

Research Article

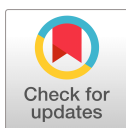
특수환경으로부터 세포외 지방분해효소를 생산하는 바실러스 서브틸리스 균주의 분리 및 특성에 관한 연구

간бат 다리마¹ · 김민경¹ · 박보현¹ · 이용직² · 남개원² · 조석철^{3*} · 이상재^{1*}

¹신라대학교 바이오식품공학과 & 해양극한미생물연구소

²서원대학교 바이오코스메틱학과

³서원대학교 식품공학과



A Study on the Isolation and Characterization of *Bacillus subtilis* Strains with Extracellular Lipase Production from Specific Environments

Dariimaa Ganbat¹, Min Kyeong Kim¹, Bo Hyeon Park¹, Yong-Jik Lee², Gaewon Nam², Seok-Cheol Cho^{3*} and Sang-Jae Lee^{1*}

¹Department of Food Biotechnology and Research Center for Extremophiles & Marine Microbiology, Silla University, Busan 46958, Republic of Korea

²Department of Bio-Cosmetics, Seowon University, Cheongju 28674, Republic of Korea

³Department of Food Science & Engineering, Seowon University, Cheongju 28674, Republic of Korea

Received: May 30, 2023

Revised: Jun. 20, 2023

Accepted: Jun. 21, 2023

*Corresponding author :

Sang-Jae Lee
Department of Food Biotechnology
and Research Center for
Extremophiles & Marine
Microbiology, Silla University,
Busan 46958, Korea.
Tel: +82-51-999-5447,
Fax: +82-51-999-5458,
E-mail: sans76@silla.ac.kr

Seok-Cheol Cho
Department of Food Science &
Engineering, Seowon University,
Cheongju 28674, Korea.
Tel: +82-43-299-8642,
Fax: +82-43-299-8470,
E-mail: cscho@seowon.ac.kr

ORCID

Dariimaa Ganbat
<https://orcid.org/0000-0003-4244-5465>
Min Kyeong Kim
<https://orcid.org/0000-0002-8067-4632>
Bo Hyeon Park
<https://orcid.org/0009-0001-0053-338X>
Yong-Jik Lee
<https://orcid.org/0000-0002-0047-2302>
Gaewon Nam
<https://orcid.org/0000-0002-4623-588X>
Seok-Cheol Cho
<https://orcid.org/0000-0001-7546-5089>
Sang-Jae Lee
<https://orcid.org/0000-0002-9516-3165>

Abstract

Screening of *Bacillus subtilis* strains capable of producing extracellular hydrolases, including lipolytic enzyme was carried out. Within the scope of this study, total 61 strains were isolated from various domestic specific environmental samples such as seawater, soil, Jeju ranch, hot spring, salt farm, and fermented food and identified as *Bacillus subtilis* based on 16S rRNA sequences. Among the isolates, 4 strains had extracellular lipase activity. The growth profile of the strains revealed that 4 strains showed well growth at 50°C, 3 strains at 55°C, and pH 7.0. All strains could tolerate salinity up to 5%(w/v), 3 strains up to 10%(w/v), and only one strain showed growth at 15%(w/v). Additionally, amylolytic and proteolytic activities were detected in these strains. The highest lipolytic, amylolytic, and proteolytic activity was detected in *Bacillus subtilis* YS-YR 5A. These results demonstrate the potential application of extracellular hydrolase-producing *Bacillus subtilis* strains, especially strain YS-YR 5A, as fermentation starter to enhance the functionality and multiplication of functional natural products in the food/medicine/cosmetics/bio industries.

Keywords

probiotic, *Bacillus subtilis*, isolation, characterization, extracellular lipase.

서론

지방분해효소(트리아실글리세롤 아실하이드롤레이스, EC 3.1.1.3)는 트리아실글리세라이드의 가수분해, 에스테르 합성, 트랜스에스테르화 등을 촉매하는 다양한 용도의 산업용 효소이며, 세제, 의약품, 유기합성, 제지, 식품 성분 및 유제품 산업 분야에서 널리 사용되고 있다(Hasan *et al.*, 2006; Ogino *et al.*, 1994). *Bacillus sp.* 균주가 생산하는 지방분해효소는 유기 용매 및 pH에 대한 높은 내성을 나타내어 세제, 식품 및 화장품용 에스테르 합성 및 바이오디젤 생산에 있어 활용성이 높기 때문에 많은 관심을 받고 있다(Guncheva and Zhiryakova, 2011; Hiol *et al.*, 2000; Moeller *et al.*, 1996). 그러나 야생형 숙주 세포에 의해 생산되는 대부분의 *Bacillus sp.* 균주 유래 지방분해효소는 생산성이 매우 낮다. *Bacillus subtilis* 168 및 *B. coagulans*에서 달성된 최대 지방분해효소 수율은 각각 0.015 U/mL 및 0.2 U/mL였으며, 이로 인해 지방분해효소 생산성을 향상시키기 위한 다양한 접근방법이 개발되고 있다(Guncheva and Zhiryakova, 2011; Kumar and Valsa, 2007; Lesuisse *et al.*, 1993; Mormeneo *et al.*, 2008; Olusesan *et al.*, 2011).

*B. subtilis*는 여러 가지 이유로 지방분해효소를 생산하는 매력적인 호스트 생산시스템이다. 비병원성으로 미국 식품의약국 기준으로 GRAS (generally recognized as safe) 유기체이다. 또한 *B. subtilis*는 외막이 얇으며, 단백질 분리 및 정제와 같은 발효 후 공정 작업을 크게 용이하게 하기 때문에 많은 양의 세포와 단백질을 직접 배지로 분비할 수 있다. *B. subtilis*는 산업적으로 scale-up이 용이하여 대량 생산에 유리한 장점을 갖는다. 이는 여러 발효 생산 공정에 사용되는, 중요한 산업 미생물 중 하나임을 의미한다(Schallmeyer *et al.*, 2004; Westers *et al.*, 2004). *B. subtilis*는 명확한 유전 배경과 간단하고 다양한 유전자 조작 시스템으로 인해 생리 및 대사 연구를 위한 그람 양성 세균의 핵심 모델이다. 또한 매우 효과적인 단백질 분비 시스템과 적응력이 높은 대사로 인해 농업과 의약품 화학 물질, 효소 및 향균 물질의 미생물 생산을 위한 셀 팩토리로 널리 사용되어져 왔으며, 내염성도 가지고 있어, 해수로부터 천일염 제조와 이를 사용한 전통적인 발효 식품을 생산하는 것과 같은 수세기에 걸친 공정에 관여되어 왔다. 다양한 단백질이 풍부한 식품 생산에 관여하는 염분 발효 공정은 부패 및 식중독 발생을 방지하는 것뿐 아니라, 풍미증진 및 유지에 중요한 세포의 hydrolase 활성이 우수한 *B. subtilis*의 산업적 응용성은 매우 중요하다(Danilova and Sharipova, 2020; Oren, 2009; Setyorini *et al.*, 2005).

본 연구에서는 여수 연등천 기수지역에서 분리한 *Bacillus subtilis*

YS-YR 5A를 포함하는 4종 균주의 생리학적 특성을 확인하고 동정을 진행하였으며, 식품 분야에서 probiotic 균주로의 활용이나 화장품/의약품/바이오 산업에서 효율적인 천연물 발효를 통한 기능성 소재 개발용 균주로서의 산업적 응용이 가능한지를 탐색하기 위해 산업적으로 많이 사용되는 lipase를 포함한 amylase와 protease의 가수분해 활성을 측정하였다. 또한 프로바이오틱/장내 유익 균주를 가지고 spray drying법 등을 이용한 제제 제조시 열에 대한 생존율이 높은 균주를 선별하기 위해, 분리된 *B. subtilis*의 생육온도 프로파일을 살펴보았다(Pérez-Juárez *et al.*, 2022). *B. subtilis*의 일반적인 특성인 단백질과 탄수화물 분해능이 우수하면서도 지방분해효소 활성이 우수한 균주를 개발하여 발효산업적 활용가능성을 최대화할 수 있는 생물 소재로의 가치 제고를 위한 기초적인 연구결과를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

균주 분리, 동정 및 배양

국내 다양한 특수환경(해수, 토양, 제주목장, 온천, 염전, 발효식품 등)으로부터 내염성 특이 *B. subtilis*를 분리하기 위해 각각의 샘플을 멸균된 0.85% (w/v) 생리식염수에 첨가하여 vortexing하였다. 현탁한 샘플 1 mL를 사용하여 10^{-1} - 10^{-4} 배로 단계 희석한 후, 일반 증식배지로 해양미생물 전용배지인 marine agar (BD, USA) 배지(3%(w/v) 염 포함)를 활용하여 고체배지를 제작해 희석액을 도말하여 37°C에서 호기적으로 배양하였다. 배양 후 선택적으로 배지상에 나타나는 균의 크기, 모양, 색깔 등 형태학적 모습을 관찰한 후, 동일한 고체배지를 사용하여 추가적으로 single colony isolation을 수행하였다. 국내의 다양한 환경시료로부터 호기적 배양 조건에서 분리된 균주들의 분자생물학적 동정을 위해 marine agar (BD, USA) 배지에 각각 분리된 균주의 colony가 배양된 상태의 고체배지를 ㈜바이오팩트(Daejeon, Korea)에 보내어 16S rRNA를 코딩하는 유전자 염기서열을 분석하였으며, 가장 유사한 근연 균주의 확인을 위하여 ㈜천랩의 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)를 사용하였다(Yoon *et al.*, 2017). 계통학적 분석은 Clustal W 및 MEGA 11.0 프로그램을 이용하여 확인하였다(Tamura *et al.*, 2021). 순수분리된 균주의 혼합배지에서의 생육 가능성을 확인하기 위하여, nutrient agar (BD, USA), R2A agar (BD, USA) 및 tryptic soy agar (BD, USA)에 평판 도말법을 이용하여 37°C에서 7일간 정지 배양을 하였다. 그리고 분리된 균주들이 호염성 균주로서 5-15%(w/v) NaCl 농도에서도 생육이 가능한지를 확인하기 위하여 marine agar 배지에 NaCl을 최종 5-15%(w/v) 되도록 첨가하여 분리 균주들의 생육을 확인하였으며, 최적 생육 pH 조건을 확인하

기 위하여 pH를 4.0, 7.0, 9.0 로 각각 조절한 marine agar 배지를 사용하였으며, 최적의 생육 온도 조건을 확인하기 위해 동일한 배지를 사용하여 30, 35, 40, 45, 50, 55°C에서 7일간 배양하였다.

세포외 분해 효소 생산능 분석

분리된 균주의 산업적 응용을 위한 세포외 분해 효소 amylase, lipase, protease 활성을 확인하기 위하여 각각의 효소와 특이적으로 반응할 기질 성분이 포함된 고체평판 선별배지를 사용하였다. 먼저 amylase 활성에 의한 분해능은 0.2%(w/v) soluble starch (BD, USA)를, lipase 활성에 의한 분해능은 1%(v/v) Tween 80 (BD, USA)을, protease 활성에 의한 분해능은 2%(w/v) skim milk (BD, USA)를 기질로 선택하여 marine agar (BD, USA) 배지에 각각 첨가하여 제조하였으며, 분리된 균주를 직접 접종하여 37°C에서 7일간 배양한 후 amylase와 protease 활성은 clear zone, lipase 활성은 opaque zone의 직경으로 조사하였다. 분리된 균주의 효소활성 분해능 평가는 배양 후 나타나는 점종균 주위의 억제환의 크기(+++ : > 7 mm, ++ : > 4~7 mm, + : 1~4 mm, - : < 1 mm)로 나타내었다.

결과 및 고찰

균주 분리, 동정 및 배양

국내 다양한 특수환경시료로부터 특이 *B. subtilis* 균주 분리를 위하여 marine agar 배지에 희석한 시료를 도말하여 배양된 콜로니를 다시 동일한 고체배지를 사용하여 2차로 단일 콜로니를 분리한 결과, 61종의 *B. subtilis* 균주를 순수하게 분리·동정하였으며, 이 중 10%(w/v) 염 환경에서 생육 가능한 내염성 26종, 45-50°C에서 생육 가능한 고온성 15종, amylase 활성 59 종, protease 활성 28종, lipase 활성 4종이 확인되었다(data not shown). 지방분해효소 활성이 확인된 4종의 *B. subtilis* 균주를 선별하였다 (Fig. 1 and Fig. 2). 4종의 균주는 각각 여수 연등천 기수지역,

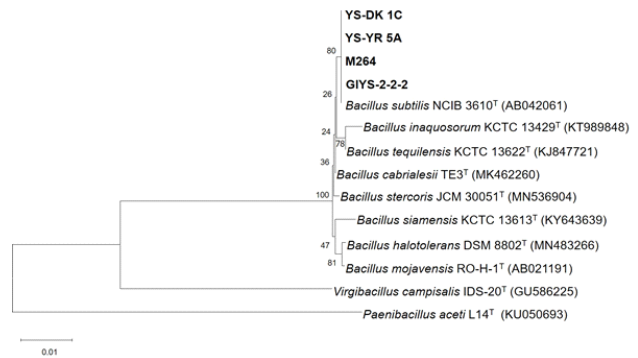


Fig. 2. Phylogenetic analysis of 4 isolates and their closely related type strains. The phylogenetic tree was constructed based on 16S rRNA gene sequence alignments using the Neighbour-Joining method in MEGA 11.0. Bootstrap values are indicated at the branch points. The scale bar indicates a branch length equivalent to 0.01 changes per nucleotide. *Virgibacillus campisalis* IDS-20^T and *Paenibacillus aceti* L14^T served as outgroup.

여수 돌산 갯김치, 금일도 야생초 군락지 흙, 부산 피트모스 시비 경작지 흙에서 호기적으로 분리되었다.

선별된 4종의 균주 모두 pH 7.0에서 생육이 가능하였으며, pH 4.0과 9.0에서도 각 2종의 생육이 확인되었으며, 이는 분리 균주들이 넓은 범위의 pH 조건에서 생육이 가능함을 알 수 있었다(Table 1). 또한, *B. subtilis* 균주의 경우 높은 염농도에서도 생육이 가능한 호염성 균주라는 보고에 따라 분리된 균주가 호염성 미생물로 높은 염 농도에서도 생육이 가능한지를 확인하기 위하여 marine agar 배지에 최종 3-15%(w/v) NaCl 함유되도록 제작하여 분리 균주들의 생육을 실험한 결과, 모든 분리 균주들은 3-5%(w/v) NaCl 조건에서도 생육이 가능하였고, 3종이 10%(w/v)에서, 1종이 15%(w/v)에서 생육 가능하여 분리된 *B. subtilis* 균주가 전반적으로 높은 염농도에서 생육이 가능함을 확인하였다(Ji *et al.*, 2020). Marine agar는 구성성분의 대부분이 무기염으로 미생물

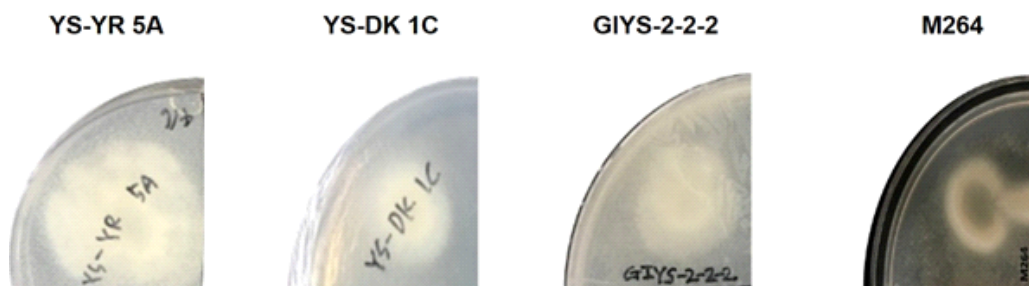


Fig. 1. Extracellular lipolytic enzyme activity results of representative strains in this study.

Table 1. Growth characteristics of representative strains in this study

No.	Source	Strain	Media			MA															
			NA [#]	R2AA [*]	TSA [†]	NaCl (%)				Temp. (℃)								pH			
						3	5	10	15	30	35	40	45	50	55	60	4.0	7.0	9.0		
1	여수 연등천 기수지역	YS-YR 5A	+ ^a	+	+	+	+	+	+	— ^c	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	
2	여수 돌산 갯김치	YS-DK 1C	+	+	+	+	+	+	+	W ^b	+	+	+	+	+	+	—	W	+	+	
3	금일도 야생초 군락지 흙	GIYS-2-2-2	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	W	—	—	—	+	—	
4	부산 피트모스 시비경작지 흙	M264	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+

[#]: Nutrient agar, ^{*}: Reasoner's 2A agar, [†]: Tryptic soy agar, ^a: Well-growth, ^b: Weak growth, ^c: No growth.

대량 배양에 적용하기에는 적합하지 않으므로 분리 균주들의 산업적으로 사용되는 복합배지에서의 생육 가능성을 확인하기 위하여 몇 종류의 복합배지에서 분리 균주들을 배양한 결과, 4 균주 모두 3종류의 배지에서 생육이 가능한 것으로 확인되었다(Table 1). 이 결과는 배지 성분에 따라서 분리 균주의 생육 가능성이 좌우되는 것으로 추후 산업적으로 이용하기 위해선 배지 성분의 최적화에 장점을 갖는 특성으로 판단되었다. 추가적으로 분리된 균주들이 고온균의 특성도 나타내는지 확인한 결과, 4종 모두 50°C에서 생육 가능하였고, 3종이 55°C에서 생육이 가능한 것을 확인하여 분리된 4종은 고온성 균주로 판단되었다(Table 1). 여수 연등천 기수지역, 여수 돌산 갯김치, 금일도 야생초 군락지 흙, 부산 피트모스 시비경작지 흙에서 호기적으로 분리된 4균주의 16S rDNA 염기서열을 바탕으로 EzBioCloud 시스템을 활용하여 확인하였다. Table 2에서 나타난 것처럼 분리된 YS-YR 5A, YS-DK 1C, GIYS-2-2-2, M264는 *Bacillus subtilis* NCIB3610^T와 가장 유사한 균주로 확인되었으며, 상동성은 100.0, 100.0, 99.0 및 99.9%를 각각 나타내었다.

세포외 분해효소

분리된 균주 4종 모두 lipase 활성을 보유하고(Fig. 1), 그 활성은 균주별로 차이를 나타내었으며 YS-YR 5A가 가장 높은 값을 나타내었다(Table 2). Amylase 활성은 4종의 균주에서 모두 우수하였으며, 2종의 균주는 우수한 protease 활성을 보였다. 최종적으로, YS-YR 5A 균주는 3가지 효소(lipase, amylase, protease) 활성이 모두 우수하였다(Table 2).

따라서 본 연구에서 분리한 균주는 국내 여러 특수환경 시료로부터 분리한 다양한 특성을 갖는 *B. subtilis* 자원의 다양성 확보 차원에서 큰 의미를 찾을 수 있을 것이며, 산업용 가수분해효소 관련 생물공학 및 세포외 지방분해효소 활성이 우수한 프로바이오틱스 미생물 제제로의 사용을 위한 생물소재로 활용이 가능할 것으로 예상된다. 또한 본 연구를 통하여 분리한 모든 균주들은 KRIBB 미생물가치제고사업단에 기탁(YS-YR 5A, NMC4-B256; YS-DK 1C, NMC4-B194; GIYS-2-2-2, NMC6-B297; M264, NMC8-B272)하였다.

Table 2. Extracellular hydrolase activities of representative strains in this study

No.	Strain	Closest taxon name	Closest strain	Similarity (%)	Extracellular enzyme activity			Deposited number
					Amylase	Lipase	Protease	
1	YS-YR 5A	<i>Bacillus subtilis</i>	NCIB 3610 ^T	100.0	+++	+++	+++	NMC4-B256
2	YS-DK 1C	<i>Bacillus subtilis</i>	NCIB 3610 ^T	100.0	+++	++	— ^a	NMC4-B194
3	GIYS-2-2-2	<i>Bacillus subtilis</i>	NCIB 3610 ^T	99.0	+++	++	—	NMC6-B297
4	M264	<i>Bacillus subtilis</i>	NCIB 3610 ^T	99.9	+++	+	+++	NMC8-B272

^a: No activity.



요약

지방분해효소를 포함한 세포외 가수분해능이 우수한 *Bacillus subtilis*를 발굴하기 위해, 다양한 국내 특수환경(해수, 토양, 제주목장, 온천, 염전, 발효식품 등)으로부터 61종의 *B. subtilis*를 분리하였다. 이 중 지방분해효소를 생산하는 균주는 4 종(여수 2, 완도 1, 부산 1)이었다. 그 특성은 모두 다양한 배지(NA, R2A, TSA)조성에서 잘 자랐고, 50-55℃에서 생육 여부에 따라, 중온성 1(GIYS-2-2-2), 고온성 3(YS-YR 5A, YS-DK 1C, M264) 종이었고, 고온성 균주의 세포외 lipase 활성은 우수하였다. 3-5% 염 환경에서는 모두 잘 자랐고, 10% 염 이상의 함유 배지에서 3 종이 잘 자랐고, 15% 이상에서도 생육하는 1 종이 있었다. pH 4.0에서 생육가능 2 종, 알칼리 pH 9.0에서 생육가능 2 종, amylase 효소활성은 4 종 모두 우수하였고, lipase와 protease 활성까지 모두 우수한 것은 여수연등천 기수지역에서 분리한 *B. subtilis* YS-YR 5A 균주였다. 본 연구를 통하여 분리한 YS-YR 5A를 포함한 *B. subtilis* 균주들은 세포외 효소 생산이 우수하여 식품/의약품/화장품/바이오 산업분야의 기능성 천연물의 기능성 강화 및 다양화를 꾀하는 프로바이오틱 발효균주로 활용 가능성을 나타내었다. 또한 이번 연구는 국내 유전자원 확보 및 특수환경 시료로부터 분리된 *B. subtilis* 미생물군의 다양성과 특성에 관한 과학적 지식 확장에 도움이 될 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 3단계 산학협력 선도대학 육성사업(LINC 3.0, 2023-90-017)과 사천시의 재원으로 사천시미생물발효재단의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

- Danilova I and Sharipova M (2020) The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production. *Front. Microbiol.* **11**, 1782.
- Guncheva M and Zhiryakova D (2011) Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **68**, 1-21.
- Hasan F, Shah AA, and Hameed A (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **39**(2), 235-251.
- Hiol A, Jonzo MD, Rugani N, Druet D, Sarda L, and Comeau LC (2000) Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzym. Microb. Technol.* **26**, 421-430.
- Ji C, Tian H, Wang X, Hao L, Wang C, Zhou Y, Xu R, Song X, Liu Y, Du J, and Liu X (2022) *Bacillus subtilis* HG-15, a halotolerant rhizoplane bacterium, promotes growth and salinity tolerance in wheat (*Triticum aestivum*). *Biomed. Res. Int.* 2022, 9506227.
- Kumar M and Valsa AK (2007) Optimization of culture media and cultural conditions for the production of extracellular lipase by *Bacillus coagulans*. *Indian J. Biotechnol.* **6**, 4.
- Lesuisse E, Schanck K, and Colson C (1993) Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **216**, 155-160.
- Moeller B, Vetter R, Wilke D, and Foullois B (1996) Alkaline *Bacillus* lipases, coding DNA sequences therefore and *Bacillus* which produce the lipase. *Biotechnol. Adv.* **14**, 315.
- Mormeneo M, Andrés I, Bofll C, Díaz P, and Zueco J (2008) Efficient secretion of *Bacillus subtilis* lipase A in *Saccharomyces cerevisiae* by translational fusion to the Pir4 cell wall protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 437-445.
- Ogino H, Miyamoto K, and Ishikawa H (1994) Organic-solvent-tolerant bacterium which secretes organic-solvent-stable lipolytic enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3884-3886.
- Olusesan AT, Azura LK, Abubakar F, Mohamed AK, Radu S, Manap MY, and Saari N (2011) Enhancement of thermostable lipase production by a genotypically identified extremophilic *Bacillus subtilis* NS 8 in a continuous bioreactor. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 105-115.
- Oren A (2009) Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.* **31**, 825-834.
- Pérez-Juárez CM, Flores-Gallegos AC, Cruz-Requena M,

- Sáenz-Galindo A, Cobos-Puc L, and Rodríguez-Herrera R (2022) Functionality of thermophilic bacteria as probiotics, in: *Microbial Extremozymes*. Elsevier, pp. 147-160.
14. Schallmey M, Singh A, and Ward OP (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* **50**, 1-17.
15. Setyorini E, Takenaka S, Murakami S, and Aoki K (2005) Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular proteases from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**(2), 433-440.
16. Tamura K, Stecher G, and Kumar S (2021) MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **31**(7), 3022-3027.
17. Westers L, Westers H, and Quax WJ (2004) *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1694**, 299-310.
18. Yoon SH, Ha SM, Kwon SJ, Lim JM, Kim YS, Seo HS, and Chun JS (2017) Introducing EzBioCloud : a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 1613-1617.