

一株产蛋白酶嗜碱菌株的分离、鉴定及酶学特性

郝建国^{1,2}, 薛燕芬¹, 马延和^{1*}

(¹ 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

(² 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:【目的】筛选产蛋白酶嗜碱菌并对其进行鉴定和特性分析。【方法】利用碱性脱脂牛奶培养基分离纯化产蛋白酶嗜碱菌,通过形态特征、生理生化、16S rRNA 基因序列分析以及 DNA-DNA 杂交实验确定菌株的分类地位,利用酪蛋白水解法分析所产蛋白酶的 pH 和温度作用范围、稳定性和耐氧化剂能力。【结果】从我国西藏盐碱湖样品中分离到一株产碱性蛋白酶的菌株 ZL223,该菌株为革兰氏阳性菌,最适生长温度为 37℃,最适生长 pH 9.0,16S rRNA 基因序列分析显示,菌株 ZL223 与假强芽孢杆菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 亲缘关系最近,16S rRNA 基因序列相似性为 98.6%,DNA-DNA 杂交结果显示与 *B. pseudofirmus* OF4 同源性为 86%。菌株 ZL223 产生的蛋白酶作用的最适 pH 为 12.0,最适温度为 40℃。【结论】结合生理生化指标测定的结果,鉴定菌株为假强芽孢杆菌 ZL223 (*B. pseudofirmus* ZL223)。该菌株产生的碱性蛋白酶具有较高的 pH 适应性,值得进一步研究。

关键词: 嗜碱微生物;假强芽孢杆菌;16S rRNA 基因;DNA-DNA 杂交

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0054-06

嗜碱微生物(alkaliphiles)是指那些最适生长在 pH 8.0 以上,通常在 pH 9.0-10.0 之间的一类嗜极微生物^[1]。嗜碱微生物具有重要的工业应用价值,它们产生的胞外酶多为碱性酶,在洗涤剂、制革、纺织、医药、化妆品等的生产中有广泛的应用价值^[2]。研究嗜碱微生物及利用碱性酶资源是一个重要的研究课题。嗜碱微生物广泛地存在于天然碱湖、碱性沙漠等极端自然环境,以及水泥制造、印染以及造纸等人类生活和生产活动引起的人工碱性环境^[3]。我国西藏拥有丰富的盐碱湖资源,由于其特殊的地理环境,其中丰富的嗜碱微生物资源还没有得到充分的开发利用。本研究从我国西藏班戈湖沉积样品中分离出一株产碱性蛋白酶的嗜碱

细菌,对其进行了多项分类学分析和蛋白酶的酶学性质分析,显示该菌株所产蛋白酶不同于已报道的碱性蛋白酶,为蛋白酶的工业应用提供了新资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:样品采自于我国西藏班戈盐碱湖,主要由湖水和湖底沉积物组成,运抵实验室后于 4℃ 密闭保存。

1.1.2 培养基:富集培养基(FJ):脱脂奶粉(Skim milk) 10 g/L,酵母粉 5 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, MgCl₂ 0.2 g/L, NaCl 50 g/L, Na₂CO₃ 10 g/L;分离培养基培养基采用 Horikoshi I 培养基^[1], NaCl 量改为 50 g/L。

基金项目:国家“863 计划”(2007AA021306, 2006AA020202)

* 通信作者。Tel: +86-10-64807590; Fax: +86-10-64807616; E-mail: mayanhe@im.ac.cn

作者简介:郝建国(1982-),男,天津人,硕士研究生,主要从事嗜碱微生物研究。E-mail: haojg@im.ac.cn

收稿日期:2009-05-27;修回日期:2009-06-15

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

以上培养基于 115℃ 蒸汽灭菌 20 min。另外, FJ 培养基中的脱脂奶粉和两种培养基中的 Na_2CO_3 分别灭菌后加入, 培养基 pH 均为 10.0。如配制固体培养基时加入 15 g/L 琼脂粉。

1.1.3 主要试剂和仪器: 脱脂奶粉 (skim milk) 购自美国 BD 公司; 聚合蛋白胨 (polypeptone) 购自日本制药株式会社; API 50CH 试剂盒购自法国生物梅里埃公司; Protein Assay 试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司。Axioskop 40 相差显微镜购自德国 ZEISS 公司; DU800 紫外分光光度计购自美国 Beckman Coulter 公司; PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 样品富集培养及菌株分离

将沉积物样品与湖水样品充分混匀, 取 50 mL 加入等体积的 FJ 培养基中, 37℃ 震荡培养 48 h, 取富集培养物在 Horikoshi I 固体培养基上进行稀释涂布, 获得能够降解脱脂奶粉形成透明圈的单菌落, 在 Horikoshi I 固体培养基上纯化, 得到菌株 ZL223。

1.3 形态特征

KOH 法确定菌株的革兰氏反应^[5]; 相差显微镜下观察菌体形态、大小、运动及产芽孢情况。

1.4 生理生化特性

1.4.1 生长特性: 在 5℃ - 55℃ 范围内测定菌株 ZL223 在各个温度下的生长量; 在最适生长温度下, 测定 ZL223 菌株在不同 pH 缓冲液 (pH 7.0 - 12.0) 中的生长量; 在最适生长温度和 pH 条件下, 测定不同 NaCl 浓度下 ZL223 菌株的生长量。以上均为 1% 的接种量, 培养时间为 2 d, 菌株的生长量以 OD_{600} 表征。

1.4.2 碳源利用: 使用梅里埃公司的 API 50 CH 试剂盒测定菌株对不同碳水化合物的利用。使用无菌的 1 mol/L NaOH 调节培养基 pH 至 9.0。

1.4.3 生化指标: 参照文献方法^[1] 测定了 ZL223 菌株的接触酶、氧化酶、淀粉酶、明胶水解以及硝酸盐和亚硝酸盐还原性质, 所用培养基用无菌的 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 9.0。

1.5 16S rRNA 基因序列分析

使用通用细菌引物^[7] 27F (5'-AGAGTTTGAT CATGGCTCAG-3') 和 1541R (5'-AAGGAGGTGA TCCAGCCGCA-3') 对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。扩增条件是: 95℃ 3 min; 95℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后, 送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。所得序列通过

BLAST 程序与 GenBank 中的 16S rRNA 基因序列进行同源性比较, 用 MEGA 4.0 软件包^[8] 中的 Kimura 2-parameter 法计算遗传距离, 用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 重复抽样 1000 次分析系统树各分枝的置信度。

1.6 DNA 的 G + C mol% 含量测定及 DNA-DNA 杂交分析

基因组 DNA 的提取参照 Marmur^[9] 所述方法进行, G + C mol% 含量测定采用热变性温度法 (T_m 值法)^[10], DNA 样品溶解在 $0.1 \times \text{SSC}$ 缓冲液中, 温度变化率为 1℃ / min, 得到熔解温度 T_m , 按照经验公式 (1) 计算得出 G + C mol% 含量。参照菌株为 *Escherichia coli* K12。

$$G + C \text{ mol\%} = G + C \text{ mol\%}_{\text{参比菌株}} + 2.08 \times (T_{m\text{未知菌株}} - T_{m\text{参比菌株}}) \quad (1)$$

参照文献方法^[11] 对 ZL223 菌株和参比菌株进行 DNA 杂交分析, 测定紫外吸光值减少速率, 依据公式 (2) 得到杂交百分数 (其中 V 为吸光值减少速率, a 为待测菌株 ZL223, b 为参比菌, m 为二者 DNA 等量混合后所得样品)。

$$\text{杂交百分数 } D\% = \frac{4V_m - (V_a + V_b)}{2 \sqrt{V_a \times V_b}} \times 100\% \quad (2)$$

1.7 发酵液蛋白酶性质分析

蛋白浓度使用 Bio-Rad Protein Assay 试剂盒测定, 以牛血清白蛋白为标准。蛋白酶活力测定参照文献^[12] 方法, 以酪蛋白为底物在 pH 12.0 和 40℃ 条件下测定。蛋白酶活力定义为: 在最适条件下 1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸所需的酶量为一个活性单位 (U), 比活力为每 mg 酶蛋白所具有的活力 (U / mg)。

将菌株 ZL223 以 5% 的接种量接入作为产酶培养基的 FJ 培养基, 37℃ 振荡培养 2d, 离心获得上清液, 以此作为粗酶液进行性质测定。将酶液于 20℃ - 80℃ 温度下反应 30 min, 测定出酶的温度作用范围; 将酶加入到 pH 7.0 - 10.0 的一系列体系中进行酶反应, 测定酶的 pH 作用范围; 将酶于 50℃、60℃ 和 70℃ 保温一定时间, 再测定酶活, 得到了酶的热稳定性曲线; 将酶液 pH 调节到 pH 8.0、pH 10.0 和 pH 12.0, 处理一定时间, 再测定酶活, 得到酶的 pH 稳定性; 在酶液中添加终浓度为 3% 的 H_2O_2 , 保温一定时间后测定酶活, 得到酶的耐氧化剂曲线; 在酶反应体系中加入终浓度 5 mmol/L 的各种金属离子和 EDTA、EGTA 以及 SDS, 以测定的活力表征金属离子等对酶的影响。

2 结果

2.1 菌株分离及形态学特征

通过利用含有脱脂奶粉的碱性培养基进行富集培养和平板划线纯化,获得产蛋白酶纯培养菌株 ZL223。菌株 ZL223 为短杆状,形成内生芽孢(图 1),大小 $3.0\ \mu\text{m} - 5.0\ \mu\text{m} \times 0.8\ \mu\text{m} - 1.0\ \mu\text{m}$,以周生鞭毛运动,革兰氏阳性。菌落呈圆形,浅黄色,表面平坦,光滑,较粘稠,易挑起,边缘整齐。

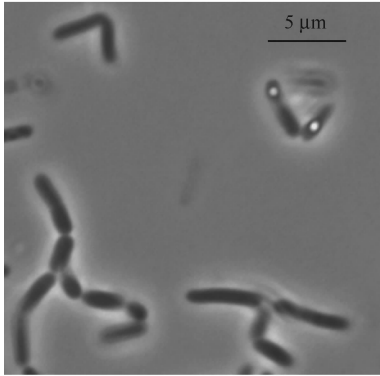


图 1 菌株 ZL223 细胞形态 (1000 ×)

Fig.1 Phase contrast micrograph of strain ZL223 showing the cell morphology and spore-forming, Bar, 5 μm .

2.2 生理生化特征

菌株 ZL223 兼性厌氧生长,在 pH 7.0 - 10.0 的条件下生长,最适生长 pH 为 9.0;最高能够耐受 15% NaCl,在含有 5% NaCl 条件下生长量最高;生长的温度范围是 15 $^{\circ}\text{C}$ - 45 $^{\circ}\text{C}$,最适生长温度是 35 $^{\circ}\text{C}$ - 40 $^{\circ}\text{C}$ 。能够分解酪蛋白、明胶、Tween 40,对 Tween 60 有微弱的分解能力,不能分解淀粉、Tween 20 和 Tween 80;触酶阳性,氧化酶阴性,不能还原硝酸盐。该菌能够利用 D-木糖、葡萄糖、果糖、七叶灵、水杨苷、麦芽糖、蔗糖、海藻糖、糖原、2-酮基葡萄糖酸钾和土伦糖,并发酵产酸;不能利用阿拉伯糖、L-木糖、鼠李糖、半乳糖、甘露糖、乳糖和纤维二糖等。

2.3 16S rRNA 基因序列及系统发育学分析

测序得到菌株 ZL223 的 16S rRNA 基因序列,含有 1456 bp,其 GenBank 登录号为 GQ202203。将菌株 ZL223 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中的序列进行比对,发现与 *Bacillus* 属成员具有较高的序列相似性,用 Neighbor-Joining 方法构建的系统发育树(图 2)表明与 *B. pseudofirmus* 种亲缘关系密切,序列相似性达到了 97.4% - 98.6%。其中菌株 ZL223 与 *B. pseudofirmus* OF4 菌 16S rRNA 基因序列相似性最高,为 98.6%。

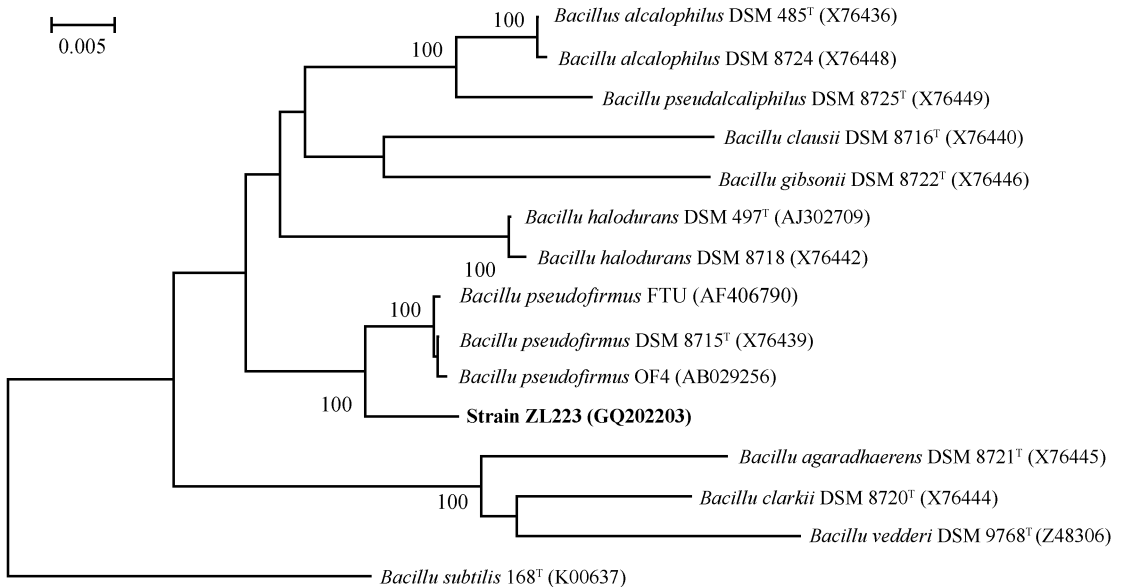


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 ZL223 与相关菌种的系统发育树,序列的 Genbank 登录号列于括号中,分支的置信度百分数标注在分支节点(只列出大于 95% 的结果),标尺所示长度为 0.5 核苷酸置换率

Fig.2 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationships between strain ZL223 and related species. Accession numbers are shown in parentheses. The number at each branch point represent the bootstrap percentages (values above 95% are shown). Bar,

2.4 DNA 的 G + C mol% 含量及 DNA-DNA 杂交分析

通过测定菌株 ZL223 以及参比菌 *B. pseudofirmus* OF4 和 *E. coli* K12 的温度溶解曲线,得到了 ZL223 菌 DNA 的 T_m 为 69.6°C ,通过公式计算出 ZL223 菌的 G + C mol% 为 40.4%,这符合 *B. pseudofirmus* 种的 G + C mol% 范围(39.0% - 40.8%)。DNA-DNA 杂交实验显示,ZL223 菌与参比菌 *B. pseudofirmus* OF4 的 DNA-DNA 杂交率为 86%,显著高于 70% 的阈值,说明它们是同一物种的不同菌株^[13]。

2.5 碱性蛋白酶性质

粗酶液的酶学性质实验结果显示 ZL223 菌产生的蛋白酶,pH 作用范围为 pH 7.5 - 12.5,最适反应 pH 为 12.0;温度作用范围是 30°C - 60°C ,最适反应温度为 40°C ;在 60°C 保温 50 min,保持 50% 以上的活力;可以耐受 pH 8.0 - 12.0 处理 4h 并保持 50% 以上活力;能够耐受终浓度 3% 的 H_2O_2 ,处理 60 min 仍能保持 50% 以上的活力。 Hg^+ 、SDS 对酶活力有抑制作用, Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 等对酶有一定的激活作用(图 3)。

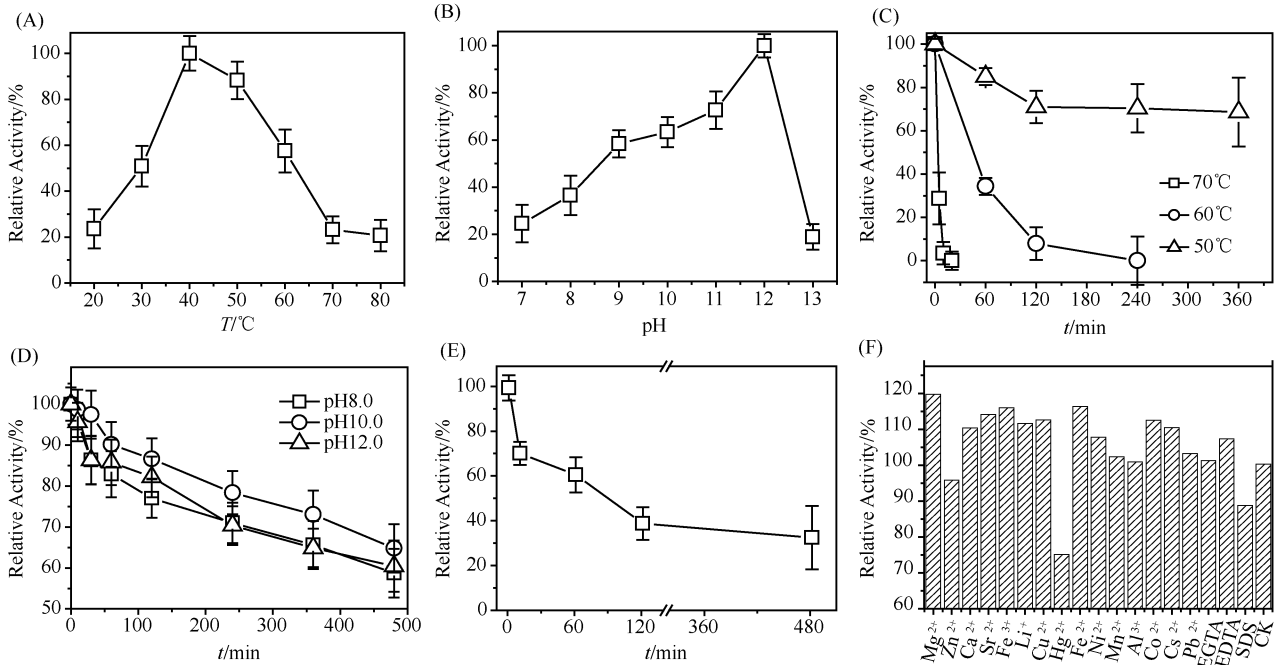


图 3 各种因素对 ZL223 菌蛋白酶活性的影响

Fig. 3 Effect of some factors on the activity and stability of protease from strain ZL223. (A), Temperature profile; (B), pH profile; (C), Thermal stability; (D), pH stability; (E), H_2O_2 resistance; (F), Metal ion, EGTA, EDTA & SDS tolerance.

3 讨论

假强芽孢杆菌 (*B. pseudofirmus*) 是 Nielsen 等^[14] 于 1995 年基于 16S rRNA 基因的系统发育分析和其它特性建立的一个嗜碱芽孢杆菌新种,已有不同的研究者从不同的环境样品中分离获得,其中 3 个菌株的特征被描述:*B. pseudofirmus* DSM 8715^[15]、*B. pseudofirmus* OF4^[16] 和 *B. pseudofirmus* FTU^[17],显示出是 *B. pseudofirmus* 种的不同菌株。本文分离的嗜碱菌株 ZL223 来自我国西藏班戈盐碱湖,系统发育分析显示菌株 ZL223 与 *B. pseudofirmus* 的亲缘关系最近;DNA-DNA 杂交是确定种的基本方法,一般认为同源性大于 70% 应为相同的种^[3],菌株 ZL223 与关系最近的 *B.*

pseudofirmus OF4 杂交同源性为 86%,说明它们应当属于同一个种;而且菌株 ZL223 具有与 *B. pseudofirmus* 相同的一系列表型特征,例如革兰氏染色阳性、杆状、有芽孢、嗜碱、能利用碳水化合物产酸、基因组 DNA 的 (G + C) mol% 是 40.5%,这些基因型和表型特征表明这个新的分离菌是 *B. pseudofirmus* 种中的不同成员(表 1)。但是菌株 ZL223 与 *B. pseudofirmus* 种已描述的其它成员的 16S rRNA 基因序列相似性仅为 98.6%,并且在一些表型特征方面也存在有明显的差异:*B. pseudofirmus* FTU 在没有 NaCl 时不能生长和形成膨胀的芽孢等特性不同于菌株 ZL223,*B. pseudofirmus* OF4 形成膨胀的芽孢和利用麦芽三糖的特性不同于菌株 ZL223,*B. pseudofirmus* DSM 8715 不能在 pH 7.0 下生长以及能

利用淀粉和 2-酮基葡萄糖酸钾的特性不同于菌株 ZL223。综上所述,菌株 ZL223 是嗜碱芽孢杆菌 *B. pseudofirmus* 的一个与其它已报道成员不同的新菌株。

嗜碱芽孢杆菌是碱性水解酶的一个重要来源。自 1971 年 Horikoshi^[4]首次报道了产自 *Bacillus* sp. 221 的外泌型碱性蛋白酶以来,已报道了多种不同的来自于嗜碱芽孢杆菌的碱性蛋白酶,有关

B. pseudofirmus 菌产生的蛋白酶也有报道^[18-20]。但是已报导的 *B. pseudofirmus* 菌产生的蛋白酶,其反应的最佳温度为 60℃ - 70℃,最佳 pH 为 9.0 - 11.0,不同于本文报道的 ZL223 菌的蛋白酶。菌株 ZL223 产生的碱性蛋白酶在 pH 耐受范围,最适温度和氧化剂耐受等方面展示了其应用潜力,而且该蛋白酶高的反应 pH 值,是研究酶分子碱适应性性的一个很好的资源,值得进行进一步的研究。

表 1 菌株 ZL223 的表型及生理生化特征

Table 1 Some phenotypic characteristics of strain ZL223 and related species of *Bacillus*

Characteristic	Strains designations				
	1	2	3	4	5
Size (μm)	0.8 - 1.0 × 5.0 - 7.0	0.6 - 0.8 × 3.0 - 6.0	0.5 - 0.6 × 3.0 - 4.0	0.6 - 0.7 × 2.0 - 5.0	0.5 - 0.6 × 2.0 - 5.0
Spore shape	Oval	Oval	Ellipsoidal	Ellipsoidal	Ellipsoidal
Temp. for growth (°C)	15 - 45	10 - 45	15 - 55	15 - 45	10 - 45
pH for growth	7.0 - 10.0	8.0 - 10.0	7.0 - 10.0	9.0 - 11.0	9.0 - 11.0
NaCl range for growth (%)	0 - 15	0 - 16	0 - 12	0 - 16	0 - 16
NO ₃ ⁻ reduction	-	-	-	-	+
Hydrolysis of:					
Starch	-	w	+	-	+
Tween 80	-	-	-	-	-/+
Utilization of:					
Ribose	w	+	+	-	+
D-xylose	+	+	-	-	+
L-arabinose	-	-	+	-	+
Galactose	-	-	+	w	+
Rhamnose	-	-	+	-	w
Lactose	-	-	+	-	-
Melibiose	-	-	+	-	+
Melzitose	-	-	+	-	-
D-raffinose	-	-	+	-	+
D-tagatose	-	-	-	-	+
Mannose	-	w	+	w	+
Inositol	-	-	+	-	-
2-ketogluconate	+	-	-	-	+

Strains designations: 1, strain ZL223; 2, *B. pseudofirmus* DSM 8715^{T[15]}; 3, *B. halodurans* DSM 497^{T[15]}; 4, *B. clarkii* DSM 8720^{T[15]}; 5, *B. agaradhaerens* DSM 8721^{T[15]}. + positive, - negative, w weak reaction.

参考文献

- [1] Horikoshi K. Alkaliphiles. Boca Raton: CRC Press, 1999.
- [2] Horikoshi K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63 (4): 735-750.
- [3] 曹军卫, 沈萍, 李朝阳. 嗜碱微生物. 武汉: 武汉大学出版社, 2004.
- [4] Horikoshi K. Production of alkaline enzymes by alkaliphilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* sp. 221. *Agricultural Biology and Chemistry*, 1971, 36: 1407-1414.
- [5] Gregersen T. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1978, 5: 123-127.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55: 541-555.
- [8] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in bioinformatics*, 2004, 5: 150-163.
- [9] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology*, 1961, 3: 208-218.
- [10] Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology*, 1962, 5: 109-118.
- [11] Huss V, Festl H, Schleifer K. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology*, 1983, 4: 184-192.
- [12] Gessesse A, Gashe BA. Production of alkaline protease

- by an alkaliphilic bacterium isolated from an alkaline soda lake. *Biotechnology Letters*, 1997, 19: 479-481.
- [13] Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1987, 37: 463-464.
- [14] Nielsen P, Rainey FA, Outtrup H, et al. Comparative 16S rDNA sequence analysis of some alkaliphilic bacilli and the establishment of a sixth rRNA group within the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 117: 61-66.
- [15] Nielsen P, Fritze D, Priest FG. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology* 1995, 141: 1745-1761.
- [16] Takami H, Krulwich T. Reidentification of facultatively alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 as *Bacillus pseudofirmus* OF4. *Extremophiles*, 2000, 4: 19-22.
- [17] Muntyan MS, Tourova TP, Lysenko AM, et al. Molecular identification of alkaliphilic and halotolerant strain *Bacillus* sp. FTU as *Bacillus pseudofirmus* FTU. *Extremophiles*, 2002, 6:195-199.
- [18] Gessesse A, Hatti-Kaul R, Gashe BA, et al. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32: 519-524.
- [19] Kojima M, Kanai M, Tominaga M, et al. Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01. *Extremophiles*, 2006, 10: 229-235.
- [20] Abdel-Fattah YR, El-Enshasy HA, Soliman NA, et al. Bioprocess development for production of alkaline protease by *Bacillus pseudofirmus* Mn6 through statistical experimental designs. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 19(4): 378-386.

Isolation, identification and enzyme profiling of an alkaliphilic protease producing bacterium

Jianguo Hao^{1,2}, Yanfen Xue¹, Yanhe Ma^{1*}

(¹Lab of Extremophiles, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

(² Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: [**Objective**] To isolate and characterize alkaliphilic bacteria with protease activity. [**Methods**] Protease-producing alkaliphiles were isolated by skim milk agar method. The morphological, biochemical and physiological characteristics, 16S rRNA gene sequence and DNA-DNA hybridization were determined to identify the taxonomic position of strain ZL223. Meanwhile, the enzyme characterization of the protease including optimal temperature and pH range, stability and oxidation resistance were tested by using casein hydrolysis test. [**Results**] A new strain named ZL223 was isolated from Bange Lake in Tibet, China. Cells were Gram-positive, spore-forming, motile rods. Growth pH range was from 7.0 to 10.0, optimum at pH 9.0. Growth temperature range was from 15°C to 45°C, optimum at 37°C. The G + C content of DNA was 40.4 mol%. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that the strain belonged to the genus *Bacillus* and most closely related to *Bacillus pseudofirmus* OF4 with 98.6 % sequence similarity. DNA-DNA hybridization analysis confirmed the close relationship of strain ZL223 with *Bacillus pseudofirmus* OF4 (86% relatedness). Strain ZL223 produced extracellular alkaline protease and its maximal enzyme activity was observed at 40°C and pH 12.0. [**Conclusion**] Base on polyphasic taxonomy, strain ZL223 was a new member of *Bacillus pseudofirmus*. It produced alkaline protease which was worth further research.

Keywords: Alkaliphile; *Bacillus pseudofirmus*; 16S rRNA gene; DNA-DNA hybridization

(本文责编:王晋芳)