

- 19 Birk, Y. Biochem. Biophys. Acta, 1961, 54: 378~381.
- 20 Birk, Y., Gertler, A. A. and Khalef, S. Biochem. Biophys. Acta, 1963, 67: 326~328.
- 21 Birk, Y., Gertler, A., Khalef, S. Biochem. J. 1963, 87: 281~284.
- 22 石彦国, 任莉编著. 大豆制品工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 1993, 10.
- 23 B. J. F. Hudson. J. Agric. Elscvicr Applied Science Publishers. London and New Yark, 1984.
- 24 C. Wu, John R. Whitaker. Food Chem, 1990, 38: 1523~1529.
- 25 M. F. Ho, X. Yin, et al. Protein Structure Function, 1983, 31: 337~343.
- 26 Y. Victor wu and David J. Sessa. J. Agric. Food Chem, 1994, 42: 2136~2138.
- 27 James Whisstock, et al. Proeins: Structure, Funtion, and Genetics I, 1996, 26: 288~303.
- 28 Bode W, Huber R. Eur. J. Biochem, 1992, 204: 433.
- 29 Teresa Altabella and Marten J. Plant Physiol, 1990, 93: 805~810.
- 30 Charles S Schick, et al. Proc. Natl. Aacad. Sci. USA, 1998, 11: 13465~13470, Biochemistry.
- 31 汤德良. 世界农业, World Agriculture, 1998, 7(231): 34~38.
- 32 Willy. J. Peumans, Els. J. M. Van. Damme. Plant Physiol, 1995, 109: 347~352.
- 33 王志斌, 李学勇, 郭三堆. 生物技术通报, 1998, 2.
- 34 Bode W, Huber R. Eur. J. Biochem, 1992, 204: 433~438.
- 35 Sangeets A. Godbole, et al. J. Sci Food Agric, 1994, 64: 87~93.
- 36 凌敏华, 祁海燕, 戚正武. 生物化学杂志, 1993, 25 (4): 367~374.
- 37 Dean D. Metcalfe, M. D. Food Technology, 1992, 136~139.
- 38 Masayuki Nakase, et al. J. Agric Food Chem, 1996, 44: 2624~2628.
- 39 孙建忠, 王克夷. 生物化学与生物物理学报, 1994, 24(6): 649~655.
- 40 彭建宗, 程双奇. 生物化学与生物物理学报, 1994, 6: 671~674.
- 41 Huge A. Sampson. Food Technology, 1992, 5: 141~144.
- 42 施炜星, 孙册. 生物化学与生物物理学报, 1993, 25 (1): 89~93.
- 43 周珉, 张民庆. 过敏性疾病的中医治疗. 上海中医药大学出版社, 1995.
- 44 施炜星, 孙册. 生物化学与生物物理学报, 1994, 26 (5): 565~569.
- 45 张与超, 张宏誉, 乔秉善. 现代生活与过敏病 - 变态反应疾病新知. 科学普及出版社, 1992.
- 46 周德义, 杨尔滨等. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27 (1): 61~5.
- 47 Steve L. Taylor. Food Technology, 1995, 5: 146~152.
- 48 Bernhisel-Broatbent J. et al. J. Aller. by Clin. Lmmunol, 1997, 84: 701~709.
- 49 Samuel B. Lehrer and Carol E. O'Neil. Food Technol-ogy, 1992, 1: 153~156.

## 冰核活性细菌的研究进展及其开发前景

高秀芝 陈庆森 天津商学院 生物技术与蛋白资源研究室 天津 300400

**摘要** 自1974年发现冰核活性细菌(ice nucleation active bacteria, 简称INA细菌)以来, 美国、日本等20多个国家分别对冰核活性细菌及冰核活性蛋白进行了多方面的研究, 并且逐步将其应用于农业、娱乐业、食品行业等领域。我国自1986年起开始了对冰核细菌的研究, 研究主要集中在种群分布、植物保护、人工降雪等方面。本文从冰核活性蛋白的分子生物学基础出发, 对冰核活性细菌的研究进展及开发应用前景进行论述。

**关键词** 冰核活性细菌 冰核活性蛋白 综述

**Abstract** A new research field about ice nucleation active (INA) bacteria and INA protein has been studied in American, Japan, Canada and other countries. Since INA bacteria was first detected by L. R. Maki in 1974. Bacterial ice nucleation has been applied to agriculture, food, medicine, entertainment and many other fields. Studies of INA bacteria in our country began in 1986. Our studies were mainly concerned about the species and their distributions on pattern, insect pests control by accelerating their frozen point with INA bacteria. This paper reported the progress on the studies of INA bacteria and INA protein. Its prospective development and application were also discussed.

**Key word** Ice Nucleation Active Bacteria INA Protein Summarize

1974年, L. R. Maki等<sup>[1]</sup>从腐烂的赤杨树叶中分离出 *Pseudomonas syringae* (丁香假单胞菌) 并发现该菌可在过冷却水(supercooled water, 低于0℃时仍呈液态的水)中诱导催化形成冰晶, 其后 S. E. Lindow<sup>[2]</sup>和 H. K. Kim等<sup>[3]</sup>又分别发现了 *Erwinia* (欧文氏菌属) 和 *Xanthomonas* (黄单胞菌属) 的一些种也具有诱导生冰晶的活性(ice nucleation active, INA)。自发

国家自然科学基金资助项目(39770580)

现冰核活性细菌以来, 美国、日本、加拿大等20多个国家对其种群分布、生理生化特性、成冰核活性的分子生物学基础<sup>[4~7]</sup>进行了较为广泛的研究, 并且先后将其应用于植物保护、人工降雪、食品冷冻保鲜<sup>[8~10]</sup>等领域。我国有关冰核活性细菌的研究是从1986年开始的, 研究进展与国际水平相比较有一定的距离, 目前有关冰核细菌的研究主要集中在种群分布、植物保

表 1 从不同冰核细菌中分离及测序的 Ina 基因

基因	菌种	分离	测序	大小 (kb)
InaA	<i>Erwinia ananas</i> IN-10	Arai et al.(1989) <sup>[15]</sup>	Abe et al.(1989) <sup>[16]</sup>	4.3
IceE	<i>Erwinia herbicola</i> M1	Orser et al.(1983) <sup>[17]</sup>	Warren and Corotto (1989) <sup>[18]</sup>	4.9
InaU	<i>E.uredovora</i> KUIN-3	Michigami et al.(1994) <sup>[19]</sup>	Michigami et al.(1994) <sup>[19]</sup>	3.4
InaW	<i>Pseudomonas fluorescens</i> MS1650	Corotto et al.(1986) <sup>[20]</sup>	Warren et al.(1986) <sup>[21]</sup>	7.5
InaZ	<i>P.syringae</i> S203	Orser et al.(1985) <sup>[22]</sup>	Green and Warren (1985) <sup>[23]</sup>	4.4
InaV	<i>Pseudomonas syringae</i>	Orser et al.(1985) <sup>[22]</sup>	D.Pridmore,pers.comm. <sup>[24]</sup>	-
inaX	<i>Xanthomonas campestris</i>	Zhao and Orser (1990) <sup>[25]</sup>	Zhao and Orser (1990) <sup>[25]</sup>	5.3

护、防灾减灾、人工降雪<sup>[11~14]</sup>等方面。我们实验室于1996年在国内率先提出并开展了冰核细菌在食品冷冻保鲜中作用的研究,1997年获得国家自然科学基金的资助,主持开展冰核细菌在食品冷冻保鲜中作用的研究,1997年获得国家自然科学基金资助,主持开展了“冰核蛋白冰晶特性与低温食品中风味营养物质的关系”的研究,已取得一定成果。并且有必要做更深一步的工作。

## 1 冰核活性细菌生物学及分子生物学特性的研究

### 1.1 冰核活性细菌简介

冰核活性细菌 (Ice Nucleation Active Bacteria, 简称 INA 细菌) 是一类能在 -2~-5℃ 条件下催化诱发植物体内水分产生冰核而引起霜冻的细菌。INA 细菌主要有三个属, 即假单孢菌属 (*Pseudomonas*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、黄单孢菌属 (*Xanthomonas*), 革兰氏染色均呈阴性, 其中假单孢菌属在肉汁胨平板上的菌落呈白色, 细菌杆状、极生鞭毛; 欧文氏菌属在肉汁胨平板上的菌落呈黄色, 杆状、周生鞭毛; 黄单孢菌属在肉汁胨平板上的菌落呈黄色, 杆状、极生鞭毛。

冰核活性细菌广泛附生于植物表面 (尤其是叶表面上)。正常情况下植物细胞中的游离水即使处于 -7~-8℃ 的低温下也不会结冰, 不产生过冷却现象; 但当冰核活性细菌存在时, 这种微生物作为最强的异质冰核因子, 诱发冰晶的生成而使植物组织中失去了过冷却作用, 进而引起对宿主植物组织的冻伤损害。INA 细菌的种类和数量受地理纬度、气候条件、植物种类及不同季节的影响和制约而在地球上存在着明显差异我国幅源辽阔基本涵盖冰核细菌的种类, 目前在我国发现的冰核细菌共有3个属和17个种或变种<sup>[14]</sup>, 其中, *P.marginlis*, *Pseudomonas* sp. (非荧光菌), *P.syringae* pvs.*E.herbicola* PVS, *E.amylovola* pvs.*Xanthomonas campestris* pv.*cerealis* 这六个种为国内外首次记录具有冰核活性的细菌, 而 *E.ananas* 和 *P.syringae* 为我国优势种类, 其中

*P.syringae* 具有较高的冰核活性, 并且为华北地区植物霜冻损害的主要致病冰核细菌。

### 1.2 冰核基因及冰核活性蛋白

对各种冰核活性细菌的研究表明, 它们的生冰核能力都是由单独编码的 INA 蛋白的基因所决定的。目前已经测序和公开出版的至少有 7 种 DNA 片段 (见表 1), 它们可将 Ina<sup>+</sup> 表型传给 *E.coli*, 其基因大小在 3.4~7.5Kb 之间。从 *Pseudomonas syringae* 预测的 InaZ 可表达一个含有 1200 个氨基酸的蛋白质, 其分子量约为 120kDa, 实际克隆到大肠杆菌中得到的冰核蛋白的分子量为 153kDa<sup>[23]</sup>。*E.ananas* 的 InaA 基因克隆后表达的冰核蛋白分子量为 130kDa<sup>[26]</sup>, *P.fluorescens* 的 InaW 克隆后表达的蛋白分子量为 180kDa<sup>[20]</sup>。各种具有 Ina<sup>+</sup> 表型的细菌冰核蛋白有相似的一级结构<sup>[27]</sup> (如图 1), 这种蛋白质由三个可区别的结构域组成, 一个是独立的 N-末端结构域 (占整个序列的 15%), 该结构域相对是疏水的; 一个是独立的 C-末端结构域 (占整个序列的 4%), 因该结构域富含碱性氨基酸残基而高度亲水; 中心高度重复的八肽由 Ala-Gly-Tyr-Gly-Ser-Thr-Leu-Thr 构成的结构域 (占 81%), 八肽中特异地富含 Ala, Gly, Thr 和 Ser, 因此具有显著的亲水性特性; 同时也观测到该重复区域, 在结构上表现出高度保真性, 是表现冰核活性最重要的模板。根据推测冰核活性蛋白的二级结构主要是由氢键连接而形成  $\beta$ -片层结构, 而更高级的结构尚不清楚。

1981 年 Yankofsky<sup>[28]</sup> 等用 Lindow<sup>[29]</sup> 改进的 Vali 小液滴冻结法<sup>[30]</sup> 定量定性测定冰核活性细菌的冰核活性, 将冰核活性细菌产生的冰核分为三种类型: 一型冰核 (Type I), 在 -5~-2℃ 有冰核活性, 这种类型冰核活性是最强的; 二型冰核 (Type II), 在 -7~-5℃ 有冰核活性, 它的冰核活性要弱于一型冰核; 三型冰核 (Type III), 在 -10~-7℃ 有活性, 冰核活性是最弱的。随着研究工作的进展, 1990 年 Turner<sup>[31]</sup> 更精确的划分了三种冰核的活性温度范围, 分别是 -4.4℃ 以上; -4.8~-5.7℃ 和 -7.6℃ 以下。冰核活性蛋白是一种膜结合蛋白, 表达形式一般有四种: 冰核活性蛋白

分布在天然冰核细菌的外膜上(如*P. syringae*);以无细胞冰核(cell-free ice nuclei, CFIN)的形式自发分泌到培养基中(如*E. herbicola*,但它产生的冰核蛋白主要分布在外膜上)<sup>[32]</sup>; InaZ基因经克隆后,在大肠杆菌表达有的结合在内膜上,有的则以包含体的形式存在。根据1991年Turner和Kozlloff的研究报道<sup>[7]</sup>,冰核活性细菌表达的强冰核活性物质,仅仅靠细菌的冰核蛋白的成分是不够的,实验发现了磷脂酰肌醇、磷脂为冰核蛋白复合物的主要成分,而且是必要成分。到90年代,Ina+基因的克隆工作有了一定的进展,实现了以包含体形式的*E. ananas* IN-10的InaA基因在*E. coli*中过量表达,并经2%TritonX-100提抽四次,以不溶性沉淀的形式得以纯化,分子量为130kDa,在-5℃以上保持冰核活性<sup>[26]</sup>,甚至在脂类等膜组分缺乏时还可有冰核活性,但其活性较差。而

*P. syringae* S203的InaZ基因在*E. coli*中过量表达的冰核活性蛋白,只有在-13.2℃才有冰核活性。基因工程的实验结果显示,以包含体的形式获取的冰核活性物质,其冰核活性得到了较好地保留。近期陈庆森等人<sup>[1]</sup>采用差速离心法分离出各种活性的冰核蛋白的组分,经过SDS-PAGE的电泳图谱结果表明,冰核蛋白质是以一种高保真的48肽的单体形式装配,而且冰核活性蛋白质的分子要在十二聚体以上的多聚体才表现出-3℃和-5℃的高冰核活性的特征。这一点与Watabe和Arai<sup>[26]</sup>所获得的结果相一致。

1.3 影响 INA 细菌冰核活性的因素

采用Lindow<sup>[29]</sup>改进的Vali小液滴冻结法<sup>[30]</sup>定量测定冰核活性细菌的冰核活性,发现影响它的冰核活性的主要因素有培养基的种类、培养温度、菌体浓度及菌种的保藏方法等几个因素。张耀东等对3种

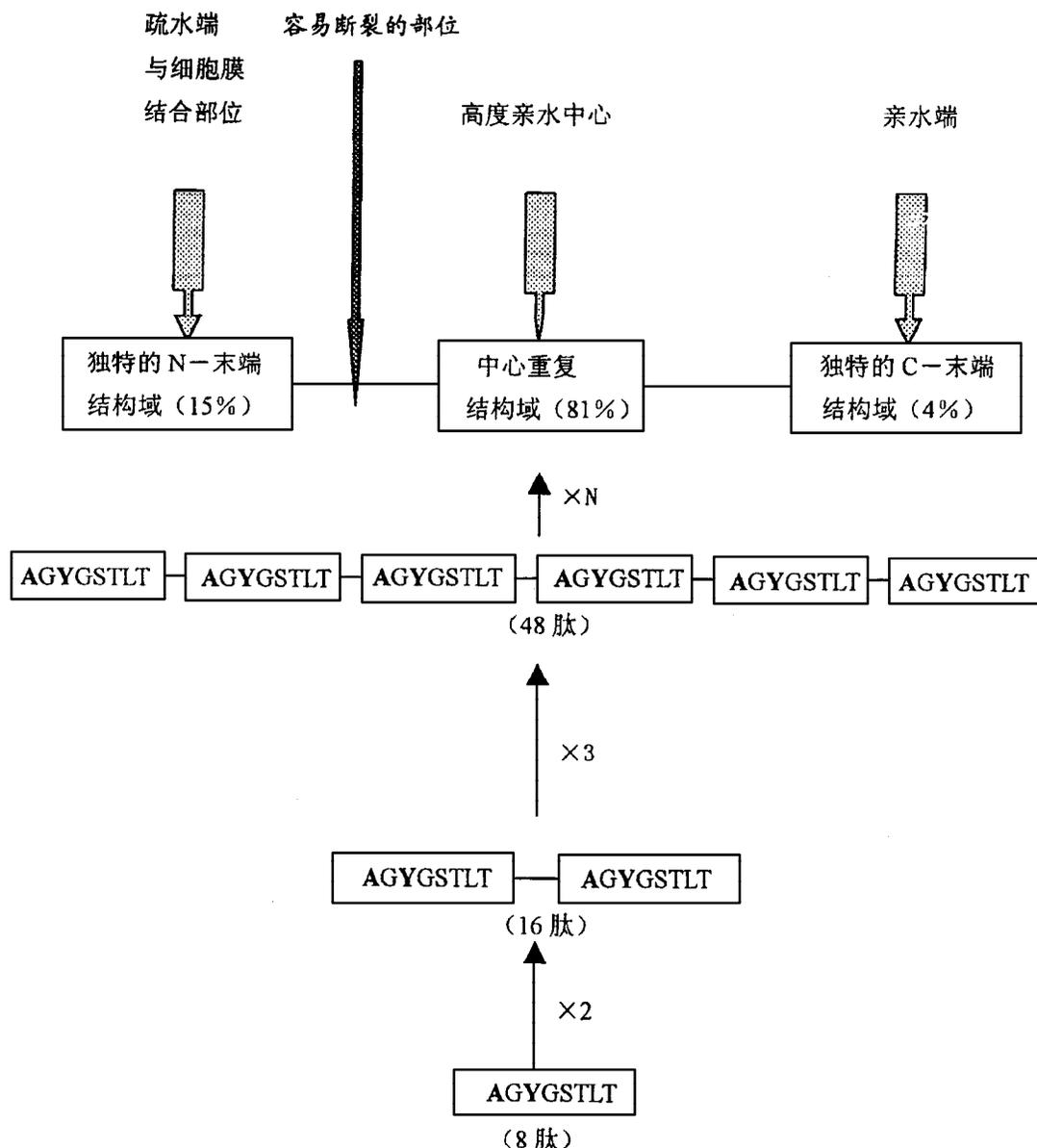


图1 典型的细菌冰核蛋白的一级结构示意图

冰核活性细菌进行培养条件的研究发现<sup>[33]</sup>,培养基的种类对菌体收获量和成冰活性影响最为显著,其中NAG、KB培养基适于培养冰核细菌,且成冰活性较高,可能是甘油或蔗糖组分能提高冰核活性,培养基的组成进一步细分为C、N、P、S的营养水平,其中一定程度的磷饥饿可诱导冰核的表达<sup>[34]</sup>;其次是培养温度,一般培养温度约为18℃~25℃,在-2℃~-7℃范围内测定冰核活性,温度越低冰核活性越强。我们实验室研究<sup>[2]</sup>也证实了*Erwinia herbicola*菌株经32℃培养后再转至15℃培养1h可诱导一型冰核活性大量产生,另外研究发现并证实,单温培养和双温培养低温均是细菌产生应激反应的必要条件。此外,一些外界条件也可以改变冰核活性细菌的冰核活性:丝裂霉素C(mitomycin C)、萘啶酮酸、适量的紫外线照射可诱导*Erwinia herbicola*形成大量无细胞冰核蛋白<sup>[35]</sup>。紫外线照射可破坏冰核细菌的冰核活性甚至完全杀死冰核细菌;陈庆森等人在研究抗菌素对冰核活性菌的生长和表达冰核活性蛋白的影响中发现,一些抗菌素如氯霉素、土霉素和链霉素等都能杀死菌体,但不能破坏冰核活性。适于冰核细菌菌种保存方法主要有真空冷冻干燥和灭菌水于-20℃冷冻保藏<sup>[36]</sup>,这两种方法对冰核细菌的存活力和冰核活性的影响较小,保存温度越高对菌株的冰核活性影响越大,如在37℃时保存24h的菌体,其冰核活性全部丧失。但如何诱导冰核细菌高水平表达强冰核活性蛋白(Type I),确定冰核细菌表达此完整蛋白复合物的条件和生理环境,尚需做进一步地研究工作。

## 2 冰核活性细菌及活性蛋白的应用技术开发现状

由于冰核活性细菌具有提高溶液过冷却温度的特点,与它相关的应用技术主要有仓储防虫、食品冷冻保鲜和加工、人工降雪、人工降雨、低温条件下的生物操作、基因报道等领域显现出越来越广阔的前景,因此是低温食品、低温生物学、分子生物学以及植物生理学等领域近期研究的热门课题。

### 2.1 冰核活性细菌与抗冻防霜

我国每年由于霜冻都会造成粮食、蔬菜及水果的严重损失,而冰核细菌正是诱发霜冻的关键因素。若是减少冰核细菌数量或者降低它的冰核活性,则可以减轻农作物冻伤损害。目前所采用的防止微生物引起植物霜冻的技术主要有以下两种方法。

#### 2.1.1 化学防治

选择适当的杀菌剂,喷洒在易受霜冻的植物表

面,使其能够降低冰核细菌的冰核活性,这样就可以减轻冰核细菌对植物的冻伤损害,达到抗冻防霜的目的。有关这方面的工作国内外都有报道,其中,中国农业科学院植保所筛选到了三种防霜药剂<sup>[12]</sup>,云南农业大学植物重点实验室也做了大量的田间防霜实验<sup>[37]</sup>。

#### 2.1.2 生物防治

利用化学防治的方法抗冻防霜,结果往往易污染环境,因此利用生物防治的方法目前逐渐为人们所采用。筛选冰核细菌的拮抗菌(包括从自然界中筛选和由冰核细菌诱变),在霜冻来临之前喷洒于植物表面,可以有效的抑制冰核细菌的繁衍,进而减轻了植物霜冻;利用基因工程的手段,去除冰核细菌的INA蛋白的启动子,消除它的冰核活性,将改装后的冰核细菌放回大自然,使其与自然冰核细菌竞争,以降低自然冰核细菌导致的霜冻损害,但生物防治的方法见效较慢。

### 2.2 冰核活性细菌与促冻杀虫

仓储害虫对粮食的危害极为严重,由此造成的损失也十分惊人。一般的防治方法主要是化学防治,但是它对人类及环境都有极大的危害。储粮害虫大多起源于热带及亚热带,耐寒性较差,但大都能越过寒冬存活下来,利用冰核细菌能提高生物过冷却点的能力,可以大大降低储粮害虫的耐寒能力,达到防治害虫的目的。目前这方面已有广泛报道<sup>[38~40]</sup>。

### 2.3 冰核活性细菌与食品行业

在食品行业中,冷冻是高质量保藏食品的方法这一。在常规的低温冷冻保藏食品时由于过冷现象的存在,使冻结过程因形成较大的冰晶,造成食品的细胞受损,进而在解冻时造成细胞内容物流失,破坏甚至杀死细胞,这样不仅使食品的风味下降,而且加速了食品解冻后腐败变质的速度。

冰核活性细菌具有在较高温度(-2℃~-5℃)下形成规则、细腻、微小异质冰晶的能力,原因是由于冰核活性细菌在细胞外膜上诱导形成了冰核蛋白,冰核细菌正是以这种重复序列作为模板,将水分子排列成细腻的冰核。将一定浓度的INA菌液喷于待冷冻食品上-2℃~-5℃保藏,这样使食品保鲜效果好于一般的冷藏方法,提高了食品冻结温度并降低了风味物质的损失。90年代,科学家们根据INA蛋白能提高冰点的特性将其应用于食品行业<sup>[41,42]</sup>,对食品进行冷冻浓缩,不仅降低了能耗,还提高了食品的冷冻浓缩质量。Lee Tung-Ching将*E. herbicola*分泌到培养基中的无

细胞冰核物质 (CFIN) 重新命名为胞外冰核因子 (extracellular ice nucleators ECIN)<sup>[43]</sup>, 并用ECIN用于多种食品处理, 如鲑鱼、鸡蛋、鸡蛋清蛋白、油、酱油等, 取得了很好的效果。冰核活性细菌用于食品业 (主要指的是食品的保藏保鲜、冷冻浓缩) 的三大优点如下: (1) 能大大降低能源的利用; (2) 改进了食品处理的内在质量; (3) 缩短了处理时间。我们实验室的刘剑红等人<sup>[3]</sup>将灭活的冰核活性细菌碎片应用于基围虾的虾体微冻保鲜技术上的研究表明, 保藏的虾体鲜度保存期最少可延长 20d, 虾体内的各种物质的变化明显减慢, 说明对基围虾的保鲜效果良好, 保鲜期至少可达到一个月之久。

#### 2.4 冰核活性细菌与喷雾制冰技术

人工降雪、降雨是喷雾制冰技术的主要应用, 同样利用的是冰核细菌提高溶液过冷却点, 使空气中水分以冰核细菌或其活性成分为异质冰核, 在浓度较低条件下冻结。早在1985年美国就已将其制成制雪剂 (SNOMAX Snow Inducer)<sup>[9]</sup>, 并且应用于实践, 效果很好。目前人工降雪在北美、南美、澳大利亚、新西兰、日本及欧洲都有使用, 我国中国农科院也已经研制成功。喷雾制冰技术不仅用于人工降雪, 它还可以用于天气调节、体育娱乐业以及北极的冰地构建等诸多方面。

#### 2.5 冰核活性细菌与报告基因

近 25 年来, “报告基因” (report genes) 的概念在分子生物学领域已广为人知, 用一个容易检测产物的基因去报道另一个不易测定的“目的基因”的存在。称前者为“报告基因”。冰核活性细菌由于具有容易测定冰核活性的显著特点, 可用来做报告基因, 称为冰核活性报告子 (ice nucleation activity reporters)。它有着不同于传统报告的特点, 即信号检测不再是酶的催化, 而是简单的物理现象 (水由液相转为固相) 的观察测定。1989年Lindgren等首次使用冰核基因作为报告基因<sup>[44]</sup>, 而今冰核基因重新构建后已成为多种基因的报告基因。

### 3 冰核活性细菌的应用前景展望

随着低温生物技术的发展, 冰核活性细菌越来越显现出广阔的应用前景。它除了应用在农业、食品业、体育娱乐业、分子生物学等领域, 还将在医药卫生业、昂贵生物制品的保藏等方面起着重要的作用, 而冰核活性细菌在食品行业的应用则显得尤为突出。研究发现, 要把冰核活性细菌真正应用到食品工业中, 必须

要解决高活力的冰核活性蛋白 (Robust INA protein) 的高水平表达和具 Ina<sup>+</sup>表型的细菌及活性成分对环境以及人类的安全性。目前国外采用克隆 INA 基因到大肠杆菌、酵母细胞中收获菌体或者分离 *E. herbicola* 的胞外冰核因子 (ECIN), 然后用于食品处理, 国内相关的报道甚少, 因为草生欧文氏菌、荧光假单胞菌等可以分泌冰核活性物质 (ECIN) 到胞外, 如果我们利用这些冰核活性细菌此特点, 诱导它们大量分泌 (ECIN), 再分离提取它。将提取物用于食品处理则可大大降低国内食品业能耗、提高食品冷冻浓缩质量。随着生物技术的发展, 冰核活性细菌将会在低温食品加工的新天地显示出巨大的威力。

#### 参考文献

- 1 Maki, R.L. Galyan, E.L. Chang-Chien, M.M. and Caldwell, D.R. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl Microbiol* 1974, 28: 456~459.
- 2 Lindow, S.E. Amy, D.C. and Upper, C.D. *Erwinia herbicola*: a bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn. *Phytopathology*, 1978, 68: 523~527.
- 3 Kim, H.K. Orser, C.S. Lindow, S.E. and Sands, D.C. *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* strains active in ice nucleation. *Plant Dis*, 1987, 71: 994~997.
- 4 Hiran, S.S. Nordheim, E.V. Arny, D.C. and Upper, C.D. Lognormal distribution of epiphytic bacterial populations on leaf surface. *Appl. Environ. Microbiol*, 1982, 44: 695~700.
- 5 Baca, S. Canfield, M.L. and Moore, L.W. Variability in ice nucleation strains of *Pseudomonas syringae* isolated from diseased woody plants in Pacific Northwest nurseries. *Plant Dis*. 1987, 71: 412~415.
- 6 Burke, M.J. and Lindow, S.E. Surface properties and size for the ice nucleation site in ice nucleation active bacteria: theoretical considerations. *Cryobiology*, 1990, 27: 80~84.
- 7 Kozloff, L.M. Turner, M.A. Arellano, F. and Lute, M. Phosphatinsitol, a phospholipid of ice nucleating bacteria. *J. Bacteriol*, 1991, 173(6), 2053~2060.
- 8 Baust J.G. and Rojas R.R. Review-Insect cold hardiness: Facts and fancy. *J. Insect Physiol*, 1985, 31: 755~759.
- 9 Ward, P.J. and DeMott, P.J. Preliminary experimental valuation of SNOMAX snow inducer *Pseudomonas syringae*, as an artificial ice nucleus for weather modification. *J. Weather Modification*, 1989, 21: 9~13.
- 10 Watanabe, M. Watanabe, J. Nakailama, N. and Arai, S. Heat-induced gel properties of freeze-concentrated egg white produced using bacterial ice nuclei. *Agric. Biol., Chem*, 1990, 54~: 2055~2059.

- 11 孙福在, 韦建福, 朱红. 我国冰核活性细菌的优势种类与研究. 生态学报, 1996, 16 (60): 618~622.
- 12 孙福在, 何维勋等. 药剂防止玉米霜冻害的初步研究. 黑龙江农业科学, 1991, 3: 24~29.
- 13 冯玉香. 细菌冰核活性提高印度谷螟过冷却点的研究. 昆虫学报, 1996, 39 (1), 53~57.
- 14 孙福在. 我国生物冰核研究进展. 中国农业科学, 1996, 29 (5), 62~67.
- 15 Arai, S. Abe, K. Watabe, S. Emori, Y., and Watanabe, M. Molecular cloning fo an ice nucleation gene *Erwinia ananas* and its expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett., 1989, 61: 53~56.
- 16 Abe, K. Watabe, S. Emori, Y. Watanabe, M., and Arai, S. An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*: Sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regiond required for ice nucleation activity. FEBS Lett. 1989, 258(2): 297~300.
- 17 Orser, C. Staskawicz, B. J. Loper, J. Panopoulos N. J. Dahlbeck, D., Lindow, S. E., and Schroth, M. N. Cloning of genes involoved in bacterial ice nucleation and fluorescent pigment siderophore production. 1983, Pages 353-361 in: Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction. A. Puhler, ed. Springer-Verlag, Berlin.
- 18 Warren, G. Cortto, L. The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola* *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae*. Gene, 1989, 85: 239~242.
- 19 Michigami, Y. watabe, S. Abe, K. Obata H., and Arai, S. Clonoing and sequencing of an ice nucleation active gene of *Ewinia uredovora*. Biosci. Biotechnol. Biochem, 1994, 58(4): 762~764.
- 20 Corotto, L. Wobler, P., and Warren, G. J. Ice nucleation activvity of *Pseudomonas fluorescens* Mutagenesis, complementation analysis and identification of agene product. EMBO j. 1986, 5: 231~236.
- 21 Warren, G. Corotto, L. and Wolber, P. Conserved repeats in diverged ice nucleation structual genes from two species of *Pseudomonas*. Nucl. Acids Res, 1986, 14: 8047~8060.
- 2 Orser, C. Staskawicz, B. J. Panopoulos, N. J. Dahlbeck, D., and Lindow, S. E. Cloning and expression of bacterial ice nucleation genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol, 1985, 164: 359~366.
- 23 Green, R. L., and Warren, G. Physical functional repetition in a bacterial ice nucleation gene. Nature, 1985, 317~645~648.
- 24 Lee, R. E. Warren, G. J. and Gusta, L. V. Biological ice nucleation and its applications, 1995, Pages 85~87 in : Identification and Analysis of ina Genes and Proteins. American Phytopathological Society; St. Paul; USA.
- 25 Zhao, J. and Orser, C. S. Conserved repetition in the ice nucleation gene *inaX* from *Xanthomonas campestris* P v. *translucentis*. Mol. Gen. Genet, 1990, 233: 163~166.
- 26 Watabe, S. Abe, K. Hirata, A., Emori, Y., Watanabe, M., and Arai, S. Large-scale production of an *Erwinia ananas* ice nucleation protein and evaluation of its ice nucleation activity. Biosci. Biotech. Biochem, 1993, 57 (4), 603~606.
- 27 Wolber, P., and Warren, G. Bacterial ice nucleation proteins. Trends. Biochem, Sci, 1989, 14: 179~182.
- 28 Yankofsky, S. A. Levin, Z., Bertold T and Sandlerman, N. Some basic characteristics of bacterial freexing nuclei, J. Appl. Meteorol, 1981, 20: 1013~1019.
- 29 Vali, G. Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous nucleation of supercooled liquids. J. Atmos, Sci, 1971, 28: 402~409.
- 30 Lindow, S. E. Population dynamics of epiphytic ice nucleation active bacteria on frost sensitive plants and frost control by means of antagonistic bacteria. 1982, Pages 395~416 in: Plant Cold Hardiness and Freezing Stress, Vol. 2. A. Sakai and P. H. Li, des. Academic Press. New York.
- 31 Turner, M. A. Arellano, F. and Kozloff, L. M. Three separate classes of BACTERIAL ICE NUCLEATION STRUCTURES. j. Bacteriol, 1990, 172(5): 6515~6527.
- 32 Phelps. P. Giddings, T. H. Prochoda, M., and Fall, R. Release of cell-free ice nuclei by *Erwinia herbicola*. J. Bacteriol. 1986, 167(2): 496~502.
- 33 张耀东, 王钦宏. 冰核活性细菌的培养条件研究. 郑州粮食学院学报, 1997, 18 (10): 8~12.
- 33 Fall, A. L. Fall, R. High-level expression of ice nuclei in *Erwinia herbicola* is induced by phosphate starvation and low temperature. Current Micro, 1998, 36: 370~376.
- 35 Warren. G. J. Bacterial ice nucleation: Molecular biology and applications. Genet. ENG. Rev. 1987, 5: 107~135.
- 36 朱红, 孙福在, 张永祥. 菌种保存方法对冰核细菌活性的影响. 微生物学通报, 1993, 20 (3): 137~139.
- 37 胡爱民, 张世光冰核活性细菌的研究进展. 云南农业大学学报, 1999, 14 (2): 219~222.
- 38 朱红. 冰核细菌对棉铃虫结冰温度影响的研究. 中国农业科学, 1994, 27 (6): 23~27.
- 39 孙福在, 朱红, 何礼远, 张永祥. 冰核细菌对光肩星天牛幼虫促冻杀虫研究. 林业科学研究, 1997, 10 (1): 96~99.
- 40 张耀东, 曹阳. 冰核活性细菌对储粮害虫耐冻性的影响. 郑州粮食学院学报, 1998, 19 (2): 1~5.
- 41 Watanabe, M., Arai, S. Bacterial ice nucleation activity and its applicaction to freeze concentration of fresh food for modification of their properties. J. Food Eng, 1994, 22: 453~473.
- 42 Li, J. K. Lee, T. C. Bacterial ice nucleation and its potential application in the food industry. Trends in Food Sci, 1995, 6: 259~265.
- 43 Li, M. and Lee, Tung-Ching. Effects of bacterial extrecellular ice nucleators on freezing of selected foods. J. Food Sci, 1998, 63: 375~381.
- 44 Lindgren, P. B. Frederick, R. Govindarajan, A. G. Panpoulos N. J. Staskawicz, B. J. and Lindow, S. E. An ice nucleation reporter gene system: Identification of inducible pathogenicity genes in *Pseudomonas syringa* pv. *Phaseolicola*. EMBO. J. 1989, 8: 2990~3001.