 1에 나타내었다. Glucose를 대조구로 보았을 때, fructose, sucrose, invertose를 첨가한 실험구들에서 성장도 잘 일어났고, MPA 생산성도 매우 높았다. 이 탄소원들의 공통점은 모두 fructose를 함유하고 있다는 것이므로, fructose가 MPA 생산에 가장 좋은 탄소원으로 해석할 수 있다. 반면에 mannose, maltose는 성장에는 차이가 없지만 약간 생산성이 낮았고, starch는 성장만 일어나고 MPA 생산은 전혀 없는 것이 특징이었다. Lactose와 dextrin은 생장과 MPA 생산이 모두 되지 않아서, 이 탄소원들의 대사와 관련된 효소 또는 유전자가 없는 것으로 해석되었다. Fructose나 sucrose를 탄소원으로 사용하면 생산성은 높지만 산업적으로 이용하기에는 매우 고가이므로 Table 1의 결과를 바탕으로 fructose를 함유한 농식품 부산물을 조사하였

Table 1. Effects of various carbon sources on the growth and MPA production

Carbon sources	PMV (%)	MPA (mg/L)
Glucose	16	190
Fructose	18	362
Mannose	9	186
Maltose	19	126
Sucrose	20	341
Lactose	6	7
Invertose	44	245
Dextrin	9	15
Starch	17	0

The concentration of added carbon sources is 160 g/L.

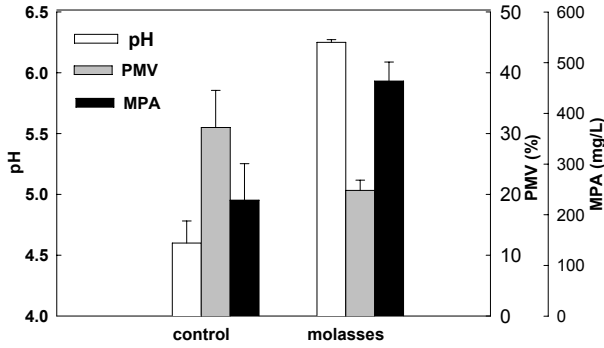


Fig. 2. Effects of molasses as carbon source on final pH, growth and MPA production.

다. 제당 부산물인 당밀을 사용하여 활용 가능성을 조사한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 당밀에는 이당류인 sucrose 형태로 탄소원이 함유되어 있어서 단당류인 포도당보다 유기산 축적이 덜 일어나 배양액 pH도 높게 유지되었고, 생장은 낮게 일어났지만, MPA 생산은 매우 증가하였다. 따라서 MPA의 산업적 생산을 위해서는 비용이 저렴하면서도 생산성이 높은 당밀을 사용하는 것이 바람직한 것으로 확인되었다.

무기질소원이 생장과 MPA 생산에 미치는 영향

생산배지에 지금까지는 NH₄NO₃를 무기질소원으로 사용하여 왔으나 Fig. 1의 MPA 발효 패턴을 보면 무기질소원으로 환원형 양이온인 NH₄⁺과 산화형 음이온인 NO₃⁻을 순차적으로 사용하는 것을 알 수 있었다. 본 실험에서는 무기질소원으로 양이온인 NH₄⁺의 염인 (NH₄)₂SO₄와 NH₄Cl를, 음이온인 NO₃⁻의 염인 KNO₃를, 공유결합 형태의 아미노기를 지닌 요소를 첨가하였다. Fig. 3에 나타난 것처럼, 환원형과 산화형의 무기질소원이 조합된 NH₄NO₃ 대조구와 비교해 볼 때, 산화형 무기질소원인 KNO₃ 첨가구에서는 생장과 MPA 생산성 모두가 약간 감소하였고, 환원형 무기질소원인 (NH₄)₂SO₄와 NH₄Cl 첨가구에서는 생장과 MPA 생산성 모두가 상당히 감소하였다. Fig. 1 발효그래프를 보면, 자화성이 NH₄⁺에 비하여 느린 NO₃⁻가 생장과 발효에는 더 양호한 것으로 나타났다. 그러나 NO₃⁻를 단독으로 사용한 것보다 NH₄NO₃가 생장과 MPA 발효에 더 유리한 것은 질소원 자체의 효과이기 보다는 NH₄⁺가 이용될 때 H⁺가 배양액에 축적되는 반면, NO₃⁻가 이용될 때는 OH⁻가 배양액에 축적되는 기작 때문에 세포 외부의 양성자 농도 즉 pH가 생장 및 MPA 발효에 큰 영향을 주는 것으로 생각되었다(18). 따라서 환원형 양이온 형태의 무기질소원인 NH₄⁺를 공급할 수 있으면서 급격한 pH 변화를 수반하지 않고, 천천히 이용될 수 있는 무기질소원으로 요소를 선택하여 첨가하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 요소를 무기질소원으로 첨가할 경우 생장은 약 1.5배, MPA 생산성은 3.6배 증가하였다. 요소를 이용할 수 있는 *Penicillium brevicompactum*는 urase 효소를 지니고 있어서, 요소를 천천히 가수분해하여 NH₄⁺ 형태의 무기질소원을 공급함으로써 급격한

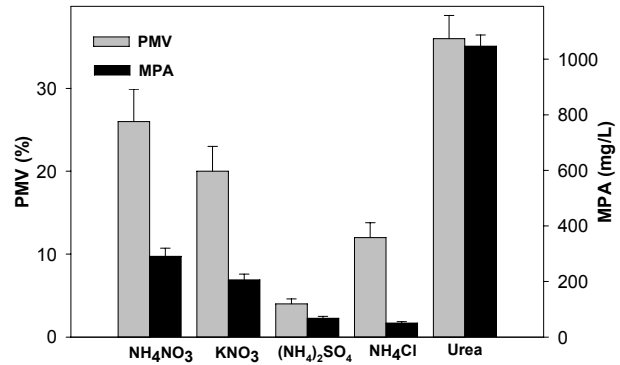


Fig. 3. Effects of various inorganic nitrogen sources on the growth and MPA production. The concentration of added inorganic nitrogen sources is 5 g/L.

pH 변화를 완충하여 높은 생장과 MPA 생산성을 보인 것으로 해석되었다.

유기질소원이 생장과 MPA 생산에 미치는 영향

지금까지 문헌상 알려진 생산배지에서 유기질소원은 yeast extract 1g/L뿐이었다. 소량 첨가된 yeast extract는 유기질소원이라기 보다는 비타민 등과 같은 미량의 성장인자의 공급원의 역할을 하는 것이고, 효소 합성에 필요한 아미노산 공급원으로는 매우 부족하다고 할 수 있다. 또 무기질소원만 사용하면 값은 저렴하지만 유기물로 합성되어 이용되어야 하므로, 빠른 생장과 MPA 생합성이 조기에 일어나게 하기 위해서는 이용이 용이한 유기질소원을 첨가하는 것이 좋다고 판단하여 유기질소원에 대한 실험을 실시하였다. Fig. 4에 나타난 것처럼, 각종 농축산물 유래 유기질소원들을 10 g/L가 되도록 첨가하고 무기질소원만 첨가한 대조군과 비교한 결과, corn steep liquor에서는 생장은 낮고 MPA 생산성은 비슷하였다. Cotton seed meal은 생장은 가장 잘 일어났지만 MPA 생산성은 낮았다. 반면에 콩 유래 질소원인 soy protein, 우유 유래 질소원인 peptone, 축산 유래 질소원인 beef extract, 알코올발효 유래 질소원인 yeast extract에서는 모두 생장은 크게 증가하지 않았지만 MPA 생산성은 매우 증가하였다. 특히 우유 단백질의 부분가수분해물인 peptone은 매우 높은 MPA 생산성을 나타낸 반면, 가수분해 전처리 없이 casein과 lactose로 구성된 skim milk는 MPA 생산성이 상대적으로 낮았다. 따라서 Fig. 5와 같이 우유 유래 유기질소원들만 별도로 효과 실험을 실시하였다. 대조구와 비교하여 탈지우유를 그대로 분무건조한 skim milk와 casein을 trypsin으로 가수분해한 tryptone은 MPA 생산성이 대조군과 유사하였다. 반면에 탈지우유에서 단백질만 정제한 casein, 그것을 부분 효소분해한 peptone, casein을 완전 산가수분해한 casamino acid는 생장도 잘 일어났고 MPA 생산성도 크게 증가하였다. Skim milk는 약 50%가 lactose이고 약 40%가 casein이므로 실제로 첨가된 casein은 4-5 g/L 밖에 안되어, 순수 casein 10 g/L가 첨가된 실험구에 비하여 생산성이 낮았던 것으로 판단되었다. 따라서 우유

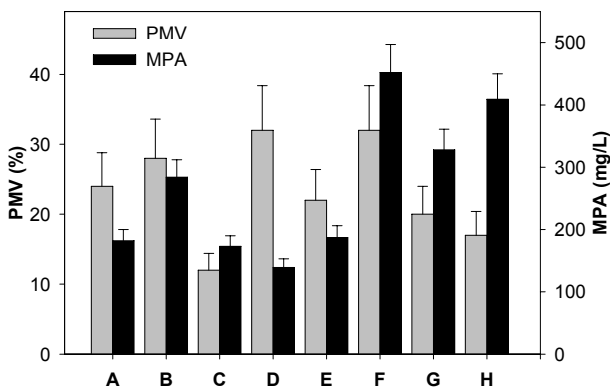


Fig. 4. Effects of various organic nitrogen sources on the growth and MPA production. A; control, B; soy protein, C; corn steep liquor, D; cotton seed meal, E; skim milk, F; peptone, G; beef extract, H; yeast extract. The concentration of added organic nitrogen sources is 10 g/L.

유래 단백질인 casein이 매우 좋은 질소원이이고, 그것을 가수분해한 peptone과 casamino acid도 좋은 질소원이지만 산업용 원료로서는 가수분해 공정을 거치지 않아서 저렴한 casein을 사용하는 것이 바람직하였다.

적요

본 연구에서는 탄소원 및 질소원의 이용 패턴과 mycophenolic acid의 생성 패턴을 확인하기 위하여 먼저 5 L 발효조에서 mycophenolic acid 발효의 경시적 변화를 조사하였다. 그 다음에는 여러 가지 탄소원들이 세포 성장과 mycophenolic acid 생산에 미치는 효과를 조사하였다. 과당이 mycophenolic acid 발효에 가장 좋은 탄소원이었지만, 값이 고가인 단점이 있어서, 과당을 지니고 있는 설탕이 주성분인 당밀을 탄소원으로 사용한 결과 mycophenolic acid의 산업적 생산에 가장 좋은

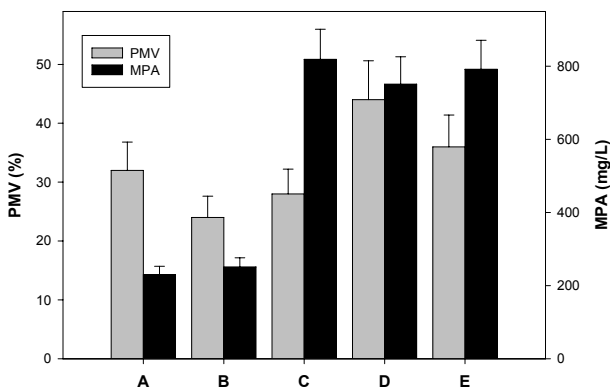


Fig. 5. Effects of various organic nitrogen sources derived from milk protein on the growth and MPA production. A; control, B; skim milk, C; casein, D; peptone, E; casamino acid. The concentration of added organic nitrogen sources is 10 g/L.

것으로 확인되었다. 당밀을 첨가한 실험구는 포도당을 탄소원으로 사용한 대조구에 비하여 발효 생산성이 2배 이상 증가하였다. 양호한 세포 성장과 높은 mycophenolic acid 생산을 얻기 위하여 다양한 무기질소원과 유기질소원에 대한 실험을 실시하였다. 무기질소원들 가운데 요소는 암모늄 형태의 질소원을 천천히 공급함으로써 성장과 mycophenolic acid 생산을 저해하는 배양액의 급격한 pH 하락을 일으키지 않았다. 요소를 첨가한 실험구는 질산암모늄을 첨가한 대조구보다 발효 생산성이 3.6배 증가하였다. 카제인, 펩톤, casamino acid 같은 우유 단백질 유래 유기질소원들은 대조구에 비하여 mycophenolic acid 발효 생산성을 최고 3.4배까지 증진시켰다. 카제인의 가수분해물인 펩톤과 casamino acid는 mycophenolic acid 발효 생산성뿐만 아니라 세포 성장도 촉진하였다.

참고문헌

- Allison, A.C. and E.M. Eugui. 1999. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47, 85-118.
- Diamond, M.S., M. Zachariah, and E. Harris. 2002. Mycophenolic acid inhibits Dengue virus infection by preventing replication of viral RNA. *Virology* 304, 211-221.
- DIFCO manual.1995. *Dehydrated culture media and reagents for microbiology* 11th ed., Difco Laboratories, Detroit, USA.
- Dipchand, A.I., B. Pietra, B.W. McCrindle, H.L. Rosebrook-Bicknell, and M.M. Boucek. 2001. Mycophenolic acid levels in pediatric heart transplant recipients receiving mycophenolate mofetil. *J. Heart Lung Transplant.* 20, 1035-1043.
- Doerfler, D.L., C.D. Bartman, and I.M. Campbell. 1979. Mycophenolic acid production by *Penicillium brevicompactum* in two media. *Microbiology* 25, 940-943.
- Fulton, B. and A. Markham. 1996. Mycophenolate mofetil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and clinical efficacy in renal transplantation. *Drugs* 51, 278-298.
- Jonsson, C.A. and H. Carlsten. 2002. Mycophenolic acid inhibits inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and suppresses production of pro-inflammatory cytokines, nitric oxide, and LDH in macrophages. *Cell. Immunol.* 216, 93-101.
- Kida, T., T. Ishikawa, and H. Shibai. 1981. Method for production of mycophenolic acid by fermentation. *U.S. Patent.* 4,452,891.
- Lafont, P., J.P. Debeauvais, E.M. Gaillaardin, and J. Payen. 1979. Production of mycophenolic acid by *Penicillium roqueforti* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 365-368.
- Lee, B.K., J.K. Kim, H.I. Kang, and J.W. Lee. 2001. Enhanced production of avermectin B1a with *Streptomyces avermitilis* by optimization of medium and glucose feeding. *Kor. J. Microbiol.* 37(2), 158-163.
- Mele, T.S. and P.F. Halloran. 1999. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. *Immunopharmacology* 47, 215-245.
- Na-Bangchang K., O. Supasynhd, T. Supaporn, V. Banmairuroi, and J. Karbwang. 1999. Simple and sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of mycophenolic acid in plasma. *J. Chromatogr. B* 738, 169-173.
- Peter J.H., S. Gregoor, T.V. Gelder, and W. Weimar. 2000. Mycophenolate mofetil, Cellcept, a new immunosuppressive drug with great potential in internal medicine. *Nether. J. Med.* 57, 233-246.

14. Pirsch, J.D. and H.W. Sollinger. 1996. Mycophenolate mofetil-clinical and experimental experience. *Ther. Drug Monit.* 18, 357-361.
15. Queener S.W. and C.H. Nash II. 1978. Procedure for obtaining *Penicillium* species mutants with improved ability to synthesize mycophenolic acid. *U.S. Patent* 4,115,197.
16. Ransom, J.T. 1995. Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Ther. Drug Monit.* 17, 681-684.
17. Sadhukhan, A.K., M.V.R. Murthy, R.A. Kumar, E.V.S. Mohan, G. Vandana, C. Bhar, and K.V. Rao. 1999. Optimization of mycophenolic acid production in solid state fermentation using response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22, 33-38.
18. Stanbury, P.F., A. Whitaker, and S.J. Hall. 1999. Principles of fermentation technology, 2nd ed., p. 175-177. Butterworth-Heinemann, Oxford, UK.
19. Yalowitz, J.A., K. Pankiewicz, S.E. Patterson, and H.N. Jayaram. 2002. Cytotoxicity and cellular differentiation activity of methylenebis (phosphonate) analogs of tiazofurin and mycophenolic acid adenine dinucleotide in human cancer cell line. *Cancer Lett.* 181, 31-38.