低温微生物的冷适应机理及其应用

张玉秀,赵微忱,于 洋,李林峰
(中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院生物工程系,北京 100083)

摘要:低温微生物广泛分布于极地、冰川、永久冻土和深海等寒冷环境,其冷适应能力是多种机理共同作用的结果,包括酶的低温催化活性、低温下膜流动性的保持、冷休克蛋白、抗冻蛋白以及抗冻保护剂等。低温微生物主要应用于催化低温发酵、表达热不稳定蛋白质、生产抗冻保护剂和冬季治理污水等领域。

关键词:冷适应;嗜冷酶;耐冷菌;嗜冷菌
文章编号:1000-0933(2008)08-3921-06 **中图分类号**:Q939.9 **文献标识码**:A

Mechanism and applications of the cold-adapted microbes

ZHANG Yu-Xiu, ZHAO Wei-Chen, YU Yang, LI Lin-Feng
Department of Bioengineering, School of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining & Technology (Beijing), Beijing 100083, *China*

***Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(8): 3921 ~ 3926.**

Abstract: Psychrophilic microorganisms have successfully colonized all permanently cold environments from the deep sea to mountain and polar region. The evolved features, genotypic and/or phenotypic of the organisms make them surmount the negative effects of low temperatures and enable growth in these extreme environments. The mechanism of cold adaptation might cover fields of cold-adapted enzyme, maintenance of membrane fluidity, role of cold shock protein, cryoprotectant and antifreeze protein. The cold-adapted microbes and its products were utilized in a broad range of industrial, agricultural and medical processes based on the achievement of mechanism research.

Key Words: cold adaption; cold-adatped enzyme; psychrotoerants; psychrophilic

自 1840 年 Hooker 首次在冰海中发现了藻类、1887 年 Foster 报道了从鱼中分离得到的一种微生物可以在 0℃生长后,在极端环境中生存的低温微生物开始受到关注。目前,已经从两极、冰川、永久冻土等低温环境以及低温保存的食物中分离到众多低温微生物,包括细菌、真菌、古细菌[1]。根据 Morita 的标准,低温微生物被分为两类:可以在 3 ~5℃生长,最高生长温度在 20℃以上生长,最适生长温度可以大于 15℃的一类被称为耐冷微生物(psychrotoerants);可以在 0℃或 0℃以下生长,最适生长温度低于 15℃,最高生长温度不超过 20℃的一类微生物被称为嗜冷微生物(psychrophiles)。

1975 年,Morita 首次系统的报道了低温细菌,并分析了其生理特点,低温微生物可以在寒冷环境下生长,而人们所熟悉的嗜温微生物则在寒冷环境下表现为生长停止甚至死亡,原因是嗜温微生物在极端环境下酶活

基金项目:中国"863"高技术研究发展计划资助项目(2006AA10Z407、2006AA06Z355 和 2006AA100205)
收稿日期:2006-12-30; **修订日期**:2008-05-14
作者简介:张玉秀(1962 ~),女,陕西人,博士,教授,主要从事基因工程研究. E-mail: zhangyuxiu@cumtb.edu.cn
Foundation item: The project was financially supported by the National High Technology Planning Program of China (No. 2006AA10Z407, 2006AA06Z355 and 2006AA100205)
Received date: 2006-12-30; **Accepted date**: 2008-05-14
Biography: ZHANG Yu-Xiu, Ph. D., Professor, mainly engaged in genetic engineering. E-mail: zhangyuxiu@cumtb.edu.cn

力过低和蛋白质变性,表明低温微生物与嗜温微生物具有明显不同的生理机制。低温微生物在催化低温发酵过程和寒冷地区污水处理等领域具有潜在的应用价值[2]。对低温微生物耐冷性的研究,不仅可以揭示其冷适应机理,同时为低温微生物应用提供坚实的理论基础。近年来,对低温微生物冷适应机理及其应用的研究逐渐展开,其中包括嗜冷酶的基本结构特点与其低温活性的关系;膜系统的流动性保持的分子基础和脂肪酸的组成关系;冷休克蛋白和抗冻蛋白结构及功能研究等领域。本文主要综述了低温微生物的冷适应机理和应用。

1 低温微生物耐冷机理

早期对低温适应机理的研究多集中在嗜冷酶的分离和特点研究,但仅通过酶学研究低温微生物的机理有局限性,细胞膜在低温下流动性的保持以及低温下的新陈代谢也是低温适应性机理中非常重要的部分。胞内物质,包括胁迫蛋白、抗冻蛋白、小分子化合物等的研究,也证明了微生物的耐冷性更趋向于全细胞的适应,而不是单纯某类分子的特性改变。

1.1 嗜冷酶

从 20 世纪 90 年代起,嗜冷酶包括 RNA 聚合酶、核酸酶、α-淀粉酶被相继从丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、以及交替假单胞菌属菌(*Alteromonas haloplanctis*)中分离并分析[3]。嗜冷酶在低温下具有较高的催化效率 $kcat/K$[4],从结构方面讲,嗜冷酶的低温下活性主要得益于其分子组成特点引起的空间高柔韧性结构(flexibility),或者说是由其热不稳定性引起——酶分子的高柔韧性结构使酶具有较高的底物结合能力从而降低 Km[5],但高柔韧性结构同样也引起酶的耐热性降低[6]。在对嗜温鸟氨酸氨基甲酰转移酶(Ornithine carbamoyl transferase)以及其嗜冷突变型的研究中发现,30℃时突变型的 $kcat$ 值为出发酶的 6 倍,Km 值降低 20%,而 75℃下的半衰期从 10h 缩短到了 1min[7],证明了酶结构不同可能同时造成催化效率的提高和热稳定性的降低。

嗜冷、嗜温和嗜热微生物中的谷氨酰脂脱氢酶(glutamate dehydrogenase)、β-内酰胺酶(β-lactamases)和 α-淀粉酶(α-amylase)等酶的氨基酸组成表明,嗜冷酶具有较少的脯氨酸和精氨酸,较低的脯氨酸与赖氨酸比,较少的二硫键[8]。嗜冷、嗜温和嗜热 3 种 DNA 连接酶的三维模型分析显示,其表面疏水残基含量依次降低(22%、18%、17%),亲水残基含量依次升高(69%、75%、77%),中性氨基酸含量依次降低(21%、18%、14%);同时,低温连接酶活性位点的表面可接触中性残基含量(20%)也高于其他两种连接酶(18%、9%),表明嗜冷酶氨基酸残基组成对酶的活性、柔韧性和耐热性具有综合影响[9]。另外,其他研究表明减少盐桥、离子键、芳香环相互作用,减弱结构域的相互作用、增加表面环状结构(surface loops)也可以提高酶的柔韧性并降低其耐热性[5, 8]。

利用定点突变等手段改造中温、嗜热酶,使其具有类似于低温的特性证明了氨基酸组成对酶的低温活性具有重要影响,也为生产广适应温度蛋白酶奠定了基础。Tindbaek 等人通过定点改造,切除了中温枯草杆菌蛋白酶(savinase,EC 3.4.21.62)活性中心中的 12 个氨基酸残基(LSLGSPSPSATL),并插入人工合成的低温枯草杆菌蛋白酶 S39 的一段同源高柔韧性性区域(MSLGSSGESSLI),获得一种新的蛋白酶 H5。该酶在低温下 H5 具有更高的催化活性与分子柔韧性,而其热稳定性也高于低温枯草杆菌蛋白酶 S39,而其最适催化温度及 pH 值与出发酶 savinase 相同[10]。

氨基酸组成与结构对比并不能完全解释嗜冷酶的机制。如从南极分离出一株 *Arthrobacter* 属低温菌,其 β-半乳糖苷酶在 18℃具有最大活性,在 0℃仍有 50% 活性,与另一种 40℃最大活性的 β-半乳糖苷酶比较,除了脯氨酸残基比较少外,上述嗜冷酶的其他特点都未发现,进一步研究表明,该酶在低温下是一种四聚体结构,在 25℃的时候分解为无活性的单体[11],说明该酶的低耐热性与其四级结构有关。

1.2 膜流动性的保持

细胞的膜系统是包裹细胞以及形成细胞器的重要结构,也是众多生化反应的场所和物质运输通道。温度降低对膜产生的影响首先表现为膜流动性的降低,最终丧失功能。因此,保持低温下膜的流动性也是微生物

耐冷机理中的重要组成部分,而膜的流动性主要由脂肪酸组成决定[12]。环境温度降低时,枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)通过脂肪酸脱氢酶合成 Δ5 不饱和脂肪酸[13],但 Δ5 脱氢酶缺失的突变株无法像正常野生菌一样在15℃下存活[14]。基因芯片(DNA macroarrays)分析表明,当枯草杆菌的生长温度从 37℃降到 18℃时,50 种左右的 mRNA 表达提高,同时 50 种左右的 mRNA 表达减弱。许多被抑制的基因是参与氨基酸与核酸合成的,表现为微生物在低温下生长速度减慢。而冷诱导表达最强的是一个编码脂肪酸脱氢酶的基因,它将饱和脂肪酸转化为不饱和脂肪酸,从而加强膜的流动性[15]。在对顺反异构酶 *cti* 缺失的低温丁香假单胞菌(*P. syringae*)突变株的研究中也发现,当培养温度从正常的 5℃上升到 28℃后,突变株无法和野生菌株一样降低膜的流动性以适应高温,原因就是突变株无法合成反式脂肪酸,从而说明反式脂肪酸可以降低膜的流动性,而顺式脂肪酸则相反[16]。所以,增加不饱和脂肪酸、支链脂肪酸、顺式脂肪酸的含量有利于维持低温下膜的流动性。

Li 等人在利用气液相色谱(gas-liquid chromatography)分析了分别在 10℃和 30℃培养的单核细胞增多性李氏菌(*Listeria monocytogenes*)后,发现其在 10℃生长时短链脂肪酸与长链脂肪酸含量比、支链脂肪酸与直链脂肪酸含量比分别较 30℃生长时提高了 52% 和 57%[17],说明短链脂肪酸与支链脂肪酸也有利于提高膜的流动性和微生物冷适应能力。异亮氨酸和缬氨酸可以降解为 α 甲基丁酰辅酶 A 和异丁酰辅酶 A,二者是合成支链脂肪酸的前体[15],在缺少异亮氨酸的不完全培养基上,枯草杆菌(*B. subtilis*)无法合成支链脂肪酸,并明显对温度变化敏感[18];另外,环境温度下降后,降解支链氨基酸的酶在转录水平上也有提高。这反映了温度降低情况下,微生物利用异亮氨酸和缬氨酸降解产物合成支链脂肪酸,是其适应低温的一种策略。

对低温微生物膜稳定性的研究也显示,某些低温菌中,非极性类胡萝卜素合成减少[19],推测极性胡萝卜素可以固定膜,为了平衡由脂肪酸加强表达而增强的膜流动性,极性类胡萝卜素相对非极性类胡萝卜素的含量也相应提高以平衡脂肪酸的影响[20]。

1.3　冷休克(cold-shock)

当环境温度突然降低,微生物会相应诱导表达多种蛋白,被称为或冷休克蛋白(cold-shock-proteins,Csps),这些蛋白广泛分布于原核、真核生物中,主要参与细胞内的转录、翻译、蛋白折叠以及调控膜的流动性[21]。

对冷休克蛋白的研究最早始于大肠杆菌,大肠杆菌在环境温度从 37℃下降到 10℃后 4 ~ 5h,双向凝胶电泳表明有多种加强表达的蛋白,即 Csps。首先被发现的冷休克蛋白是大肠杆菌(*E. coli*)CspA,当温度下降 1 ~ 1.5h 后,CspA 的浓度达到 100μmol/L,随后还在大肠杆菌中发现了从 CspB 到 CspI 的多种冷休克蛋白。大肠杆菌 9 种 Csp 中,只有 CspA、CspB 和 CspG 是冷诱导的,其他几种 Csp 有的是组成型表达(CspE、CspC),或者在细胞生长的固定阶段表达并受到葡萄糖缺乏的诱导(CspD)[22]。由于 CspA 可以阻止 mRNA 形成抗 RNA 酶的二级结构,其功能被推测为促进 mRNA 水解;CspC 和 CspE 的功能被推测为调控两种胁迫蛋白的表达;而 CspD 的表达主要在细胞对数生长后期的细胞核区域发现,据此推测其主要功能为结合复制叉并阻止 DNA 复制,引起细胞死亡;另外,CspB 和 CspG 是 CspA 的同系物,但其功能除了作为 RNA 伴侣外,可能还起着 DNA 伴侣的作用,协助低温时 RNA 的转录和 DNA 的复制[23]

目前在低温微生物中发现的冷休克蛋白具有类似于其在中温菌中的作用,在利用 *cspA* 探针对南极发现的多种低温菌(*Pseudomonas* sp.,*Planococcus* sp., *Micrococcus* sp. 等)基因组进行的 Sorthern 杂交表明,有多种低温菌中的冷休克蛋白是 CspA 的同系物[23]。两种冷休克蛋白基因 *cspA* 和 *cspG* 也在低温海洋希瓦氏属细菌(*Shewanella violacea*)中被克隆,这两种基因编码的蛋白都由 70 个氨基酸残基组成,它们与大肠杆菌的冷休克蛋白 Csp A 和 Csp G 的氨基酸组成一致性分别达到了 62% 和 67%,推测这两种蛋白起到 mRNA 分子伴侣的作用。并且发现,冷休克蛋白的一个亚属——冷适应蛋白(cold-acclimation proteins,Caps)只在低温微生物中表达,在长时间处于低温环境时,低温微生物会过量表达 Caps。低温微生物和中温微生物冷休克蛋白的另一个区别在于,低温微生物中,持家蛋白(housekeeping proteins)在低温下的表达不受抑制,其表达量与最适生长

温度下相当[24]。

1.4 抗冻蛋白及低温防护剂

抗冻蛋白(antifreeze proteins,Afps)首先在极地鱼类中被发现,具有改变晶体结构、阻止胞外细小冰晶重结晶,以及通过热滞效应(thermal hysteresis 降低水的冰点但不改变其熔点)使生物可以在低温下生存的功能[25]。对抗冻蛋白的研究多集中于鱼类、昆虫以及植物中,但自从 1993 年首次从南极低温菌 *Moraxella sp.* 中发现 Afps 以来,已有 20 余项关于微生物抗冻蛋白的报道。在微生物中发现的 Afps 大部分热滞能力较差,属于分泌型表达,其活性远低于动物细胞中的 Afps(可以通过热滞效应使冰点降低 2 ~ 5℃)。但 2005 年 Gilbert 等人报道从南极菌 *Marinomonas primoryensis* 中发现一个特例 Afps,该蛋白具有 2℃热滞能力,分布在胞质内,并且依赖 Ca^{2+}[26],这个发现对了解微生物抗冻蛋白具有重要意义。

在对野生北极细菌 *Pseudomonas putida* 及其低温敏感突变株的对比研究中发现,突变株的 Afps 表达量只有野生型的 10% ~19%,而在向突变株悬浮培养液中加入纯化的 Afps 后,可以部分恢复其抗冻能力,充分说明了抗冻蛋白对该菌低温适应能力的重要性[27]。与鱼类等生物一样,微生物表达的抗冻蛋白主要通过热滞效应保护细胞免受低温造成的损伤,最近 Muryoi 等人首次从 *P. putida* 中克隆并表达了抗冻蛋白 *afp*A,通过对其蛋白结构分析发现,它与细菌冰核蛋白 Inps 在结构上有相似性,推测 *afp*A 有可能具有一定阻止小冰晶重结晶的能力[28]。

低温下微生物合成的一些化合物也对微生物的低温适应具有重要意义,包括海藻糖、胞外多糖、糖胶甜菜碱、甘露醇等,被称为低温防护剂。这些化合物起到防止结晶、浓缩营养物质以及防止酶冷变性等作用——海藻糖被推测可以防止蛋白质变性凝聚,普遍认为胞外多糖改变了微生物的生理生化指标,帮助微生物有效保持细胞膜流动性并保存水分,协助浓缩营养物质,并保护酶免受冷变性[29]。

2 低温微生物的应用

低温微生物与中温微生物在生理生化方面存在显著差异——主要集中在酶、蛋白质的特性,目前对微生物的应用多是中温微生物,这就为进一步开拓微生物应用空间提供了可能。

嗜冷酶最明显的特征就是低温下的催化能力以及热不稳定性,这两点也是嗜冷酶的应用重点。Ohgiya 等人将嗜冷酶分为 3 类:第一类酶和同类嗜温酶有相似活性但是热稳定性差于嗜温酶;第二类在低温下活性强但是热稳定性更差;第三类是低温下活性强且热稳定性也较强,但大多数嗜冷酶属于第一、二类,第三类极少,目前投入应用的嗜冷酶主要属于第二类。

嗜冷酶在较低温度下具有比嗜温酶更强的活性,利用这一特点,众多必须在低温条件下进行的催化反应可以更高效的进行,并避免了一些高温下不必要的化学反应的发生——如在食品工业中保持食品风味要求生产温度不能过高。同时,较低的催化温度为工业生产应用节约了大量能源。例如,α 淀粉酶是第一个被成功结晶的嗜冷酶[30],其最适催化温度比中温 α 淀粉酶低 30℃,在 4℃和 25℃下,其催化效率 *kcat/Km* 分别为嗜温酶的 6.6、3.7 倍,目前低温 α 淀粉酶被广泛应用于洗涤剂生产、食品发酵、布料脱浆、纸张漂白等领域。其他一些嗜冷酶的应用领域包括了环境保护、药物于饲料生产、化学分析等。另外,嗜冷酶的热不稳定性也具有相当的应用价值,因为当催化反应结束后,只需提高温度就可以让酶失活,而不必借助于添加化学药品除去酶。

目前对低温微生物的应用正处于起步阶段,并多为嗜冷酶的利用,但其他方面的研究也在逐步进展中,如膳食不饱和脂肪酸、作为防冻保护剂的抗冻蛋白、食品发酵中的低温酵母等[31]。在环境治理领域,利用低温微生物可以在冬季等低温环境下保持较高代谢活性的优势,一些环境治理的新方法也得以实现,如固定化培养耐冷隐球酵母(*Cryptococcus* sp.)和红酵母(*Rhodotorula* sp.)降解工业苯酚等。另外,古细菌作为一种新兴的生物资源,广泛分布于高寒地带,而开发和利用古细菌资源——包括其表达的酶、蛋白质、脂类等物质——已经成为近年研究的热点[32]。

从冰冻淤泥中分离得到 7 株耐冷细菌,水解酪蛋白法检测显示其中两株能够表达低温蛋白酶,经 16S-

rDNA 鉴定二者分别为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)及希瓦氏(*Shewanella* sp.)菌属,外源基因在假单胞菌中的表达可以提高低温蛋白酶的活性,这些研究结果为低温酶的生产和工业化应用奠定了基础(待发表)。

3　展望

冰川、永久冻土、深海等极端环境占据了地球表面的大部分区域,而人们对作为这些极端环境中的主要物种——低温微生物的研究却是近几十年才兴起的。通过从分子、生化、代谢等角度的研究,低温微生物特殊的耐冷机理也逐渐清楚,为利用低温微生物资源提供了指导,如通过最近公布的 4 种低温微生物基因组全序列的分析,通过基因功能分析,人们可以更深入的了解嗜冷酶以及休克蛋白在低温微生物中的作用[33]。

应用低温微生物的计划也在相关领域展开,如系统开发南极低温微生物的嗜冷酶类项目(EU Fourth Framework research program),该项目计划开发 α 淀粉酶,纤维素酶,β 半乳糖苷酶,脂肪酶,蛋白酶,木聚糖酶等南极嗜冷酶类的应用,专业讲述嗜冷酶应用的书籍也已经出版发行[3],Ferrer 等人从南极分离到低温细菌 *Oleispira antarctica*,并从中获得了两种在 4 ~ 12℃具有较强蛋白复性能力的分子伴侣 Cpn60 和 Cpn10,随后在大肠杆菌中表达这两种分子伴侣,获得冷适应的大肠杆菌基因工程菌,并在寒冷地区污染治理领域取得了突破[33]。

在探索低温微生物适应机理和低温微生物的利用上仍存在很多问题,如嗜冷酶的低温催化机制,冷休克蛋白的功能,以及抗冻保护剂等生物小分子的具体功能还需进一步研究,揭示其冷适应机制,可以为开发新型生物制剂、解决环境污染和生态保护等实际应用提供理论依据。另外,低温微生物的应用工艺也不成熟,如在细菌和真菌表达系统中获得高效表达的耐低温古细菌中蛋白等。相信随着研究工作的深入,低温微生物的机理会进一步被阐明,而其应用前景也会更加广阔。

References:

[1] Cavicchioli R, Thomas T. Encylopedia of microbiology, Extremophiles. 2nd ed. San Diego: Academic Press Inc, 2000. 317 -337.

[2] Cavicchioli R, Siddiqui K S, Andrews D, *et al*. Low-temperature extremophiles and their applications. Curr. Opin. Biotechnol., 2002, 13 (3): 253 -261.

[3] Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, *et al*. Cold-adapted enzymes:from fundamentals to biotechnology. Trends Biotechnol., 2000, 18 (3):103 -107.

[4] Hoyoux A, Jennes I, Dubois P, *et al*. Cold-adapted beta-galactosidase from the Antarctic psychrophile Pseudoalteromonas haloplanktis. Appl. Environ. Microbiol., 2001, 67 (4): 1529 -1535.

[5] Fields P A. Review: protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. Comp Biochem Physiol, 2001, 129 (2-3): 417 -431.

[6] Roovers M, Sanchez R, Legrain C, *et al*. Experimental evolution on enzyme temperature activity profile: selection in vivo and characterization of low-temperature-adapted mutants of Pyrococcus furiosus ornithine carbamoyltransferase. J. Bacteriol., 2001, 183 (3): 1101 -1105.

[7] D'Amico S, Claverie P, Collins T, *et al*. Molecular basis of cold adaptation. London B. Biol. Sci., 2002, 357 (1423): 917 -925.

[8] Georlette D, Damien B, Blaise V, *et al*. Structural and functional adaptations to extreme temperatures in psychrophilic, mesophilic, and thermophilic DNA Ligases. J. Biol. Chem., 2003, 278 (39): 37015 -37023.

[9] Tindbaek N, Svendsen A, Oestergaard P R, *et al*. Engineering a substrate-specific cold-adapted subtilisin. Protein Eng. Des. Sel., 2004, 17 (2): 149 -156.

[10] Coker J A, Sheridan P P, Loveland-Curtze J, *et al*. Biochemical characterization of a β-galactosidase with a low temperature optimum obtained from an Antarctic arthrobacter isolate. J. Bacteriol., 2003, 185 (18): 5473 -5482.

[11] D'Amico S, Collins T, Marx J, *et al*. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. EMBO reports, 2006, 7 (4): 385 -389.

[12] Hunger K, Beckering C L, Marahiel M A. Genetic evidence for the temperature-sensing ability of the membrane domain of the Bacillus subtilis histidine kinase DesK. FEMS Microbiol. Lett., 2004, 230(1): 41 -50.

[13] Weber M H W, Klein W, Müller L, *et al*. Role of the Bacillus subtilis fatty acid desaturase in membrane adaptationduring cold shock. Mol. Microbiol., 2001, 39 (5): 1321 -1329.

[14] Kaan T, Homuth G, Mader U, *et al*. Genome-wide transcriptional profiling of the Bacillus subtilis cold-shock response. Microbiol., 2004, 148 (11): 3441 -3455.

[15] Kiran M D, Prakash J S S, Annapoorni S, *et al*. Psychrophilic Pseudomonas syringae requires trans-monounsaturated fatty acid for growth at higher temperature. Extremophiles, 2004, 8 (5): 401 −410.

[16] Li J, Chikindas M L, Ludescher R D. Temperature-and surfactant-induced membrane modifications that alter Listeria monocytogenes nisin sensitivity by different mechanisms. Appl. Environ. Microbiol., 2002, 68 (12): 5904 −5910.

[17] Klein W, Weber M H W, Marahiel M A. Cold shock response of Bacillus subtilis: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. J. Bacteriol., 1999, 181 (17): 5341 −5349.

[18] Varcamonti M, Arsenijevic S, Martirani L, *et al*. Expression of the heat shock gene clpL of Streptococcus thermophilus is induced by both heat and cold shock. Microb. Cell Fact, 2006, 5: 1 −6.

[19] Chattopadhyay M K, Jagannadham M V. Maintenance of membrane fluidity in Antarctic bacteria. Polar Biol., 2001, 24: 386 −388.

[20] Ulusu N N, Tezcan E F. Cold shock proteins. Tr. J. Med. Sci., 2001, 31:283 −290.

[21] Ermolenko D N, Makhatadze G I. Bacterial cold-shock proteins. Cell. Mol. Life Sci., 2002, 59 (11): 1902 −1913.

[22] Yamanaka K, Zheng W, Crooke E, *et al*. CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in Escherichia coli. Mol. Microbiol., 2001, 39 (6): 1572 −1584.

[23] Fujii S, Nakasone K, Horikoshi K. Cloning of two cold shock genes, cspA and cspG, from the deep-sea psychrophilic bacterium Shewanella violacea strain DSS12. FEMS Microbiol. Lett., 1999, 178 (1): 123 −128.

[24] Gilbert J A, Hill P J, Dodd C E, *et al*. Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. Microbiology, 2004, 150 (1): 171 −180.

[25] Gilbert J A, Davies P L. A hyperactive, Ca^{2+}-dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium. FEMS Microbiol. Lett., 2005, 245 (1): 67 −72.

[26] Kawahara H, Li J, Griffith M, *et al*. Relationship between antifreeze protein and freezing resistance in Pseudomonas putida GR12-2. Curr. Microbiol., 2001, 43 (5): 365 −370.

[27] Muryoi N, Sato M, Kaneko S, *et al*. Cloning and expression of afpA, a gene encoding an antifreeze protein from the arctic plant growth-promoting Rhizobacterium Pseudomonas putida GR12-2. J. Bacteriol., 2004, 186 (17): 5661 −5671.

[28] Mancuso N C A, Guezennec J, Bowman J P. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents. Mar Biotechnol., 2005, 7 (4): 253 −271.

[29] Aghajari N, Feller G, Gerday C, *et al*. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of alpha-amylase from the antarctic psychrophile Alteromonas haloplanctis A23. Protein Sci., 1996, 5 (10): 2128 −2129.

[30] Sheridan P P, Nicholas P, Coombs J M, *et al*. Approaches for deciphering the structural basis of low temperature enzyme activity. Biochim. Biophys. Acta., 2000, 1543 (2): 417 −433.

[31] Cavicchioli R. Cold-adapted archaea. Nat. Rev. Microbiol., 2006, 4 (5): 331 −343.

[32] Podar M, Louise A. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. Curr. Opin. Biotechnol., 2006, 17 (3): 250 −255.

[33] Ferrer M, Chernikova T N, Yakimov M M, *et al*. Chaperonins govern growth of Escherichia coli at low temperatures. Nat. Biotechnol., 2003, 21 (11): 1266 −1267.