ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science 2023 Vol. 33. No. 10. 808~819 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2023.33.10.808

Development of a Molecular Selection Marker for *Bacillus licheniformis* K12

Young Jin Kim[1,2], Sam Woong Kim[2], Tae Wok Lee[1], Won-Jae Chi[3], Woo Young Bang[3], Ki Hwan Moon[5], Tae Wan Kim[6], Kyu Ho Bang[1] and Sang Wan Gal[1,2]*

[1]*Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea*
[2]*Agri-Food Bio Convergence Institute, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea*
[3]*Species Diversity Research Division, National Institute of Biological Resources (NIBR), Environmental Research Complex, Incheon 22689, Korea*
[4]*Biodiversity Research and Cooperation Division, National Institute of Biological Resources (NIBR), Environmental Research Complex, Incheon 22689, Korea*
[5]*Division of Marine Bioscience, Korea Maritime and Ocean University, Busan 49112, Korea*
[6]*Leaders in Industry University Cooperation 3.0, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea*

Received August 22, 2023 /Revised September 21, 2023 /Accepted September 22, 2023

This study was conducted to develop a selection marker for the identification of the *Bacillus licheniformis* K12 strain in microbial communities. The strain not only demonstrates good growth at moderate temperatures but also contains enzymes that catalyze the decomposition of various polymer materials, such as proteases, amylases, cellulases, lipases, and xylanases. To identify molecular markers appropriate for use in a microbial community, a search was conducted to identify variable gene regions that show considerable genetic mutations, such as recombinase, integration, and transposase sites, as well as phase-related genes. As a result, five areas were identified that have potential as selection markers. The candidate markers were two recombinase sites (BLK1 and BLK2), two integration sites (BLK3 and BLK4), and one phase-related site (BLK5). A PCR analysis performed with different *Bacillus* species (e.g., *B. licheniformis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus cereus*) confirmed that PCR products appeared at specific locations in *B. licheniformis*: BLK1 in recombinase, BLK2 in recombinase family protein, and BLK3 and BLK4 as site-specific integrations. In addition, BLK1 and BLK3 were identified as good candidate markers via a PCR analysis performed on subspecies of standard *B. licheniformis* strains. Therefore, the findings suggest that BLK1 can be used as a selection marker for *B. licheniformis* species and subspecies in the microbiome.

Key words : *Bacillus licheniformis*, enzyme, genetic mutation, genome, molecular marker

서 론

바실러스 균주는 다양한 환경에서 생육이 가능하며, 불리한 여건에서는 포자를 형성하여 다음 세대로 생존을 이어간다. 다양한 바실러스 균주는 Generally Recognized as Safe (GRAS)로서 인식되어 프로바이오틱스 균주로써 활용되어 오고 있다. 대표적으로 바실러스 GRAS균주로 분류되어 있는 것들은 *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. coagulans*, *B. subtilis* var. natto, *B. polyfermenticus*, *B. subtilis* 등이 알려져 있다[10, 13, 18]. 특히, 바실러스 균주는 다양한 고분자를 분해하는 능력을 보유하기 때문에 된장, 간장, 청국장, 젓갈류 등 다양한 발효식품에 관여하고 있다[6, 10, 11, 13, 15]

*Bacillus licheniformis*는 중온성 미생물로써, 자연계에 널리 분포되어 있는 균주중에 하나이다. 또한, 본 균주는 포자를 형성하지만, 병원성과는 일반적으로 연관성이 없다[14]. *Bacillus licheniformis*는 alkalase를 산업적으로 생산하는 균주로 알려져 있을 뿐만 아니라 다양한 고분자 분해에 연관된 효소들을 보유하고 있다[4, 21, 22]. 본 균주가 생산이 가능한 고분자 분해 효소류는 amylase, protease, lipase, cellulose, xylanase 등으로 자연계에 존재하는 대부분의 고분자를 분해할 수 있다[5, 16, 17, 23]. 이들 고분자 분해효소들은 세포외로 분비가 되어 자연환경에서 분해가 가능하다. 다른 한편으로, *Bacillus licheniformis*는 다양한 생활환경에서 성장이 가능하기 때문에 이동이 가능한 유전자를 타종으로부터 수평적으로 전달받는 것이 가능한 것으로 보인다[12, 19]. 따라서 본 균 종은 다양한 유전

***Corresponding author**
Tel : +82-55-772-3393, Fax : +82-55-751-3399
E-mail : sangal@gnu.ac.kr
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

자원을 유전체 내에 내포할 가능성이 높은 것으로 나타난다. 실재적으로, transposable element 영역, recombinase 영역 등 수평적 전달이 가능한 영역을 포함한 부위에 대해 분석 시 종 내에 다양성을 유도하는 것으로 나타난다[7, 10, 17].

진핵생물에서는 초위성체가 존재하여 유전자마커로써 활용되어 집단유전, 개체분류 및 친자확인 등의 수단으로 사용되고 있다[7, 8]. 미생물에 있어서는 종 수준에서 특정 개체들을 추적하는 것이 가능한 것으로 나타난다[1]. 그러나 미생물은 진핵생물처럼 유연관계 확립 및 개체 분류 등의 확인 수단으로써의 분자 마커가 결여되어 있기 때문에 특정미생물에 대해 지식재산권을 보유하더라도 실질적인 보호 수단이 결여되어 있다. 따라서 향후 진핵생물과 같은 개체식별 수단으로써 제공될 수 있는 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

본 연구는 유전적 수평 전달이 빈번하게 도출되는 영역을 탐색한 후, *Bacillus licheniformis* K12 균주의 분자마커를 개발하여 환경 중에 존재하는 미생물 군집에서 미생물 개체의 추적 수단 및 산업현장에서 특정 미생물의 보호 목적으로 활용할 수 있는 수단으로 제공되도록 실시하였다.

재료 및 방법

재료 및 배양방법

Bacillus licheniformis K12은 바위게 내장으로부터 분리된 균주이다. *Bacillus velezensis* K10은 본 연구실에서 사람 장내에서 분리한 균주이며, *Bacillus subtilis* KCTC2217와 *Bacillus cereus* ATCC11778는 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)와 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 분양 받았다. *B. licheniformis* 표준균주인 KCTC1030, 1659, 1831, 3056 등은 KCTC로부터 분양 받아 본 연구에 사용하였다. 분양된 균주들은 LB 액체 및 한천배지 혹은 NB 액체 및 한천배지에서 30 또는 37℃에서 16~24시간 배양하여 본 연구에 사용하였다. 또한, 참고 유전체를 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)로부터 *B. licheniformis* SCDB 14, GCF_002074095.1의 유전체 및 단백체 정보를 제공받아 활용하였다.

유전체 분석

박테리아 게놈 DNA 추출 키트 Ver.3.0 (TaKaRa Korea, Seoul, Republic of Korea)을 사용하여 *B. licheniformis* K12에서 게놈 DNA를 분리하였고, 이 DNA를 유전자 서열분석에 사용하였다.

분리된 DNA는 Covaris S2 초음속 장치를 이용하여 유전자 단편화 단계를 거친 후, Truseq Nano DNA sample prep kit (Illumina, Inc., San Diego, CA)을 이용하여 350 bps의 DNA 단편으로 구성된 라이브러리를 구축하였다. 이러한 최종 산물은 2100 BioAnalyzer를 이용하여 확인하였고, Illumina HiSeq platform (Illumina, Inc., San Diego, CA)을 이용하여 서열해독을 진행하였다.

확보된 유전자 서열 reads은 sickle (v1.33)와 BWA ver. 0.7.12.을 사용하여 고품질의 reads만 필터하여 얻었고, 이것은 *Bacillus licheniformis*에 대해 유전자 지도 및 게놈 집합체를 형성 하는데 사용되었다. 유전자 지도 형성 이후, 영역별 재배열은 GATK ver. 3.1-1을 사용하여 수행하였고, duplicates는 Picard ver. 1.98(http://picard.sourceforge.net)을 사용하였다. 서열상의 변이들은 GATK ver 3.1-1을 통해 형성되어 졌으며, 변이에 대한 주석은 SnpEff (v.4.1)에 의해서 수행되었다.

선발 부위 탐색 및 상동성 비교

분석된 *B. licheniformis* 유전체 서열을 바탕으로 변이가 자주 유발될 수 있는 recombinase, integrase, transposase, phage related gene 등의 부위 유전자들을 탐색하였다. 탐색된 유전자들은 NCBI (National Center for Biotechnology Information; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)를 이용하여 상동성 조사를 수행하였고, 선발마커로써 가능성이 높은 후보 유전자들을 선발하였다.

유전자 조작 방법

일반적인 유전자 조작은 Sambrook et al. [20]에 의해 수행되었다. 유전체 정보 및 후보 선발 마커 분석을 통해 확보된 유전자들은 PCR 증폭을 위해 primer가 디자인 되었고 합성되었다(도 2; 바이오니아, 한국). PCR을 위한 게놈의 확보는 colony PCR를 수행하였다. 필요할 경우에는 genomic prep kit (Solg^{TM} Genomic DNA prep kit; SolGent co., Ltd.)를 이용하여 게놈을 분리하여 PCR을 위한 주형으로 사용하였다. 합성된 primer set와 PCR PreMix (AccuPower PCRMix, Bioneer)를 통해 증폭된 각 후보 DNA 단편은 agarose gel에 loading에 의해 단편길이를 확인하였고, 필요할 경우 유전자 서열 분석을 통해 확인하였다.

결과 및 고찰

유전체의 특성 및 후보 마커의 발굴

B. licheniformis K12의 유전체 정보 분석 결과, 총 4,338,510 bps로 구성되었다(Table 1). 본 유전체는 참고 유전체인 *B. licheniformis* SCDB 14의 4,342,466 bps에 비교하여 3,956 bps가 적게 존재하는 것으로 나타났고, open reading frame (*orf*)는 62개가 적게 존재하는 것으로 관찰되었다. Plasmid의 개수는 동일하게 각 1개로 존재하였으며, *B. licheniformis* K12의 plasmid 안에 5,791 bps에 1 *orf*로 예측되었다. 그러나 *B. licheniformis* SCDB 14에서는 plasmid가 205,480 bps으로 나타났기 때문에 전체 유전체 길이

Table 1. Examination of chromosome-modifiable genes

Genotype	BL K12	BL SCDB 14
Total nucleotides (bps)	4,338,510	4,342,466
Total amino acids	4,412	4,474
Plasmid No	1	1
Integrase	7	2
Recombinase	11	7
Transposase	35	5
phage	120	42
Total	173	56

*BL K12; B. licheniforms K12, BL SCDB 14; B. licheniformis SCDB 14, GCF_002074095.

및 *orf* 차이에 plasmid가 많은 영향을 미치는 것으로 추정된다.

유전체 분석이 수행된 *B. licheniformis*의 유전자 서열 중 돌연변이 빈도가 높을 것으로 예상되는 영역인 recombinase, integrase, transposase, phage-related regions 등에 대해 분석을 수행하였다[1]. 해당되는 영역의 유전자로써 integrase 관련 7, recomibinase 관련 11, transposase 관련 35, phage 관련 120 유전자 부위로써 총 173 유전자가 확보되었다(Table 1). 참고균주인 *B. licheniformis* SCDB 14의 경우에는 2 integrase, 7 recombinase, 5 transposase, 42 phage 연관된 유전자로써 총 56개의 관련 유전자가 탐색되었다(Table 1). 따라서 *B. licheniformis* K12은 *B. licheniformis* SCDB 14에 비교하여 3.1배가 높은 다변성 영역을 보유하는 것으로 나타났다.

해당 가변 유전자들은 일반적으로 유전자의 삽입 및 결손과 연관이 많이 나타나기 때문에 본 유전자 및 주변 부위에 유전자의 변이가 발생하기 쉬울 것으로 추정되었다. 따라서 본 해당 유전자를 포함하여 이들 유전자들에 대해 각 1 kbps up- 및 down-stream 영역에 대해 NCBI 상동성을 비교하였다. *B. licheniformis* K12의 가변성 영역에 대한 NCBI blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) 결과 상동성이 낮은 것으로 나타난 후보 선발 마커로써 총 5개 유전자를 확보하였다(Table 2). 그 외 유전자들은 대부분 다양한 *Bacillus* 또는 유사 균주들과 높은 정도의 상동성을 보였다(data not shown). 후보 마커로써 선발된 유전자들은 recombinase 관련 유전자가 3개(BGLPMFGA_00209, 02924, 00195, BLK1~3), integrase 연관 유전자가 1개(BGLPMFGA_01007, BLK4), phage 연관 유전자가 1개(BGLPMFGA_00197, BLK5) 등으로 나타났다. BGLPMFGA_00195는 유전체 분석결과 자료에서 integrase 연관 유전자로 분류되어 있었지만, 상동성을 재검토하는 과정에서 recombinase로 재분류 되었다.

선발 후보 마커 영역의 특성 분석

BGLPMFGA_00209는 *Bacillus* sp. 7586-K recombinase RecT와 상동성을 보였으며, 867 bps로 구성되었다(Table 2). BGLPMFGA_00209 유전자의 상동성 비교 결과 *B. licheniformis* P8_B2가 100% 일치한 반면에, 나머지 균주들의 유전자는 90% query cover에서 94.66% 미만의 상동성을 보유하고 있었다. 특히, 3'-말단에서 787 bps로부터 종료지점까지 80 bps가 완전히 결여되어 있었다(Fig. 1A 및 B). BGLPMFGA_00209는 유전체 분석결과의 contig 1 176,422~177,288 bps의 영역에 위치해 있었다(Fig. 1B). 다른 한편으로 양 말단 부위에서 1 kb 지점까지 확장하여 상동성을 분석하여 본 결과 상동성이 전혀 감지되지 않는 것으로 나타났다(data not shown). BGLPMFGA_00209 ORF는 *Bacillus* sp. 7586-K의 Recombinase RecT와 80.4%의 상동성을 보였기 때문에 recombinase로서 역할을 수행할 것으로 추정되었다. *Enterococcus faecium*에서 RecT recombinase는 돌연변이된 DNA 주형을 게놈 DNA에 대치, 결손, 삽입 등을 유도하도록 빠르고 능률적 병합을 가능하도록 하였기 때문에 미생물에서 유전자변이 억제에 중요한 역할을 수행하는 것으로 추정된다[3]. 따라서 BLK1 유전자 마커는 *B. licheniformis* K12 내에 보유되어 있는 BGLPMFGA_00209 유전자에 상동성이 결여되어 있는 부분을 포함하도록 중간 영역에서 3'-말단까지 474 bps PCR product가 생성되도록 디자인 되었다(Table 3 및 Fig. 1B).

BGLPMFGA_02924는 recombinase family protein 이며, 1,632 bps로 구성된다(Table 3). 본 *orf* 영역을 대상으로 1 kbps up- 및 down stream 영역에 대해 상동성을 분석한 결과 *B. licheniformis* subspecies 및 일부 *Bacillus* 종 중에서 83% 이상의 query cover로 84.44% 이상의 상동성을 보였지만, *Bacillus* species 간에는 매우 변이가 높은 것으로 관찰되었다(Fig. 2A, Fig. 2B). *Bacillus* 균주들에 대해 대부분의

Table 2. B. licheniformis K12 candidate markers

Candidate marker	Sequence name	Description	Length (bps)
BLK1	BGLPMFGA_00209	*Bacillus* sp. 7586-K Recombinase RecT	867
BLK2	BGLPMFGA_02924	*Bacillus mesophilum* Recombinase family protein	1,632
BLK3	BGLPMFGA_00195	*Niallia nealsonii* Tyr recombinase domain-containing protein	876
BLK4	BGLPMFGA_01007	*Bacillus dafuensis* Site-specific integrase	1,125
BLK5	BGLPMFGA_00197	*Bacillus subtilis* (strain 168) SPbeta prophage-derived uncharacterized lipoprotein YonS	600

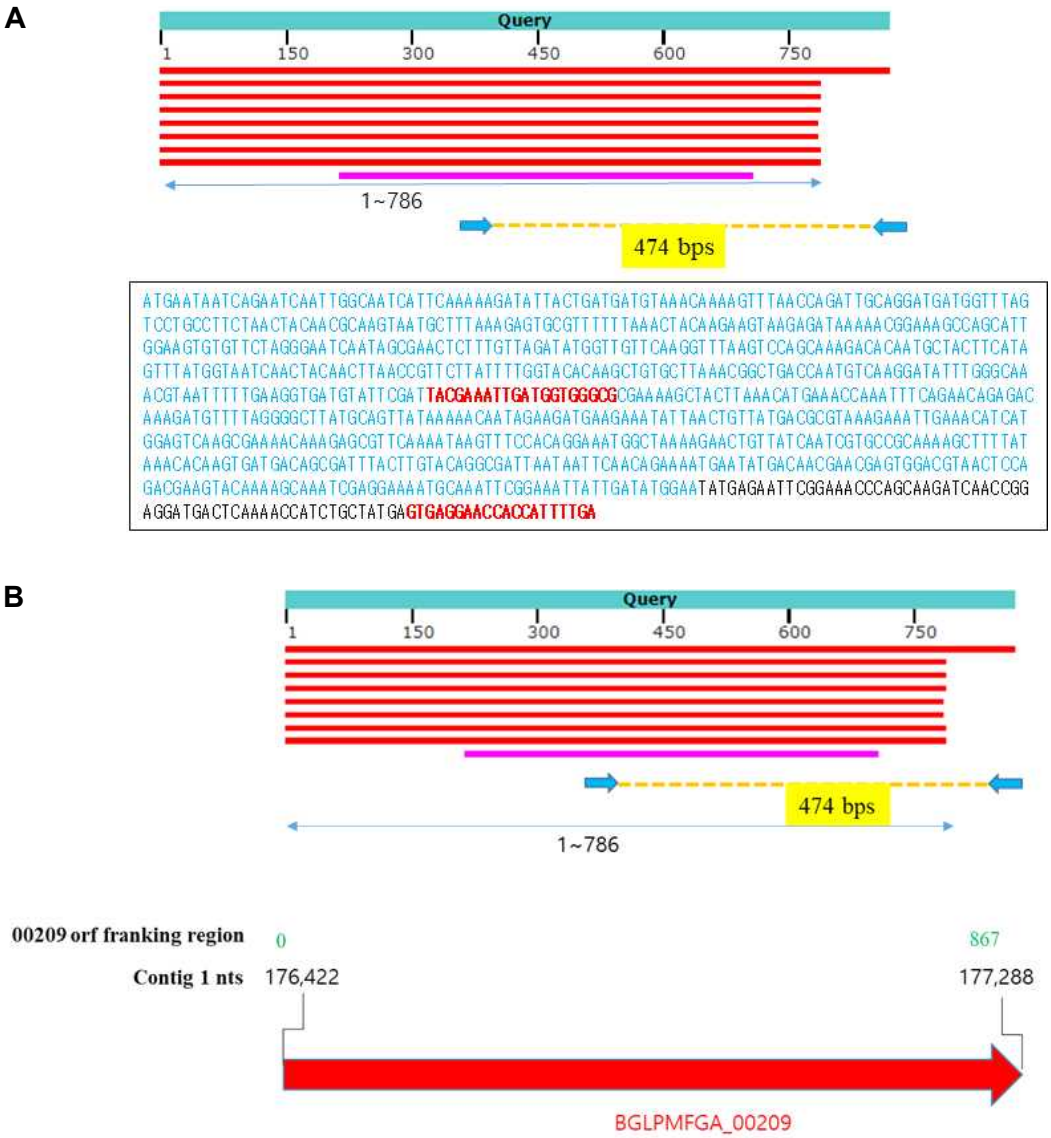


Fig. 1. BGLPMFGA_00209 nucleotide homology comparison. (A) Comparison of homology for BGLPMFGA_00209 and (B) gene arrangement of BGLPMFGA_00209. The homology of BGLPMFGA_00209 was analyzed by NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). (A) Blue letters; homologous regions, red and bold letters; primer regions. (B) BGLPMFGA_00209; *Bacillus* sp. 7586-K Recombinase RecT.

Table 3. Designs of oligonucleotides as candidate molecular markers

	Name	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
BLK1	BGLPMFGA_00209	TACGAAATTGATGGTGGGCG	TCAAAATGGTGGTTCCTCAC
BLK2	BGLPMFGA_02924	TTGGACGGAATGACTTCCTTA	CTCTTGCTTCAATCTCTTGA
BLK3	BGLPMFGA_00195	ACATTTCTGAAGATGTCCCA	TATGTCCAAATAGCAATTCTC
BLK4	BGLPMFGA_01007	ATGGCATCTATAAGAAAACGTG	TTATTTGAACCGAACCAATTC
BLK5	BGLPMFGA_00197	GTGAGCATGTGCATTGTAGC	TACTCTCTGGAAGCCCTATC

상동성이 나타나는 영역은 3'-영역에서 관찰되었다. BGLPMFGA _02924 및 주변 영역에 유전자의 분석 결과 BGLPMFGA_ 02922부터 02926까지 포함되는 것으로 나타났다(Fig. 2B), BGLPMFGA_02924는 *Bacillus mesophilum* Recombinase family protein과 59.1%의 상동성을 보였기 때문에 정확한 기능성에 대해서는 향후 좀 더 연구

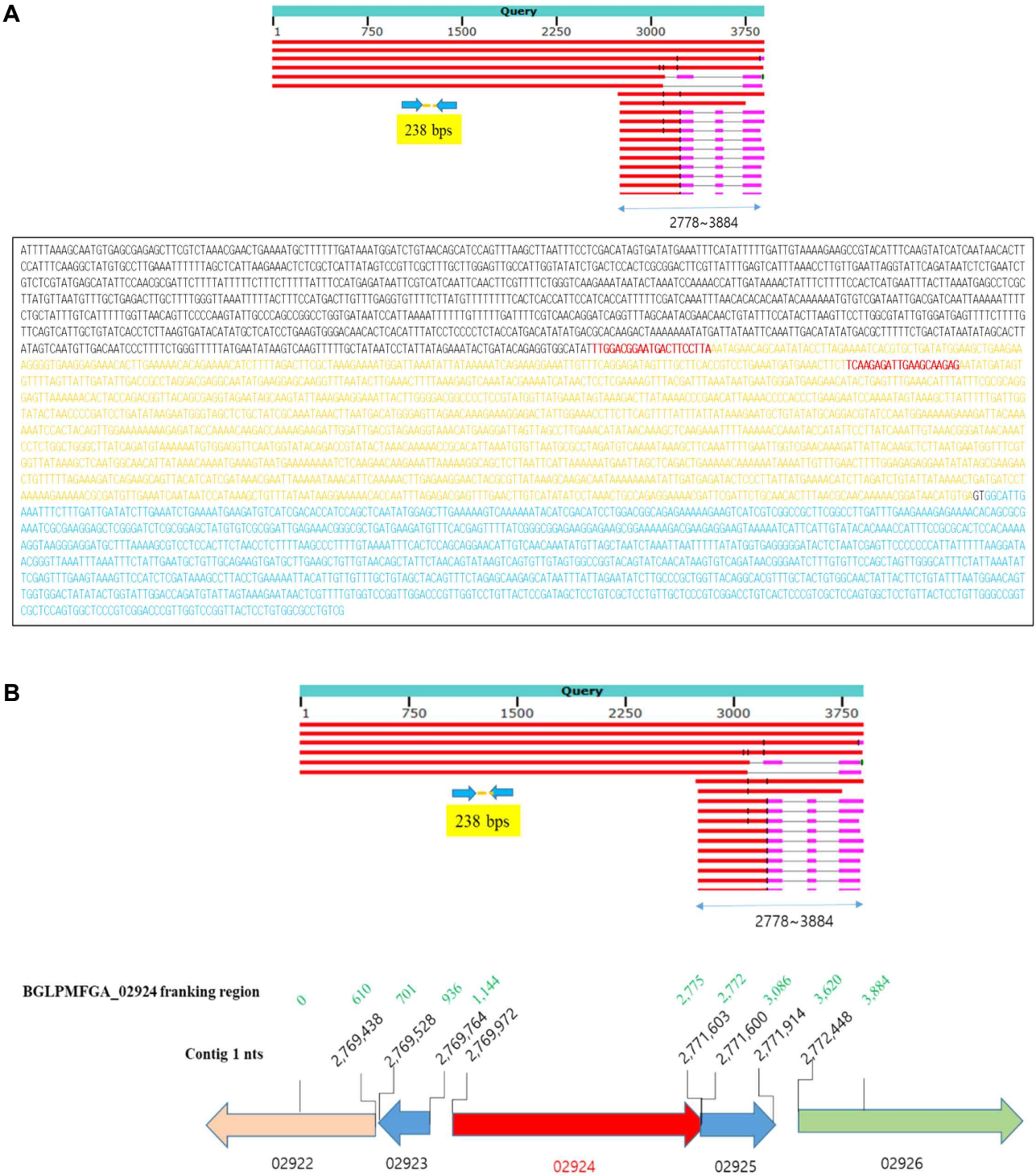


Fig. 2. BGLPMFGA_02924 nucleotide homology comparison. (A) Comparison of homology for BGLPMFGA_02924 and (B) examination of neighboring genes for BGLPMFGA_02924. The homology of Recominase (BGLPMFGA_02924) was analyzed by NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). (A) Yellow letters; BGLPMFGA_02924 region, blue letters; NCBI homologous region, red and bold letters; primer regions. (B) BGLPMFGA_02922; *Bacillus* phage Tavor_SA HTH cro/C1-type domain-containing protein, BGLPMFGA_02923; *Paenibacillus contaminans* DUF4177 domain-containing protein, BGLPMFGA_02924; *Bacillus mesophilum* Recombinase family protein, BGLPMFGA_02925; *Bacillus licheniformis* RNA polymerase sigma factor, BGLPMFGA_02926; *Bacillus safensis* Mucin 17-like protein.

가 필요한 것으로 보인다(data not shown). 주변 영역 중 BGLPMFGA_02924 ORF의 N-말단 부위에서는 상동성이 비교적 낮게 형성되어 있는 반면에 C-말단 영역은 상동성이 높게 나타났다. 이 결과는 유전자 서열 비교와 유사한 양상을 보였다. 본 분석의 결과에 따라 비교적 상동성이 낮게 형성되어 있는 BGLPMFGA_02924 *orf*의 5'-영역에 해당되는 부분에 프라이머를 디자인하여 BLK2 후보 마커로 선정하였다(Fig. 2B, Table 3).

BGLPMFGA_00195는 Tyr recombinase domain-containing protein 유전자로써 876 bps로 구성된다(Fig. 3A, Fig. 3B). 본 유전자는 유전체 분석결과 자료에서는 site-specific integrase로 분류되어 있었지만, 재검토 중에 recombinase로 분류되었다(Fig. 3B). 확장 영역의 상동성 분석 결과 *B. licheniformis* strain P8_B2 및 KS28 균주에만, 100% query cover로 96.24% 이상의 상동성을 보였다. 그러나 나머지 *B. licheniformis*에는 26% query cover로 99.76% 미만의 상동성으로 균주 의존적으로 매우 가변성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 3A, Fig. 3B). BGLPMFGA_00195 *orf*의 3'-말단 부위(reverse orientation)는 대부분 tRNA가 차지되어 있기 때문에 가변성이 매우 낮은 것으로 보인다(Fig. 3B). 그러나 이 *orf*의 5'-영역은 매우 가변적인 상태인 것으로 관찰되었다. 실재 GLPMFGA_00195 ORF의 아미노산 상동성 분석 결과 *Niallia nealsonii*의 Tyr recombinase domain-containing proteindp eogo 62.5%의 상동성을 보여 정확한 기능성은 향후 연구에 의해 밝혀져야 할 것이다. 본 ORF의 N-말단 영역에 해당되는 BGLPMFGA_00196 및 00197은 phage와 연관되는 유전자로 구성되어 있지만, 이들 유전자들도 상동성이 낮은 관계로 향후 추가 연구가 필요하다. 따라서 상동성이 비교적 낮게 유지되어 있는 BGLPMFGA_00195 *orf*의 3'-말단 영역이 해당되도록 프라이머를 디자인하여 413 bps의 PCR 산물이 생성되도록 BLK3를 구축하였다(Fig. 3B, Table 3).

BGLPMFGA_01007은 site-specific integrase 유전자로써 1,125 bps로 구성되었다(Table 2). 확장 영역의 상동성 비교 결과 28% query cover로 100% 상동성을 보이는 양상을 보였다(Fig. 4A). 본 유전자는 *B. licheniformis* substrain 간에도 매우 낮은 상동성을 보이는 것으로 관찰되었기 때문에 특수한 미생물이나 기타 영역으로부터 전이된 것으로 추정된다. BGLPMFGA_01007 *orf*의 3'-말단은 tRNA에 의해 연속적으로 발현되기 때문에 상동성이 매우 높은 것으로 나타났다(Fig. 4A, Fig. 4B). 그러나 본 *orf*를 포함하여 BGLPMFGA_01010까지 완전히 상동성이 결여되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). ORF 수준에서 BGLPMFGA _01007은 68.7%의 비교적 낮은 상동성을 보였고, BGLPMFGA _01008~01010은 35.7~76.2% 수준으로 나타났기 때문에 매우 특이적인 기원으로부터 유전자를 전이 받은 것으로 추정되었다. 따라서 BLK4 후보 유전자 마커는 BGLPMFGA_ 01007 *orf* 중에서 상동성 영역과 완전히 떨어져 있는 3' -영역쪽으로 디자인하여 407 bps의 PCR 산물이 생성되도록 하였다(Fig. 4B).

BGLPMFGA_00197은 SPbeta prophage-derived uncharacterized lipoprotein YonS 유전자로써 600 bps로 구성되어 있었다(Table 2). 이 유전자는 *B. licheniformis* P8_B2 및 KS28 유전체와 100% query cover로 95.54% 이상의 상동성을 보였다(Fig. 5A). 본 유전자 부위는 BGLPMFGA_00195의 상동성 비교와 유사한 양상으로 이웃한 유전자이기 때문에 유사한 패턴을 보이는 것으로 추정되었다. 그러나 두 subspecies를 제외하고 나머지 *Bacillus* 균주들은 17% query cover로 66.67% 미만의 상동성을 보였다. 이 결과는 또한, BGLPMFGA_00195과 유사한 양상이었지만, 전반적으로 낮은 상동성이 산재해 있는 것이 차이점을 나타났다(Fig. 5A, Fig. 5B). ORF 수준에서 BGLPMFGA_00197은 *Bacillus subtilis* (strain 168)의 SPbeta prophage-derived uncharacterized lipoprotein YonS의 유전자에 32.5%만의 상동성을 보였다(data not shown). 또한, 주변 영역의 ORF들도 39.6~62.5% 정도 만의 상동성을 보였고, BGLPMFGA_ 00197 ORF의 C-말단 쪽은 phage와 연관된 유전자가 삽입되어 있기 때문에 특이적인 phage 유전자 또는 phage가 운반된 유전자가 삽입되어 구성된 것으로 추정된다. BLK5는 비교적 상동성 영역에서 제외되어 있는 부위에 해당되는 BGLPMFGA_00197 *orf*의 5' -영역 부위쪽에 프라이머를 디자인하여 407 bps의 PCR 산물이 생성되도록 구축하였다(Fig. 5B 및 Table 3).

선발 마커의 종(species) 특성 분석

선발된 후보유전자 마커 primer을 이용하여 *B. licheniformis* K12, *B. velezensis* K10, *B. subtilis*, *B. cereus* 등의 *Bacillus* 종(species)에 따른 PCR을 수행하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보여지는 바와 같이 *B. licheniformis*에 대해서는 모든 primer set에서 단일 PCR product가 형성되는 것으로 나타났다. 그러나 후보 유전자 마커에 따라 다른 종에서는 다양한 비특이적인 PCR product가 형성되는 것으로 관찰되었다. BLK5를 제외하고, 후보 유전자 마커와 일치되는 PCR product가 존재하지 않는 것으로 나타났다. BLK5에서는 *B. subtilis*와 *B. cereus*에서 *B. licheniformis*의 407 bps에 유사한 PCR product가 주요 산물로써 나타났다. 이와 같은 결과는 아직 유전체 서열이 확인되지 않은 *B. subtilis*와 *B, cereus*에 유사한 유전자를 보유하거나 사용한 프라이머 세트에 유사한 반응하는 PCR product가 생성되는 것으로 판단된다. 다른 한편으로 BLK3는 동일한 크기의 PCR 산물이 생성되지는 않았지만, 유사영역에 PCR product가 *B. velezensis*와 *B. subtilis*에서 형성되어 혼동의 우려가 있어 보였다. 그러나 다양한 lysate 제조 방법이나 게놈 분리 키트 등에 의한 추가 시험에서 뚜렷하게 주요

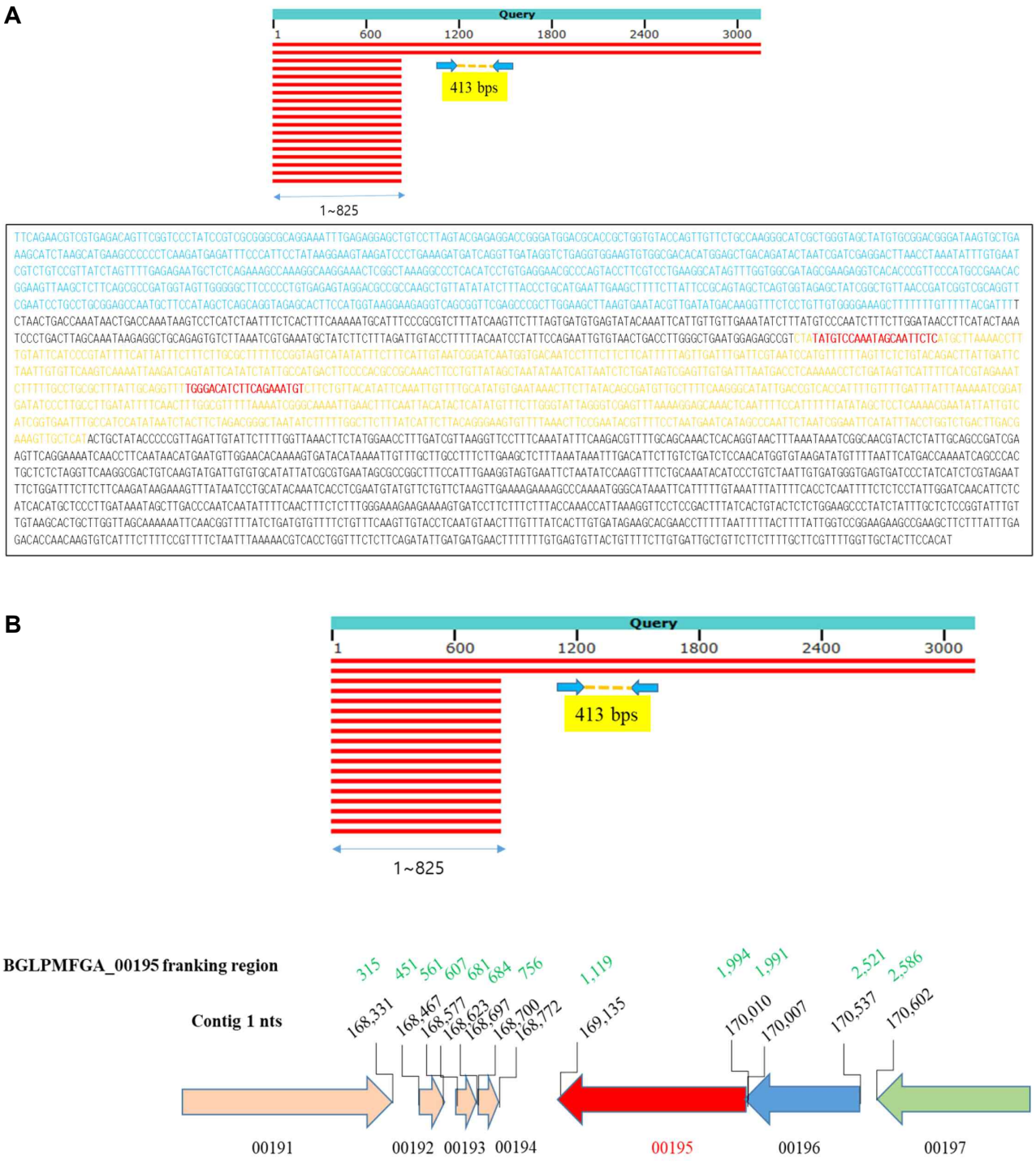
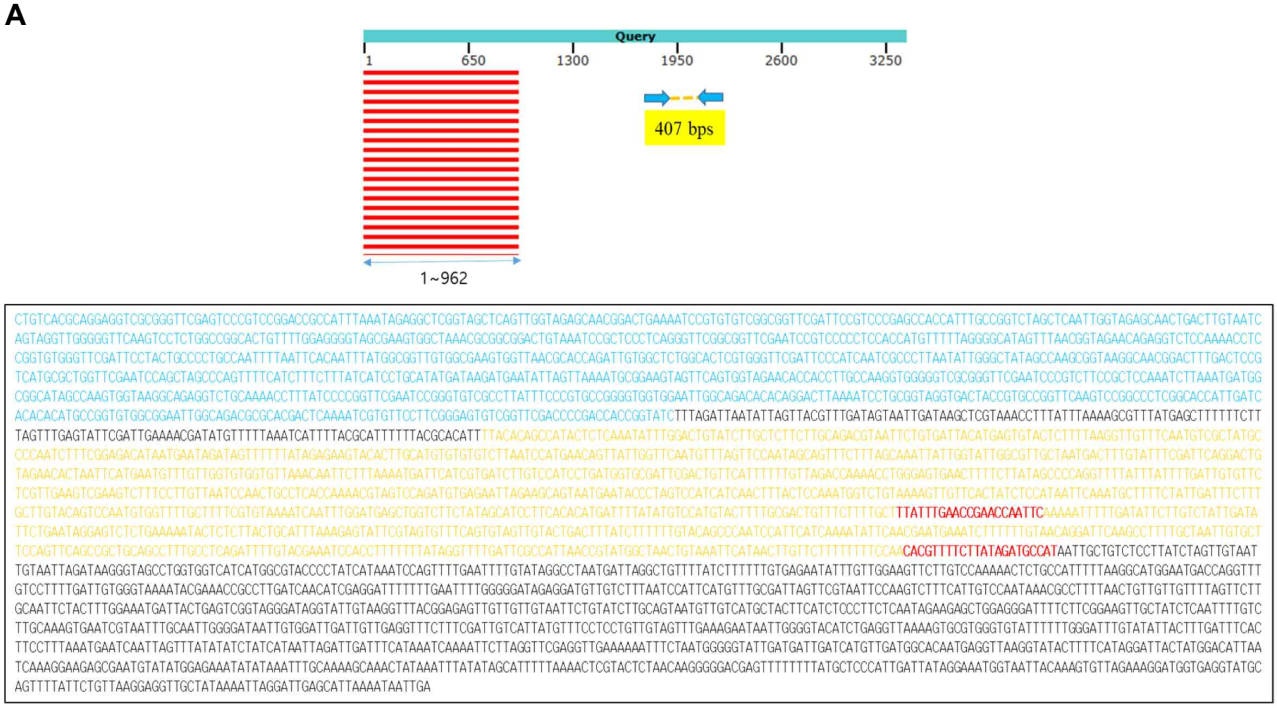


Fig. 3. BGLPMFGA_00195 nucleotide homology comparison. (A) Comparison of homology for BGLPMFGA_00195 and (B) examination of neighboring genes for BGLPMFGA_00195. The homology of Tyr recombinase domain-containing protein (BGLPMFGA_00195) was analyzed by NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). (A) Yellow letters; BGLPMFGA_00195 region, blue letters; NCBI homologous region, red and bold letters; primer regions. (B) BGLPMFGA_00191; 23S ribosomal RNA, BGLPMFGA_00192; 5S ribosomal RNA, BGLPMFGA_00193; tRNA-Asn(gtt), BGLPMFGA_00194; tRNA-Thr (ggt), BGLPMFGA_00195; *Niallia nealsonii* Tyr recombinase domain-containing protein, BGLPMFGA_00196; *Bacillus licheniformis* Phage related protein, BGLPMFGA_00197; *Bacillus subtilis* (strain 168) SPbeta prophage-derived uncharacterized lipoprotein YonS.

A



B

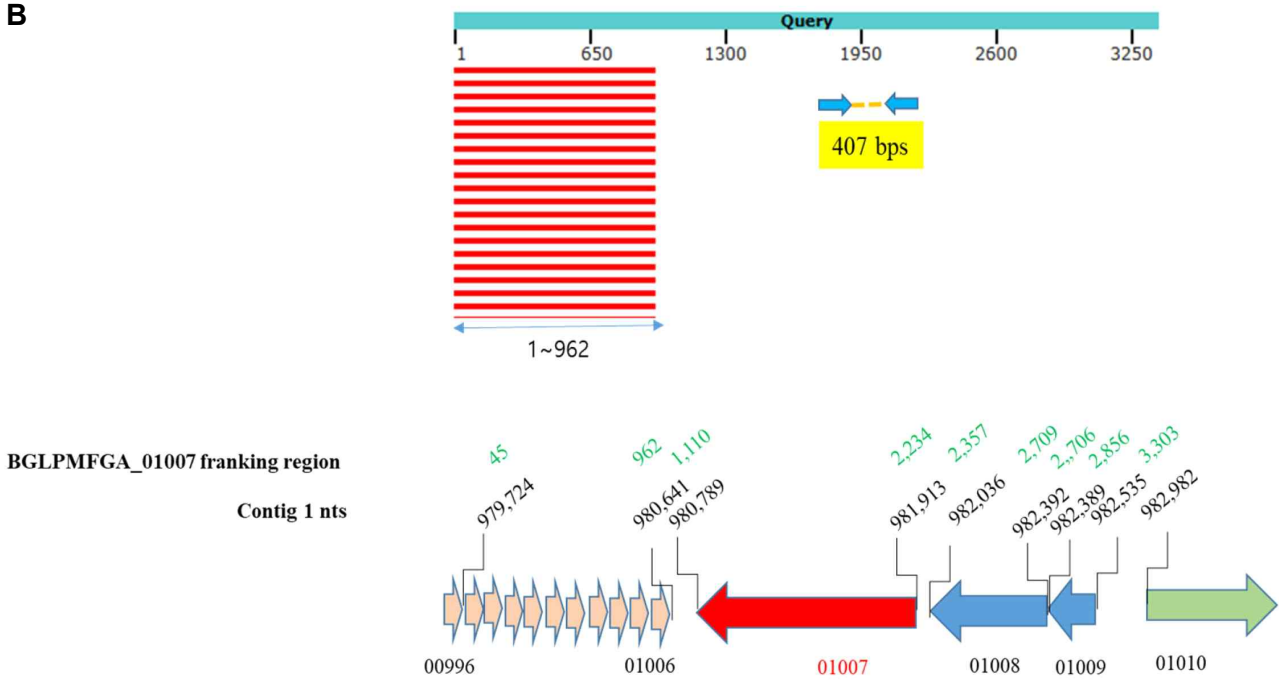


Fig. 4. BGLPMFGA_01007 nucleotide homology comparison. (A) Comparison of homology for BGLPMFGA_01007 and (B) examination of neighboring genes for BGLPMFGA_01007. The homology of Tyr recombinase domain-containing protein (BGLPMFGA_01007) was analyzed by NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). (A) Yellow letters; BGLPMFGA_01007 region, blue letters; NCBI homologous region, red and bold letters; primer regions. (B) BGLPMFGA_00996~01006; tRNA; BGLPMFGA_01007; *Bacillus dafuensis* Site-specific integrase, BGLPMFGA_01008; *Bacillus dafuensis* DUF771 domain-containing protein, BGLPMFGA_01009; *Mucilaginibacter oryzae* DNA-directed DNA polymerase, BGLPMFGA_01010; *Bacillus yapensis* DNA-binding protein.

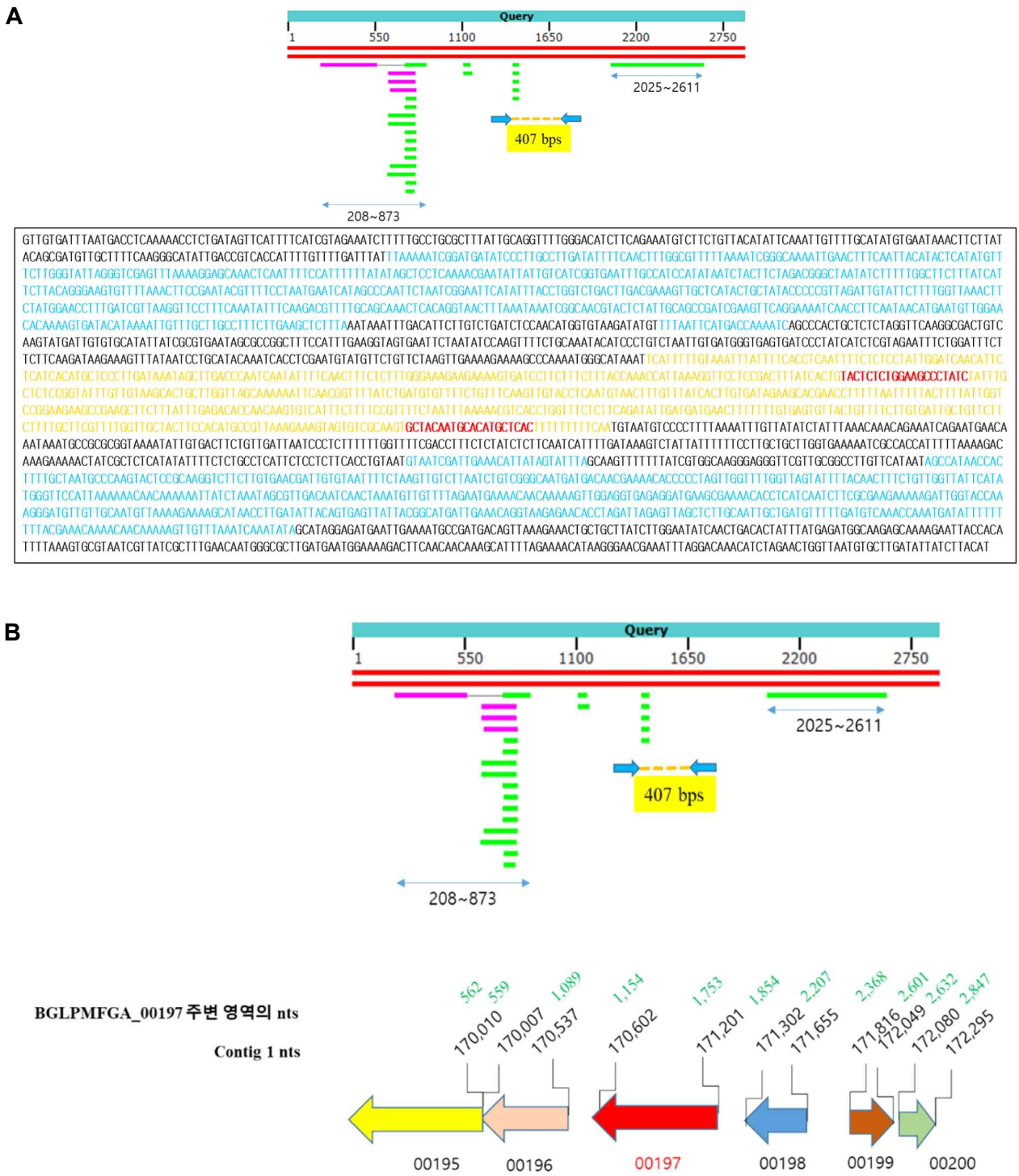


Fig. 5. BGLPMFGA_00197 nucleotide homology comparison. (A) Comparison of homology for BGLPMFGA_00197 and (B) examination of neighboring genes for BGLPMFGA_00197. The homology of Tyr recombinase domain-containing protein (BGLPMFGA_00197) was analyzed by NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). (A) Yellow letters; BGLPMFGA_00197 region, blue letters; NCBI homologous region, red and bold letters; primer regions. (B) BGLPMFGA_00195; *Niallia nealsonii* Tyr recombinase domain-containing protein, BGLPMFGA_00196; *Bacillus licheniformis* Phage related protein, BGLPMFGA_00197; *Bacillus subtilis* (strain 168) SPbeta prophage-derived uncharacterized lipoprotein YonS, BGLPMFGA_0198; *Bacillus subtilis* (strain 168) HTH-type transcriptional regulator Xre, BGLPMFGA_0199; *Marinithermofilum abyssi* HTH cro/C1-type domain-containing protein, BGLPMFGA_0200; *Bacillus badius* Helix-turn-helix domain-containing protein.

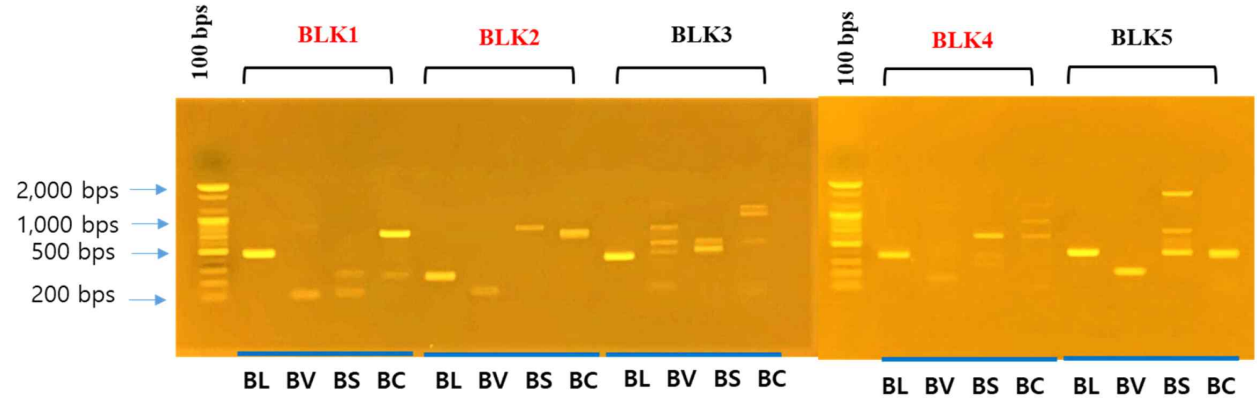


Fig. 6. PCR results of *B. licheniformis* selection markers among *Bacillus* species. The templates for PCR were directly done by colony or after preparation of genomic isolations. BL; *Bacillus licheniformis* K12, BV; *Bacillus velezensis* K10, BS; *Bacillus subtilis*, BC; *Bacillus cereus*. BLK1; 474 bps, BLK 2; 238 bps, BLK 3; 413 bps, BLK4; 371 bps, BLK5; 407 bps.

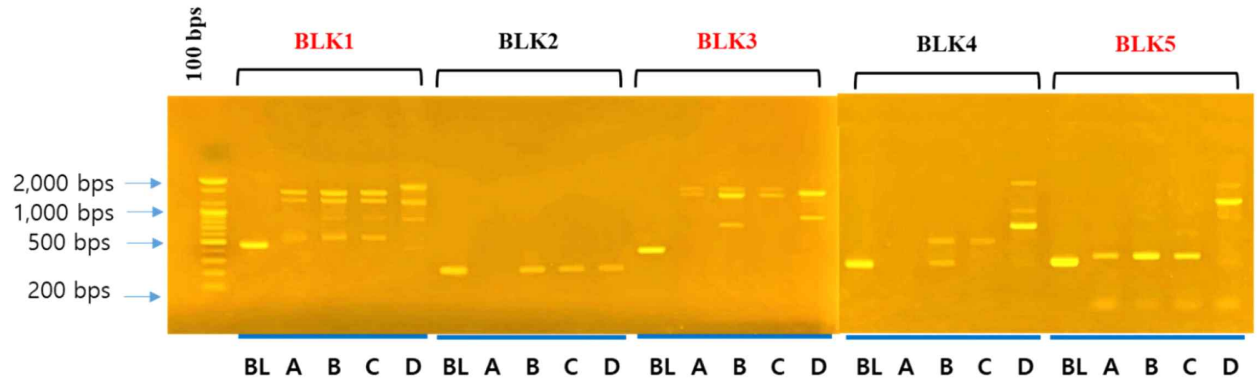


Fig. 7. PCR results of *B. licheniformis* selection markers among *Bacillus licheniformis* subspecies. The templates for PCR were directly done by colony or after preparation of genomic isolations. BL; *Bacillus licheniformis* K12, A; *B. licheniformis* KCTC1030, B; *B. licheniformis* KCTC1659, C; *B. licheniformis* KCTC1831, D; *B. licheniformis* KCTC3056.

산물로써 형성되지 않았기 때문에 추가적인 혼동은 없을 것으로 판단되었다. *B. licheniformis*의 분자 마커를 개발하기 위해 실시된 연구에서 사용된 마커의 PCR 산물에 대한 유사한 밴드가 BL5B, BL8A, BL18A 등에서 *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. atrophaeus* 등에서 형성되는 것이 관찰되었다[2]. 따라서 *Bacillus* 종(species) 유전자 선발마커로써 적합한 것은 BLK3와 5를 제외한 BLK1, 2, 4 primer sets가 가능한 것으로 제의된다.

선발마커의 아종(sub-species) 특이성 분석 결과

선발된 유전자 마커를 *B. licheniformis* 표준균주에 대해 적용하여 보았다. Fig. 7에서 보여지는 바와 같이 대상 균주인 *B. licheniformis*에 비교하여 대부분 PCR product의 크기가 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이 경우에서 특이적인 것은 종(species) 특이적인 것으로 나타났던 BLK4에서는 *B. licheniformis* KCTC1659에서 동일한 PCR product가 존재하였다. 그러나 BLK1, BLK3, BLK5에서는 동일한 PCR product가 존재하지 않는 것을 확인할 수 있었다. *B. licheniformis* substrain를 이용한 PCR 확인에서 양성대조구를 포함하는 사용된 모든 *B. licheniformis* substrain에서 주 PCR 산물을 형성하는 것에 비교하여 매우 특이적인 양상인 것을 관찰할 수 있었다[2]. 따라서 *B. licheniformis* substrain 선발용 유전자 마커는 BLK1, 3, 5 등이 적합한 것으로 추정되었다.

종합적으로 *B. licheniformis* genetic marker로써 선발된 총 5쌍의 프라이머들 중에서 종(species)에 적합한 것은 BLK1, 2, 3, 4인 반면에, *B. licheniformis* substrain 유전자 선발마커로써 BLK1, 3, 5가 적합한 것으로 나타났다. 모든 경우에 가장 적합한 유전자 마커는 BLK1인 것으로 나타났다.

감사의 글

이 연구는 2023년도 경상국립대학교 연구년제 연구교

수 연구지원비에 의하여 수행되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Albuquerque, P., Caridade, C. M. R., Rodrigues, A. S., Marçal, A. R. S., Cruz, J., Cruz, L., Santos, C. L., Mendes, M. V. and Tavares, F. 2012. Evolutionary and experimental assessment of novel markers for detection of *Xanthomonas euvesicatoria* in plant samples. *PLoS One* **7**, e37836.
2. Almeida, E. 2014. *Bacillus licheniformis* specific DNA markers for identification and culture-independent monitoring. Doctorial thesis.
3. Chen, V., Griffin, M. E., Maguin, P., Varble, A. and Hang, H. C. 2021. RecT Recombinase expression enables efficient gene editing in *Enterococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol*. **87**, e0084421.
4. de Boer, A. S., Priest, F. and Diderichsen, B. 1994. "On the industrial use of Bacillus licheniformis: a review". *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **40**, 595-598.
5. Elsababty, Z. E., Abdel-Aziz, S. H., Ibrahim, A. M., Guirgis, A. A. and Dawwam, G. E. 2022. Purification, biochemical characterization, and molecular cloning of cellulase from Bacillus licheniformis strain Z9 isolated from soil. *J. Genet. Eng. Biotechnol*. **20**, 34.
6. Elshaghabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C. and Panwar, H. 2017. Bacillus as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Front. Microbiol*. **8**,1490.
7. Grover, A. and Sharma, P. C. 2016. Development and use of molecular markers: past and present. *Crit. Rev. Biotechnol*. **36**, 290-302.
8. Haddrill, P. R. 2021. Developments in forensic DNA analysis. 2021. *Emerg. Top Life Sci.* **5**, 381-393.
9. Jeong, D. W., Lee, B., Heo, S., Oh, Y., Heo, G. and Lee, J. H. 2020. Two genes involved in clindamycin resistance of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* identified by comparative genomic analysis. *PLoS One* **15**, e0231274.
10. Jezewska-Frackowiak, J., Seroczynska, K., Banaszczyk, J., Jedrzejczak, G., zylicz-Stachula, A. and Skowron, P. M. 2018. The promises and risks of probiotic Bacillus species. *Acta Biochim. Pol*. **65**, 509-519.
11. Khan, S., Moore, R. J., Stanley, D. and Chousalkar, K. K. 2020. The Gut microbiota of laying hens and its manipulation with prebiotics and probiotics to enhance gut health and food safety. *Appl. Environ. Microbiol*. **86**, e00600-20.
12. Lapidus, A., Galleron, N., Andersen, J. T., Jørgensen, P. L., Ehrlich, S. D. and Sorokin, A. 2002. Co-linear scaffold of the *Bacillus licheniformis* and Bacillus subtilis genomes and its use to compare their competence genes. *FEMS Microbiol. Lett*. **209**, 23-30.
13. Lee, N. K., Kim, W. S. and Paik, H. D. 2019. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food Sci. Biotechnol*. **28**,1297-1305.
14. Logan, N. A. and Vos, P. D. 2015. "Bacillus", Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, American Cancer Society, pp. 1-163.
15. Lu, S., Na, K., Li, Y., Zhang, L., Fang, Y. and Guo, X. 2022. Bacillus-derived probiotics: metabolites and mechanisms involved in bacteria-host interactions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. **6**, 1-14.
16. Malhotra, G. and Chapadgaonkar, S. S. 2022. Partial purification and characterization of a thermosTable xylanase from Bacillus licheniformis isolated from hot water geyser. *J. Genet. Eng. Biotechnol*. **20**, 50.
17. Muras, A., Romero, M., Mayer, C. and Otero, A. 2021. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. *Crit. Rev. Biotechnol*. **41**, 609-627.
18. National Food Safety Information Service. http://www.foodsafetykorea.go.kr/
19. Rey, M. W., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpin, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, M., Lopez, de Leon. A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I. G., Olsen, P. B., Rasmussen, M. D., Andersen, J. T., Jørgensen, P. L., Larsen, T. S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S. D. and Berka, R. M. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol*. **5**, R77.
20. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
21. Schallmey, M., Singh, A. and Ward, O. P. 2004. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Can. J. Microbiol*. **50**, 1-17.
22. Sellami-Kamoun, A., Haddar, A., Ali, N. E.-H., Ghorbel-Frikha, B., Kanoun, S. and Nasri, M. 2008. Stability of thermosTable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. *Microbiol. Res*. **163**, 299-306.
23. Zhao, J., Liu, S., Gao, Y., Ma, M., Yan, X., Cheng, D., Wan, D., Zeng, Z., Yu, P. and Gong, D. 2021. Characterization of a novel lipase from Bacillus licheniformis NCU CS-5 for applications in detergent industry and biodegradation of 2,4-D butyl ester. *Int. J. Biol. Macromol*. **176**, 126-136.

초록 : *Bacillus licheniformis* K12 균주 분자 선발 마커 개발

김영진[1,2] · 김삼웅[2] · 이태욱[1] · 지원재[3] · 방우영[4] · 문기환[5] · 김태완[6] · 방규호[2] · 갈상완[1,2]*

([1]경상국립대학교 제약공학과, [2]경상국립대학교 농식품융복합바이오연구원, [3]국립생물자원관 생물다양성연구과, [4]국립생물자원관 생물다양성총괄과, [5]한국해양대학교 해양과학기술융합학과, [6]경상국립대학교 산학연협력 선도대학 육성사업단)

본 연구에서는 미생물균총에서 *B. licheniformis* K12 균주의 양상을 확인하기 위한 선발마커 개발을 시도하였다. *Bacillus licheniformis*는 바위게 내장에서 유산생산균주로써 분리되었다. 본 균주는 중온에서 성장이 양호할 뿐만 아니라 유전체 분석결과 protease, amylase, cellulase, lipase, protease, xylanase 등 다양한 고분자 물질들을 분해할 수 있는 효소류들을 보유하고 있는 것으로 나타났다. 선발마커 발굴을 위해 recombinase, integrase, transposase, phage-related genes, bacteriocin 등 유전자 변이 유발이 쉬운 게놈상의 영역에 대해 탐색을 실시하였다. 그 결과, 선발마커로써 가능성이 높은 5개 부위를 확보하였다. 후보마커는 recombinase 부위 3개(BLK1, 2, 3) integrase 부위 1개(BLK4), phase 관련 1개(BLK5)로 나타났다. 후보 선발마커로써 *Bacillus* species가 다른 *B. licheniformis*, *B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. cereus* 등에 대해 PCR 분석을 실시하였다. 그 결과 BLK1 recombinase, BLK2 recombinase family protein, BLK4 site-specific integrase 등에서 *B. licheniformis*에서 특이적인 위치에 PCR 산물이 나타나는 것을 확인하였다. 또한, *B. licheniformis* 표준균주로써 subspecies에 대한 PCR을 수행한 결과 BLK1 및 3이 선발마커로써 양호한 것으로 나타났다. 따라서 BLK1이 미생물균총에서 종(species) 및 아종(subspecies) 선발마커로써 활용 가능할 것으로 판단된다.