

토양 균주 발효 추출물 Nargenicin 및 그 유도체의 항생제 대체 효과능 평가*

조승식*** · 홍준희**** · 채정일***** · 심정현*** · 나중삼***** · 유진철**

Biological Evaluation of Nargenicin and Its Derivatives as Antimicrobial Anti-inflammatory Agents

Cho, Seung-Sik · Hong, Joon-Hee · Chae, Jung-Il ·
Shim, Jung-Hyun · Na, Chong-Sam · Yoo, Jin-Cheol

In vitro antimicrobial and anti-inflammatory activities of nargenicin and its derivatives were investigated. Nargenicin, an unusual macrolide antibiotic with potent anti-MRSA (methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*) activity, was purified from the culture broth of *Nocardia* sp. CS682. And variety of novel nargenicin derivatives was synthesized from nargenicin. Two compounds (4 and 5) exhibit a broad spectrum of antimicrobial activities against infectious bacteria. The antimicrobial activity of derivatives against fifteen organisms was assessed using the minimum inhibitory concentration (MIC). The MIC values were in the ranges of 0.15~80 µg/mL (w/v) for compound 1 and 2, 5~80 µg/mL (w/v) for compound 3, 1.25~40 µg/mL (w/v) for compound 4, and 1.25~80 µg/mL (w/v) for compound 5, depending on the pathogens studied. In vitro, we investigated cytotoxicity and inhibition of nitric oxide (NO) production of synthesized compounds 1-5 in Raw 264.7 cells. LPS-induced nitric oxide releases were significantly blocked by compound 3, 4 and 5 in a dose-dependent manner. At high concentrations (5 µg/mL) compound 5 inhibited the NO production by 95%. Compound 4 inhibited the release of NO in LPS-activated Raw 264.7 cells by 75% at the concentration of 10 µg/mL. Compound 3 inhibited the release of NO in LPS-activated Raw 264.7 cells by 65% at the concentration of 100 µg/mL. On the other hand, nargenicin, compound 1 and

* 본 연구는 농림축산식품부 Gloden Seed 프로젝트사업(2130051)에 의해 이루어진 것임.

** Corresponding author, 조선대학교 약학과(jcyu@chosun.ac.kr)

*** 목포대학교 약학대학 천연약물연구소

**** 조선대학교 약학과

***** 전북대학교 치의학대학원 치과약리학교실(BK21 플러스사업단)

***** 전북대학교 동물생명공학과

2 did not inhibit NO production. These results demonstrated that compound 4 and 5 displayed antimicrobial activity and blocked LPS-induced pro-inflammatory mediators such as NO in macrophages, which might be responsible for its therapeutic application.

Key words : *nargenicin*, *nargenicin derivatives*, *antimicrobial activity*, *anti-inflammatory activity*

I. 서 론

농업용 항생물질의 개발은 1900년대 초반부터 시작되었다. Penicillin의 발견 후 griseofulvin, streptomycin이 발견되었으며, 1950년대 이후로부터 농업용 항생물질은 본격적으로 개발되기 시작하여 streptomycin, oxytetracyclin, 및 polyoxin 등이 실용화에 성공하여 현재까지 사용되고 있다(Vander et al., 1946; Nand et al., 1973; McManus et al., 2002). 농업용 항생제는 미생물에 대한 강한 침투성을 가지고 있는 것이 특징이다. 그러나 농업용 항생제를 장기적으로 사용시 자연계로 유출이 되어 생태계에 악영향을 미칠 것으로 예상되었고, 미생물이 다양한 경로로 항생제 내성을 가지게 되었다. 최근 농업, 축산, 의료 분야에서 공통적으로 떠오르는 문제는 항생물질 내성 세균의 발생이라고 할 수 있다. 농약용 항생물질의 장기사용은 식물병원균의 내성을 유발하였으며 토양하천 및 분변에 존재하는 항생물질 내성균은 잠재적인 공중 위생의 위협 요인으로 인식되었다. 항생물질 내성균 중 대장균의 경우 돼지 분변에서 100%, 퇴비 71.4%, 돼지농가 하천 56.7%, 토양 33.3%로 대부분의 채취지역에서 검출되었고 분변의 경우 대장균, 장구균, 감필러박터균 및 포도상 구균이 검출될 정도로 내성균 출현은 심각하다(Witte, 2000; Jung, 2003). 인체 감염에 관련한 항생제 내성세균에는 메티실린 내성 세균(MRSA, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), vancomycin 내성 장구균(VRE, vancomycin resistant enterococci), carbapenemase 생성 imipenem 내성균 및 extended-spectrum β -lactamase 생성균(ESBL, extended-spectrum β -lactamase)이 대표적이다(Watkins et al., 2013). 항생물질 내성균은 vancomycin, teicoplanin등의 제한적인 항생제로 억제 가능하나(Stille et al., 1988; Kergueris et al., 1994), 최근 이 항생제에 대한 내성균 보고가 증가하고 있고 항생물질 내성균의 경우 대부분의 항생제에 대한 교차 내성을 보이고 있어 새로운 항생물질에 대한 개발이 시급하다(Rumore et al., 2010; Ager and Gould, 2012, Chastre et al., 2014; Mendes et al., 2014).

본 연구자들은 항생제 내성균에 유효한 소재를 개발하고자 국내 토양에서 항생물질 생산 신규 방선균을 분리하여 *Nocardia* sp. CS682라 명명하고 균주 발효물에서 항균 물질인 nargenicin을 순수 정제하여 생물학적 특성을 보고하였다(Sohng et al., 2008; Cho et al., 2009). 또한 nargenicin 생합성 경로를 유전학적 수준에서 조절하여 nargenicin 생산성을 증가시켜

보고하였다(Koju et al., 2012, Maharjan et al., 2012). 본 연구에서는 nargenicin 및 유기합성물인 nargenicin 유도체를 사용하여 항생제 내성균에 대한 항균 효과를 확인하고 면역세포인 Raw 264.7 세포를 이용하여 *in vitro* 상에서 세포독성평가 및 nitric oxide(NO) 저해효과를 확인하여 저독성의 항생제 내성 균주 성장 억제제로 활용 가능성을 타진 하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

LPS(Lipopolysaccharide), sodium nitrate, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)은 Sigma(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였고, FBS, penicillin-streptomycin 및 배지는 Gibco(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 용매들은 특급으로 wako(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 사로부터 구입하였다. 본 실험에 사용한 nargenicin은 *Nocardia* sp. CS682(기탁번호 KCTC11297BP, Korean Collection for Type Cultures) 균주의 배양액에서 정제하여 사용하였다. Nargenicin 유도체는 조선대학교 약학대학 의약화학실험실에서 합성한 것을 분양받아 사용하였다.

2. 사용 균주

항균활성 검정을 위하여 그람양성 및 음성균 *Alcaligenes faecalis* ATCC 1004, *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Mycrobacterium smegmatis* ATCC 9341, *Salmonella typhimrium* KCTC 1925, *Escherichia coli* KCTC 1923, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1637, *Enterococcus faecium* ATCC 8043, *Enterococcus cloacae* ATCC13047, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC10537, *Staphylococcus aureus* KCTC1928(R209), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P를 한국생명공학 연구원생물자원센터(Korean Collection for Type Culture, KCTC)에서 분양받아 사용하였으며, 다약제 내성균인 MRSA, VRE, IMP, ESBL은 순천대학교 생물학과 미생물학 실험실에서 분양받아 사용하였다.

3. 항생물질 감수성 시험(MIC test)

항생물질 감수성은 MIC법으로 평가하였다(CLSI, 2007). 시험균주는 MHB(Mueller hinton

broth, Difco)에 배양하였으며, 최종 1×10^6 CFU/mL가 되도록 조정하였다. Nargenicin 및 유도체는 메탄올에 녹여 syringe filter로 무균 여과하여 MHB 배지에 섞었을 때 배지내의 0~80 $\mu\text{g/mL}$ (v/w)가 되도록 조정하여 36°C에서 24시간 배양 후 육안으로 관찰하여 MIC를 판별하였다. 시료 전처리에 사용한 용매에 대한 영향을 확인하기 위해 MHB 배지에 메탄올을 첨가하여 시험균주를 36°C에서 24시간 배양하여 메탄올이 시험균주 생장에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

4. 세포배양

실험에 사용된 마우스 대식 세포 Raw 264.7은 한국세포주은행(Seoul)에서 구입하였다. 세포는 5% CO₂, 37°C 배양기(SANYO, San Diego, CA, USA)에서 배양하였으며 배양액은 10% FBS(fetal bovine serum), 1% penicillin-streptomycin을 함유한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 사용하였다. 배지는 2~3일마다 교환하였으며 세포가 80% 이상 자랐을 때 phosphate buffered saline solution(PBS)로 세척한 후 cell scraper를 사용하여 계대배양 하였다.

5. 세포독성 평가

시료들의 농도에 따른 Raw 264.7 세포의 생존율을 측정하기 위해 독성평가를 실시하였다. 100 μL (1×10^4 cells/well)의 세포 부유액을 96 well plate에 분주 후, CO₂ 배양기 안에서 4시간 동안 전 배양(pre-incubation)을 한 후, 0(0.1% DMSO)~400 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 nargenicin 및 유도체, 2 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 LPS를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지와 함께 24시간 배양했다. 배양 후 각 well에 MTT solution을 첨가하고 30분간 다시 배양하였다. MTT-formazan 생성물은 DMSO로 회수하여 micro plate reader(Multiscan, Thermo co)를 사용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다(Sohng et al., 2008; Cho et al., 2009). 모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였다.

6. Nitric oxide(NO) 생성능 측정

Nargenicin 및 유도체들이 LPS가 유도된 Raw 264.7 세포에서 농도별 항염증 효과를 측정하기 위해 시료처리 후, NO assay를 시행하였다. 1mL(1×10^5 cells/well)의 세포 부유액을 24 well plate에 분주 후, CO₂ 배양기 안에서 4시간 동안 전 배양(pre-incubation)을 한 후, 0(0.1% DMSO)~100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 nargenicin 및 유도체를 처리한 후, 2 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 LPS를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지(without phenol red)와 함께 20시간 반응했다. 20시간 후, 상층액

50 μ L를 회수하여 Griees reagent(Promega, Madison, WI, USA)를 이용한 NO assay를 수행하였다(Sohng et al., 2008; Cho et al., 2009). 모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Nargenicin 및 그 유도체의 항균 효능 평가

Nargenicin 및 유도체의 그람양성, 음성 및 다약제 내성균에 대한 항균효과를 조사하였다. 항균효과는 MIC 시험법으로 평가하였으며, vancomycin을 대조 약물로 사용하였다. 시험 결과는 Table 1에 나타내었다. Compound 4 및 5가 vancomycin보다 광범위한 항균효과를 보였다. Vancomycin 및 nargenicin들은 *A. faecalis* ATCC8750, *E. faecalis* ATCC29212, *B. subtilis* 그리고 *P. aeruginosa* KCTC1637에서 낮은 저해 효과를 보였다. Vancomycin의 경우 MRSA5-3, MRSA4-21, VRE89 및 VRE98에 대하여 항균효과를 보이지 않았으나, compound 4 및 5는 MIC가 20 μ g/mL, 80 μ g/mL로써 vancomycin보다 우수한 활성을 보여주었다. Compounds 1 및 2는 *S. aureus* KCTC1928, *M. luteus* ACTT9341 and MRSA 693E 균주에 대하여 nargenicin과 유사한 항균 활성을 나타내었다. 반면, compound 1은 vancomycin에 비교하였을 때 MRSA 5-3, 4-21 및 VRE89 균주에 대하여 20~80 μ g/mL MIC값을 보였다. Compound 3는 *S. aureus* KCTC1928, *M. luteus* ACTT9341 and MRSA 693E 균주에 대하여 vancomycin보다 낮은 활성을 보여주었다. Compound 4 및 5는 compound 1, 2 및 3에 비하여 항균효과가 우수하였다. 최근 다약제 내성균의 극복을 위한 항균 소재에 대한 연구는 지속적으로 이루어지고 있으며 주로 미생물의 2차 대사산물이나 유기 합성물질에서 얻어지고 있는 실정이다(Watkins et al., 2013). Kato 등(1998, 2011)은 *Lysobactor* sp. 미생물에서 MRSA에 유효한 항균물질을 분리하였으나 *Pseudomonas* sp., *E. coli*, *Alcaligenes* sp. 균주에는 효과는 보이지 않았다. 본 연구의 compound 4, 5의 경우 *Pseudomonas* sp., *E. coli*, *Alcaligenes* sp. 균주에 감수성을 보였다. Kato 등(1998, 2011)은 *in vivo*에서 MRSA 감염모델을 통하여 vancomycin의 ED50(ED, effective dose)은 5.3mg/kg이며 항균물질의 ED50은 0.38mg/kg으로 보고하였다. 본 연구의 compound 4 및 5가 넓은 항균 범위를 가지고 있는 것을 고려한다면 추후 *in vivo* 연구를 수행시 광범위 항균소재의 개발 가능성을 검토해야 할 것으로 생각된다. Cho 등(2001)은 C-7 위치에 aminopyridine을 치환하여 다양한 cephalosporin계 약물을 합성하였으며 다약제 내성균주에 대하여 항균 효능평가를 하였다. 약 6종의 다약제 내성균인 MRSA를 대상으로 항균 활성을 확인하였으며, MIC value가 1~4 μ g/mL을 나타내었으나, 대조균인 vancomycin의 MIC 역시 0.5~1 μ g/mL로 유사함을 보였다. 본 연구에 사용된 다약제 내성균(MRSA 및 VRE)의 경우 vancomycin에 대하여 80 μ g/mL 이상의 농도에도 감수성을 보이지 않았다. 따라서 본

연구의 compound 4, 5의 경우 Cho 등(2001)의 항생물질에 비하여 우수한 항균력을 가지고 있는 것으로 사료된다. Sunagawa 등(2002)은 신규한 carbapenem계열 유도체를 합성하였으며, 유도체들이 MRSA 및 VRE에 유효함을 보고하였다. 유도체들은 methicillin, penicillin, ampicillin, vancomycin에 저항성인 균주를 대상으로 항균효능을 평가하였다. Sunagawa 등(2002)은 vancomycin의 MIC value가 MRSA의 경우 2 μ g/mL였으며, VRE의 경우 64~256 μ g/mL로 보고하였으며, 유도체의 VRE에 대한 MIC는 2~4 μ g/mL로 보고하였다. 본 연구에 사용된 VRE의 경우 vancomycin의 MIC가 80 μ g/mL 이상이었으며, compound 4 및 5의 MIC는 20 μ g/mL 및 80 μ g/mL로 Sunagawa 등(2002)이 보고한 carbapenem에 비하여는 우수한 감수성을 보이는 것으로 생각된다. Sakagami 등(2002)은 신규 quinolone 유도체를 합성하였으며, 유도체들이 MRSA, VRE 균주에 유효함을 보고하였다. 또한 minocyclin이나 fosfomycin과 병용치료를 하는 경우 항균효과의 상승효과가 나타남을 보고하였다. 이는 신규 quinolone 유도체가 VRE, MRSA같은 내성균 감염증 치료시 약물 투여량을 줄일 수 있음을 의미한다. 본 연구의 compound 4, 5 또한 타 항생물질과의 상호작용에 대한 연구가 추후 수행되어야 할 것으로 사료된다.

Table 1. MIC values of the compounds

(Unit : μ g/mL)

Organism	Nargenicin derivatives					Nargenicin	Vancomycin
	1	2	3	4	5		
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC8750	>80	>80	>80	40	40	>80	>80
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	>80	>80	>80	40	80	>80	1.25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>80	>80	>80	10	2.5	>80	0.15
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC1928	0.15	0.15	5	5	2.5	0.31	5
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	0.15	0.15	5	1.25	2.5	0.625	0.625
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC9341	>80	>80	80	10	5	>80	2.5
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC1925	80	80	>80	20	2.5	>80	>80
<i>E. coli</i> KCTC1923	80	>80	>80	40	20	>80	>80
<i>Pseudomonas aeginosa</i> KCTC1637	>80	>80	>80	40	40	>80	>80
<i>Streptococcus pyrogenes</i> ATCC21059	>80	40	80	20	80	>80	>80
MRSA 693E	0.15	0.15	5	5	1.25	0.15	0.3
MRSA 5-3	20	40	>80	20	80	0.3	>80
MRSA 4-21	80	40	>80	20	80	>80	>80
VRE 89	40	>80	80	20	80	>80	>80
VRE 98	>80	>80	40	20	80	>80	>80

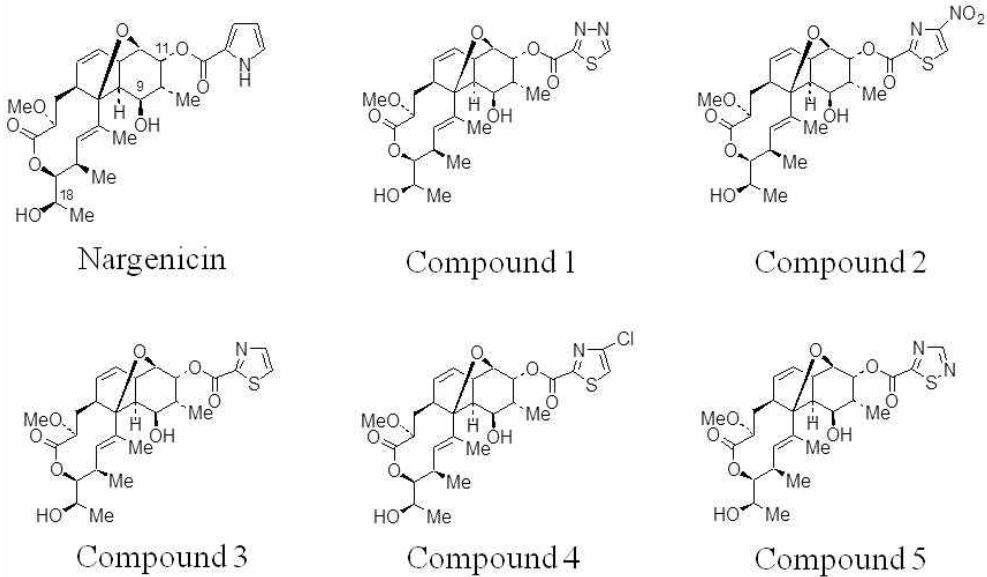


Fig. 1. Structures of nargenicin and its derivatives

2. Nargenicin 및 그 유도체의 세포독성 및 LPS에 유도된 NO 생성 억제 유도능

Nargenicin 및 유도체의 세포독성 평가 결과는 Fig. 2와 같다. NO 생성 저해능은 LPS에 유도된 Raw 264.7 세포에 다양한 농도의 nargenicin 및 유도체를 처리하여 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 세포독성 시험 결과 compound 1은 0.1~0.5 μ g/mL까지의 범위에서 독성을 보이지 않았다. Compound 4 및 5는 0.1~5 μ g/mL까지 100%의 생존율을 보였다. 특히, compound 3은 1~100 μ g/mL까지 어떠한 독성효과도 보이지 않았다. Nargenicin 및 유도체의 NO assay는 Griess's reagent method를 이용하여 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이, Raw 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NO의 생성량은 compound 3, 4 및 5에서 농도에 따라 의존적으로 억제됨이 확인되었다. Compound 5는 5 μ g/mL 농도에서 NO 생성을 LPS 처리군과 비교시 약 95% 저해하였으며, Compound 4는 동일한 농도에서 NO 생성을 LPS 처리군과 비교시 약 75% 감소시킴을 확인하였다. Compound 3는 100 μ g/mL 농도에서 NO 생성을 LPS 처리군과 비교시 약 65% 감소시켰다. 반면 nargenicin, compound 1 및 2는 NO 생성을 저해하지 못하였다. Akhter 등(2011)은 1-(3-Phenyl-3,4-Dihydro-2H-1,3-Benzoxazin-6-yl)-Ethanone Derivatives가 황색포도상구균, 대장균, 고초균에 항균 효과를 가지며, 카라기난에 유도된 마우스 염증모델에서 각 화합물은 26~79%의 부종 억제 효과가 있음을 보고하였다. Khan 등(2009)은 quinoxalinone 유도체를 합성하여 항균-항염증 효과를 확인하였다. 그러나 항균효능 평가에 있어 cup plate method를 사용하여 정확한 항균효능 비교가 어려웠다. Hrabak 등(2011)은 항생물질인 indomethacin이 0.1~0.5mM의 농도에서 자극된 murine

macrophage의 NO 생성을 감소시키는 것으로 보고하였다. Kazimierczuk 등(2010)은 isothiourea 유도체가 항균효능 및 NO synthase 억제능이 있음을 보고하였다. Isothiourea 유도체들은 다양한 그람 음성 및 양성균에 대하여 12.5~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 MIC값을 가지며, 10개의 후보물질은 10 μM 수준에서 20~80%의 NOS활성 억제가 있음을 보고하였다. NO는 생체 내에서 과다 생성시 암의 형성이나 염증반응에 관여하는 인자로 알려져 있다(Guzik et al., 2003; Bosca et al., 2005). 항 염증성 물질은 면역세포에서 염증반응 관련 인자인 NO 생성 및 전염증성 cytokine의 발현을 감소시켜 항염증효과를 가진다(Bondarenko et al., 1999; Du and Li, 1999). 최근 들어 천연물 유래 항염증 소재의 정제 및 유도체 합성에 대한 연구가 증가하고 있으며, 항균-항염증, 항균-항암, 항균-항바이러스 활성 같은 dual effect를 기대할 수 있는 소재의 연구가 증가하는 추세이다(Kontogiorgis and Hadjipavlou-Litina, 2005; Ojewole, 2006; Bhandari et al., 2008; Fathalla et al., 2008; Yoo et al., 2008; Franklin et al., 2009; Akhter et al., 2011; Rai, 2013). 위의 결과를 종합해 보면 nargenicin 유도체 Compound 4 및 5는 그람 음성, 양성 및 다약제 내성균에 대하여 광범위한 항균 효과를 보이고 LPS에 유도된 염증관련 인자인 NO 생성을 억제하여 감염 및 면역질환에 응용이 가능할 것으로 생각된다. 또한 향후 유도체들의 염증 억제 기작 연구가 필요할 것으로 사료된다.

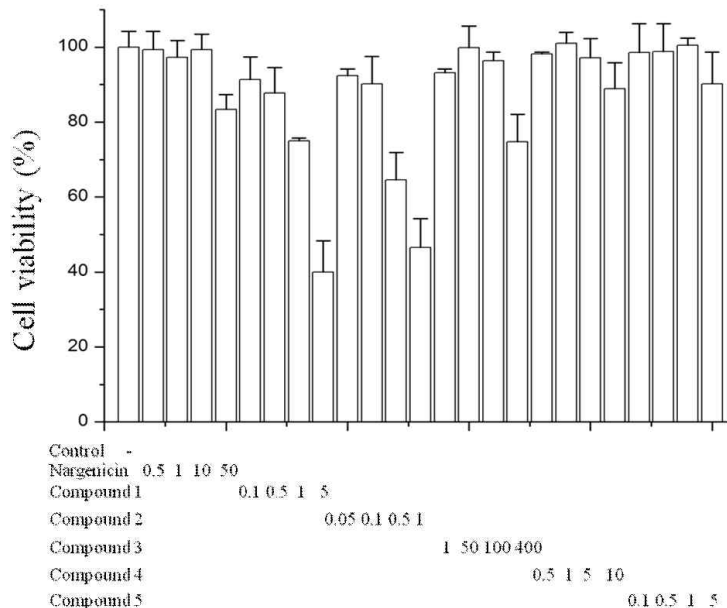


Fig. 2. Effect of the active compounds on cell viability. Cell viability was measured after 20h incubation. Survival rates were tested with MTT assay in Raw 264.7 cells. Raw264.7 cells were incubated in the presence or absence of 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ active compounds for 24 h. Each bar shows the mean \pm S.D.

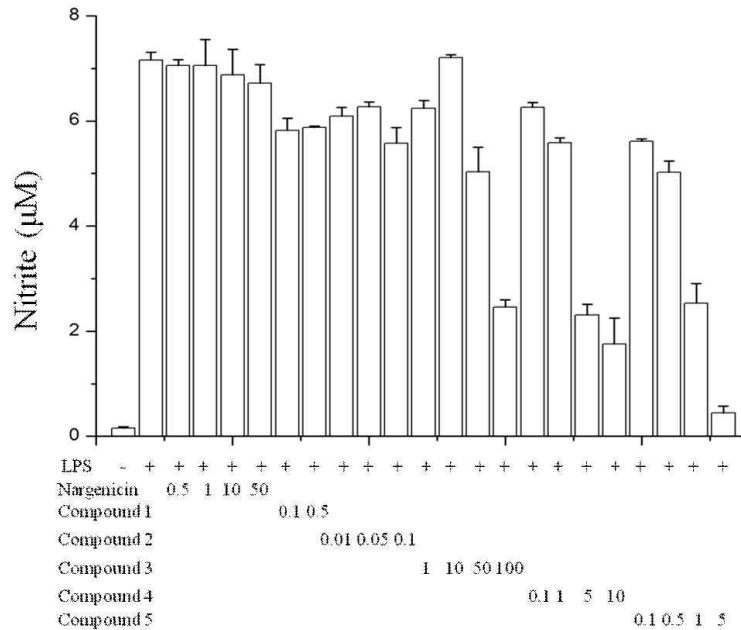


Fig. 3. Effect of nargenicin and its derivatives on suppression of NO production in LPS-induced Raw 264.7 macrophage cells. Cells were pretreated with the various concentrations of compounds for 30 min, followed by treatment with 2 µg/mL of LPS. NO production in the culture media 20 h after the treatment was determined using the Griess reagent.

IV. 적 요

본 연구진은 신규 미생물인 *Nocardia* sp. CS682 균주에서 항균물질인 nargenicin을 확보하고, 그 유도체 5종을 확보하여 그람양성, 음성 및 다약제 내성균에 대한 항균 효능 및 LPS로 자극된 대식세포에서의 nitric oxide 생성 억제능을 확인하였다. Nargenicin 유도체들은 nargenicin 및 vancomycin에 비교하여 우수한 항균 활성을 보여주었으며, compound 4 및 5는 광범위한 항균 효능 외에 nitric oxide 생성 억제능을 보여 항균-항염효과를 가지는 dual effector로써 감염, 면역 질환에 응용 가능성을 시사하였다. Nargenicin 유도체들은 향후 염증반응에서의 면역 조절 기작에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Reference

1. Ager, S. and K. Gould. 2012. Clinical update on linezolid in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Infect Drug Resist.* 5: 87-102.
2. Akhter, M., A. Husain, N. Akhter, and M. S. Khan. 2011. Synthesis, Antiinflammatory and Antimicrobial Activity of Some New 1-(3-Phenyl-3,4-Dihydro-2H-1,3-Benzoxazin-6-yl)-Eth-anone Derivatives. *Indian J Pharm Sci.* 73(1): 101-104.
3. Bhandari, S. V., K. G. Bothara, M. K. Raut, A. A. Patil, A. P. Sarkate, and V. J. Mokale. 2008. Design, synthesis and evaluation of antiinflammatory, analgesic and ulcerogenicity studies of novel S-substituted phenacyl-1,3,4-oxadiazole-2-thiol and Schiff bases of diclo-fenac acid as nonulcerogenic derivatives. *Bioorg Med Chem* 16(4): 1822-1831.
4. Bondarenko, V. M., N. A. Vinogradov, and V. V. Maleev. 1999. The antimicrobial activity of nitric oxide and its role in the infectious process. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* (5): 61-67.
5. Bosca, L., M. Zeini, P. G. Traves, and S. Hortelano. 2005. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology.* 208(2): 249-258.
6. Boyanova, L., R. Kolarov, and I. Mitov. 2014. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. *Anaerobe*. Epub ahead of print.
7. Chastre, J., F. Blasi, R. G. Masterton, J. Rello, A. Torres, and T. Welte. 2014. European perspective and update on the management of nosocomial pneumonia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after more than 10 years of experience with linezolid. *Clin Microbiol Infect.* 20 Suppl 4: 19-36.
8. Cho, A., T. W. Glinka, M. Ludwikow, A. T. Fan, M. Wang, and S. J. Hecker. 2001. New anti-MRSA cephalosporins with a basic aminopyridine at the C-7 position. *Bioorg Med Chem Lett.* 11(2): 137-140.
9. Cho, S. S., J. K. Sohng, H. J. Lee, S. J. Park, J. R. Simkhada, and J. C. Yoo. 2009. Quantitative analysis of nargenicin in *Nocardia* sp. CS682 culture by high performance liquid chromatography. *Arch Pharm Res.* 32(3): 335-340.
10. CLSI. 2007. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventh informational supplement. Suit, USA. 27: 98-114.
11. Du, Z. Y. and X. Y. Li. 1999. Inhibitory effects of indomethacin on interleukin-1 and nitric oxide production in rat microglia in vitro. *Int J Immunopharmacol.* 21(3): 219-225.
12. Fathalla, O. A., E. M. Kassem, N. M. Ibrahim, and M. M. Kamel. 2008. Synthesis of some

- new quinazolin-4-one derivatives and evaluation of their antimicrobial and antiinflammatory effects. *Acta Pol Pharm.* 65(1): 11-20.
13. Franklin, P. X., S. Yerande, H. M. Thakar, G. S. Inamdar, R. S. Giri, H. Padh, V. Sudarshanam, and K. K. Vasu. 2009. Synthesis, Antiinflammatory and HIV-1 Integrase Inhibitory Activities of 1,2-Bis[5-thiazolyl]ethane-1,2-dione Derivatives. *Indian J Pharm Sci.* 71(3): 259-263.
 14. Guzik, T. J., R. Korbut, and T. Adamek-Guzik. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 54(4): 469-487.
 15. Hrabak, A., V. Vercruyse, I. L. Kahan, and B. Vray. 2001. Indomethacin prevents the induction of inducible nitric oxide synthase in murine peritoneal macrophages and decreases their nitric oxide production. *Life Sci.* 68(16): 1923-1930.
 16. Jung, Y. H. 2003. Monitoring of antimicrobial resistant bacteria from animal farm environments in Korea. The Korea food and drug administration.
 17. Kato, A., H. Hirata, Y. Ohashi, K. Fujii, K. Mori, and K. Harada. 2011. A new anti-MRSA antibiotic complex, WAP-8294A II. Structure characterization of minor components by ESI LCMS and MS/MS. *J Antibiot (Tokyo).* 64(5): 373-379.
 18. Kato, A., S. Nakaya, N. Kokubo, Y. Aiba, Y. Ohashi, H. Hirata, K. Fujii, and K. Harada. 1998. A new anti-MRSA antibiotic complex, WAP-8294A. I. Taxonomy, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo).* 51(10): 929-935.
 19. Kazimierzuk, Z., M. Chalimoniuk, A. E. Laudy, R. Moo-Puc, R. Cedillo-Rivera, B. J. Starosciak, and S. J. Chrapusta. 2010. Synthesis and antimicrobial and nitric oxide synthase inhibitory activities of novel isothiourea derivatives. *Arch Pharm Res.* 33(6): 821-830.
 20. Kergueris, M. F., Y. Le Normand, P. Jahan, and N. Milpied. 1994. Application of USC* PACK clinical programs to vancomycin in neutropenic patients. *Int. J Biomed Comput.* 36(1-2): 163-165.
 21. Khan, S. A., P. Mullick, S. Pandit, and D. Kaushik. 2009. Synthesis of hydrazones derivatives of quinoxalinone-prospective antimicrobial and antiinflammatory agents. *Acta Pol Pharm.* 66(2): 169-172.
 22. Koju, D., S. Maharjan, D. Dhakal, J. C. Yoo, and J. K. Sohng. 2012. Effect of different biosynthetic precursors on the production of nargenicin A1 from metabolically engineered *Nocardia* sp. CS682. *J Microbiol Biotechnol.* 22(8): 1127-1132.
 23. Kontogiorgis, C. A. and D. J. Hadjipavlou-Litina. 2005. Synthesis and antiinflammatory activity of coumarin derivatives. *J Med Chem.* 48(20): 6400-6408.
 24. Maharjan, S., N. Aryal, S. Bhattarai, D. Koju, J. Lamichhane, and J. K. Sohng. 2012.

- Biosynthesis of the nargenicin A1 pyrrole moiety from *Nocardia* sp. CS682. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93(2): 687-696.
25. Maharjan, S., D. Koju, H. C. Lee, J. C. Yoo, and J. K. Sohng. 2012. Metabolic engineering of *Nocardia* sp. CS682 for enhanced production of nargenicin A(1). *Appl Biochem Biotechnol.* 166(3): 805-817.
 26. McManus, P. S., V. O. Stockwell, G. W. Sundin, and A. L. Jones. 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol* 40: 443-465.
 27. Mendes, R. E., L. M. Deshpande, and R. N. Jones. 2014. Linezolid update: Stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist Updat.* 17(1-2): 1-12.
 28. Nand, K., R. Joseph and T. N. Rao. 1973. Use of griseofulvin for the isolation of auxotrophic mutants of *Rhodotorula* sp. *Experientia* 29(2): 237-239.
 29. Ojewole, J. A. 2006. Analgesic, antiinflammatory and hypoglycaemic effects of ethanol extract of *Zingiber officinale* (Roscoe) rhizomes (Zingiberaceae) in mice and rats. *Phyther Res.* 20(9): 764-772.
 30. Rai, A. 2013. The Antiinflammatory and Antiarthritic Properties of Ethanol Extract of *Hedera helix*. *Indian. J Pharm Sci* 75(1): 99-102.
 31. Rumore, M. M., M. Roth, and A. Orfanos. 2010. Dietary tyramine restriction for hospitalized patients on linezolid: an update. *Nutr Clin Pract.* 25(3): 265-269.
 32. Sohng, J. K., T. Yamaguchi, C. N. Seong, K. S. Baik, S. C. Park, H. J. Lee, S. Y. Jang, J. R. Simkhada, and J. C. Yoo. 2008. Production, isolation and biological activity of nargenicin from *Nocardia* sp. CS682. *Arch Pharm Res.* 31(10): 1339-1345.
 33. Stille, W., W. Sietzen, H. A. Dieterich, and J. J. Fell. 1988. Clinical efficacy and safety of teicoplanin. *J Antimicrob Chemother.* 21 Suppl A: 69-79.
 34. Sunagawa, M., M. Itoh, K. Kubota, A. Sasaki, Y. Ueda, P. Angehrn, A. Bourson, E. Goetschi, P. Hebeisen, and R. L. Then. 2002. New anti-MRSA and anti-VRE carbapenems; synthesis and structure-activity relationships of 1beta-methyl-2-(thiazol-2-ylthio)carbapenems. *J Antibiot (Tokyo).* 55(8): 722-757.
 35. Vander Brook, M. J., A. N. Wick, and et al. 1946. Extraction and purification of streptomycin, with a note on streptothricin. *J Biol Chem* 165(2): 463-468.
 36. Watkins, R. R., K. M. Papp-Wallace, S. M. Drawz, and R. A. Bonomo. 2013. Novel beta-lactamase inhibitors: a therapeutic hope against the scourge of multidrug resistance. *Front Microbiol.*4: 392.
 37. Witte, W. 2000. Selective pressure by antibiotic use in livestock. *Int J Antimicrob Agents* 16

Suppl 1: S19-24.

38. Yoo, K. Y., I. K. Hwang, J. D. Kim, I. J. Kang, J. Park, J. S. Yi, J. K. Kim, Y. S. Bae, and M. H. Won. 2008. Antiinflammatory effect of the ethanol extract of *Berberis koreana* in a gerbil model of cerebral ischemia/reperfusion. *Phytother Res.* 22(11): 1527-1532.