

南极细菌胞外多糖溶液冻结特性的差示扫描量热研究

何培青^{1,2}, 李 江^{1,2}, 王 昉³, 顾敏芬³, 沈继红^{1,2}

(1. 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室, 山东 青岛 266061; 2. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061;
3. 南京师范大学分析测试中心, 江苏 南京 210097)

摘要: 采用差示扫描量热法, 测定几种南极细菌胞外多糖 (简称, EPSs) 溶液的结晶、熔融、焓转变以及水合性质等冻结特性, 分析了 EPSs 的浓度和分子量与其抗冻活性的关系。结果表明, 在溶液冻结过程中, 仅 0.25% 的 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 EPSs (分子量, 6.2×10^4 Da) 可抑制冰核形成, 溶液冻结温度较纯水的降低 (1.07 ± 0.62) °C; 溶液的冻结焓降低说明冰核生长变缓, 冰晶形成细小, 0.125% 的 *Shewanella* sp. 5-1-11-4 EPSs (分子量, 1.2×10^3 Da) 和 *Moritella* sp. 2-5-10-1 EPSs (分子量, 3.0×10^3 Da) 冻结焓分别较纯水的降低 17.15% 和 29.13%, S-15-13 EPSs 在 0.125% ~ 0.5% 的范围内可降低冻结焓, 0.125% 时冻结焓较纯水的低 30%, 其不冻水含量为 (0.292 ± 0.05) g/g。在冰晶熔化过程中, 几种 EPSs 均可降低溶液熔融温度和熔融焓, 促进冰晶熔化, 使冰晶细小; 4.0% 的 5-1-11-4 EPSs、2-5-10-1 EPSs 和 0.5% S-15-13 EPSs 的熔融温度较纯水的分别降低 (2.70 ± 0.15) °C、(2.30 ± 0.39) °C 和 (4.66 ± 0.42) °C。研究结果阐明 EPSs 可以通过改变菌体周围水的冻结特性, 以抵御冰晶对微生物的损伤, 大分子量 EPSs 对冰晶的抑制作用强于低分子量的。

关键词: 南极细菌; 胞外多糖; 冻结特性; 差示扫描量热

文章编号: 1000-0933(2009)11-5766-07 中图分类号: TQ223.16 文献标识码: A

Freezing properties of Antarctic bacterial exopolysaccharides solutions by differential scanning calorimetry

HE Pei-Qing^{1,2}, LI Jiang^{1,2}, WANG Fang³, GU Min-Fen³, SHEN Ji-Hong^{1,2}

1. Key Laboratory of Marine Bioactive Substances, SOA, Qingdao 266061, China

2. First Institute of Oceanography, SOA Qingdao 266061, China

3. Analysis and Testing Center, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(11): 5766 ~ 5772.

Abstract: The freezing, melting, enthalpy change and hydration properties of Antarctic bacterial exopolysaccharides (EPSs) solutions have been investigated by differential scanning calorimetry, and the possible relations between concentration, molecular weight and antifreezing activities of exopolysaccharides have also been analyzed. Experimental results showed that, during the course of freezing, only *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 EPSs (molecular weight, 6.2×10^4 Da) at 0.25% could inhibit nucleation of ice, and depress the freezing temperature by (1.07 ± 0.62) °C. Reduction of freezing enthalpies meant the inhibited growth of ice nuclei and reduced size of crystallites. As compared with pure water, *Shewanella* sp. 5-1-11-4 EPSs (molecular weight, 1.2×10^3 Da) and *Moritella* sp. 2-5-10-1 EPSs (molecular weight, 3.0×10^3 Da) at 0.125% could reduce freezing enthalpies by 17.15% and 29.13%, respectively. S-15-13 EPSs ranged between 0.125%—0.5% could reduce freezing enthalpies, EPSs at 0.125% could reduce freezing enthalpy by 30%, and its non-freezing water was (0.292 ± 0.05) g/g. During the course of freezing, all the EPSs reduced the melting temperature and melting enthalpies, thereby enhanced the ice melting and reduced the size of crystallites. As compared with pure water, EPSs of 5-1-11-4 and 2-5-10-1 at 4.0%, EPSs of S-15-13 at 0.5% reduced the melting temperatures by

基金项目: 国家高新技术研究发展计划项目(2007AA091905); 国家自然科学基金资助项目(40706053); 中国极地科学战略研究基金项目; 基本科研业务费专用资助项目(2007T11)

收稿日期: 2009-04-08; 修订日期: 2009-09-01

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hepeiing@126.com

(2.70 ± 0.15) $^{\circ}\text{C}$, (2.30 ± 0.39) $^{\circ}\text{C}$ and (4.66 ± 0.42) $^{\circ}\text{C}$, respectively. The results of this study suggested that, EPSs could change the freezing properties of ambient water to defense bacteria from the harm of ice. The anti-crystallites effect of EPSs was stronger with a higher molecular weight.

Key Words: Antarctic bacteria; exopolysaccharides; freezing properties; differential scanning calorimetry

南北极微生物(微藻、细菌和真菌)可分泌产生大量的胞外多糖(Exopolysaccharides,简称 EPSs),EPSs 广泛分布于微生物生存的海冰、冰水界面和海冰通道中^[1~3]。南北极海冰细菌 EPSs 与常温海洋细菌的化学组成相似,多为杂多糖,主要由戊糖、己糖、氨基糖、糖醛酸等组成,单糖组成无种属的特异性。南北极海冰细菌 EPSs 分子量较常温海洋细菌的高 5~50 倍,且富含树胶醛糖和木糖,糖醛酸羧基基团、氨基化合物、硫酸盐和羟基基团等,这些特性使其具有独特的多聚体三级结构,可能与海冰细菌适应极地的极端环境密切相关^[4,5]。

南北极海冰晶体在生物体细胞外形成时,会导致游离水和渗透压的强烈变化,破坏细胞膜;冰晶还可直接侵入细胞,破坏其完整性^[6]。据报道,低温可促进南极细菌 EPSs 的合成与积累^[7,8]。盐度和 pH 等的大幅度变化以及冷冻-复融对南极细菌 EPSs 的粘性和流变特性影响不大,说明 EPSs 对环境胁迫具有缓冲作用^[9,10]。Krembs 等^[6]观察发现,EPSs 的硅藻可占据大于其体积的海冰空隙,因而使细胞和叶绿体具有完整性,而硅藻周围空隙少或者缺少空隙,冰晶就可以侵入细胞和叶绿体,使其丧失完整性。Selbmann 等^[11]从南极分离获得的真菌 *Phoma herbarum*,可产生分子量为 7.4×10^6 Da 的葡聚糖,该多糖具有保护菌体免受重复冻融伤害的作用。实验室从南极细菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 获得分子量为 6.2×10^6 Da,由(1, 2)-a-D-Man 组成主链、并在 6 位上有分支的甘露聚糖,菌体对反复冻融的耐受能力与其分泌的甘露聚糖直接相关;该 EPSs 可能通过降低溶液的熔融温度以抵御冰晶伤害^[12]。EPSs 是极地微生物抵御低温胁迫的第一道屏障,目前,国内外学者仅采用显微观察^[6]和冷冻-复融培养^[12]等方法初步阐明 EPSs 对冰晶形成的抑制作用,因此有必要深入探讨其作用途径及规律。

差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)是一种热分析技术,可定量分析溶液发生结晶、熔化等转变过程中的转变温度以及放热和吸热反应热等,已广泛应用于低温生物学领域^[13]。Liu 和 Cowman 采用调制式 DSC 比较了不同浓度、不同分子量的透明质酸水溶液的结晶温度、熔融温度和转变焓,从热力学角度揭示透明质酸对冰核形成和冰晶生长的抑制作用^[14]。南北极细菌 EPSs 的分子量、功能基团和三级结构与常温细菌的不同^[4,5],其独特的 EPSs 结构特征可能与菌体抵御冰晶伤害密切相关。目前,国内外对极地细菌 EPSs 对水溶液冻结特性的影响尚无系统研究。本研究采用差示扫描量热技术,测定几种南极细菌 EPSs 溶液的结晶、熔融、焓转变以及水合性质等冻结特性,分析 EPSs 的浓度和分子量与其抗冻活性的关系及规律,以期进一步揭示 EPSs 在极地微生物适应海冰低温环境中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

实验室保存菌种,于 2002~2003 年第 19 次中国南极科学考察采集的海冰和海泥样品中分离获得。

1.2 产 EPSs 南极细菌的筛选

采用 Zobell 2216E 固体培养基(蛋白胨 0.5%,酵母粉 0.1%,琼脂糖 1.7%,陈海水 100ml, pH7.0),根据细菌菌落粘性的大小,对 200 多株南极细菌进行了筛选。进一步结合王源等^[15]的显微镜检测以及 Freeman 等^[16]对细菌 EPSs 进行染色的方法,筛选高产 EPSs 的菌株。

1.3 南极细菌的培养与 EPSs 的制备

将菌种 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13, *Moritella* sp. 2-5-10-1 和 *Shewanella* sp. 5-1-11-4 分别接种于 Zobell 2216E 液体培养基,于 5~6 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72h。发酵上清液经乙醇沉淀和 Seveage 法除蛋白后,再经 DEAE-Sephadex 离子交换层析和 Sephadex 凝胶层析进行分离纯化,选择 EPSs 主组分,合并其峰位洗脱液样品,透析后浓缩冻

干获得纯品。采用紫外分光光度法和高效液相色谱法,确定其纯度^[17]。实验用时,将 EPSs 以双蒸水配制成 0.125%、0.25%、0.5%、1.0%、2.0% 和 4.0% (质量分数)。

1.4 EPSs 分子量的测定

将 *Moritella* sp. 2-5-10-1 和 *Shewanella* sp. 5-1-11-4 EPSs 样品溶于 2.84% 的 Na₂SO₄ 中,经高效凝胶渗透色谱仪 (HPGPC) 测定分子量。分析条件:TSK-GELG2000PW, 300mm × 7.5mm ID 色谱柱;流动相 0.1mol/L Na₂SO₄ 溶液,流速 1.0ml/min;柱温 60℃;进样量 2.0μl;示差折光检测器检测^[18]。

1.5 差示扫描量热仪测定

差示扫描量热仪为 Diamond DSC (美国 Perkin-Elmer 公司)。温度标定采用钢的熔融转变的外推起始温度 156.60℃ 和双蒸水的熔融转变的外推起始温度 0℃,进行两点标定;热焓标定采用双蒸水的熔融焓 (333.88kJ/kg) 标定。标定升温速率为 10℃/min。样品冲洗气体为高纯度氦气 (纯度 > 99.999%)。冷却方式为液氮制冷,样品冲洗气体为高纯度氦气 (纯度 > 99.999%)。为避免炉块结霜,加样时用高纯度氮气冲洗炉块。样品皿为 PE 标准液体铝皿,样品量为 2.0 ~ 3.0 mg,精确到 ±0.10 mg。

实验中,以 10℃/min 的速率使样品在 25 ~ -25℃、-25 ~ 5℃ 的范围内降温 and 升温,分别得到出现结晶放热峰和熔化吸热峰的热流扫描曲线。吹气速度为 20 ~ 30ml/min,保护气速率为 60 ~ 70ml/min。

1.6 数据分析

如图 1 所示,冻结温度 T_f 为放热峰 (向下) 下降沿斜率最大点和基线交点对应的温度,称为外推起始温度 (Onset)。熔融温度 T_m 为吸热峰 (向上) 上升沿斜率最大点和基线交点对应的温度。溶液中不冻水含量的计算公式如下^[19]:

$$\text{纯水在不同温度下的冻结焓的经验公式 } \Delta H (T_f) = -334 - 2.05 \times (T_f - 273) \quad (1);$$

溶液中不冻水含量的计算公式:

$$\alpha = 1 - \frac{\Delta H (T_f)_{\text{DSC}}}{\Delta H (T_f)} \cdot (1 - w) \quad (2)$$

其中, α 为溶液中不冻水的含量 (g/g); w 为表示溶液的质量浓度; T_f 为样品在降温过程中的冻结温度 (℃); $\Delta H (T_f)_{\text{DSC}}$ 为 DSC 测得的溶液在温度 T_f 下的冻结焓 (J/g); $\Delta H (T_f)$ 为方程 (1) 确定的纯水在温度 T_f 下的冻结焓 (J/g)。每组实验至少重复 3 次,并进行标准偏差分析。

2 结果

2.1 高产 EPSs 的南极菌株的获得

根据细菌菌落的粘性大小,从 200 多株南极细菌中初步获得 30 多株高产 EPSs 细菌,并对细菌 EPSs 染色加以验证。选择其中的 3 株,根据 16S rDNA PCR 扩增及测序,鉴定并命名为 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13、*Moritella* sp. 2-5-10-1 和 *Shewanella* sp. 5-1-11-4,并进行进一步研究。

2.2 *Moritella* sp. 2-5-10-1 和 *Shewanella* sp. 5-1-11-4 EPSs 分子量的测定结果

已报道, *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 EPSs 分子量为 6.2×10^6 Da^[17]。经高效凝胶仪 (GPC) 测定, *Moritella* sp. 2-5-10-1 EPSs 的分子量为 3.0×10^3 Da, *Shewanella* sp. 5-1-11-4 EPSs 分子量为 1.2×10^3 Da。

2.3 EPSs 的差示量热扫描曲线

溶液降温时,要先过冷到某一温度才开始冻结,测试的 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13、*Moritella* sp. 2-5-10-1 和 *Shewanella* sp. 5-1-11-4 EPSs 在 0.125% ~ 4.0% 的浓度范围内,冰核形成后立即快速生长;同结晶过程相比,溶液的熔融过程则在较宽的温度范围内完成。图 1 描述了 4.0% 的 *Moritella* sp. 2-5-10-1 EPSs 溶液的差示量热扫描曲线。

2.4 EPSs 对溶液冻结温度 T_f 的影响

几种 EPSs 对溶液 T_f 的影响如图 2 所示。纯水的冻结温度为 -23.15℃, 0.125% ~ 4.0% 的 5-1-11-4 EPSs 和 2-5-10-1 EPSs 溶液的 T_f 均高于纯水的,说明该浓度范围的这两种 EPSs 促进了冰核的产生。S-15-13EPSs

(分子量 6.2×10^4 Da) 在 0.125% 时, 溶液 T_f 与纯水的差别不大; 0.25% 时, 溶液 T_f 较纯水的降低 (1.07 ± 0.62) °C; 0.5% ~ 4.0% 时, 溶液 T_f 较纯水的提高, 且随浓度的增加迅速提高, 4.0% 时, 溶液 T_f 较纯水的提高 (8.48 ± 0.80) °C。结果说明, 不同种类和不同浓度的 EPSs, 对溶液 T_f 的影响呈不同特性, 高分子量的 S-15-13 EPSs 在较低浓度时, 可抑制溶液冰核产生。

2.5 EPSs 对溶液熔融温度 T_m 的影响

EPSs 对溶液熔融温度 T_m 的影响如图 3 所示。纯水的熔融温度 T_m 为 0 °C, 5-1-11-4 EPSs 和 2-5-10-1 EPSs 的溶液随着 EPSs 浓度的提高 T_m 持续降低, 浓度为 4.0% 时, T_m 较纯水的分别降低 (2.70 ± 0.15) °C 和 (2.30 ± 0.39) °C。与 5-1-11-4 和 2-5-10-1 EPSs 相比, S-15-13 EPSs 的 T_m 明显低于纯水的, 在 0.125% ~ 0.5% 的范围内, T_m 随浓度增加而降低, 0.5% 时达到最低值, T_m 较纯水的降低 (4.66 ± 0.42) °C。结果说明, 不同浓度、不同种类 EPSs 均可降低溶液的 T_m , 从而促进溶液的熔融, 高分子量 EPSs 对冰晶熔融作用最强。

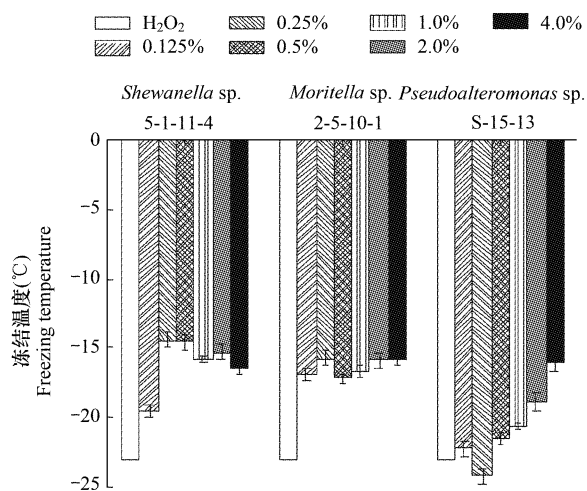


图 2 不同浓度的几种南极细菌 EPSs 对溶液冻结温度的影响

Fig. 2 Effect of several Antarctic bacterial EPSs at different concentrations on freezing temperature of solutions

2.6 EPSs 对溶液冻结焓的影响

当溶质对溶液结晶过程抑制时, 表现为溶液冻结焓降低。5-1-11-4 EPSs 和 2-5-10-1 EPSs 溶液在 0.125% 时, 冻结焓较纯水的分别降低 17.15% 和 29.13%; S-15-13 EPSs 在 0.125% ~ 4.0% 浓度范围内, 冻结焓均低于纯水的, 0.125% 时较纯水的降低了 30%, 如图 4 所示。结果说明, 高分子量 EPSs 对溶液结晶过程的抑制作用高于低分子量的, 低浓度 EPSs 对溶液结晶过程的抑制作用高于高浓度的。

2.7 EPSs 对熔融焓的影响

熔融曲线的热焓转变可以准确地反映 EPSs 溶液中水的状态, 围绕于糖链界面层的水可导致冰晶形成细小, 表现为熔融焓降低。不同浓度、不同分子量的 EPSs 溶液的熔融焓均较纯水的低, 但并无明显的规律性。

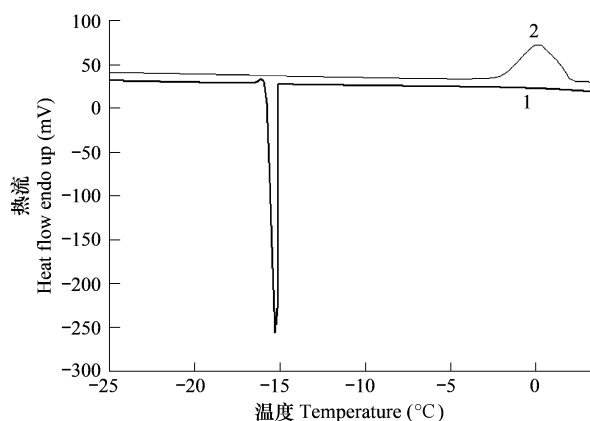


图 1 EPSs 溶液的差示量热扫描曲线

Fig. 1 Cooling and heating curves for EPSs solutions

以 4.0% *Moritella* sp. 2-5-10-1 的 EPSs 溶液为例, 1 为结晶曲线, 2 为熔融曲线 The sample was EPSs of *Moritella* sp. 2-5-10-1, dissolved in water at a concentration of 4.0%. 1. The transition temperature and enthalpy are shown for the cooling curve. 2. The transition temperature and enthalpy are shown for the heating curve

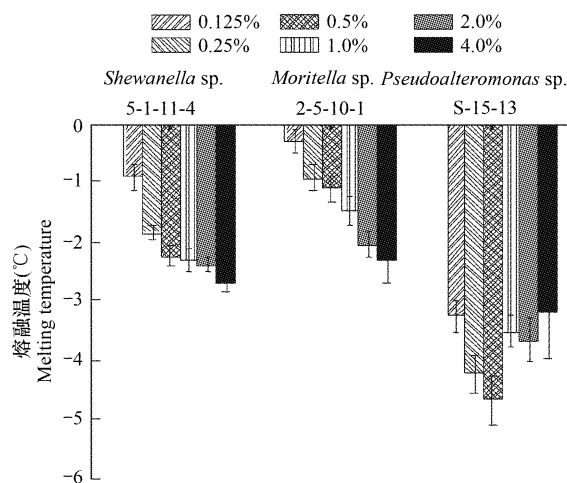


图 3 不同浓度的几种南极细菌 EPSs 对溶液熔融温度的影响

Fig. 3 Effect of several Antarctic bacterial EPSs at different concentrations on melting temperature of solutions

与 5-1-11-4 EPSs 和 2-5-10-1 EPSs 相比, S-15-13 EPSs 在 1.0% ~ 4.0% 范围内, 熔融焓减少的程度最明显, 如图 5 所示。

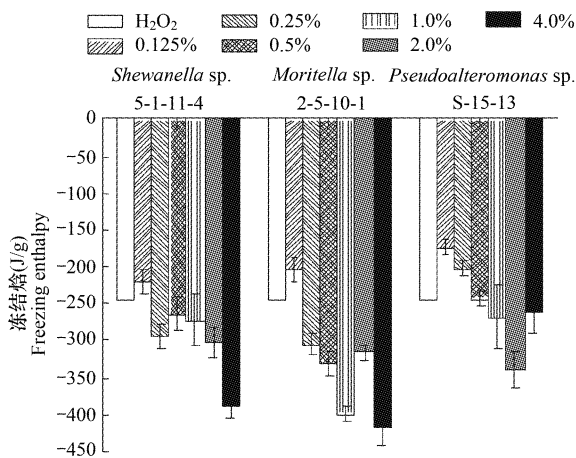


图 4 不同浓度的几种南极细菌 EPSs 对溶液冻结焓的影响

Fig. 4 Effect of several Antarctic bacterial EPSs at different concentrations on freezing enthalpy of solutions

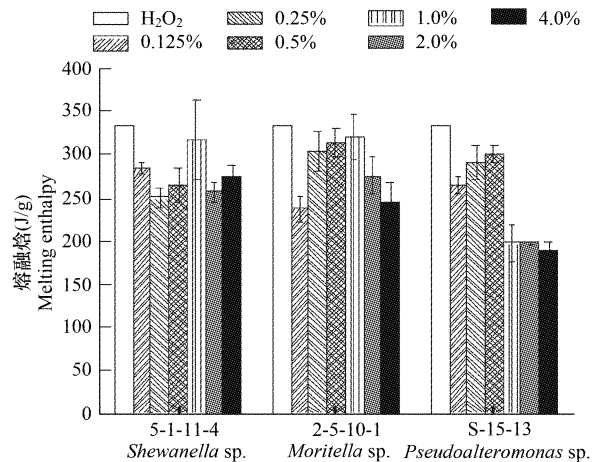


图 5 不同浓度的几种南极细菌 EPSs 对溶液熔融焓的影响

Fig. 5 Effect of several Antarctic bacterial EPSs at different concentrations on melting enthalpy of solutions

2.8 EPSs 对溶液水合性质的影响

当溶质与部分水之间以氢键的形式键合, 会发生水合作用, 减少了游离水的含量并增加了溶液的粘性, 使冰核生长变缓, 冰晶形成细小。不冻水含量的高低反映了溶质结合水的能力强弱, 根据不冻水的计算公式可以得出, 5-1-11-4EPSs 和 2-5-10-1EPSs 溶液在 0.125% 时, 不冻水的含量分别为 $(0.095 \pm 0.07) \text{ g/g}$ 和 $(0.173 \pm 0.10) \text{ g/g}$ 。0.125% 的 S-15-13EPSs 不冻水含量为 $(0.292 \pm 0.05) \text{ g/g}$, 其与水的结合能力最强, 如表 1 所示。

表 1 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 EPSs 对溶液不冻水含量的影响

Fig. 1 Effect of *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 EPSs on non-freezing water of solution

浓度 Concentration (%)	0	0.125	0.25	0.5
不冻水 Non-freezing water (g/g)	0	0.292 ± 0.05	0.172 ± 0.01	0.015 ± 0.04

3 讨论

目前, 国外学者采用显微直接观察^[6]和冷冻-复融培养^[12]等方法初步阐明 EPSs 对极地微生物的低温保护作用。本研究通过比较不同分子量和不同浓度的几种南极细菌 EPSs 对溶液冻结过程、冰晶融化过程的影响及规律, 从热力学角度, 定量分析其与微生物低温适应性的关系。

(1) 3 种 EPSs 溶液在冻结过程中, 冻结温度和冻结焓随 EPSs 种类和浓度呈不同的变化规律。0.25% 的 S-15-13 EPSs 可降低冻结温度, 抑制冰核的产生。低浓度范围时, 5-1-11-4 EPSs、2-5-10-1 EPSs 和 S-15-13 EPSs 的冻结焓均低于纯水的, 说明低浓度的 EPSs 可使溶液的冰核生长缓慢, 冰晶形成细小。0.125% 的 S-15-13 EPSs 的不冻水含量为 $(0.292 \pm 0.05) \text{ g/g}$, 高于常见醇类低温保护剂乙二醇和丙三醇在 5.0% 时的不冻水含量 (分别为 0.173 g/g 和 0.150 g/g)^[19], 说明该糖的羟基官能团与水之间以氢键的形式键合, 使得溶液变得粘稠, 水溶液中受扩散制约的冰晶生长过程变缓, 玻璃化形成趋势增强。结果进一步证明, 有 EPSs 包被的极地微生物对反复冻融的胁迫具有抗性^[7,8], 与菌体分泌的 EPSs 改变了溶液的冻结特性, 并影响冰核的产生和冰晶的生长密切相关。

(2) 与冻结过程相比, 各种 EPSs 对冰晶熔融过程的作用更明显。不同浓度的各种 EPSs 均可降低溶液熔

融温度和熔融焓,促进冰晶熔化、使冰晶细小。此结果与实验室采用冰盐混合法测得的 S-15-13 EPSs 可降低溶液熔融温度的结果一致^[8]。由于许多 EPSs 并不具有热延迟^[20],其与抗冻蛋白的作用机理不同,可能是通过物理吸附冰核和自身的羟基基团增加冰核表面的亲水性,以改变冰核的结构和电荷,进而抑制冰核的形成和生长。

(3) S-15-13 EPSs 为(1, 2)-a-D-Man 组成主链、并在 6 位上有分支的甘露聚糖(6.2×10^6 Da)^[17]。与其它两种低分子量的 EPSs 相比, S-15-13 EPSs 对熔融温度、冻结焓和熔融焓的降低程度更明显。Liu 和 Cowman 的研究也表明,高分子量的透明质酸(2.1×10^6 Da)较低分子量的对冰核的抑制作用稳定、强,并显著降低熔融温度等的特性^[14]。高聚合度的 EPSs 可使糖链复杂的缠结和作用于分子间的缔合机会增加,通过 EPSs 网状结构影响临界冰核的产生和冰晶的生长^[5,6,14]。海冰细菌 EPSs 分子量多高于常温海洋细菌的,除了具有一定的水合特性,通过围绕于糖链的界面层水改变溶液的热动力学特性,抑制冰核形成和生长,可能是 EPSs 在海冰细菌低温适应中的另一重要机制。

References:

- [1] Flemming H C, Wingender J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - part I: structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*, 2001, 43: 1—8.
- [2] Junge K, Eicken H, Deming J W. Bacterial activity at 2°C to 20°C in Arctic wintertime sea ice. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 550—557.
- [3] Sun J. Transparent exopolymer particles (TEP) and aggregation web in marine environments. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(5): 1192—1197.
- [4] Mancuso Nichols 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; a review. *Marine Biology*, 2005, 7: 253—271.
- [5] Mancuso Nichols C A, Garon Lardiere S, Bowman J P, et al. Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microbial Ecology*, 2005, 49: 578—589.
- [6] Krembs C, Eicken H, Junge K, et al. High concentrations of exopolymeric substances in Arctic winter sea ice: implications for the polar ocean carbon cycle and cryoprotection of diatoms. *Deep-Sea Research*, 2002, 49: 2163—2181.
- [7] Mancuso Nichols C, Garon S, Bowman J P, et al. Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96: 1057—1066.
- [8] Li J, Chen K S, Lin X Z, et al. Production of extracellular polysaccharide and phylogenetic analysis of Antarctic bacterial *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13. *Chinese Journal of Polar Science*, 2006, 18(2): 130—136.
- [9] Krembs C, Engel A. Abundance and variability of microorganisms and transparent exopolymer particles across ice-water interface of melting first-year sea ice in the Laptev Sea (Arctic). *Marine Biology*, 2001, 138: 173—185.
- [10] Arias S, del Moral A, Ferrer M R, et al. Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles*, 2003, 7(3): 19—326.
- [11] Selbmann L, Onofri S, Fenice M, et al. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. *Research in Microbiology*, 2002, 153: 585—592.
- [12] Li J, He P Q, Chen K S, et al. Study on cryoprotection of exopolysaccharides from Antarctic psychrotroph *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13. *Advances in Marine Science*, 2006, 25(2): 215—219.
- [13] Hua Z Z, Ren H S. *Cryobiology and Cryomedicine Technology*. Beijing: Science Press, 1994.
- [14] Liu J, Cowman M K. Thermal analysis of semi-dilute hyaluronan solutions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2000, 59: 547—557.
- [15] Wang Y, Cong Y G, Liu J K, et al. Bacterial glycocalyx stain analyzed by light microscopical technique. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 1998, 21(4): 197—198.
- [16] Freeman D J. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 1989, 42: 872—876.
- [17] Li J, Song G Q, Chen K S, et al. Separation, purification and structure analysis of an extracellular polysaccharides from Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2008, 25: 1149—152.
- [18] Zhang W J. *Biochemistry Research and Technology Glycoconjugates*, 2nd Edition Hangzhou: Zhejiang University Press, 1999, 12—13.
- [19] Gao C, Zhou G Y, Xu Y, et al. Freezing properties of EG and glycerol aqueous solutions studied by DSC. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2004, 20(2): 123—128.

- [20] Yamashita Y, Kawahara H, Obata H. Identification of a novel anti-ice-nucleating polysaccharide from *Bacillus thuringiensis* YY529. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2002, 66(5): 948–954.

参考文献:

- [3] 孙军. 海洋中的凝集网与透明胞外聚合颗粒. *生态学报*, 2005, 25(5): 1192–1197.
- [8] 李江, 陈靠山, 林学政, 等. 南极细菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 产胞外多糖的研究及其分子鉴定. *极地研究*, 2006, 18(2): 130–136.
- [12] 李江, 何培青, 陈靠山, 等. 南极适冷菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 胞外多糖低温保护作用的研究. *海洋科学进展*, 2006, 25(2): 215–219.
- [13] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术. 北京: 科学出版社, 1994.
- [15] 王源, 丛延广, 刘俊康, 等. 细菌胞外糖染色显微镜检测技术. *中华医学检验杂志*. 1998, 21(4): 197–198.
- [17] 李江, 宋国强, 陈靠山, 等. 南极适冷菌 *Pseudoalteromonas* sp. S-15-13 胞外多糖的分离、纯化和结构分析. *高等学校化学学报*, 2008, 25: 1149–1152.
- [18] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术. 第二版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999, 12–13.
- [19] 高才, 周国燕, 胥义, 等. 乙二醇和丙三醇水溶液冻结特性的研究. *物理化学学报*, 2004, 20(2): 123–128.