

张译升,张森,刘国兴,等.牛支原体冻干保护性物质的初步筛选[J].华中农业大学学报,2024,43(6):282-288.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.06.027

## 牛支原体冻干保护性物质的初步筛选

张译升<sup>1,2</sup>,张森<sup>1,2</sup>,刘国兴<sup>1,2</sup>,刘希健<sup>1,2</sup>,杨莉<sup>3</sup>,  
陈建国<sup>2</sup>,郭爱珍<sup>1,2,4</sup>,陈颖钰<sup>1,2</sup>

1. 华中农业大学农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室,武汉 430070;  
2. 华中农业大学动物医学院,武汉 430070; 3. 武汉科前生物股份有限公司,武汉 430070;  
4. 湖北洪山实验室,武汉 430070

**摘要** 为探求牛支原体冻干菌的有效保护性物质,利用四因素四水平正交试验和单因素试验,通过检测冻干后牛支原体HB150的活菌数,筛选并评价脱脂乳、蔗糖、甘露醇、葡聚糖、海藻糖、尿素、BSA、赖氨酸等物质对牛支原体冻干后活菌率的影响,并最终确定不同保护剂的最佳浓度及配比。结果显示,最佳的冻干保护剂配比(m/V)为:脱脂乳15%、蔗糖4.0%、甘露醇4.0%、葡聚糖3.0%、海藻糖2.0%、尿素1.5%、BSA 1.0%、赖氨酸0.3%。该配方于-40℃、12 Pa条件下冷冻干燥20 h,能够保持牛支原体的最高活菌率,达到(55.2±2.1)%。结果表明,所筛选的冻干保护剂具有较好的保护作用,可以应用于牛支原体的实际冻干操作。

**关键词** 牛支原体; 冷冻干燥; 保护剂; 正交试验; 疫苗

**中图分类号** S852.62 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)06-0282-07

牛支原体(*Mycoplasma bovis*)是牛呼吸道疾病综合征的主要病原体之一<sup>[1]</sup>,能够引起牛的支气管炎、关节炎、生殖道疾病等多种症状,致死率可高达50%<sup>[2]</sup>,给全球养牛业造成了巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。2008年我国首次在湖北省新购牛群中具有呼吸道疾病症状牛体内分离鉴定到该病原,随后全国多个地方报道了运输应激诱发的牛支原体肺炎和新生犊牛的牛支原体肺炎<sup>[4]</sup>。随着牛支原体对抗生素耐药性的逐年上升<sup>[5]</sup>,该病的防治也越来越困难。疫苗免疫成为了预防和控制牛支原体病的重要手段。为预防该病,笔者所在课题组前期已开发出了牛支原体减毒活疫苗(HB150株),临床试验证实具有较好的保护效力,但如何保持疫苗株冻干后的高存活率成为问题。

冻干保护剂是疫苗研发过程中的重要组成部分。有效的冻干保护剂可以改变生物制品由于冷冻干燥时的物理、化学环境所带来的菌体伤害,尽可能保持原有的生理、生物活性。目前常用的冻干保护剂成分主要有脱脂奶、山梨醇、甘油、海藻糖、谷氨酸

钠、蔗糖、乳糖、抗坏血酸、甘露醇等<sup>[6-8]</sup>。

本研究以海藻糖、蔗糖、脱脂奶、山梨醇、尿素、牛血清白蛋白等16种物质为基础,利用正交试验、单因素试验<sup>[9]</sup>,以牛支原体冻干后的存活率为指标,对牛支原体疫苗株冷冻干燥时起保护性作用的物质进行评价,并确定最佳浓度配比,旨在筛选牛支原体疫苗株在冻干条件下的有效保护性物质,并为后期牛支原体冻干疫苗株HB150的生产提供重要的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

1)牛支原体HB150株。由华中农业大学反刍动物病原研究室制备并保存。

2)PPLO液体培养基。PPLO Broth 10.5 g,酵母浸出物 2.5 g,丙酮酸钠 0.5 g,纯水定容至 500 mL,121℃灭菌 15 min后,加入无菌马血清 50 mL,10×MEM 5 mL,青霉素钠溶液 5 mL(8万 IU/mL),1%酚红溶液 0.5 mL。

收稿日期:2023-06-08

基金项目:宁夏回族自治区重点研发计划项目(2023BCF01038);国家现代农业(肉牛/牦牛)产业技术体系项目(CARS-37)

张译升,E-mail:18753985565@163.com

通信作者:陈颖钰,E-mail:chenyingyu@mail.hzau.edu.cn

3) PPLO 固体培养基。在 PPLO 液体培养基的基础上,加 1.5% 琼脂。

4) 保护剂配料。海藻糖、葡聚糖、山梨醇为阿拉丁试剂(上海)有限公司产品;尿素、蔗糖,国药集团化学试剂有限公司产品;脱脂乳、甘露醇为 BioFroxx 公司产品;牛血清白蛋白为 biosharp 公司产品;赖氨酸为杭州微生物试剂有限公司产品。

### 1.2 菌种的制备

1) 牛支原体 HB150 株菌液的制备。将保存的牛支原体接种于 PPLO 液体培养基中,于 5% CO<sub>2</sub>、(37.0±1.0) °C 条件下静置培养 48 h 复壮后,再按 1:100 比例接种于 PPLO 液体培养基,于 5% CO<sub>2</sub>、(37.0±1.0) °C 条件下厌氧静置培养 40~44 h,保存菌液备用。

2) 冻干菌粉的制备。将培养后的牛支原体菌液,于 4.0 °C、12 000 r/min 条件下离心 30 min,收集沉淀,分别于含有不同组分的候选冻干保护剂中重悬。将重悬后的菌液分装后置于真空冷冻干燥机中冷冻干燥 20 h,得到冻干菌粉。随机抽取 3 瓶检测有效活菌数,计算存活率。

### 1.3 活菌数检测

采用 PPLO 固体平板计数法计算活菌数。将冻干前菌液做 10 倍梯度稀释,分别从 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 稀释度各取 100 μL 接种于 PPLO 固体培养基上,于 5% CO<sub>2</sub>、(37.0±1.0) °C 培养箱中培养 72 h 后,取菌落数在 20~200 个的稀释度进行计数;冻干后的菌粉用生理盐水恢复至冻干前体积,计数方法同上。

冻干后活菌率计算方法:活菌率=冻干后 2 mL 菌悬液的活菌总数/冻干前 2 mL 菌悬液的活菌总数×100%。

### 1.4 冻干保护剂筛选及冻干保护程序

1) 冻干保护剂主成分的筛选。为研究不同质量/体积的海藻糖、葡聚糖、蔗糖和脱脂乳对牛支原体 HB150 株冻干后细菌存活能力的影响,设计四因素四水平正交试验,各因素水平如表 1 所示。

依据表 1,利用 SPSSAU 系统得到海藻糖、葡聚糖、蔗糖和脱脂乳的四因素四水平正交设计表,如表 2 所示。

将不同保护性物质依照表 2 进行配比后,制备用于冻干的保护剂配方,与菌株混合,制备冻干菌粉。计算冻干菌粉的活菌率,最高值所对应的组合为最佳主成分配比。

2) 冻干保护剂辅成分的筛选。依据正交试验

表 1 冻干保护剂因素水平

Table 1 Freeze-drying protectant factor levels

水平 Level	因素 Factor			
	A 海藻糖 Trehalose	B 葡聚糖 Glucan	C 蔗糖 Saccharose	D 脱脂乳 Skim milk
1	2	2	4	0
2	4	3	6	5
3	6	4	8	10
4	8	5	10	15

表 2 冻干保护剂正交设计表

Table 2 Orthogonal design table for freeze-drying protectants

试验号 Number	因素 Factor			
	A 海藻糖 Trehalose	B 葡聚糖 Glucan	C 蔗糖 Saccharose	D 脱脂乳 Skim milk
G1	1	1	1	1
G2	1	2	2	2
G3	1	3	3	3
G4	1	4	4	4
G5	2	1	2	3
G6	2	2	1	4
G7	2	3	4	1
G8	2	4	3	2
G9	3	1	3	4
G10	3	2	4	3
G11	3	3	1	2
G12	3	4	2	1
G13	4	1	4	2
G14	4	2	3	1
G15	4	3	2	4
G16	4	4	1	3

(材料与方法中“1.4”)的结果,通过单因素试验在所确定的主成分配比的基础上,逐步按比例添加以下物质。

①向主成分中分别添加 1%、2%、3%、4%、5% (m/V) 含量的山梨醇、甘露醇和 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% (m/V) 的聚乙二醇 8000,与菌株混合,冻干后计算活菌率。对比这 3 种醇类物质的冻干保护效果,确定最佳保护性物质及配比。

②在添加醇类物质的基础上,分别添加 1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0% (m/V) 的半乳糖和 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5% (m/V) 的尿素以及 0.4%、0.8%、1.2%、1.6%、2.0% (m/V) 的抗坏血酸,与菌株混合,冻干后计算活菌率。对比半乳糖、尿素和抗坏

血酸3种不同性质物质对冻干后活菌率的提升效果,确定最佳保护性物质及配比。

③在此基础上再分别添加0.5%、1.0%、1.5%、2.0% (*m/V*)的酪蛋白、BSA和1.0%、1.5%、2%、2.5% (*m/V*)的NBS,与菌株混合,冻干后计算活菌率。对比这3种物质的冻干保护效果,确定最佳蛋白类的保护性物质及配比。

④最后分别添加0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5% (*m/V*)的甘氨酸、赖氨酸和精氨酸,冻干后计算活菌率;对比3种物质的冻干保护效果,确定最佳氨基酸类的保护性物质及配比。最终确定辅成分及其最佳配比。

3)冻干保护程序。使用笔者所在实验室常规冻干保护程序参数:−40℃、12 Pa条件下冷冻干燥20 h对牛支原体进行冻干。

## 1.5 统计学分析

采用单因素方差分析来检测组间的显著性差异。采用以下方法判定统计学显著性:\*表示有差异,但不显著( $P>0.05$ ),\*\*表示存在显著性差异( $P<0.01$ ),\*\*\*表示存在极显著差异( $P<0.001$ ),\*\*\*\*表示存在极极显著差异( $P<0.0001$ )。误差条表示平均值的标准误差。

## 2 结果与分析

### 2.1 冻干保护剂主成分筛选

通过四因素四水平正交设计试验对冻干保护剂的主成分进行筛选,结果如图1所示,G6组对应的冻干菌粉的活菌率最高,为(32.7±1.5)%,所对应的成分及配比为4.0%海藻糖、3.0%葡聚糖、4.0%蔗糖及15%脱脂乳。

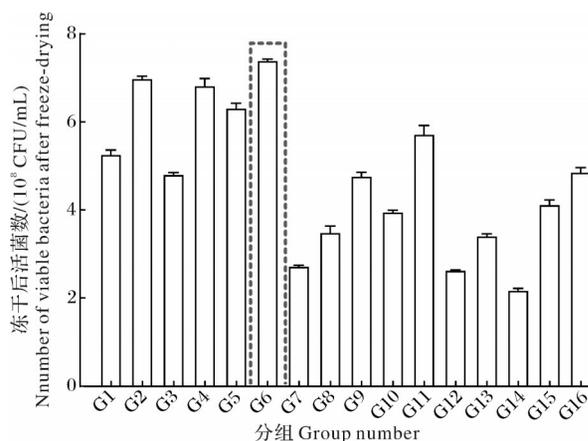


图1 应用不同保护剂配方冻干后菌粉活菌数

Fig.1 Number of bacteria after freeze-drying of different protectant formulations

计算得到A、B、C和D四因素的极差*R*依次为10.33、3.48、8.84和11.41。极差越大表明该因素对活菌率的影响越显著,因此可知脱脂乳对牛支原体冻干后活菌率影响最大,其次为海藻糖、蔗糖,葡聚糖对冻干后活菌率影响作用最小。*k*值为正交试验各水平下的指标总和,*k*值越高表明该因素对活菌率的影响越显著。由表3中*k*值可知,牛支原体冻干保护剂主成分最佳组合为A<sub>1</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>D<sub>4</sub>,即2.0%海藻糖、3.0%葡聚糖、4.0%蔗糖、15%脱脂乳,将该配方命名为G17。在该配方条件下重复3次试验,得到的牛支原体HB150株冻干后活菌率为(33.6±1.1)%,高于正交试验组(G6组)的冻干后活菌率[(32.7±1.5)%]。

表3 不同冻干保护剂配方对冻干后活菌数影响

Table 3 Effect of different protectant formulations on the number of viable bacteria after freeze-drying

指标 Index	A 海藻糖 Trehalose	B 葡聚糖 Glucan	C 蔗糖 Saccharose	D 脱脂乳 Skim milk
<i>k</i> <sub>1</sub>	26.43	21.86	25.70	14.15
<i>k</i> <sub>2</sub>	22.00	22.68	22.18	21.68
<i>k</i> <sub>3</sub>	18.91	19.20	16.86	22.05
<i>k</i> <sub>4</sub>	16.10	19.70	18.70	25.56
<i>R</i>	10.33	3.48	8.84	11.41

### 2.2 冻干保护剂辅成分筛选结果

1)添加3种不同的醇类物质冻干后活菌率。在2.0%海藻糖、3.0%葡聚糖、4.0%蔗糖、15%脱脂乳的基础上,逐一添加不同含量的甘露醇(图2A)、山梨醇(图2B)和聚乙二醇8000(图2C),结果显示,添加4%的甘露醇和山梨醇冻干后活菌率最高,分别为(35.4±1.2)%和(32.7±0.7)%;聚乙二醇8000的添加量与活菌率呈负相关,在1%时活菌率最高,为(24.1±1.3)%。表明3种醇类物质中4.0%甘露醇对牛支原体冻干保护效果好于4.0%山梨醇和1.0%聚乙二醇8000,且添加聚乙二醇8000作为保护性物质会降低牛支原体冻干保护效率。

2)添加不同含量的半乳糖、尿素和抗坏血酸的牛支原体冻干后活菌率。在2.0%海藻糖、3.0%葡聚糖、4.0%蔗糖、15%脱脂乳、4.0%甘露醇的基础上,添加不同含量的半乳糖(图3A)、尿素(图3B),结果显示,牛支原体冻干后2.0%半乳糖冻干后活菌率最高,为(33.6±1.2)%,与本文“2.2.1)”中添加4.0%甘露醇冻干后保护效果无差异( $P>0.05$ );1.5%的尿素冻干后活菌率为(44.1±1.6)%,较其他含量的尿

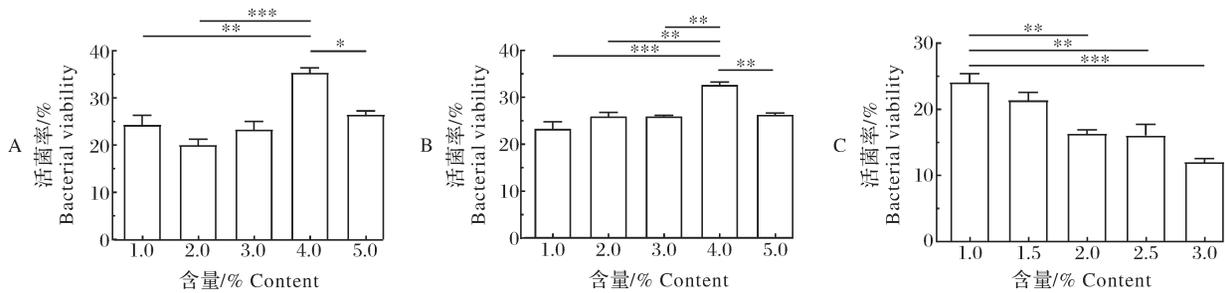


图2 添加甘露醇(A)、山梨醇(B)和聚乙二醇8000(C)后牛支原体HB150冻干后活菌率

Fig.2 Viability of *Mycoplasma bovis* HB150 freeze-drying after adding mannitol (A), sorbitol (B), and polyethylene glycol 8000 (C)

素冻干保护效果更好。而添加抗坏血酸(图3C)的  
保护剂配方冻干后活菌率在抗坏血酸占比为1.2%  
时,活菌率最高仅为(24.6±2.4)%,继续增加抗坏  
血酸的比例,则会导致制品溶液产生絮状物,改变  
原有冻品的物理性状,进而降低制品中牛支原体的  
活菌率。

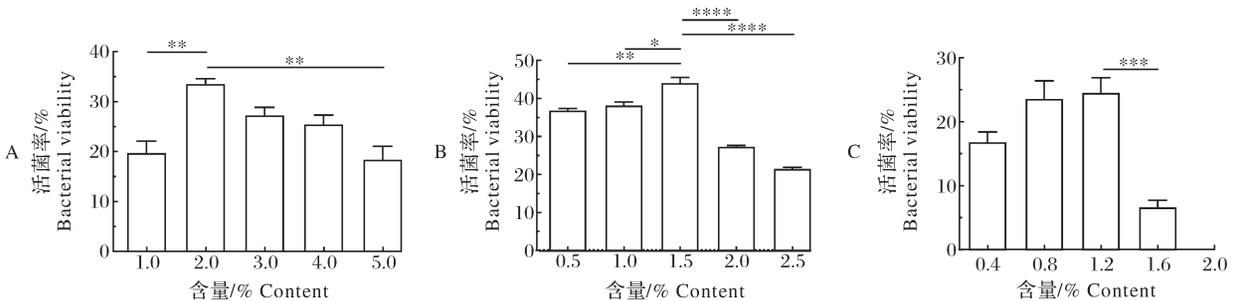


图3 添加不同含量的半乳糖(A)、尿素(B)和抗坏血酸(C)的牛支原体冻干后活菌率

Fig.3 Post-freeze-drying viability of *Mycoplasma bovis* supplemented with different levels of galactose (A), urea (B) and ascorbic acid (C)

3)添加3种不同的蛋白类物质冻干后活菌率。  
在1.5% 尿素、2.0% 海藻糖、3.0% 葡聚糖、4.0% 蔗  
糖、15% 脱脂乳、4.0% 甘露醇的基础上,添加不同含  
量的蛋白类保护性物质,冻干后结果显示:1.0%  
BSA(图4A)冻干活菌最高为(52.3±1.8)%;0.5%  
酪蛋白(图4B)冻干活菌最高为(32.5±1.5)%;2.0%  
NBS(图4C)活菌率冻干活菌最高为(35.9±2.1)%。  
酪蛋白和NBS的对牛支原体的冻干保护效果不如  
BSA。

4)添加3种不同的氨基酸类物质的牛支原体冻  
干后活菌率。在1.0% BSA、1.5% 尿素、2.0% 海藻

糖、3.0% 葡聚糖、4.0% 蔗糖、15% 脱脂乳、4.0% 甘露  
醇的基础上,继续添加含量为0.3%、0.6%、0.9%、  
1.2%、1.5%的甘氨酸(图5A)、赖氨酸(图5B)和精氨  
酸(图5C),冻干后计算活菌率;其中添加0.3%甘氨  
酸、0.3% 赖氨酸、0.6% 精氨酸活菌率最高,分别为  
(47.2±3.0)%、(55.2±2.1)%和(36.9±1.0)%。综  
上所述,在本文“2.2.3)”的配方基础上添加0.3%的  
赖氨酸能够最显著提高牛支原体的冻干后活菌率。

### 2.3 最佳冻干保护剂配方对冻干物外形的影响及其保护效果的稳定性

根据上述试验结果,我们初步确定了牛支原体

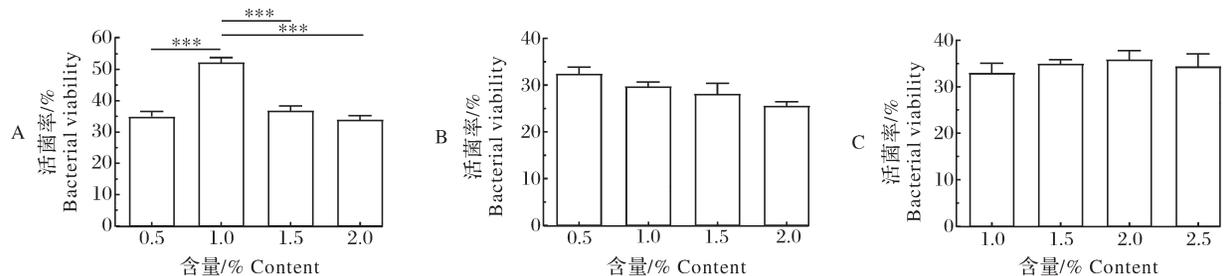


图4 添加BSA(A)、酪蛋白(B)和NBS(C)的牛支原体冻干后活菌率

Fig.4 Post-freeze-drying viability of *Mycoplasma bovis* with the addition of BSA(A), casein (B) and NBS(C)

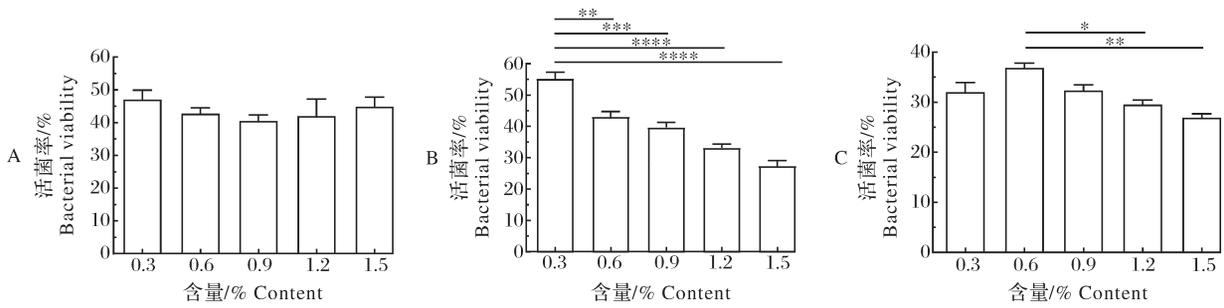


图5 添加甘氨酸(A)、赖氨酸(B)和精氨酸(C)牛支原体冻干后活菌率

Fig.5 Post-freeze-drying viability of *Mycoplasma bovis* with the addition of glycine (A), lysine (B), and arginine (C)

冻干保护剂的最佳配方,为15%脱脂乳、4.0%蔗糖、4.0%甘露醇、3.0%葡聚糖、2.0%海藻糖、1.5%尿素、1.0%BSA、0.3%赖氨酸。用该配方进行牛支原体冻干,冻干物外观呈淡黄色海绵状疏松团块,易与瓶身脱离(图6)。



图6 牛支原体HB150冻干物外观

Fig.6 *Mycoplasma bovis* HB150 strain freeze-drying material appearance

确定牛支原体最佳保护剂配方即15%脱脂乳、4.0%蔗糖、4.0%甘露醇、3.0%葡聚糖、2.0%海藻糖、1.5%尿素、1.0%BSA、0.3%赖氨酸后,将牛支原体冻干物置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 存放,以确定冻干保护剂保护效果的稳定性。在冻干后30、90、180 d,分别随机取3瓶冻干的牛支原体进行计数,结果如表4所示,冻干后活菌率在180 d内随着时间变化基本无衰减,证明我们筛选出的牛支原体最佳冻干保护剂组合具有较高的稳定性。

### 3 讨论

添加不同类型的保护剂可有效提高牛支原体HB150株冻干后的存活率,推测冻干保护剂对菌株微环境的调节、降低菌体冻干损伤、提高菌体抗冻能力等有关。研究发现,糖类物质能在冷冻过程中增加蛋白质自由能从而抑制蛋白变性,又能在干燥脱

表4 最佳冻干保护剂配方在不同保存时间下的冻干后存活情况

Table 4 Analysis of the optimal freeze-drying protectant formulation on the effect of preservation time test

保存时间/d Preservation time	冻干前平均活菌 数/( $1.0\times$ $10^9$ CFU/mL) Average number of bacteria before freeze-drying	冻干后平均活菌 数/( $1.0\times$ $10^9$ CFU/mL) Average number of bacteria after freeze-drying	冻干后活菌 率/% Viability after freeze-drying
30		1.25	55.3 $\pm$ 0.4
90	2.26	1.24	54.9 $\pm$ 0.5
180		1.20	53.1 $\pm$ 0.2

水过程中取代蛋白质与水分子间的氢键来稳定蛋白,并且不含还原基,不会使生物制品发生蛋白质褐变反应从而变质失活<sup>[10]</sup>;但葡聚糖、聚乙二醇8000这2种聚合物类保护剂在牛支原体的冷冻干燥中的作用并不明显<sup>[11]</sup>,且新生牛血清(NBS)的保护效果不如同为聚合物的牛血清白蛋白(BSA)保护效果明显。

多羟基醇能与菌体细胞膜的自由基通过水合作用降低游离水含量,减少低温下晶核的形成,稳定磷脂双分子层和膜蛋白结构,增加细胞的稳定性,从而起到保护作用<sup>[12]</sup>。山梨醇与甘露醇互为同分异构体,在本研究中,添加甘露醇作为牛支原体冻干保护性物质对提升冻干后活菌率的效果较山梨醇明显。

尿素作为低温保护剂,能够减缓冻品温度降低速度,有效保护活菌;抗坏血酸作为抗氧化剂在冻干过程中能够防止制品中的有效成分在冷冻干燥过程中发生氧化变性,从而保护菌体内的酶活性<sup>[12]</sup>,但抗坏血酸添加量超过1.2%时,制品溶液产生絮状物,物理性状发生改变,导致冻品中牛支原体的活菌率降低。

半乳糖作为冻干保护剂的一种,在制品脱水干燥过程前就已经开始发生不可逆变性,在本研究中作为牛支原体保护剂只能提供十分有限的保护效

力。因此,笔者设想使用蛋白类保护性物质,通过提高制品溶液中的蛋白浓度来降低牛支原体在冷冻干燥中的死亡率。BSA作为一种球蛋白,在冻干过程中作为填充剂为冻干制品提供支撑,本研究结果表明,相比酪蛋白和NBS,BSA在牛支原体冻干过程中显示出最好的保护效果。另外,对于冻干保护剂中添加的氨基酸类物质,本研究中使用的赖氨酸较甘氨酸、精氨酸能更好地控制冻干制品在冷冻干燥过程中溶液pH的变化,从而维持冻干制品的活性。

本研究通过正交试验设计对冻干保护剂的主成分进行了筛选,发现保护剂主成分对牛支原体冻干后存活率的影响顺序分别为:脱脂乳>海藻糖>蔗糖>葡聚糖。通过单因素试验分析12种不同物质对牛支原体冻干后活菌率的影响,筛选到甘露醇、尿素、BSA等几种对牛支原体冻干后活菌率有明显提升作用的辅助物质成分,并确定了在主成分上添加4.0%甘露醇、1.5%尿素、1.0%BSA以及0.3%赖氨酸,最终冻干后活菌率能够达到(55.2±2.1)%;同时也证实复合保护剂因各种物质之间存在互补作用,相比较单一保护剂能拥有更高的保护作用。有其他研究指出,猪肺炎支原体在冻干后6a仍能存活<sup>[13]</sup>;鸡败血支原体和滑膜支原体在冻干后分别获得了10%和90%的存活率<sup>[14]</sup>,与这些结果比较,本研究筛选出的冻干保护性物质保护牛支原体冻干后达到的存活率处于较高水平,可为后期牛支原体冻干保护剂配方优化提供物质选择的理论参考依据。

## 参考文献References

- [1] 徐恩红,祁明普,项志杰,等.牛呼吸疾病综合征七病原联合检测多重qPCR方法的建立[J].华中农业大学学报,2023,42(2):38-47. XU E H, QI M P, XIANG Z J, et al. Establishment of multiple qPCR for simultaneous detection of 7 pathogens causing bovine respiratory diseases complex [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2023, 42(4): 38-47 (in Chinese with English abstract).
- [2] HAINES D M, MARTIN K M, CLARK E G, et al. The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhoea virus in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis[J]. The Canadian veterinary journal, 2001, 42(11): 857-860.
- [3] SHAHRIAR F M, CLARK E G, JANZEN E, et al. Coinfection with bovine viral diarrhoea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia[J]. The Canadian veterinary journal, 2002, 43(11): 863-868.
- [4] NICHOLAS R A J. Bovine mycoplasmosis: silent and deadly [J]. Veterinary record, 2011, 168(17): 459-462.
- [5] LYSNYANSKY I, AYLING R D. *Mycoplasma bovis*: mechanisms of resistance and trends in antimicrobial susceptibility[J/OL]. Frontiers in microbiology, 2016, 7: 595 [2023-06-08]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00595>.
- [6] JOUKI M, KHAZAEI N, REZAEI F, et al. Production of synbiotic freeze-dried yoghurt powder using microencapsulation and cryopreservation of *L. plantarum* in alginate-skim milk microcapsules[J/OL]. International dairy journal, 2021, 122: 105133 [2023-06-08]. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105133>.
- [7] 周佳豪,雷文平,刘成国,等.高活菌数干酪乳杆菌LZ183E冻干保护剂的制备[J].食品与发酵工业,2020,46(24):138-143. ZHOU J H, LEI W P, LIU C G, et al. Preparation of *Lactobacillus casei* LZ183E lyoprotectant with high viable cell count [J]. Food and fermentation industries, 2020, 46(24): 138-143 (in Chinese with English abstract).
- [8] HOLM T P, MENG-LUND H, RANTANEN J, et al. Screening of novel excipients for freeze-dried protein formulations[J]. European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics, 2021, 160: 55-64.
- [9] 于慧春,殷勇,李欣.回归正交试验设计原理浅析[J].知识库,2020(4):203-204. YU H C, YIN Y, LI X. Analysis on the design principle of regression orthogonal experiment [J]. Knowledge library, 2020(4): 203-204 (in Chinese).
- [10] 刘玉章,姜岩,黄迪.冻干细菌保护剂研究进展[J].应用化工,2023,52(6):1865-1869. LIU Y Z, JIANG Y, HUANG D. Research progress of bacterial lyoprotectants [J]. Applied chemical industry, 2023, 52(6): 1865-1869 (in Chinese with English abstract).
- [11] 李真,姬生鑫,梁静静,等.以燕麦β-葡聚糖为主的酵母冻干保护剂优化[J].现代食品科技,2022,38(7):63-69. LI Z, JI S X, LIANG J J, et al. Optimization of yeast lyophilization protectant based on oat β-glucan [J]. Modern food science and technology, 2022, 38(7): 63-69 (in Chinese with English abstract).
- [12] 张玲,张楠驰,魏勇,等.响应面法优化羊源解淀粉芽孢杆菌冻干保护剂配方[J].西南民族大学学报(自然科学版),2022,48(1):22-28. ZHANG L, ZHANG N C, WEI Y, et al. Optimization of cryoprotectant formulation for *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from goat by response surface methodology [J]. Journal of Southwest Minzu University (natural science edition), 2022, 48(1): 22-28 (in Chinese with English abstract).
- [13] 吕立新,毛洪先,钱建飞.肺炎支原体的分离与冻干保存[J].畜牧与兽医,1994,26(4):173. LÜ L X, MAO H X, QIAN J F. Isolation and lyophilized preservation of *Mycoplasma pneumoniae* [J]. Animal husbandry & veterinary medicine, 1994, 26(4): 173 (in Chinese).

- [14] 文希震. 支原体的冻干保存[J]. 畜牧兽医简讯, 1979(4):54. animal husbandry and veterinary medicine, 1979(4): 54 (in Chinese).  
WEN X Z. Lyophilized preservation of mycoplasma[J]. Gansu

## Pre-screening study on freeze-drying protectants for *Mycoplasma bovis*

ZHANG Yisheng<sup>1,2</sup>, ZHANG Sen<sup>1,2</sup>, LIU Guoxing<sup>1,2</sup>, LIU Xijian<sup>1,2</sup>,  
YANG Li<sup>3</sup>, CHEN Jianguo<sup>2</sup>, GUO Aizhen<sup>1,2,4</sup>, CHEN Yingyu<sup>1,2</sup>

1. National Key Laboratory of Agricultural Microbiology in Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
3. Wuhan Keqian Biology Co., Ltd., Wuhan 430070, China;
4. Hubei Hongshan Laboratory, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** In order to explore the effective protective substances for freeze-drying *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*), this study employed a four-factor, four-level orthogonal design experiment alongside a single-factor experiment. The effects of skim milk, sucrose, mannitol, glucan, trehalose, urea, BSA, lysine, and other substances on the survival rate of *M. bovis* were detected by measuring the number of the live *M. bovis* HB150 post freeze-drying and the optimal concentrations and ratios of the different protective agents were ultimately established. The ratios of the main and auxiliary components of the freeze-drying protectants were determined through orthogonal design experiments, and the final ratios of the lyophilized protectants were as follows: 15% skimmed milk, 4.0% sucrose, 4.0% mannitol, 3.0% glucan, 2.0% alginate, 1.5% urea, 1.0% BSA, and 0.3% lysine. When freeze-drying at  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 12 Pa for 20 h, this formulation maintained the highest activity rate of *M. bovis*, reaching  $(55.2\pm 2.1)\%$ . The results indicated that the selected dynamic dry protectants exhibited a strong protective effect and could be effectively applied in the actual freeze-drying process of *M. bovis*.

**Keywords** *Mycoplasma bovis*; freeze drying; protective agents; orthogonal design experiments; vaccines

(责任编辑:边书京)