

아욱 잎에서 분리한 *Bacillus velezensis* MV2의 유전체 염기서열 분석과 항균활성능 연구

이현주^{1†}, 조은혜^{1†}, 김지혜¹, 문금옥¹, 김민지², 신재호², 차재호^{1*}

¹부산대학교 미생물학과

²경북대학교 응용생명과학부

Received: November 19, 2020 / Revised: December 4, 2020 / Accepted: December 7, 2020

Complete Genome Sequence and Antimicrobial Activities of *Bacillus velezensis* MV2 Isolated from a *Malva verticillata* Leaf

Hyeonju Lee^{1†}, Eunhye Jo^{1†}, Jihye Kim¹, Keumok Moon¹, Min Ji Kim², Jae-Ho Shin², and JaeHo Cha^{1*}

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Republic of Korea

²School of Applied Biosciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

A bacterial strain isolated from a *Malva verticillata* leaf was identified as *Bacillus velezensis* MV2 based on the 16S rRNA sequencing results. Complete genome sequencing revealed that *B. velezensis* MV2 possessed a single 4,191,702-bp contig with 45.57% GC content. Generally, *Bacillus* spp. are known to produce diverse antimicrobial compounds including bacteriocins, polyketides, and non-ribosomal peptides. Antimicrobial compounds in the *B. velezensis* MV2 were extracted from culture supernatants using hydrophobic interaction chromatography. The crude extracts showed antimicrobial activity against both gram-positive bacteria and gram-negative bacteria; however, they were more effective against gram-positive bacteria. The extracts also showed antifungal activity against phytopathogenic fungi such as *Fusarium fujikuroi* and *F. graminearum*. In time-kill assays, these antimicrobial compounds showed bactericidal activity against *Bacillus cereus*, used as indicator strain. To predict the type of antimicrobial compounds produced by this strain, we used the antiSMASH algorithm. Forty-seven secondary metabolites were predicted to be synthesized in MV2, and among them, fourteen were identified with a similarity of 80% or more with those previously identified. Based on the antimicrobial properties, the antimicrobial compounds may be non-ribosomal peptides or polyketides. These compounds possess the potential to be used as biopesticides in the food and agricultural industry as an alternative to antibiotics.

Keywords: *Bacillus velezensis*, antibacterial activity, antifungal activity, *Malva verticillata*, whole genome sequence

서 론

식물생장촉진 근권세균(Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR)은 식물 뿌리 주변의 토양에 생육하면서 식물의 성장을 촉진한다고 잘 알려져 있다[1]. 유도 저항성(induced systemic resistance)을 촉진시켜 식물 자체의 방어 기작을 유도해 외부 환경적 스트레스와 병원균으로부터 식물을 보호하기도 한다. 이들은 식물 뿌리 주변에 공생하면

서 식물 질병을 유발하는 병원미생물을 저해하기 때문에 농업에 미치는 영향은 매우 크다고 할 수 있다[2].

대표적인 PGPR로는 *Azotobacter* spp., *Pseudomonas* spp. 그리고 *Bacillus* spp.가 있다. *Azotobacter*속은 indole acetic acid, 사이토카인(cytokine)과 같은 식물호르몬을 생산하여 식물 성장에 직접적으로 영향을 준다고 잘 알려져 있으며[3], *Azospirillum*속 또한 다양한 식물호르몬을 생산하여 뿌리세포의 분화와 수분 흡수를 촉진시킨다고 알려져 있다[4]. 식물병 방제에도 역할을 하는데, 항생물질을 분비하여 직접적으로 작용하거나 siderophore를 생산하여 병원균의 성장을 저해한다. *Rhizobium japonicum*는 rhizobitoxine이라는 항생물질을 생산하여 콩의 뿌리나 줄기에 균핵마름병

*Corresponding author

Tel: +82-51-510-2196, Fax: +82-51-514-1778

E-mail: jhcha@pusan.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

(charcoal rot disease)을 유발하는 식물병원성 곰팡이인 *Macrophomina phaseolina*의 생장을 억제한다[5]. Novozyme에서 판매하는 Actinovate는 *Streptomyces lydicus* WYEC 108균주 자체를 상업화한 제품으로 조경 및 농업 분야에서 항진균제로서 사용되고 있다[6].

*Bacillus*속은 PGPR 중에서도 식물뿌리 주변에 많이 분포하고 있는 대표적인 세균으로, 포자를 생산하는 그람양성균이며, 식물 생장을 촉진하거나 수확량을 증가시킨다고 알려져 있을 뿐만 아니라 다양한 항생물질을 생산하는 강력한 생물방제제이다[7, 8]. 특히 *Bacillus subtilis*는 유전체의 4~5%가 항생 물질 생산에 관여하며[9], 그 작용 범위는 그람양성균 뿐만 아니라 그람음성균과 곰팡이까지 넓기 때문에 산업적으로 응용 가치가 높다.

*Bacillus*속은 200개 이상의 종으로 분류되는데, *B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus*, *B. subtilis*로 분류되었던 일부 종이 최근 *B. velezensis*로 재분류 되었다[10]. *B. velezensis*는 토양에 흔히 존재하며 다양한 항생물질들을 생산해 PGPR의 역할도 수행한다고 알려져 있다. *B. velezensis*가 생산할 수 있는 항생물질들은 크게 폴리케타이드(polyketide), 리보솜 펩타이드(ribosomal peptide), 비리보솜 펩타이드(non-ribosomal peptide, NRP), 휘발성 화합물이 있으며 이들은 각 물질의 특성에 따라 항균, 항진균, 항바이러스 등의 효과를 보인다[11]. 박테리오킨은 리보솜 펩타이드의 대표적인 물질로, 5 kDa에서 30 kDa 정도 크기를 가지는 1차 대사산물이다[12]. 열에 대해 매우 안정하며 생물학적 식품보존제로서 각광받고 있다[13]. 폴리케타이드는 acyl CoA 전구체로부터 합성되는 물질로 tetracycline이 여기에 속하며 구조적으로 매우 다양하다[14]. 리포펩타이드(lipopeptide)는 NRP에 속하는 화합물로 아미노산 고리 구조와 선형으로 이루어진 지방산 사슬의 구조를 동시에 갖기 때문에 양극성을 나타낸다. 구조적 특징 때문에 생물학적 계면활성제로도 불리며 *Brevibacterium aureum*과 같은 다른 미생물에서도 생성되지만 주로 *Bacillus* 속에서 많이 생산된다[15]. 대표적인 리포펩타이드로는 surfactin, iturin과 fengycin이 있으며 새로운 리포펩타이드에 대한 탐색이 꾸준히 진행되고 있다[16].

작물의 수확량은 식물병원성 미생물과 같은 외부 요인에 쉽게 영향을 받기 때문에 식물병 방제에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 안전한 먹거리에 대한 수요의 증가와 내성 균주 출현에 대한 경각심으로 인해 유용미생물을 이용한 생물학적 방제제에 대한 관심이 높아지는 추세이다[17, 18]. 본 연구에서는 흔히 식용되는 식물인 아욱(*Malva verticillata*)에서 분리된 *B. velezensis* MV2의 항균 및 항진균 활성을 검사하고, 전장 유전체 분석을 통해 항생물질을 암호화하는 유전자들을 탐색하여 생물학적 방제제로서의 가

능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 동정

부산광역시 지역 마켓에서 구매한 아욱(*Malva verticillata*)을 세척하여 오염물질을 제거한 뒤 60°C에서 12시간 동안 건조하였다. 건조 후 파쇄된 아욱 분말을 121°C에서 15분간 고압 멸균한 뒤 Yeast extract Peptone Dextrose (YPD, BD Difco, USA) 한천 배지에 도말하여 30°C에서 배양하였다. 순수 분리된 균주의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 수행하였다. 범용 프라이머인 785F (5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3')와 907R (5'-CCGTCGAATTCMTTTRAGTTT-3')을 이용하여 염기서열 정보를 확인하였고(Macrogen, Korea), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST에서 기존에 등록된 균주들과의 상동성을 비교하여 동정하였다. 이후 아욱에서 분리된 균주는 Tryptic Soy Broth (TSB, BD Difco) 배지에 37°C에서 배양되었다.

유전체 염기서열 결정 및 계통학적 분석

B. velezensis MV2 균을 TSB에 접종하고 30°C에서 18시간 이상 배양한 뒤, QIAamp DNA mini kit (Qiagen, USA)를 사용하여 제조사가 제공한 방법에 따라 유전체 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 유전정보 서열은 PacBio Sequel system (Pacific Biosciences, USA)을 이용해 시퀀싱되었고, SMRTlink HGAP 4.0 pipeline을 이용해 assembly되었다. NCBI의 Prokaryotic Genome Annotation Pipeline을 이용해 annotation을 진행하였으며, 유전체 서열을 시각화하기 위해 CGView Server (<http://cgview.ca/>)로 해독된 서열들과 GC 함량 정보들을 함께 나타내었다. 전체 염기서열 중 16S rRNA 서열을 기반으로 BLAST를 이용해 상동성을 확인했다. NCBI에서 13개의 *Bacillus*속 균주의 유전자 염기서열을 얻었고 계통도 작성을 위해 MEGA X 프로그램의 Clustal W를 이용하여 염기서열을 정렬하였으며, neighbor-joining 알고리즘을 사용하여 1,000회 반복 bootstrapping을 통해 계통도의 신뢰성을 확인하였다. 다른 균주와 유전체 정보상의 유사도를 확인하기 위해 *B. velezensis* FZB42, *B. amyloliquefaciens* DSM7와 비교하였다.

해당 서열은 NCBI Sequin 프로그램을 이용해 GenBank에 제출되었고, 등록된 accession number는 CP059405이다.

분리된 균주로부터 항생물질 추출

B. velezensis MV2 전배양액을 1%로 접종한 TSB 100 ml를 37°C에서 정지기(Stationary phase)에 도달하는 48시간

동안 교반 배양하였다. 본배양액을 22,000 ×g로 15분 동안 원심분리하여 상등액을 얻고, 0.45 μm pore size의 membrane filter (SciLab, Korea)로 여과하였다. 상등액은 C₁₈ syringe cartridge 컬럼(Phenomenex, USA)을 통과시킨 뒤 94% 메탄올로 용출하였다. 메탄올을 제거하기 위해 회전진공농축기(Eyela, Singapore)를 이용해 60℃에서 분획을 농축하였다. 건조된 시료의 무게를 측정 후 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충액 1 ml에 현탁하였고, 이렇게 얻어진 항균물질 조추출물을 항균 활성 및 항진균 활성 측정 실험에 사용하였다.

항균 활성 측정

분리 균주로부터 얻은 조추출물의 병원성 세균에 대한 항균 활성을 조사하기 위해 부산대학교 미생물학부에 보관중인 *B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus iniae*, *S. parauberis*, *Burkholderia glumae*, *Escherichia coli*, *Edwardciella tarda*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio furnissii*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. campbellii*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. ordalii*, *V. fluvialis* 총 19종을 대상으로 검정하였다. *Vibrio* 속은 TSB에 NaCl을 1%로 첨가한 배지를 사용하였고 *Streptococcus* 속은 Brain Heart Infusion (BHI, BD Difco, USA) 배지를, *B. cereus*, *E. coli*와 *B. glumae*는 Luria-bertani (LB) 배지를 사용하였다. 그 외의 균주에 대해서는 TSB 배지를 사용하였다. 직경 8 mm의 멸균된 디스크 여과지(Advantec, Japan)를 사용하여 디스크 확산법으로 실행하였다. 각 병원성 세균 전배양액을 분광광도계를 이용하여 600 nm에서 측정된 흡광도가 1.0이 될 때까지 키운 뒤, 10배 희석액 200 μl를 top agar (0.5% agar, 0.6% NaCl) 5 ml과 혼합하여 각각의 고체배지에 부었다. 30분 동안 굳힌 뒤 디스크 여과지를 올려 균주의 상등액으로부터 얻어진 조추출액 10 mg을 처리하였다. 37℃에서 10시간 배양한 뒤 관찰되는 생육억제환의 직경을 측정하였다.

항진균 활성 측정

항생물질 조추출물의 항진균 활성을 조사하기 위해 부산대학교 미생물학부에 보관중인 *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Rhizopus oryzae*, *Fusarium graminearum*, *F. fujikuroi*, *Trichoderma longibrachiatum*을 대상으로 실험하였다. 조추출물의 농도가 1 mg/ml이 되도록 첨가한 Potato Dextrose Agar (PDA, BD Difco, USA) 배지에 대상 진균이 자란 배지를 cork borer (3.5 mm; Daihan Scientific Co. Ltd., Korea)로 뚫어서 접종하였다. 이를 28℃에서 40시간 동안 배양하며 진균의 성장을 관찰하였다.

Time kill assay

B. velezensis MV2가 생산하는 항미생물질이 갖는 작용 기작에 대해 조사하기 위해 *B. cereus*를 indicator로 채택하여 실험을 진행하였다. LB 배지 30 ml에 600 nm에서의 흡광도가 0.1이 되도록 *B. cereus* 전배양액을 접종하였다. 37℃에서 교반 배양하면서 흡광도를 측정하였고, 그 값이 0.5–0.6 범위에 도달하였을 때 항생물질 조추출물을 처리하였다. 각 처리 농도는 0, 12.5, 25, 50, 100과 200 μg/ml이 되도록 하였다. 이 후 항생물질 조추출물을 처리하지 않은 *B. cereus*의 생장이 정지기에 들어갈 때까지 흡광도를 측정하여 성장 곡선의 변화를 관찰하였다.

이차 대사산물의 생합성 관련 유전자군 비교

NCBI에 등록된 Genbank 파일을 이용해 antiSMASH 5.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>)에서 *B. velezensis* MV2 유전체에 존재하는 이차 대사산물의 생성과 관련된 유전자들을 예측하였다[19].

결과 및 고찰

미생물의 분리 및 동정

건조 멸균한 아욱에 *A. oryzae*를 첨가하였을 때 *A. oryzae*의 생장이 억제되는 현상을 확인하였고, 아욱에 존재하는 자생균의 항진균 활성으로 예측되어 이를 고체 배지에 배양한 후 집락을 얻었다. 해당 미생물을 16S rRNA 유전자 기반으로 BLAST search한 결과, *B. velezensis* CR-502가 99.71%, *B. subtilis* 168이 99.72%, *B. amyloliquefaciens* DSM7이 99.72%의 identity를 갖는 것으로 나타났다. 계통수를 작성하여 분석한 결과, 기존에 밝혀져 있던 *B. velezensis*들과 구분되었고 9개의 *B. velezensis* 균주를 포함한 총 13개의 *Bacillus*속 중에서 *B. velezensis* CR-502 균주와 통계학적으로 가장 근접하였다(Fig. 1). 따라서 아욱에서 분리된 균주는 *Bacillus velezensis* MV2라고 명명하였다.

전장 유전체 염기서열 분석

유전체 염기서열 분석 결과, *B. velezensis* MV2는 GC 함량이 45.57%인 4,191,702 bp 크기의 1개 컨티그(contig)를 가지는 것으로 확인되었다(Fig. 2). 전체 유전자의 개수는 4,253개로 나타났으며, 이중 암호화 유전자(coding sequence)와 RNA 유전자의 개수는 각각 4,135개와 118개로 나타났다. RNA는 tRNA가 86개, rRNA의 경우 총 27개(5S 9개, 16S 9개, 23S 9개), 비암호화 RNA (non-coding RNA)가 5개 존재하는 것으로 분석되었다. 이는 유사 균주인 *B. velezensis* 및 *B. amyloliquefaciens*와 비교하였을 때, 매우 유사하게 나타난 것을 알 수 있었다(Table 1).

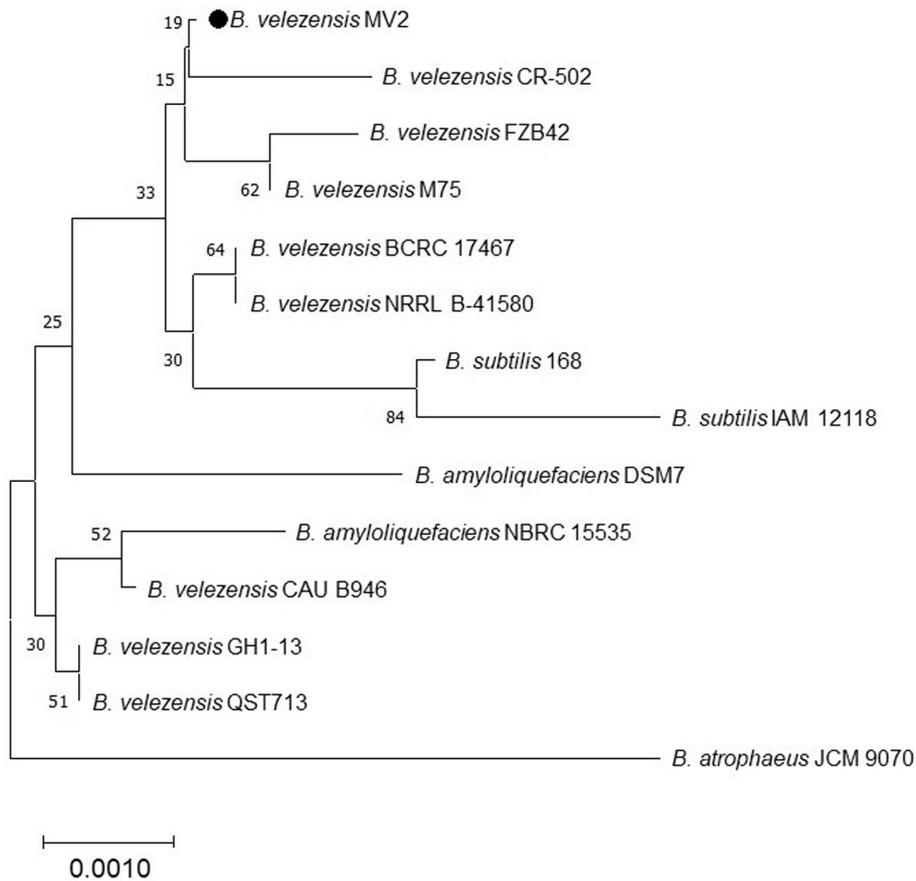


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences using the Neighbor-Joining method in MEGA X. Bootstrap values (1,000 replicates) were shown at the branch points. *B. velezensis* CR-502 (MG846018.1), *B. velezensis* FZB42 (NC009725.2), *B. velezensis* M75 (NZ CP016395.1), *B. velezensis* BCRC 17467 (EF433407.1), *B. velezensis* NRRL B-41580 (KY694464.1), *B. subtilis* 168 (NR102783.1), *B. subtilis* IAM 12118 (NR112116.2), *B. amyloliquefaciens* DSM7 (FN597644.1), *B. amyloliquefaciens* NBRC 15535 (MK182997.1), *B. velezensis* CAU B946 (NC016784.1), *B. velezensis* GH1-13 (CP019040.1), *B. velezensis* QST713 (NZ CP025079.1), and *B. atropheus* JCM 9070 (NR024689.1) are compared with *B. velezensis* MV2.

Table 1. Genome characteristics of *B. velezensis* MV2 compared with other *Bacillus* sp.

Features	<i>B. velezensis</i> MV2	<i>B. velezensis</i> FZB42	<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7
Size (bp)	4,191,702	3,918,596	3,980,199
G+C content (%)	45.57	46.48	46.08
Replicons	One chromosome	One chromosome	
Total genes	4,253	3,921	4,102
Predicted No. of CDS	4,135	3,799	3,974
Ribosomal RNA	27	29	30
Transfer RNA	86	89	93
other RNA	5	4	5
Pseudogene	104	89	123
GenBank ID	CP059405	NC009725	NC014551

항미생물 활성 검정

B. velezensis MV2 배양액으로부터 상등액을 얻어 소수성 물질과 친수성 물질로 분리한 결과, 소수성 물질에서 높은 항균활성을 관찰할 수 있었다. 확인된 소수성 조추출물을 이용하여 이후 항미생물 활성을 확인하였다. 다양한 병원성 세균을 대상으로 디스크 확산법 실험을 수행한 결과, 그람양성균에서는 *S. aureus*를 제외한 모든 균에서 활성이 관찰되었으며 특히 *B. cereus*에서 가장 높은 항균 활성이 나타났다. 그람음성균에서는 *V. furnissii*와 *V. alginolyticus*에서 활성이 관찰되었다. 전반적인 세균에 대한 항균활성 검사는 그람 음성균보다 그람양성균에서 더 높은 활성을 보였다(Table 2). 특히 6개의 진균을 대상으로 실험한 결과 모든 진균에 대해 강한 저해 활성을 보였다(Fig. 3). 특히 벼의 주요 곰팡이 병원균인 *F. fujikuroi* (키다리병균)와 밀과 보리의 주 병원

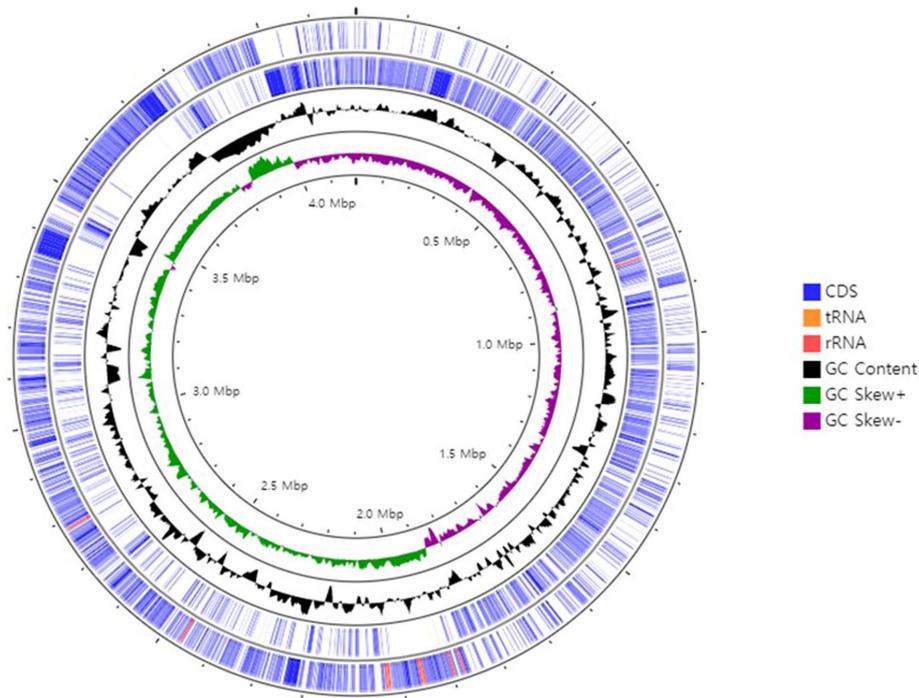


Fig. 2. Complete genome map of *B. velezensis* MV2. The image shows (from outside to center): genes on the forward strand, genes on the reverse strand (coding sequences in blue, tRNAs in orange, rRNAs in red). The GC content is in black with peaks indicating higher or lower values than the average GC content (peaks out/inside, respectively). The inner circle shows the GC skew. Positive values correspond to green peaks, indicating that the amounts of guanines are enriched in the top strand versus the amount of cytosines in the bottom strand. Purple peaks represent the opposite.

균인 *F. graminearum* (푸사리움머리병해균)에 대한 항진균 활성이 매우 강하였다. *L. lactis*가 생산하는 nisin과 같은 박테리오신의 경우 대체로 그람양성균에만 효과가 있는 것으로 알려져 있다[20, 21]. 한편 폴리케타이드 생합성 효소에 의해 생산되는 bacillaene의 경우 그람음성균과 그람양성균 모두에 효과를 나타내며 *Fusarium* sp.와 *Trichoderma* sp.에도 저해활성을 갖는다고 알려져 있다[22, 23]. *Bacillus* 속이 생산하는 리포펩타이드인 iturin과 fengycin은 *Xanthomonas campestris* Cucurbitae (갈색무늬세균병), *Rhizoctonia solani* (잎집무늬마름병)과 *F. graminearum* 등의 주요 곰팡이 병원균에 대해 생육 억제 활성을 갖는 것으로 알려져 있다[24, 25]. 소수성 물질에서 항균활성이 나타났다는 것과 확인된 항미생물 활성의 스펙트럼을 통해 *B. velezensis* MV2에서 분리된 항생물질은 박테리오신으로 추측하기는 어려우며, 폴리케타이드나 비리보솜 계열의 리포펩타이드로 예상되었다.

항미생물질의 작용기작 분석

항생물질의 작용기작을 확인하기 위해 Time kill assay 실험을 진행하였다. Indicator 균주인 *B. cereus*에 조추출물을 농도별로 처리한 결과, 모든 농도에 대해 *B. cereus*의 생장

이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 해당 항균물질의 작용기작은 균을 용해시키는 살균작용(bactericidal effect) 특성임을 알 수 있었다(Fig. 4). 조추출물의 여러 농도 조건 중에서도 100 µg/ml과 200 µg/ml의 농도로 처리했을 때 흡광도가 급격히 감소하여 그 특성을 뚜렷이 관찰할 수 있었다. 특히 200 µg/ml의 농도에서는 다른 농도 조건과 달리 물질을 처리하지 않은 *B. cereus*가 정지기에 도달한 이후 시간 까지도 저해된 생장이 유지되었다. 200 µg/ml의 농도 처리시를 제외하고는 감소했던 생장이 시간이 지남에 따라 생장이 복구되는 양상이 관찰되었는데, 이는 처리한 조추출물의 농도가 낮아질수록 빠르게 복구되었다. 이러한 현상은 항생제 내성을 갖는 돌연변이 균주의 출현으로 추측되며 [26], 조추출물은 여러 물질이 혼합되었을 가능성이 있기 때문에 추가적인 정제 과정을 통한 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이차 대사산물 생합성 유전자 기반 생성 물질 탐색

항균활성을 보이는 조추출물은 *B. velezensis* MV2의 생장기 중 정지기에 생산되었으며 앞선 실험의 항균활성 스펙트럼을 통해 해당 물질은 일차대사산물 계통보다는 이차대사

Table 2. Antibacterial activity of antimicrobial substance produced from *B. velezensis* MV2.

Indicator strain	Diameter of inhibition zone (mm)
Gram positive bacteria	
<i>Bacillus cereus</i>	14.2 ± 0.7 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	10.7 ± 1.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND ^b
<i>Streptococcus iniae</i>	11.6 ± 0.4
<i>Streptococcus parauberis</i>	12.0 ± 0.4
Gram negative bacteria	
<i>Vibrio furnissii</i>	14.0 ± 3.3
<i>Vibrio alginolyticus</i>	13.7 ± 2.5
<i>Vibrio mimicus</i>	ND
<i>Vibrio campbellii</i>	ND
<i>Vibrio vulnificus</i>	ND
<i>Vibrio harveyi</i>	ND
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ND
<i>Vibrio ordalii</i>	ND
<i>Vibrio fluvialis</i>	ND
<i>Burkholderia glumae</i>	ND
<i>Escherichia coli</i> DH5a	ND
<i>Edwardsiella tarda</i>	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ND

^aData are mean ± standard deviation of at least three replicates.
^bND: not detected.

산물 형태의 항균물질로 생각되었다. 따라서 전장 유전체 염기서열 분석을 통해 얻은 *B. velezensis* MV2의 유전체를 활용하여 항미생물활성과 관련된 이차대사산물 생합성 유전자의 예측을 위해 antiSMASH 5.0 알고리즘을 이용하였다.

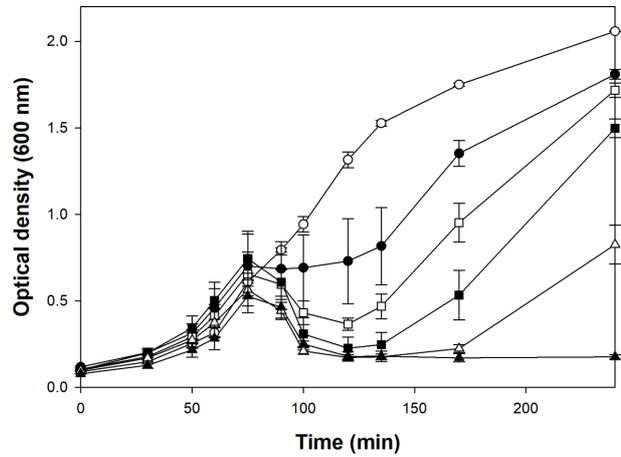


Fig. 4. Mode of action of antimicrobial substance produced from *B. velezensis* MV2 strain against *B. cereus*. The arrow indicates the point at which crude extract was added to the culture. Error bar indicates standard deviations from three independent experiments. Untreated control (○); 12.5 µg/ml treatment (●); 25 µg/ml treatment (□); 50 µg/ml treatment (■); 100 µg/ml treatment (△); 200 µg/ml treatment (▲).

antiSMASH는 원핵생물의 유전정보를 바탕으로 항생물질 혹은 이차대사산물의 생합성 유전자군(biosynthetic gene clusters, BGCs)을 탐색하여 예측되는 생합성 물질의 정보를 제공한다. 전체 서열로부터 총 14개의 영역 중 8개 영역에서 47종류의 이차대사산물의 생합성이 예측되었으며, 그 중에서 기존에 밝혀져 있는 물질들과 유사도가 80% 이상으로 나타나는 물질은 14개로 확인되었다(Table 3).

B. velezensis MV2 유전체 내에 이차대사산물 생성 유전자 cluster는 non-ribosomal peptide (NRP), polyketide, NRP siderophore, ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide (RiPP), lipopeptide gene

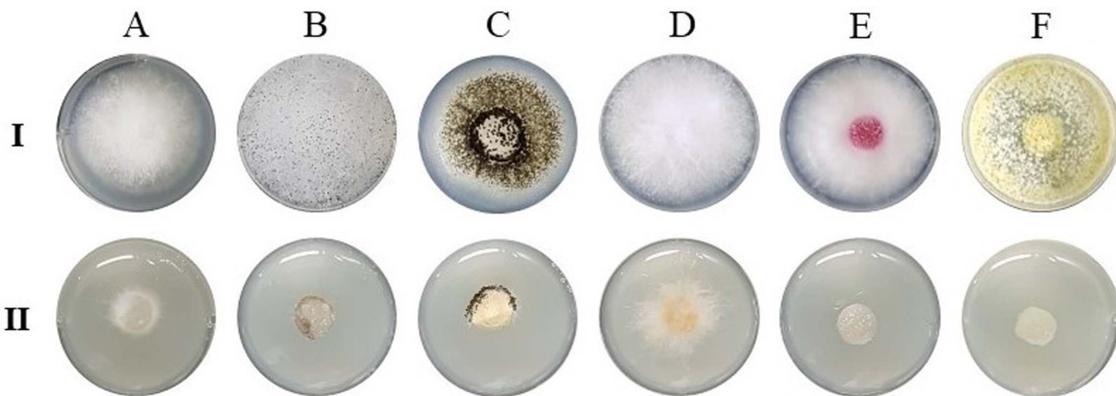


Fig. 3. Antifungal activity of antimicrobial substance produced from *B. velezensis* MV2. (A) *A. oryzae*, (B) *R. oryzae*, (C) *A. niger*, (D) *F. fujikuroi*, (E) *F. graminearum*, (F) *T. longibrachiatum*. I, Untreated; II, Treated with crude extract (1 mg/ml).

Table 3. Gene clusters involved in the synthesis of secondary metabolites in *B. velezensis* MV2 using antiSMASH.

Region	From	To	Most similar known cluster	Substance	Similarity
Region 1	160978	242046	Polyketide + NRP	difficidin	86%
Region 2	907772	957290	NRP	bacillibactin	100%
			NRP	paenibactin	100%
			NRP:NRP siderophore	bacillibactin	100%
			RiPP:Head-to-tail cyclized peptide	amylocyclicin	100%
Region 3	1480831	1522249	Other	bacilysin	100%
			Other	bacilysin	100%
Region 6	2194765	2259809	NRP:Lipopeptide	surfactin	82%
Region 11	3334911	3421250	Polyketide	macrolactin	100%
			Polyketide	macrolactin	100%
Region 12	3690286	3779337	Polyketide + NRP	bacillaene	100%
Region 13	3964642	4099723	NRP	fengycin	93%
			NRP	plipastatin	92%
			Polyketide + NRP Lipopeptide	bacillomycin D	90%
			NRP + Polyketide	mycosubtilin	100%
			NRP + Polyketide	iturin	88%
			NRP	paenilarvins	100%

NRP, Non-ribosomal peptide; RiPP, Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides.

cluster가 존재하는 것으로 예상되었으며, 이 유전자 cluster는 이차대사산물로 difficidin, bacillibactin, paenibactin, amylocyclicin, bacilysin, surfactin, macrolactin, bacillaene, fengycin, plipastatin, bacillomycin D, mycosubtilin, iturin 및 paenilarvins 생합성에 관여하는 것으로 확인되었다.

기존의 연구에서 antiSMASH를 이용한 이차대사산물 생합성 유전자 cluster를 예측한 후 실제 향미생물 활성물질을 확인해 보고한 바 있다. Stincone 연구팀에 따르면, *B. velezensis* P34 유전체에서 예측된 유사도가 75% 이상인 7가지 물질(macrolactin, surfactin, fengycin, bacillaene, bacilysin, difficidin, bacillibactin) 중 iturin, bacillomycin과 fengycin의 실제 향미생물적 활성이 확인되었다[27]. 유전체에 존재하는 생합성 유전자와 분리된 항균물질의 특성을 고려하였을 때, *B. velezensis* MV2에서 예측된 14개 향미생물 활성물질들 중 실제 활성을 나타내는 물질은 비리보솜 펩타이드 계열의 리포펩타이드 물질일 것으로 예상할 수 있다. 이 결과를 통해 *B. velezensis* MV2 균주가 벼를 포함한 다양한 작물의 병해 방제를 위한 미생물제로서의 잠재적 가치가 큰 것으로 평가된다. 향후 해당 연구를 바탕으로 항균물질의 동정과 본 균주의 현장 적용성 평가가 수행되어야 할 것으로 판단되며, 이를 바탕으로 토착 세균을 이용한 우수한 미생물제로서의 활용 가능성 및 다양한 병원균에 대한 생육 억제 활성 기작에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 여겨진다.

요 약

본 연구에서는 국내 자생 식물인 아욱으로부터 새로운 균주를 분리 및 동정하였고 해당 미생물이 생산하는 향미생물질의 활성과 관련 생합성 유전자들을 확인하고자 하였다. 16S rRNA 유전자 서열 정보를 토대로 비교한 결과, 아욱에서 분리된 균주는 *Bacillus velezensis*이었으며 strain은 MV2라고 명명되었다. 유전체 염기서열 분석을 통해 전체 유전정보를 확인할 수 있었으며, 45.57% GC 함량을 가지는 4,191,702 bp 크기의 1개 컨티그(contig)가 존재하는 것으로 확인되었다. *B. velezensis* MV2가 정지기에 생산하는 물질 중 항균 활성이 확인된 소수성 물질 분획을 이용하여 항균 활성 스펙트럼 테스트를 진행한 결과, 그람음성균보다 그람 양성균에서 더 높은 억제능이 확인되었다. 6종의 곰팡이를 이용한 항진균 활성 테스트에서는 모든 진균에 대해 강한 저해 활성을 보였으며, 특히 *F. fujikuroi*와 *F. graminearum*에 대한 항진균 활성이 매우 강하게 나타났다. 세균에 대한 항균물질의 작용 기작 분석을 통해 해당 항균물질은 균을 용해시키는 살균(bactericidal) 특성을 가진 것으로 추측할 수 있었다. *B. velezensis* MV2의 유전체 염기서열 정보를 통해 이차대사산물 생합성 유전자 cluster를 탐색한 결과 총 47가지 이차대사산물 생산이 예측되었으며, 기존에 밝혀져 있는 물질들과 유사도 80% 이상인 물질은 14개로 확인되었다. 앞서 확인된 내용들을 바탕으로 *B. velezensis* MV2에서 생성

되는 항균물질은 비리보솜 펩타이드성 물질로 예상되며, 향후 항균물질의 동정과 활용 가능성에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되었다. 기존에 상업적으로 이용되었던 곰팡이에 대한 활성이 낮은 항균물질 생물제제들과 함께 복합기능성 미생물제로 활용하여 식품산업 및 농업에서의 이용 가능성이 있음을 보여주었다.

Acknowledgments

This research was supported by PNU-RENovation (2019-2020).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Joseph WK, Leong J, Teintze M, Schroth MN. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. *Nature* **286**: 885-886.
- Glick B. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 109-117.
- Rodelas BJ, González-López, Martínez-Toledo MV, Pozo C, Salmerón V. 1999. Influence of *Rhizobium/Azotobacter* and *Rhizobium/Azospirillum* combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.). *Biol. Fertil. Soils.* **29**: 165-169.
- Bashan Y, Levanony H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* **36**: 591-608.
- Chakraborty U, Purkayastha RP. 1983. Role of rhizobitoxine in protecting soybean roots from *Macrophomina phaseolina* infection. *Can. J. Microbiol.* **30**: 285-289.
- Yuan WM, Crawford DL. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3119-3128.
- Orhan E, Esitken A, Ercisli S, Turan M, Sahin F. 2006. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Sci. Hortic.* **111**: 38-43.
- Maksimov IV, Abizgil'dina RR, Pusenkova LI. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **47**: 333-345.
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* **56**: 845-857.
- Dunlap C, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP. 2016. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**: 1212-1217.
- Rabbee MF, Ali MS, Choi J, Hwang BS, Jeong SC, Baek KH. 2019. *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules* **24**: 1-13.
- Abriouel H, Franz CM, Omar NB, Galvez A. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 201-232.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**: 1-20.
- Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J. 2019. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* Group. *Front. Microbiol.* **10**: 302.
- Rangarajan V, Kim GC. 2016. Towards bacterial lipopeptide products for specific applications - a review of appropriate downstream processing schemes. *Process Biochem.* **51**: 2176-2185.
- Ma Z, Zhang S, Zhang S, Wu G, Shao Y, Mi Q, et al. 2020. Isolation and characterization of a new cyclic lipopeptide surfactin from a marine-derived *Bacillus velezensis* SH-B74. *J. Antibiot.* **73**: 863-867.
- Kang DW, Ryu IH, Han SS. 2012. The isolation of *Bacillus subtilis* KYS-10 with antifungal activity against plant pathogens. *Korean J. Pestic. Sci.* **16**: 178-186.
- Smith JL, Collins HP, Crump AR, Bailey VL. 2015. Management of soil biota and their processes, pp. 539-572. In Paul EA (ed.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, 4th Ed. Waltham, MA: Academic Press, Boston, USA.
- Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, et al. 2019. AntiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* **47**: W81-W87.
- Russell AD. 1998. Mechanisms of Bacterial Resistance to Antibiotics and Biocides, pp. 133-197. In Ellis GP, Luscombe DK, Oxford AW (ed.), *Prog. Med. Chem.*, Ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, Oxford, England.
- Russell AD. 1998. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics and biocides. *Prog. Med. Chem.* **35**: 133-197.
- Patel P, Huang S, Fisher S, Pirnik D, Aklonis C, Dean L, et al. 1995. Bacillaene, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot.* **48**: 997-1003.
- Müller S, Strack SN, Hoefler BC, Straight PD, Kearns DB, Kirby JR. 2014. Bacillaene and sporulation protect *Bacillus subtilis* from predation by *Myxococcus xanthus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 5603-5610.
- Gong A, Li HP, Yuan QS, Song XS, Yao W, He WJ, et al. 2015. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS One* **10**: e0116871.
- Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, et al. 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* **186**: 1084-1096.

26. Chen M, Wang J, Liu B, Zhu Y, Xiao R, Yang W, *et al.* 2020. Bio-control of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides. *BMC Microbiol.* **20**: 160-172.
27. Stincone P, Veras FF, Pereira JQ, Mayer FQ, Varela APM, Brandelli A. 2020. Diversity of cyclic antimicrobial lipopeptides from *Bacillus* P34 revealed by functional annotation and comparative genome analysis. *Microbiol. Res.* **238**: 126515.