

海洋低温蛋白酶生产菌 YS-9412-130 原生质体的制备与再生

张 琇^{1,2}, 孙 谡¹, 王清印¹, 李国保³

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛, 266071; 2. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 3. 上海水产大学 食品学院, 上海, 200090)

摘要:以海洋低温蛋白酶生产菌株 YS-9412-130 为研究对象, 从传代、菌龄、溶菌酶浓度与酶解时间、甘氨酸与 EDTA 预处理以及稳定剂对该菌原生质体形成与再生的影响进行研究。结果表明, 在相同条件下, 第一代菌至第五代菌原生质体的形成率分别为 86.9%、70.3%、66.8%、63.4%、60.2%, 再生率分别为 10.5%、18.6%、17.9%、18.2%、17.8%; 取该菌对数生长期前期、对数生长期后期、稳定期部分菌液制备原生质体, 原生质体的形成率分别为 72.1%、70.4%、60.5%, 再生率为 13.4%、18.9%、10.4%; 溶菌酶浓度为 2.5 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL, 酶解 60 min, 原生质体的形成率分别为 40.6%、70.8%、81.8%、95.6%, 原生质体的再生率为 19.0%、19.2%、19.0%、10.6%; 使用 10 mg/mL 溶菌酶酶解 YS-9412-130 菌 30 min、60 min、90 min、120 min, 原生质体的形成率分别为 30.8%、81.3%、81.7%、82.9%, 原生质体的再生率分别为 19.2%、19.3%、16.9%、11.2%; 在细菌培养液中添加终质量浓度为 5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL 和 40 mg/mL 的甘氨酸, 培养该菌 16 h 后制备原生质体, 原生质体的形成率分别为 81.0%、81.1%、90.3%、90.8%、90.6%, 再生率为 19.1%、19.0%、19.3%、12.0%、9.0%; EDTA 对原生质体的形成稍有促进作用, 但作用超过 30 min 会影响原生质体的再生; 分别以 0.6 mol/L KCl、0.3 mol/L KCl + 0.3 mol/L 蔗糖、0.6 mol/L 蔗糖作为稳定剂, 原生质体的再生率分别为 10.9%、19.6%、25.9%。结论认为, YS-9412-130 原生质体制备的最佳条件为选用第 2 代 YS-9412-130 菌, 在培养基中添加终质量浓度为 10 mg/mL 的甘氨酸培养 16 h 后, 再将菌体置于含有 0.05 mol/L EDTA 的高渗溶液中 30℃ 预处理 30 min, 用 10 mg/mL 溶菌酶, 30℃ 酶解 60 min, 再用 0.6 mol/L 蔗糖作为原生质体再生培养稳定剂, 比较适合 YS-9412-130 原生质体的制备与再生。这一试验结果将为通过原生质体技术对 YS-9412-130 菌进行遗传改良提供重要参数。[中国水产科学, 2006, 13(1): 106–111]

关键词:原生质体的制备与再生; 低温碱性蛋白酶; YS-9412-130 菌

中图分类号:Q932, Q938.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0106-07

原生质体技术在研究微生物细胞遗传特性的改造中起着重要作用^[1], 例如通过细菌原生质体诱变或融合等技术已成功地选育出多种酶、抗生素的高产菌株并应用于生产^[2-3]。在原生质体选育技术中, 原生质体的制备与再生是两个重要的环节, 直接制约着选育效率^[3-4]。目前, 尽管对产抗生素菌种原生质体的制备与再生研究较多, 但对于来自海洋产酶细菌的研究报道比较少见。本课题组从海水贝类中分离出一株产低温蛋白酶的菌株 YS-9412-130, 经鉴定为黄杆菌属内的一个新种 *Flavobacterium yellowsea* sp. nov., 革兰氏染色为阴性。该菌所产的蛋白酶在低温下具有催化效率高与性质稳定等特点^[5], 有着重要的工业应用价值。本研究就海洋

低温蛋白酶生产菌株 YS-9412-130 原生质体的制备与再生条件进行探讨, 旨在为通过原生质体技术选育出高产低温蛋白酶生产菌株提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

YS-9412-130 菌(图 1)由中国水产科学研究院黄海水产研究所产物资源室保存。

1.2 培养基及试剂

液体培养基(g/100 mL): 牛肉膏 1%, 蛋白胨 1%, 甘油 0.4% (0.4 mL 甘油加入到 100 mL 培养液中), pH 7.0~7.5; 固体培养基: 牛肉膏 1%, 蛋白胨 1%, 甘油 0.4% (0.4 mL 甘油加入到 100 mL 培

收稿日期: 2005-04-27; 修订日期: 2005-07-11。

基金项目: 国家“863”引导项目资助(2003AA001028)。

作者简介: 张 琇(1977-), 男, 助理研究员, 主要从事海洋微生物酶与细胞工程的研究。E-mail: zhangxiu101@yishoo.com.cn

通讯作者: 孙 谡(1962-), E-mail: sunsi@ysfri.ac.cn

养液中), 琼脂 2.0%, pH 7.0~7.5; 高渗缓冲液: 0.3 mol/L KCl + 0.3 mol/L 蔗糖, 用磷酸盐缓冲液配制, pH 7.0~7.5; 高渗培养基: 用高渗缓冲液代替蒸馏水按照培养基组分配制; 酶液: 溶菌酶液(上海生工)用高渗缓冲液代替蒸馏水配制, 贮存浓度为 20 mg/mL; EDTA 贮存液: 用高渗缓冲液配制 0.05 mol/L EDTA; 甘氨酸贮存液: 用蒸馏水配制, 贮存浓度为 40 mg/mL^[6-7]。

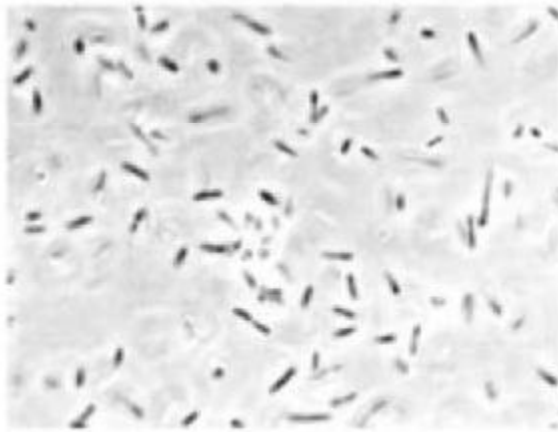


图1 YS-9412-130 菌($\times 1000$)
Fig.1 Strain YS-9412-130 ($\times 1000$)

1.3 实验方法

1.3.1 生长曲线的绘制, OD 值法^[8] 取活化菌液 1 mL, 接种于 25 mL 液体培养基中, 振荡培养 56 h, 摇床转速为 200 r/min, 培养温度 18 ℃, 每隔 4 小时取菌液用无菌水稀释 10 倍, 用 721 型分光光度计在 550 nm 波长处测得菌液 OD 值, 以培养时间为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制菌体的生长曲线。

1.3.2 原生质体的制备 取活化菌液 100 μ L, 加入盛有 3 mL 培养基的试管中, 振荡培养, 摇床转速为 200 r/min, 培养温度 18 ℃, 培养一定时间后, 离心收集菌体, 用缓冲液洗涤一遍; 再将菌体移入 0.05 mol/L EDTA 高渗溶液中, 30 ℃, 预处理 30 min (除特别注明外), 离心收集菌体, 用缓冲液洗涤一遍; 再加入溶菌酶液中进行酶解, 酶解温度为 30 ℃^[8]。

1.3.3 原生质体的再生 菌液经溶菌酶作用一定时间后, 离心弃去酶液, 用高渗缓冲液洗涤一遍, 然后将原生质体悬液稀释到约 1×10^2 , 取 100 μ L 原生质体悬液加入再生培养基平板上, 涂布, 18 ℃, 培养 3 d, 统计结果^[7]。

1.3.4 原生质体的计算方法 原生质体的形成率 = 酶解处理后形成的原生质体数 / 未经酶解处理的总菌落数 $\times 100\%$; 原生质体的再生率 = 能再生的原生质体 / 酶解处理后形成的原生质体数 $\times 100\%$ ^[7]。

1.3.5 细菌代数与菌龄对原生质体形成与再生的影响 用接种环从斜面挑一环 YS-9412-130 菌体接入 3 mL 试管液体培养基中 (设定为第一代菌), 振荡培养, 摇床转速 200 r/min, 培养温度为 18 ℃, 培养一定时间后, 从其中再取 100 μ L 菌悬液接入同体积新鲜液体试管培养基中培养, 设定为第 2 代菌, 连续传代 4 次, 共 5 代细菌, 将每一代细菌在相同的条件下制成原生质体, 统计原生质体的形成率与再生率。根据上述实验结果, 从 5 代细菌中选出其中一代细菌, 分别在对数生长前期、对数生长中后期、稳定期, 取部分菌液, 制备原生质体, 统计原生质体的形成率与再生率^[7]。

1.3.6 溶菌酶浓度与酶解时间对原生质体的形成率与再生率的影响 在相同条件下, 分别用 2.5 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL 的溶菌酶制备原生质体, 统计原生质体的形成率与再生率; 在相同条件下, 比较同浓度溶菌酶分别酶解 30 min、60 min、90 min、120 min 后原生质体的形成率与再生率。

1.3.7 甘氨酸和 EDTA 预处理对原生质体的制备率与形成率的影响 接种前, 在培养基中分别加入终质量浓度分别为 5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、40 mg/mL 的甘氨酸, 接种后培养 20 h, 比较甘氨酸预处理对原生质体形成率和再生率的影响^[9-10]。在用溶菌酶酶解细菌之前, 先在含有 0.05 mol/L 的 EDTA 高渗液中预处理 0、10 min、30 min、60 min、90 min 后, 离心 7 000 r/min, 6 min, 弃 EDTA 高渗液, 用高渗缓冲液洗涤一遍后, 再将菌体酶解制备原生质体, 统计原生质体的形成率与再生率^[8]。

1.3.8 稳定剂对原生质体再生率的影响 在再生培养基中分别加入 0.6 mol/L KCl、0.3 mol/L KCl + 0.3 mol/L 蔗糖、0.6 mol/L 蔗糖作为稳定剂, 比较稳定剂对原生质体再生的影响^[12]。

2 结果

2.1 生长曲线的绘制

生长曲线 (图 2) 的横坐标为菌体培养时间, 纵坐标为用 721 型分光光度计在 550 nm 波长处测得

该菌液OD值。将该菌培养56 h,每隔4小时取样测定其OD值,绘制菌体生长曲线。可见该菌在培养至24 h后就达到生长稳定期。

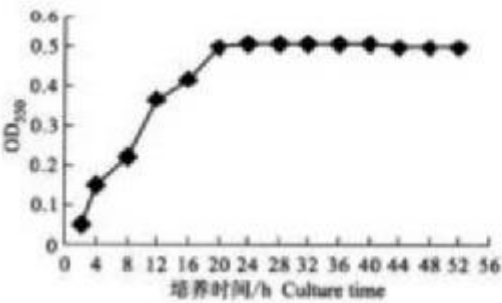


图2 YS-9412-130 生长曲线
Fig.2 YS-9412-130 growth curve

2.2 细菌代数对原生质体形成率与再生率的影响
分别将第1、第2、第3、第4、第5代菌制备成原生质体,结果见表1。

表1 细菌代数对原生质体形成率与再生率的影响

Tab.1 Effects of generation on the formation and regeneration of protoplasts

传代 Generation	原生质体 Protoplasts	
	形成率/% Formation rate	再生率/% Regeneration rate
1	86.9	10.5
2	70.3	18.6
3	66.8	17.9
4	63.4	18.2
5	60.2	17.8

由表1可见,随着传代次数的增加,原生质体(图3)的形成率略有下降趋势,虽然第一代菌原生质体的形成率高,但第1代菌原生质体再生率明显低于第2~5代菌的原生质体再生率;第2~5代之间原生质体的再生率基本无明显差异。

2.3 菌龄对原生质体形成率与再生率的影响

根据上述结果,选用第2代YS-9412-130菌,分别取生长期3个阶段的菌液制备原生质体,酶质量浓度为5 mg/mL,酶解时间为60 min(表2)。在对数生长前期,菌体原生质体的形成率较高,但再生率较低;在稳定期,菌体原生质体的形成率与再生率均较低;在对数生长中后期,菌体有较高的原生质体形成率与再生率。

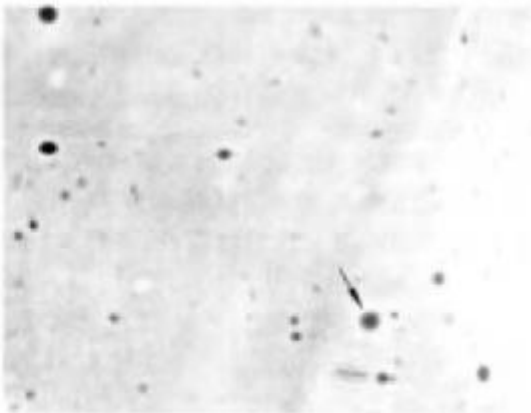


图3 YS-9412-130 菌的原生质体(×1000)
Fig.3 Protoplasts of Strain YS-9412-130 (×1000)

表2 菌龄对原生质体形成率与再生率的影响

Tab.2 Effects of cell age on formation and regeneration of protoplasts

菌龄 Cell age	原生质体 Protoplasts	
	形成率/% Formation rate	再生率/% Regeneration rate
对数生长前期(8 h) Logarithmic growth prophase	72.1	13.4
对数生长中后期(16 h) Logarithmic growth met anaphase	70.4	18.9
稳定期(24 h) Logarithmic growth stabilization phase	60.5	10.4

2.4 酶浓度对原生质体的形成与再生的影响

在相同条件下,使用不同浓度的酶作用于YS-9412-130,酶解时间为60 min,原生质体的形成率与再生率,结果见表3。

表3 酶浓度对原生质体形成率与再生率的影响

Tab.3 Effects of lysozyme concentration on formation and regeneration of protoplasts

酶浓度/ (mg·mL ⁻¹) Lysozyme concentration	原生质体 Protoplasts	
	形成率/% Formation rate	再生率/% Regeneration rate
2.5	40.6	19.0
5	70.8	19.2
10	81.8	19.0
20	95.6	10.6

由表3可见,随着溶菌酶浓度的升高,原生质体的形成率随之明显提高;当溶菌酶质量浓度达到20 mg/mL时,原生质体的再生率明显降低。

2.5 酶解时间对原生质体的形成与再生的影响

取第2代 YS-9412-130 菌,菌龄为16 h的菌液制备原生质体,使用10 mg/mL的溶菌酶作用不同时间,原生质体的形成率与再生率见表4。

表4 酶解时间对原生质体形成率与再生率的影响

Tab.4 Effects of enzymolysis time on formation and regeneration of protoplasts

酶作用时间 /min Enzymolysis time	原生质体 Protoplasts	
	形成率/% Formation rate	再生率/% Regeneration rate
30	30.8	19.2
60	81.3	19.3
90	81.7	16.9
120	82.9	11.2

由表4可见,随着酶解时间的延长,原生质体的形成率呈增长趋势,再生率呈下降趋势,酶解时间超过60 min,原生质体形成率增加不再明显,再生率有下降趋势,酶解120 min后原生质体再生率明显降低。

2.6 甘氨酸预处理对原生质体形成率与再生率的影响

在相同条件下,比较甘氨酸对原生质体制备与再生的影响(表5)。

表5 甘氨酸对原生质体制备与再生的影响

Tab.5 Effects of Gly on formation and regeneration of protoplasts

甘氨酸终浓度/ (mg·mL ⁻¹) Gly concentration	原生质体 Protoplasts	
	形成率/% Formation rate	再生率/% Regeneration rate
0	81.0	19.1
5	81.1	19.0
10	90.3	19.3
20	90.8	12.0
40	90.6	9.0

由表5可见,在培养基中添加甘氨酸对原生质体的形成有明显地促进作用,添加10~40 mg/mL甘氨酸,原生质体的形成率可达90%以上,添加超过10 mg/mL甘氨酸会明显降低原生质体的再生率。

2.7 EDTA 预处理对原生质体形成率与再生率的影响

在相同条件下,比较EDTA(0.05 mol/L)对原生质体制备与再生的影响(表6)。

表6 EDTA 预处理对原生质体制备与再生的影响

Tab.6 Effects of EDTA action time on formation and regeneration of protoplasts

EDTA 作用时间 /min Action time	原生质体 Protoplasts	
	形成率/% Formation rate	再生率/% Regeneration rate
0	90.1	19.6
10	90.0	19.6
30	95.1	19.3
90	94.3	18.3
120	94.0	12.4

由表6可见,EDTA对原生质体的形成稍有促进作用,作用超过30 min会影响原生质体的再生。

2.8 稳定剂对原生质体再生的影响

在相同条件下,比较再生培养基添加不同稳定剂对原生质体再生的影响,结果表明,分别以0.6 mol/L KCl、0.3 mol/L KCl+0.3 mol/L 蔗糖、0.6 mol/L 蔗糖作为稳定剂,原生质体的再生率分别为10.9%、19.6%、25.9%。原生质体在含0.6 mol/L 蔗糖的再生培养基上培养,再生率较高。

3 讨论

菌龄对原生质体的形成有直接的影响^[7]。随着菌龄的增长,细菌细胞壁的厚度随着增加,从而降低了细菌细胞壁对溶菌酶的敏感度,进而影响了原生质体的释放^[13]。本实验发现,不但菌龄对细菌原生质体的形成与再生有着明显的影响,细菌传代次数对细菌原生质体的形成与再生也有一定的影响。原代菌原生质体的形成率要比随后几代菌的形成率高,但其原生质体的再生率较低。或许是因为原代菌在生长过程中细胞壁的形成的强度还不如随后几代菌的强度高,故对溶菌酶的敏感性较高。

除菌龄与传代次数对原生质体制备与再生的影响外,另一个影响原生质体形成率的因素是溶菌酶的酶解浓度与酶解时间。一般溶菌酶浓度越高,酶解时间越长,所得到的原生质体数量越多,但溶菌酶浓度过高或作用时间过长,原生质体的再生率会降低^[10,13]。

本实验结果支持上述结论,溶菌酶浓度与作用时间对原生质体的形成有着较为明显的影响,溶菌酶浓度越高原生质体的形成率就越高;在一定浓度下,随着酶解时间的延长原生质的数量就会增大,酶解时间超过1 h,原生质体的形成率不再明显增加。然而,溶菌酶浓度和作用时间超出一定范围,原生质体的再生率都会明显下降,原因可能是由于酶解强度过大,细胞脱壁完全,原生质体易被酶破坏,从而失去再生模板,再生变得较为困难^[13]。

一般认为,革兰氏阴性菌对溶菌酶的敏感性没有革兰氏阳性菌高,所以在革兰氏阴性菌原生质体制备中需先用抗生素、甘氨酸、EDTA 等进行预处理,以提高其对溶菌酶的敏感度^[9-10]。有研究认为选择甘氨酸浓度为0.7%^[14]较为合适,经甘氨酸预处理后,革兰氏阴性菌对溶菌酶的敏感性明显提高,原生质体形成率随甘氨酸浓度增加而增大,但甘氨酸浓度超过4%,对细胞损伤严重,原生质体易自溶^[9]。本实验结果表明,培养基中加入一定量的甘氨酸,有助于原生质体的形成;但浓度过高,虽然原生质体数量增加,但再生率较低,甘氨酸的浓度以1%为宜,这与以往其他报道有所不同,或许与菌种各自特性差异有关。另外,甘氨酸处理时间不同,取代细菌胞壁肽聚糖中D-丙氨酸的量不同,从而阻碍胞壁合成程度不一,原生质体形成与再生能力不同^[9]。本实验表明,在溶菌酶作用之前,先用0.05 mol/L的EDTA预处理30 min后对原生质体的形成率提高有所帮助,但也有人认为在溶菌酶作用后,再用EDTA处理,效果更佳^[13]。至于作用机理还有待于进一步研究。原生质体的再生与再生培养基有着重要的关系^[12],本实验结果证实0.6 mol/L蔗糖比较适合原生质体的再生。

本实验认为选用第2代YS-9412-130菌,培养基中加入10 mg/mL的甘氨酸,培养16 h后的菌液制备原生质体,酶解前将菌体置于0.05 mol/L的

EDTA溶液中预处理30 min,30℃;再用10 mg/mL溶菌酶液酶解60 min,原生质体的形成率可达90%以上;在原生质体再生培养基中,以0.6 mol/L蔗糖作为稳定剂,有利于原生质体的再生。

参考文献:

- [1] 张尚德,陈林,张德纯. 保加利亚乳杆菌原生质体的制备与回复研究[J]. 中国微生物学杂志,2004,16(2):73-74.
- [2] 倪孟祥,刘娜,顾觉奇,等. 柱晶白霉素产生菌的原生质体制备、再生和诱变[J]. 中国药科大学学报,2003,32(6):462-467.
- [3] 谭周进,肖启明,肖克宇,等. 原生质体融合技术在微生物菌种选育中的应用[J]. 生物技术,2003,13(1):35-36.
- [4] 陈玉岭,景建洲. 链霉菌种间原生质体融合的研究[J]. 西北大学学报(自然科学版),1995,25(5):517-520.
- [5] 孙 蕾,王跃军,张云波,等. 一株产低温碱性蛋白酶嗜冷海洋细菌YS-9412-130的分离和培养条件研究[J]. 海洋水产研究,2000,21(4):1-5.
- [6] 王跃军,孙 蕾,张云波,等. 产低温碱性蛋白酶嗜冷海洋细菌YS-9412-130的复合诱变原生质体选育[J]. 海洋水产研究,2000,21(4):20-25.
- [7] 陈玉岭,张芳琳,景建洲,等. 天活原生质体融合技术选育苏云金杆菌新菌株[J]. 西北大学学报,1998,28(2):147-150.
- [8] 赵 华,赵树欣,张 维,等. 运用紫外天活原生质体融合技术选育高产胞外凝乳酶的研究[J]. 酿酒科技,1996(5):13-16.
- [9] 张增艳,穆国俊,吕泽融,等. 苏云金杆菌原生质体制备的新方法[J]. 微生物学研究与应用,1992(4):34-36.
- [10] 余健秀,李建华,鹿 义. 芽孢杆菌原生质体融合技术[J]. 生物技术,2000,10(3):45-47.
- [11] 王兴龙,刘玉斌,冯米坤. 多抗性巴氏杆菌X73与P109株原生质体融合株的构建[J]. 中国兽医学报,1994,14(2):177-180.
- [12] 崔宗强,罗信昌. 羊肚菌原生质体制备与再生[J]. 菌物系统,2003,22(3):498-501.
- [13] 李祥俊,安志东,朱 非. 林肯链霉菌双亲天活原生质体融合的研究[J]. 氨基酸和生物资源,2001,23(4):24-27.
- [14] 邹 坚. 应用原生质体诱变技术筛选并产酶高产菌株的研究[J]. 现代农药,2003,2(2):27-27.
- [15] 任 涛,黄青云,欧守抒. 大肠杆菌(*Nar^r*,*Clp^r*),*O₆*(*Clp^r*,*Nar^r*)原生质体制备和再生的研究[J]. 华南农业大学学报,1998,19(1):49-53.

Protoplasts formation and regeneration in marine low temperature protease producing strain YS-9412-130

ZHANG Xiu^{1,2}, SUN Mi¹, WANG Qing-yin¹, LI Guo-bao³

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 3. Shanghai Fisheries University College of Food Science, Shanghai 200090, China)

Abstract: The effects of several factors on protoplast formation and regeneration of strain YS-9412-130 were studied such as strain generations, age, lysozyme concentration, enzymolysis time, the pretreatment by Gly or EDTA and osmotic stabilizer. The results showed that the protoplast formation rates of the first passage bacteria to the fifth passage ones were 86.9%, 70.3%, 66.8%, 63.4% and 60.2% respectively, and the protoplast regeneration rates were 10.5%, 18.6%, 17.9%, 18.2% and 17.8%. The bacteria obtained at their prophase, met anaphase and stabilization phase of logarithmic growth were prepared as protoplasts; the protoplast formation rates were 72.1%, 70.4% and 60.5% and regeneration rates were 13.4%, 18.9% and 10.4% respectively; the results also revealed that when enzymolysis on the bacteria by 2.5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL lysozyme for 60 min respectively; the protoplast formation rates were 40.6%, 70.8%, 81.8% and 95.6%, and the regeneration rates were 19.0%, 19.2%, 19.0% and 10.6% respectively. As the same way, when enzymolysis on the bacteria by 10 mg/mL lysozyme for 30 min, 60 min, 90 min and 120 min, the protoplast formation rates of the bacteria were 30.8%, 81.3%, 81.7% and 82.9%, and the regeneration rates were 19.2%, 19.3%, 16.9% and 11.2% respectively. Another experiment indicated that the strain cultured in media containing 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL and 40 mg/mL Gly, its protoplast formation rates were 81.0%, 81.1%, 90.3%, 90.8% and 90.6%, and regeneration rates were 19.1%, 19.0%, 19.3%, 12.0% and 9.0% respectively. It demonstrated that EDTA had good effects on protoplast formation, but affected protoplast regeneration when its action time beyond 30 min. Selecting 0.6 mol/L KCl, 0.3 mol/L KCl + 0.3 mol/L sucrose and 0.6 mol/L sucrose as osmotic stabilizer, the protoplast regeneration rates were 10.9%, 19.6% and 25.9% respectively. It was concluded that the second passage strain YS-9412-130 were cultured in culture media with 10 mg/mL Gly for 16 h, then the bacteria were pretreatment in 0.05 mol/L EDTA at 30 °C for 30 min before enzymolysis at 30 °C for 60 min by 10 mg/mL lysozyme, subsequently 0.6 mol/L sucrose was chosen as osmotic stabilizer. All conditions above were suitable for the protoplast formation and regeneration of strain YS-9412-130. These results and data would provide important parameters for the strain improvement of strain YS-9412-130 through the protoplast technology. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 106 - 111]

Key words: protoplast formation; protoplast regeneration; marine low temperature protease; strain YS-9412-130

Corresponding author: SUN Mi. E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn