

超低温保藏去甲基万古霉素产生菌的研究

章名春 张恋英 王欣 罗小灵

王蕾 张俊玲 陈杰 刘云清

(华北制药厂抗生素研究所, 石家庄)

超低温液氮保藏(-150°C 或 -196°C)微生物菌种是 70 年代兴起的新技术^[1]。Meryman^[2]曾引证, 在 -130°C 时活细胞及组织不发生生化反应, 也就是说在 -130°C 以下无生命活动, 不发生遗传物质的变异。超低温冷冻保藏菌种效果好, 已引起广泛关注^[1-3]。关于抗生素产生菌液氮保藏的报道不多, McDanel^[4] 及 Macdonald^[5] 分别报道了液氮保藏假丝菌素产生菌及青霉素产生菌的突变株效果良好。

去甲基万古霉素产生菌——东方拟无枝菌酸菌 (*Amycolatopsis orientalis*) 不易保藏。该菌株与链霉菌属的菌株不同, 因其孢子壁薄, 无厚壁休眠孢子, 用砂土保藏法不能长期保藏, 即使采用冷冻干燥法保藏, 效果也不理想。

本文报道了东方拟无枝菌酸菌超低温液氮冷冻保藏的研究结果。

材料和方法

(一) 菌株

去甲基万古霉素产生菌——东方拟无枝菌酸菌 (*Amycolatopsis orientalis*)。

(二) 培养基

斜面培养基和分离培养基为蚕蛹粉-葡萄糖培养基。发酵培养基为黄豆粉-葡萄糖培养基, 250 ml 三角瓶装量 40 ml, 旋转式摇床, 转速 200 r/min。发酵罐容量为 5 吨。

(三) 存活率

采用平板活菌落计数法。

(四) 抗生素活性测定

用生物测定法, 测定菌为枯草杆菌 6633。检测培养基为 1 号培养基。

(五) 保护剂

用 10% 甘油或 10% 二甲基亚砜, 灭菌后使用(本试验为甘油保护剂)。

(六) 冻结与融化

将样品快速置液氮罐中冻结, 于气相 -150°C 或液相 -196°C 保藏。样品由液氮罐中取出后, 在 $30-35^{\circ}\text{C}$ 水浴中摇动, 使其融化。

结果和讨论

(一) 液氮保藏与砂土保藏法菌株成活率比较

液氮超低温冷冻虽然对菌株有冷冻损伤, 但从存活率看, 这种损伤是可恢复的。不论是气相还是液相保藏, 均得良好的保藏效果, 而砂土保藏则死亡率很高(表 1)。

(二) 保藏条件试验

1. 不同保藏材料液氮保藏效果: 孢子或菌丝短期超低温保藏时, 其存活率无差异。保藏 270 天后, 菌丝存活率略低于孢子的。这可能与菌丝对快速冻结的耐受力较低有关。如采用 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温曲线, 会提高其存活率(表 2)。

2. 孢子浓度对液氮保藏效果的影响: 液氮超低温冻结与其他保藏方法一样, 孢子浓度不同对冷冻损伤的反应也不同。孢子浓度在 $10^7/\text{ml}$ 以上, 保藏效果好, 存活率可达 100%。当其浓度在 $10^6/\text{ml}$ 以下时, 则存活率明显下降。不论在气相或者液相条件下保藏, 其结果无明显差异。

(三) 液氮保藏对东方拟无枝菌酸菌产生去甲基万古霉素的影响

东方拟无枝菌酸菌冷冻管保藏 2 年, 孢子大量死亡, 生产能力下降。其斜面菌种在冰箱中保藏 7d, 发酵罐生产能力下降 18.7—23.4%。而该菌株采用液氮保藏 390 天以上的菌种, 在 250 ml 摇瓶及 5 吨发酵罐中, 其生产能力均无下降趋势。

(四) 液氮保藏后菌株的变化

液氮保藏的东方拟无枝菌酸菌, 因受冷冻损

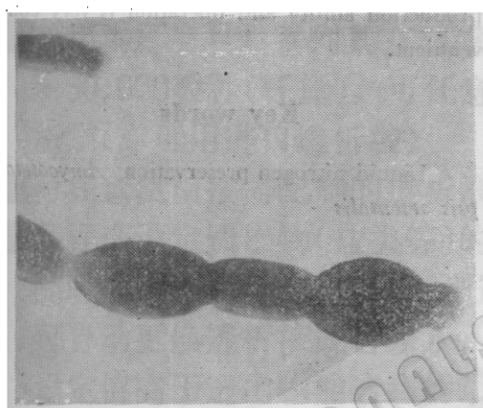
本文于 1989 年 2 月 16 日收到。

表 1 液氮和砂土保藏东方拟无枝菌酸菌存活率的比较

保藏方法		1 周后存活率(%)	1 年后存活率 (%)
液 氮	气相	100	100
	液相	97.55	100
砂 土		8.38	<0.0001

表 2 东方拟无枝菌酸菌孢子与菌丝液氮保藏后存活率比较

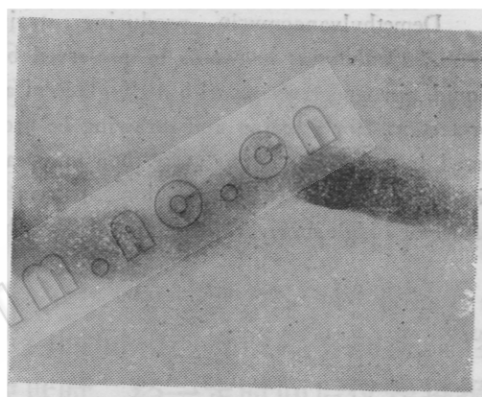
保藏材料	保藏 30 天存活率 (%)	保藏 270 天存活率 (%)
孢子	99.07	105.59
菌丝	103.9	22.3

图 1 液氮保藏前的东方拟无枝菌酸菌 ($\times 15000$)

伤,孢子出现收缩变形现象。电镜照片(图 1、2)可见,液氮冷冻前孢子整齐,圆,边缘清晰。液氮保藏后,孢子不整齐,边缘模糊。这是由于东方拟无枝菌酸菌的细胞壁薄所造成的。菌株受超低温冷冻损伤是可以恢复的,这可从生产试验结果的稳定性方面看出,但菌落及摇瓶菌丝的生长均比未保藏的对照菌株慢 20—24h。

参 考 文 献

[1] Diety, A.: Roundtable Conference on the Cryogenic Preservation of Cell Culture, pp. 22—35,

图 2 液氮保藏后的东方拟无枝菌酸菌 ($\times 15000$)

- 1975.
- [2] Meryman, H. T. et al.: *Science*, 124: 515—521, 1956.
- [3] Shannon, J. E. et al.: Roundtable Conference on Cryogenic Preservation of Cell Culture, pp. 1—8, 1975.
- [4] Hill, L. R.: *Essays in Applied Microbiology*, pp. 21—30, 1981.
- [5] Sharp, R. J.: *Advances in Biotechnological Process*, 3: 81—109, 1984.
- [6] McDanel, L. E. et al.: *Appl. Microbiol.*, 16 (6): 912—916, 1968.
- [7] Macdonald, K. D. et al.: *ibid.*, 24(5): 990—993, 1972.

STUDY ON ULTRALOW TEMPERATURE PRESERVATION OF THE DEMETHYLVANCOMYCIN PRODUCING STRAIN

Zhang Mingchun Zhang Lianyin Wang Xin Luo Xiaoling Wang Lei
Zhang Junling Chen Jie Liu Yuning

(Institute of Antibiotic of Northchina Pharmaceutical Factory, Shijiazhuang)

Demethylvancomycin producing strain
—*Amycolatopsis orientalis* be preserved by
liquid nitrogen freezing with 10% glycerol as
protectant. For freezing and thawing be pre-
ferred fast manner. After more than one year
time, the strain used in production still has the
effect of high survival rate, stableness of the

production ability and operation is very con-
venient.

Key words

Liquid nitrogen preservation; *Amycolato-
psis orientalis*