

## 去甲基万古霉素菌种低温冷冻、冷干保藏条件优化及 10 年菌种保藏效果

王耀耀 朱研研 郝惠云 付美红 王亚莉 张雪霞\*

(微生物药物国家工程研究中心 河北省工业微生物代谢工程技术研究中心

华北制药集团新药研究开发有限责任公司 河北 石家庄 050015)

**摘要:**【目的】针对去甲基万古霉素产生菌不耐保藏的问题,改进菌种保藏方法,对超低温液氮保藏、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冷冻保藏、冷干保藏方法跟踪考察 10 年保藏稳定性,评价不同保藏方法对去甲基万古霉素产生菌的保藏适用性。【方法】采用甘油作基础保护剂进行超低温液氮保藏和 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冷冻保藏,采用脱脂牛奶作基础保护剂进行冷干保藏,针对超低温液氮保藏进行降温速率考察,研究非渗透性冷冻保护剂海藻糖、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等对 3 种保藏方法的冻存影响,对优选出的保藏方法进行 10 年跟踪考察。【结果】3 种保藏方法冻后菌种存活率依次为: $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冷冻保藏>超低温液氮保藏>冷干保藏。液氮保藏最适降温速率为快速冷冻。优选出最佳保护剂配方:超低温液氮保藏为甘油 8.0%,海藻糖 3.5%; $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冷冻保藏为甘油 6.0%,PVP 5.0%;冷干保藏为脱脂牛奶,6.0%海藻糖。采用优化保藏条件,液氮保藏 10 年存活率稳定在 70.6%,菌种发酵水平为入藏水平的 92.9%。【结论】在优化条件下,尤以超低温液氮保藏适合于去甲基万古霉素产生菌长期保藏。

**关键词:**去甲基万古霉素产生菌,超低温液氮保藏, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冷冻保藏,冷干保藏,海藻糖,聚乙烯吡咯烷酮

**Foundation item:** National Science and Technology Program for “Major New Drug Innovation and Development” (No. 2014ZX09201001-004)

\*Corresponding author: Tel: 86-311-86685347; E-mail: zhangxuexiazxx@163.com

**Received:** January 21, 2016; **Accepted:** April 15, 2016; **Published online** (www.cnki.net): April 27, 2016

**基金项目:** 国家“重大新药创制”科技专项(No. 2014ZX09201001-004)

\*通讯作者: Tel: 86-311-86685347; E-mail: zhangxuexiazxx@163.com

**收稿日期:** 2016-01-21; **接受日期:** 2016-04-15; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-04-27

# Optimization of cryopreservation and lyophilization for demethylvancomycin producing strain—an assessment of 10-year preservation

WANG Yao-Yao ZHU Yan-Yan HAO Hui-Yun FU Mei-Hong  
WANG Ya-Li ZHANG Xue-Xia\*

(National Engineering Research Center of Microbial Medicine, Hebei Industry Microbial Metabolic Engineering & Technology Research Center, New Drug Research & Development Company of NCPC, Shijiazhuang, Hebei 050015, China)

**Abstract:** [Objective] Due to the difficulties in preserving demethylvancomycin producing strain, we optimized the preservation conditions, and assessed the 10-year stability of different preservation methods with liquid nitrogen preservation,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  cryopreservation and lyophilization outcomes. [Methods] Using glycerol and skim milk as the basic protective agent for cryopreservation and lyophilization, the effect of cooling rate for liquid nitrogen cryopreservation and impermeability protective agents such as trehalose and polyvinylpyrrolidone (PVP) to these three preservation methods were studied. Ten years tracking assessment on optimal preservation method was performed. [Results] Among the three preservation methods,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  cryopreservation showed the highest survival rate for demethylvancomycin producing strain, followed by liquid nitrogen cryopreservation and lyophilization. The optimum cooling rate for liquid nitrogen cryopreservation was rapid freezing, and the optimum protective agent was as follows: 8.0% glycerol with 3.5% trehalose for liquid nitrogen cryopreservation, 6.0% glycerol with 5.0% PVP for  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  cryopreservation, skimmed milk with 6.0% trehalose for lyophilization. The 10-year survival rate of liquid nitrogen preservation reached 70.6% through optimum preservation condition, productivity of demethylvancomycin remained 92.9% of the original level. [Conclusion] Under optimum preservation condition, liquid nitrogen cryopreservation is suitable for long-term preservation.

**Keywords:** Demethylvancomycin producing strain, Liquid nitrogen cryopreservation,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  cryopreservation, Lyophilization, Trehalose, Polyvinylpyrrolidone

去甲基万古霉素是目前临床上用于治疗由甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌引起的严重感染疾病的重要药物<sup>[1]</sup>,是由我公司研究开发的国内首个抗耐药抗生素品种。其结构比万古霉素在亮氨酸部位少1个甲基,与万古霉素具有相同的抗菌谱和相似的抗菌活性<sup>[2-3]</sup>。其产生菌东方拟无枝菌酸菌(*Amycolatopsis orientalis*)属拟无枝菌酸菌属<sup>[4]</sup>,培养特征表现为气生菌丝较薄弱,孢子少,斜面传代遗传稳定性不好<sup>[5]</sup>,常规保藏损伤性大,为不易保藏菌。对去甲基万古霉素产生菌进行菌种保藏方法的研究具有重要的生产和研究意义。文献[6]首次报道了超低温液氮对东方拟无枝菌酸菌的保藏效果,有关该菌种长期保藏方法的研究尚无报道。本文在对3种经典保藏方法——超低温液氮保藏、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

低温冷冻保藏、冷干保藏进行保藏制备损伤研究的基础上,探索性地研究了非渗透性冷冻保护剂海藻糖、聚乙烯吡咯烷酮结合渗透性保护剂甘油、脱脂牛奶对去甲基万古霉素产生菌的冷冻及冷干保藏效果影响,对优选出的保藏方法进行了10年长期跟踪考察,对去甲基万古霉素产生菌种、长期保藏方法进行了综合评价,为去甲基万古霉素工业生产菌种的保藏提出合理的保藏措施及理论研究依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验菌株:** 去甲基万古霉素产生菌(*Amycolatopsis orientalis*) NCPC11014 保藏于本实验室。

**1.1.2 培养基及保护剂:** 斜面和分离固体培养基

(g/L): 葡萄糖 30.0, 胰蛋白胨 5.0, 麦芽浸出粉 5.0, 氯化钠 2.5, 琼脂 20.0, pH 7.2,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。母瓶培养基(g/L): 葡萄糖 40, 玉米浆 3, 酵母粉 5, 硫酸铵 5, 磷酸二氢钾 1, pH 7.2,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。发酵培养基(g/L): 葡萄糖 80, 玉米粉 5, 豆饼粉 5, 硫酸铵 8, 磷酸二氢钾 2, 碳酸钙 8, pH 7.2,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。基础冷冻保护剂: 准确量取甘油 10–15 g 溶于 100 mL 蒸馏水中,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min 备用。基础冷干保护剂: 取鲜奶 500 mL 分装于离心杯, 3 000 r/min 离心 30 min, 去除上层油脂, 二次离心 30 min 进行脱脂处理, 取脱脂奶分装于中试管中,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min 备用。

**1.1.3 主要试剂与仪器:** 胰蛋白胨、麦芽浸出粉, 英国 Oxoid 公司; 硫酸铵等无机盐为化学纯试剂, 天津瑞金特化学品有限公司; 葡萄糖、蔗糖、D-海藻糖等为分析纯试剂, 北京欣经科生物技术公司; 牛奶为脱脂的新鲜纯液态奶。

–80 °C 超低温冰箱, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 液氮罐, 美国 Thermolyne 公司; 冷干机 DW3, 丹麦 Heto-Holten 公司; 程序降温仪, 奥地利 SY-LAB 公司; 高压液相色谱仪 Waters2690, 美国 Waters 公司; 调速摇瓶机 Innovo 5000, 美国 New Brunswick Scientific 公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 超低温液氮保藏:** 保藏管制备: 参照文献[7]的方法进行超低温液氮保藏。降温速度进行分组设置, 分装不同装量冷冻管依次为玻璃液氮管 0.5 mL、Corning 冷冻管 0.5 mL、Corning 冷冻管 1.8 mL, 速冻降温直接放入液氮罐液相保藏; 程序降温按照两步法<sup>[8]</sup>进行, Corning 冷冻管 1.8 mL 组首先在 4 °C 放置 1 h, 利用程序降温仪在 4–40 °C 范围内分别设定降温速度–1、–5、–10、–20 °C/min 进行降温速率考察, 降温完成后迅速放于液氮罐液相保藏。分离平板置于 28 °C 恒温培养 7 d, 观察并记录冻前孢子液浓度及菌落形态特征。液氮保藏管复苏: 取出冻存管快速置于水浴 37 °C 复苏。

**1.2.2 –80 °C 低温冷冻保藏:** 用一定浓度的冷冻保

护剂悬浮并收集菌体, 分装于无菌冷冻管中, 直接放入–80 °C 低温保存。孢子悬浮液进行稀释分离计数培养。

**1.2.3 冷冻干燥保藏:** 参照文献[7]的方法进行冷冻干燥保藏。孢子悬浮液进行稀释分离计数培养。

**1.2.4 冷冻干燥管真空度及含水量检测:** 冷冻干燥管真空度检测采用高频电火花真空测定仪进行真空检验, 产生蓝紫色辉光表示真空合格。冷冻干燥管含水量测定参考文献[9]中干燥失重测定法。

**1.2.5 菌种保藏存活率及变异率检测:** 将不同保藏时间段的保藏管复苏, 菌悬液稀释涂布在分离培养基上, 28 °C 恒温培养, 观察并记录菌落个数及菌落形态特征, 与冻前计数数据比较, 计算菌种保藏存活率及变异率。存活率计算方法: 存活率(%)=冻后活菌计数/冻前活菌计数; 变异率计算方法: 形态变异率(%)=100%×平板菌落形态变异计数/平板菌落总计数×100。以菌落直径、表面质地、孢子多少、孢子颜色等菌落形态特征变化判断菌落形态变异。

**1.2.6 摇瓶发酵培养:** 摇瓶发酵条件见文献[10]。

**1.2.7 发酵液效价检测:** HPLC 色谱分析见文献[11]。

## 2 结果与分析

### 2.1 传统保藏方法制备损伤的考察

将去甲基万古霉素产生菌 NCPC11014 培养成熟的中管斜面 and 茄子瓶斜面分别制备超低温液氮保藏管(保护剂甘油 10%, 采用 Coining 冷冻管装量 1.8 mL 直接放入液氮中)、–80 °C 低温冷冻保藏管(保护剂甘油 15%)、冷冻干燥保藏管(保护剂脱脂牛奶), 于 1 周后进行冻后菌落平板计数分析考察各保藏方法对菌种的制备损伤。图 1 显示, 3 种保藏方法冻后存活率依次为: –80 °C 低温冷冻保藏>超低温液氮保藏>冷干保藏。–80 °C 低温冻存损伤更小, 存活率达到 36.5%–47.9%; 超低温液氮冷冻存活率达到 25.2%–34.8%; 冷干保藏对菌株损伤最大, 菌株对细胞失水极不耐受, 两种培养形式存活率均小于 5%。实验显示斜面孢子质量对菌种保藏效果影响较显著, 茄子瓶斜面孢子量达到  $5.3 \times 10^7$  CFU/mL, 大

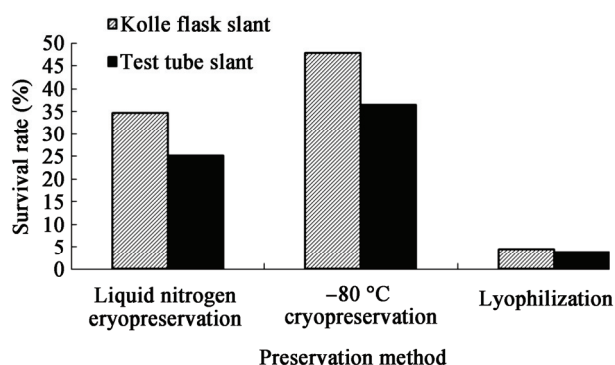


图1 东方拟无枝菌酸菌3种保藏方法制备存活率比较  
Figure 1 Comparative effect of three preservation methods on survival rate of *Amycolatopsis orientalis* strain

于中管斜面孢子量  $1.8 \times 10^7$  CFU/mL, 其对3种保藏方法的耐受性均好于中管斜面孢子。

## 2.2 超低温液氮保藏降温速率影响

按照方法1.2.1, 以甘油10%作保护剂制备液氮管, 于1周后进行冻后菌落平板计数考察不同冷冻降温速率对菌种的损伤。表1显示去甲基万古霉素产生菌对不同降温速率耐受性差异较大。采用直放入液氮液相中的降温措施对菌种损伤最小, 而玻璃管材由于其传热快速的材质特性也表现出更好的保藏优势, 冻后存活率达到42.1%, 变异率12.2%; 其次为Corning冷冻管低装量0.5 mL组, 存活率达

到38.7%; Corning冷冻管装量1.8 mL组(对照), 存活率为34.8%; 对程序降温控制 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 和 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 两组较快速降温菌种死亡率达到80%以上; 显示极不适应的试验组为慢速降温组 $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 和 $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 死亡率达到95%以上。

## 2.3 保护剂影响

以速冻降温液氮保藏条件下考察渗透型冷冻保护剂甘油浓度冻存效果, 图2显示甘油浓度在10%–30%范围内孢子存活率较高, 存活率在甘油15%浓度最高达到46.5%, 变异率最小, 为10.8%; 甘油浓度在5%–10%范围内, 孢子存活率有所下降; 菌种对高浓度甘油组表现极不耐受, 浓度大于30%的实验组, 冻存死亡率快速增加, 甘油50%组冻存死亡率达到98.5%。

进一步考察非渗透冷冻保护剂糖类及大分子保护剂聚乙烯吡咯烷酮在3种保藏方法中的冻存影响, 图3显示二糖保护作用优于单糖, 其中以10%海藻糖作保护剂液氮冷冻孢子存活率达到58.7%, 在冷冻干燥保藏方法考察中, 海藻糖也表现出特殊的保护优势, 存活率提高到10.3%; 聚乙烯吡咯烷酮在两种冷冻保藏方法中均效果显著, 尤其在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保藏中孢子存活率达到70.9%。蔗糖、麦芽糖在液氮保藏中存活率达到20.8%–24.7%, 不

表1 降温速率对东方拟无枝菌酸菌液氮保藏存活率和变异率的影响

Table 1 Effect of cooling rate on survival and mutation rate of *Amycolatopsis orientalis* strain after liquid nitrogen freezing

降温速度 Cooling rate ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )	管材及装量 Material and cryotube containing (mL)	存活率 Survival rate (%)	变异率 Mutation rate (%)
Directly into liquid nitrogen	玻璃管 0.5 mL	42.1	12.2
Directly into liquid nitrogen	Corning 管 0.5 mL	38.7	14.7
Directly into liquid nitrogen	Corning 管 1.8 mL (对照)	34.8	18.5
$-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ two step cooling	Corning 管 1.8 mL	0.4	—
$-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ two step cooling	Corning 管 1.8 mL	3.5	—
$-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ two step cooling	Corning 管 1.8 mL	12.3	27.4
$-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ two step cooling	Corning 管 1.8 mL	18.9	25.2

注: —: 未检测。

Note: —: Not tested.

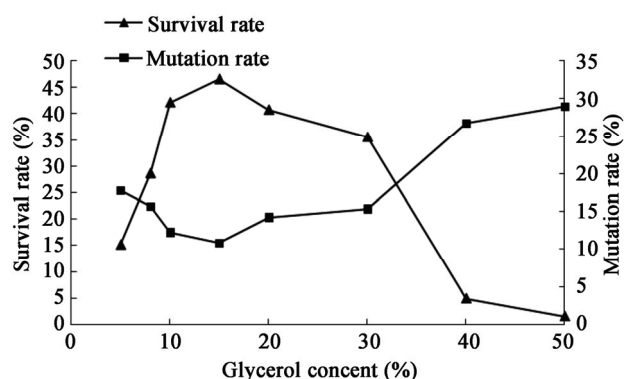


图 2 保护剂甘油浓度对东方拟无枝菌酸菌液氮保藏存活率和变异率的影响

Figure 2 Effect of different glycerol concentration on survival and mutation rate of *Amycolatopsis orientalis* strain after liquid nitrogen freezing

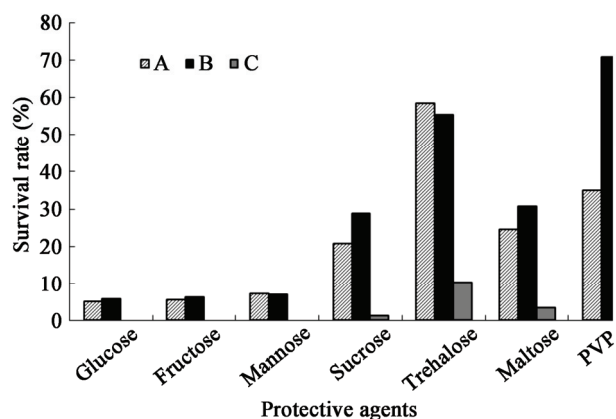


图 3 非渗透性保护剂对东方拟无枝菌酸菌冷冻及冷干保藏菌种存活率的影响

Figure 3 Effect of different impermeability protective agents on survival rate of *Amycolatopsis orientalis* strain after freezing or freeze-drying

注: A: 超低温液氮保藏; B:  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冷冻保藏; C: 冷冻干燥保藏.

Note: A: Liquid nitrogen cryopreservation; B:  $-80^{\circ}\text{C}$  cryopreservation; C: Lyophilization.

及甘油保藏效果, 3 种单糖液氮保藏存活率差异不明显。

将单因素考察优选出的海藻糖和 PVP 添加到基础保护剂配方中, 考察组合型保护剂的协同作用, 表 2 显示采用甘油 8.0%海藻糖 3.5%组合进行液氮保藏, 孢子存活率达到 75.5%; 采用甘油 6.0% PVP 5.0%组合进行 $-80^{\circ}\text{C}$  低温冷冻保藏, 孢子存活

率达到 87.1%; 真空冷冻干燥组含水量均达到 3.0%以下, 采用脱脂牛奶添加 6.0%海藻糖作保护剂, 孢子存活率达到 35.6%, 保藏效果均显著高于相应对照组。

## 2.4 去甲基万古霉素产生菌保藏方法 10 年跟踪考察

针对优选出的保藏方法进行冻存效果跟踪考察, 相继于保藏 1 个月、3 个月、6 个月、1 年、2 年、3 年、5 年、8 年、10 年进行保藏管支质量检查(表 3)。结果显示液氮保藏 10 年存活率稳定在 70.6%左右, 变异率 11.6%, 菌种发酵水平达到入藏水平的 92.9%, 菌种特征与冻前基本保持一致;  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冷冻保藏 2 年内较稳定, 存活率达到 82.1%, 变异率 6.8%, 菌种发酵水平达到入藏水平的 95.2%, 保藏期 2 年之后显示死亡率加速, 菌种退化显著; 冷干保藏制备存活率达到 35.6%, 保藏期 6 个月内较稳定, 1 年期存活率降至 10.2%, 之后菌种存活率呈数量级大幅下降。

## 3 结论与讨论

菌种保藏的机理主要是运用干燥、低温和隔绝空气的条件, 降低微生物菌株新陈代谢的速度, 使细菌的生命活动处于半永久性休眠状态, 从而达到保藏的目的<sup>[12]</sup>。研究微生物保藏条件的影响因素主要涉及菌悬液浓度<sup>[13]</sup>、降温速度<sup>[14-15]</sup>、超低温冷冻保护剂<sup>[16]</sup>及冷冻干燥保护剂<sup>[17]</sup>特性研究、冰晶形成<sup>[18]</sup>、玻璃化温度<sup>[19]</sup>等方面。对去甲基万古霉素产生菌 3 种保藏方法的考察发现, 菌株表现出对真空冷冻干燥方法极不耐受, 细胞脱水造成菌种损伤率极大。菌株对于失水环境敏感的特性同样表现在对高浓度甘油环境导致的失水刺激极不耐受, 在冷冻保藏方法平衡冰晶刺激及失水损伤两种伤害时, 应着重侧重于制备过程中缓解失水的问题。

不同的降温速率对微生物的损伤主要来自于胞内结冰冰晶机械损伤以及细胞外溶液部分结冰, 从而使胞内溶质浓度过高, 产生的高浓度溶质渗透损害<sup>[20]</sup>。研究显示去甲基万古霉素产生菌超低温液

表 2 组合型保护剂对东方拟无枝菌酸菌冷冻及冷干保藏的影响  
Table 2 Effect of combined protective agents on survival and mutation rate of *Amycolatopsis orientalis* strain after freezing or freeze-drying

保护剂 Protective agents	保藏方法 Preservation method	含水量 Water content (%)	存活率 Survival rate (%)	变异率 Mutation rate (%)
Glycerol 10.0% (contrast)	液氮保藏		42.1	12.2
10.0% Glycerol with 3.5% trehalose	液氮保藏		62.8	10.3
8.0% Glycerol with 3.5% trehalose	液氮保藏		75.5	6.4
6.0% Glycerol with 3.5% trehalose	液氮保藏		68.2	7.8
Glycerol 15.0% (contrast)	-80 °C低温冷冻保藏		47.9	11.7
10.0% Glycerol with PVP 5.0%	-80 °C低温冷冻保藏		60.7	10.3
8.0% Glycerol with PVP 5.0%	-80 °C低温冷冻保藏		75.2	8.5
6.0% Glycerol with PVP 5.0%	-80 °C低温冷冻保藏		87.1	4.3
Skim milk (contrast)	冷冻干燥	2.3	4.5	30.4
Skim milk with 3.0% trehalose	冷冻干燥	2.1	16.5	25.2
Skim milk with 6.0% trehalose	冷冻干燥	2.5	35.6	15.7
Skim milk with 8.0% trehalose	冷冻干燥	2.3	22.8	23.5

氮保藏适应于超快速降温速率, 利用操作细节中孢子液装量及其冻存管材质, 达到实验设置的最大降温速率, 制备损伤最小。慢速冷冻容易造成细胞严重脱水, 菌种保藏死亡率高, 再一次证实了菌株对于失水刺激的敏感性。

保护剂不仅对于菌种冷冻保藏及冷干保藏的存活率有影响, 对于菌种特性表型及其产物代谢特性都会带来不稳定性影响。由于去甲基万古霉素产生菌菌株对脱水刺激的高敏感性导致渗透性保护剂高浓度甘油的限制使用。对非渗透性保护剂的考察优选出两种保护剂: 小分子糖类海藻糖及高分子聚合物 PVP。将海藻糖及 PVP 与经典保护剂甘油及脱脂牛奶的配方组合分别在低温冷冻及冻干保藏中显示出了协同保护作用。得到了优化保护剂配方: 超低温液氮保藏为甘油 8.0%, 海藻糖 3.5%; -80 °C 低温冷冻保藏为甘油 6.0%, PVP 5.0%; 冷干保藏为脱脂牛奶, 6.0%海藻糖, 制备

存活率得到大幅提高。考察 10 年内不同时段菌种保藏效果: 液氮保藏 10 年存活率稳定在 70.6%, 菌种发酵水平为入藏水平的 92.9%; -80 °C 低温冷冻保藏在 2 年内保藏效果优于液氮保藏, 之后菌种退化显著; 冷干保藏时效更短, 6 个月菌种较稳定, 1 年后存活率快速降至 10.2%。

由此基本确证了适合去甲基万古霉素产生菌的菌种保藏方法: 以海藻糖甘油作为复合保护剂速冻降温进行超低温液氮保藏适合于去甲基万古霉素产生菌长期保藏; 以 PVP 复合甘油保护剂-80 °C 低温冷冻保藏在 3 种保藏方法中制备损伤最小, 保藏年限为 2 年, 适合于作为中短期保藏方法; 冷干保藏对菌种损伤最大, 海藻糖优化组方存活率显著上升, 由于其方法本身的成本低、储藏方便、不需特殊保藏设备和能耗等特点<sup>[21]</sup>, 可作为短期保藏备份和场地转移使用。



表 3 东方拟无枝菌酸菌种保藏方法 10 年跟踪考察  
Table 3 Tracking investigation on *Amycolatopsis orientalis* preservation methods in 10 years

保藏方法 Preservation method	保藏时间 Time	存活率 Survival rate (%)	变异率 Mutation rate (%)	发酵水平 Productivity of demethylvancomycin (mg/L)
Liquid nitrogen cryopreservation (8.0% glycerol with 3.5% trehalose, rapid cooling)	0	75.5	6.4	6 540
	1 个月	75.2	7.6	6 638
	3 个月	73.8	7.5	6 609
	6 个月	72.1	8.2	6 246
	1 年	74.5	8.5	6 509
	2 年	76.3	8.7	6 430
	3 年	70.8	9.2	6 359
	5 年	72.6	9.3	6 247
	8 年	71.2	10.3	6 150
	10 年	70.6	11.6	6 074
-80 °C cryopreservation (6.0% glycerol with PVP 5.0%)	0	87.1	4.3	6 658
	1 个月	85.3	5.7	6 592
	3 个月	87.6	6.2	6 640
	6 个月	86.3	6.3	6 831
	1 年	81.4	6.0	6 549
	2 年	82.1	6.8	6 338
	3 年	52.1	7.5	5 738
	5 年	23.2	15.8	5 430
	8 年	5.7	19.3	4 876
	10 年	1.2	25.7	4 217
Lyophilization (skim milk with 6.0% trehalose)	0	35.6	15.7	6 176
	1 个月	32.8	15.9	6 155
	3 个月	27.5	17.4	6 280
	6 个月	22.3	18.6	6 073
	1 年	10.2	28.5	4 328
	2 年	0.3	—	—
	3 年	0.02	—	—
	5 年	0.000 5	—	—
	8 年	0	—	—
	10 年	0	—	—

注: —: 未检测.

Note: —: Not tested.

## 参 考 文 献

- [1] Li JT, Wei J. Diagnosis and treatment for MRSA infections[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 1993, 9(2): 97-108 (in Chinese)  
李家泰, 魏瑾. 甲氧西林耐药金葡菌(MRSA)感染的诊断与治疗[J]. 中国临床药理学杂志, 1993, 9(2): 97-108
- [2] Hunt AH, Marconi GG, Elzey TK, et al. A51568A: N-demethylvancomycin[J]. The Journal of Antibiotics, 1984, 37(8): 917-919
- [3] Zhou Y, Liu YF, Zheng CL. A study on separation and purification of components of N-demethyl Vancomycin[J]. Antibiotic, 1986, 11(5): 414-418 (in Chinese)  
周玉, 刘玉芳, 郑昌亮. N-去甲基万古霉素单组份的分离与精制[J]. 抗生素, 1986, 11(5): 414-418
- [4] Lechevalier MP, Prauser H, Labeda DP, et al. Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1986, 36(1): 29-37
- [5] Wang YY, Liu YQ, Zhu YY, et al. Screening of high yield norvancomycin producing strain by streptomycin and rifampicin resistant mutation[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2006, 31(4): 243-246 (in Chinese)  
王耀耀, 刘云清, 朱研研, 等. 组合链霉素和利福平抗性突变去甲基万古霉素高产菌株的选育[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(4): 243-246
- [6] Zhang MC, Zhang LY, Wang X, et al. Study on ultralow temperature preservation of the demethylvancomycin producing strain[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1991, 31(1): 82-84 (in Chinese)  
章名春, 张恋英, 王欣, 等. 超低温保藏去甲基万古霉素产生菌的研究[J]. 微生物学报, 1991, 31(1): 82-84
- [7] Shi QQ, Wu SG. Industrial Microbial Breeding Science[M]. Beijing: Science Press, 2006: 407-413 (in Chinese)  
施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 407-413
- [8] Hua ZZ, Ren HS. Cryobiomedical Technology[M]. Beijing: Science Press, 1994: 63-67 (in Chinese)  
华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 63-67
- [9] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Volume IV)[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 103 (in Chinese)  
国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 103
- [10] Zhu YY, Wang YY, Liu YQ, et al. Effects of trace elements and precursor on the biosynthesis of N-demethylvancomycin[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2006, 26(5): 542-546 (in Chinese)  
朱研研, 王耀耀, 刘云清, 等. 微量元素和前体对去甲基万古霉素合成的影响[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2006, 26(5): 542-546
- [11] Wang J, Lin Y, Wang HY, et al. Study on N-Demethylvancomycin purification process by macroreticular adsorbent resin[J]. Chemistry & Bioengineering, 2010, 27(5): 76-78 (in Chinese)  
王健, 林毅, 王海燕, 等. 大孔吸附树脂提取分离去甲基万古霉素的工艺研究[J]. 化学与生物工程, 2010, 27(5): 76-78
- [12] Chang JM, Cai ZH, Wu QP, et al. Influencing factors to freeze-drying preservation of culture[J]. Microbiology China, 2008, 35(6): 959-962 (in Chinese)  
常金梅, 蔡芷荷, 吴清平, 等. 菌种冷冻干燥保藏的影响因素[J]. 微生物学通报, 2008, 35(6): 959-962
- [13] Palmfeld J, Rådström P, Hahn-Hägerdal B. Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*[J]. Cryobiology, 2003, 47(1): 21-29
- [14] Lewis JG, Learmonth RP, Watson K. Cryoprotection of yeast by alcohols during rapid freezing[J]. Cryobiology, 1994, 31(2): 193-198
- [15] Dumont F, Marechal PA, Gervais P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates[J]. Cryobiology, 2003, 46(1): 33-42
- [16] Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms[J]. Cryobiology, 2003, 46(3): 205-229
- [17] Abadias M, Teixidó N, Usall J, et al. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media[J]. Journal of Food Protection, 2001, 64(6): 856-861
- [18] Acker JP, McGann LE. Protective effect of intracellular ice during freezing?[J]. Cryobiology, 2003, 46(2): 197-202
- [19] Streeter JG. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95(3): 484-491
- [20] Dumont F, Marechal PA, Gervais P. Cell size and permeability as determining factors for cell viability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 268-272
- [21] Morgan CA, Herman N, White PA, et al. Preservation of micro-organisms by drying: a review[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66(2): 183-193