

植物乳杆菌漱口水的制备及其防龋效果的初步研究

吴晨铭¹, 曹海涛¹, 施雨祺², 朱 晗², 赵 颖¹, 裘迪红^{1*}

¹杭州医学院公共卫生学院, 浙江 杭州

²杭州医学院存济口腔医学院, 浙江 杭州

收稿日期: 2024年3月8日; 录用日期: 2024年5月4日; 发布日期: 2024年5月14日

摘要

采用对变异链球菌具有抑制作用的植物乳杆菌为原料制备漱口水, 通过正交实验, 确定最佳配比。通过人工体外菌斑模型, 测定不同生长时期且不同处理后人工体外菌斑模型的pH值变化情况, 对其防龋效果进行初步研究。结果显示, 漱口水最佳配比为卡拉胶0.03 mg, 阿斯巴甜0.2 mg, 低聚果糖0.4 mg, 甘油15 mL。成功建立了人工体外菌斑模型, 随着体外菌斑在产酸液中培养时间的延长, 产酸液中的pH呈现下降趋势; 植物乳杆菌漱口水对生长48 h及96 h人工体外菌斑代谢产酸都有明显的抑制作用($P < 0.01$)。由此可见, 植物乳杆菌漱口水具备一定的防龋效果。

关键词

植物乳杆菌, 漱口水, 体外菌斑模型, 防龋

Preparation of *Lactiplantibacillus plantarum* Mouthwash and Its Anti-Caries Effect

Chenming Wu¹, Haitao Cao¹, Yuqi Shi², Han Zhu², Ying Zhao¹, Dihong Qiu^{1*}

¹School of Public Health, Hangzhou Medical University, Hangzhou Zhejiang

²Cunji College of Stomatology, Hangzhou Medical College, Hangzhou Zhejiang

Received: Mar. 8th, 2024; accepted: May 4th, 2024; published: May 14th, 2024

Abstract

Mouthwash was produced using *Lactiplantibacillus plantarum* with an inhibitory effect on *Strep-*
*通讯作者。

文章引用: 吴晨铭, 曹海涛, 施雨祺, 朱晗, 赵颖, 裘迪红. 植物乳杆菌漱口水的制备及其防龋效果的初步研究[J]. 食品与营养科学, 2024, 13(2): 227-233. DOI: 10.12677/hjfn.2024.132029

tococcus mutans. The optimal conditions were obtained by orthogonal experiments. Its anti-dental caries effect was investigated by measuring the pH values after different growth periods and different treatments using an artificial *in vitro* plaque model. The results showed that the optimal formulation was as follows: carrageenan 0.03 mg, aspartame 0.2 mg, fructooligosaccharides 0.4 mg, glycerin 15 mL. The *in vitro* plaque model was established successfully. By prolonging the cultivation time of *in vitro* plaque in an acid-producing solution, the pH values of the acid-producing solution reduced gradually. *L. plantarum* mouthwash had a significantly inhibitory effect on acid production by the artificial *in vitro* plaque at 48 and 96 hours of growth ($P < 0.01$). Therefore, the *L. plantarum* mouthwash possessed a remarkable anti-dental caries effect.

Keywords

Lactiplantibacillus plantarum, Mouthwash, *In Vitro* Plaque Model, Dental Caries Prevention

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

龋病在我国的发病率较高，12岁儿童龋齿的患病率为34.5%，中年人龋齿患病率为88.1%，老年人高达98.4%，龋病严重影响了人们的生活[1]。龋病的进展是一个连续矿化和脱矿化交替变化的过程。牙齿表面的牙菌斑是龋病发生的始动因子，牙菌斑是细菌分泌物质产生的一种典型的生物膜。变异链球菌(*Streptococcus mutans*)是公认的人类口腔中最主要的致龋细菌，目前仅有10%~20%的龋损中检测不到变异链菌，它能破坏牙体组织，并且具有很强的粘附能力和产多糖能力，在刺激肽(CSP)和ComD/ComE双组分信号转导系统组成的QS系统的调节下，会促进牙齿表面致龋性生物膜的进一步形成和发展[2]-[7]。

目前，控制龋病的方法主要有机械法和药物法，但它们都有明显的不足之处，临床上使用的漱口水多为化学剂或中西药混合配方剂，有些对细胞有中度毒性，可能的副作用包括灼烧感、苦味和黏膜染色，有的使细菌对抗生素的耐药性增加。因此，益生菌治疗龋齿逐渐成为热门，益生菌在对龋病的治疗中发挥了很大作用[8][9]。口腔益生菌能竞争性抑制口腔致病菌粘附和定殖，尤其可以减少唾液中变异链球菌的数量，调节粘膜免疫功能[10]。乳酸菌为主的细菌替代疗法越来越受到关注，乳酸菌产品的开发方兴未艾[11][12]。漱口水作为控制菌斑的一种方法，在口腔疾病的预防及治疗中起着重要的作用。它可以进入很多牙刷难以到达的区域，弥补刷牙的不足[13][14]。研究表明益生菌植物乳杆菌对牙面的酸蚀作用弱，对溶菌酶的耐受性高，有利于菌种的存活，具备漱口水原料的先决条件，因此，本文利用实验室分离筛选的一株对变异链球菌有抑制作用的植物乳杆菌为主要成分研制漱口水，制成一种新型的安全有效的绿色口腔护理清洁液，通过益生菌的作用调节口腔微生态，抑制有害菌的生长，防止牙菌斑的产生[15][16]，解决了传统漱口水的不足之处，本研究的成果可以为口腔护理提供一种新的产品，为防治口腔龋病提供新方法。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

植物乳杆菌(实验室保藏)；低聚果糖、水、甘油、卡拉胶；LB培养基、MRS液体培养基；人混合唾液：通过咀嚼橡皮圈刺激产生唾液，并收集在小烧杯中，4℃冷藏，备用；

TSB 培养液：将 12 克胰蛋白和 40 克葡萄糖溶于去离子水中，配成 400 ml 溶液，121℃，15 min，冷却，用时加入新鲜的刺激性人混合唾液 26 ml；

产酸液：将 0.12 克胰蛋白陈和 20 克葡萄糖用三蒸水配成 400 ml 溶液，121℃，15 min，冷却，备用。

2.2. 仪器与设备

玻璃棒：直径 5 mm，长 90 mm，一端用于固定，另一端依次用 240、320、400 和 600 目砂纸磨毛，磨毛长度为 25 mm，再用 600 目砂纸打磨，去离子水冲洗后，晾干，备用。

pH 计；恒温培养箱；超净台。

2.3. 方法

2.3.1. 漱口水的制备

(1) 植物乳杆菌菌悬液制备：

取 1 ml 菌液于 10 ml MRS 液体培养基中，活化二次，4℃ 保藏备用。

(2) 漱口水的制备流程

先将胶体(K 型卡拉胶)分散于甘油、低聚果糖，阿斯巴甜，再加入去离子水，充分搅拌，并加热至一定温度下保温 15 分钟，然后降温至 40℃，再将植物乳杆菌菌悬液 5% (V/V)加入，直至混合均匀，装瓶，冷藏。

2.3.2. 漱口水配方的优化

(1) 正交试验设计

在单因素试验基础上确定的原料设计正交试验，设计四因素(低聚果糖、阿斯巴甜、甘油、卡拉胶)三水平 $L_9(3^4)$ ，以确定益生菌漱口水最佳配比，如表 1 正交试验设计因素与水平所示。

Table 1. Factors and levels used for orthogonal array experiment

表 1. 正交试验设计因素与水平

水平/因素	阿斯巴甜(mg)	甘油(mL)	卡拉胶(mg)	低聚果糖(mg)
1	0.1	5	0.01	0.2
2	0.2	8	0.03	0.4
3	0.4	10	0.05	0.6

评分标准：外观透明、口感好、稳定性好、无粘性 5 分；外观较透明、口感较好、稳定、无粘性 4 分；外观不透明、口感适中、稳定性一般、粘稠 3 分；外观不透明、口感一般、不稳定、较粘稠 2 分；外观浑浊、口感差、久置沉淀、很粘稠 1 分。

稳定性观察：将漱口水置于 48℃、40℃与-10℃冷热循环条件下观察 3 天，观察外观是否有变化。轻摇既混匀既判定为稳定，轻摇不能混匀既判定为分层[17]。

2.3.3. 人工体外菌斑模型的建立及体外菌斑代谢产酸检测

(1) 人工体外菌斑模型的建立

将经过处理的玻璃棒固定于预先准备好的架子上，将架子放入培养箱中。玻璃棒下固定加有刺激性人混合唾液试管，调节试管与玻璃棒的位置，使得玻璃棒浸入一定体积的刺激性人混合唾液 10 mm 处，37℃ 培养过夜。再在相同体积的 TSB 培养液的试管培养 6 h，然后换成新鲜刺激性人混合唾液培养过夜。这样，体外菌斑就形成了一定的规模，重复上述过程几个循环，玻璃棒上就形成了不同生长时期的菌斑了。

(2) 体外菌斑代谢产酸检测

不同生长时期(48 h, 96 h)体外菌斑模型代谢产酸量的比较: 取 8 支玻璃棒分成 2 组, 每组 4 支, 第 1 组不用漱口水处理, 直接将 48 h 菌斑浸入产酸液中培养 6 h; 第 2 组不用漱口水处理, 直接将 96 h 菌斑浸入产酸液中培养 6 h, 比较不同生长时期体外菌斑代谢产酸情况。

人工体外菌斑(48 h)在产酸液中培养不同时间代谢产酸量变化: 取 10 支玻璃棒, 分成 5 组每组 2 支。将 48 h 体外菌斑不经任何漱口水处理, 分别浸入产酸液中, 在培养 0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h 时取出一组, 测量并记录产酸液的 pH 值, 比较不同培养时间体外菌斑代谢产酸量的变化情况。

(3) 漱口水对不同生长时期人工体外菌斑模型代谢产酸的影响

漱口水对生长 48 h 人工体外菌斑模型代谢产酸的影响: 取 9 支玻璃棒, 分成 3 组, 每组 3 支。3 组先形成 48 h 体外菌斑。第 1 组不用药物处理, 第 2 组用漱口液处理, 第 3 组用商品漱口水处理。三组玻璃棒分别浸入产酸液中培养 6 h, 测量并记录产酸液的 pH, 比较三组代谢产酸的差异情况。

漱口水对生长 96 h 人工体外菌斑模型代谢产酸的作用: 取 9 支玻璃棒, 分成 3 组, 每组 3 支。3 组先形成 96 h 体外菌斑。第 1 组不用药物处理, 第 2 组用漱口液处理, 第 3 组用商品漱口水处理。三组玻璃棒分别浸入产酸液中培养 6 h, 测量并记录产酸液的 pH, 比较三组代谢产酸的差异情况。

2.4. 数据分析

采用 SPSS1.3 进行数据处理, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

3. 结果与分析

3.1. 配方确定

Table 2. Orthogonal array design with experimental results

表 2. 正交实验设计与结果

试验号	阿斯巴甜(mg) A	甘油(mL) B	卡拉胶(mg) C	益生元(mg) D	综合评分
1	0.1	10	0.01	0.2	3.0
2	0.1	15	0.03	0.4	4.5
3	0.1	20	0.05	0.6	3.5
4	0.2	10	0.03	0.6	4.5
5	0.2	15	0.05	0.2	3
6	0.2	20	0.01	0.4	4
7	0.4	10	0.05	0.4	3
8	0.4	15	0.01	0.6	3.5
9	0.4	20	0.03	0.2	4
k1	3.7	3.5	3.5	3.3	
k2	3.8	3.8	4.3	3.8	
k3	3.5	3.7	3.2	3.8	
R	0.3	0.3	1.1	0.5	

由于益生菌是细胞结构, 强行溶解将会破坏其生物活性, 因此, 要将益生菌添加到漱口水中就必须有合适的悬浮体系让其均匀分散在漱口水中。经过筛选我们采用卡拉胶作为稳定剂, 既让益生菌能够被

很好的分散、悬浮，又让漱口水不粘腻，具有清水一般的口感。为了促进益生菌生长，我们选择益生元低聚果糖，保水剂甘油和甜味剂阿斯巴甜，经正交实验得出最佳配比，如表 2 正交实验设计与结果所示，最佳配比为 C2D2A2B2，即卡拉胶 0.03 mg，阿斯巴甜 0.2 mg，低聚果糖 0.4 mg，甘油 15 mL。

3.2. 体外菌斑模型建立

Table 3. Acids produced of 48 h and 96 h artificial in vitro plaque

表 3. 不同生长时期体外菌斑代谢产酸情况

生长时间(h)	pH 值(X ± S)
0	7.670 ± 0.096
48	6.832 ± 0.042
96	6.614 ± 0.140

我们拟采用人工体外菌斑模型来评价漱口水的防龋效果，通过对不同生长时期(48 h, 96 h)的体外菌斑产酸情况比较发现，体外菌斑在产酸液中 37℃ 培养 6 h 后，96 h 的菌斑的因为生长时间增加，产量也增加，产酸液中 pH 比 48 h 的明显降低，具体结果见表 3 不同生长时期体外菌斑代谢产酸情况，原因是随着时间的延长，在玻璃棒上形成的菌斑的量增加，菌斑中细菌的量也增加了，代谢产酸量也增加。

Table 4. The pH value of the in vitro plaque model after different growth periods

表 4. 不同培养时间体外菌斑 pH 值

培养时间(h)	pH 值 (X ± S)
0 小时	7.670 ± 0.096
0.5 小时	7.414 ± 0.019
1.0 小时	6.951 ± 0.072
2.0 小时	6.813 ± 0.216
4.0 小时	6.967 ± 0.172
6.0 小时	6.785 ± 0.044

从体外菌斑不同培养时间的 pH 变化来看，随着体外菌斑在产酸液中培养时间延长，产酸液 pH 总体呈现下降趋势，具体结果见表 4 不同培养时间体外菌斑 pH 值。从表中可以发现，在 1 h 内 pH 下降迅速，到了 6 h 基本稳定，所以设定 6 h 的培养时间可以了解模型的 pH 变化规律，通过 pH 变化规律可以了解体外菌斑代谢产酸情况，进而可以来判断漱口水对菌斑代谢产酸的影响。由此可见，本实验建立的模型可以作为评价漱口水的防龋效果的方法之一。

3.3. 漱口水对不同生长时期人工体外菌斑模型代谢产酸的影响结果

Table 5. The pH values of 48 h in vitro plaque model measured by mouthwash

表 5. 漱口水处理后生长 48 h 体外菌斑 pH 值

别	pH 值 (X ± S)
对照组	4.733 ± 0.150
商用漱口水组	5.930 ± 0.080
植物乳杆菌漱口水组	5.608 ± 0.221

三组生长 48 h 菌斑的玻璃棒分别浸入产酸液中培养 6 h 后, 产酸液的 pH 值如表 5 漱口水处理后生长 48 h 体外菌斑 pH 值, 各组之间存在显著差异($P < 0.05$), 植物乳杆菌漱口水处理过的组与对照组相比, 对生长 48 h 体外菌斑代谢产酸的抑制作用极显著($P < 0.01$), 对生长 48 h 体外菌斑代谢产酸的抑制作用植物乳杆菌漱口水组与商用漱口水组也存在显著差异性($P < 0.05$), 植物乳杆菌漱口水比商用漱口水更具优势。

Table 6. The pH values of 96 h in vitro plaque model measured by mouthwash

表 6. 漱口水处理后生长 96 h 体外菌斑 pH 值

组别	pH 值($X \pm S$)
对照组	4.867 \pm 0.121
商用漱口水组	6.390 \pm 0.168
植物乳杆菌漱口水组	6.430 \pm 0.086

植物乳杆菌漱口水对生长 96 h 体外菌斑代谢产酸的抑制作用非常明显, 具体结果见表 6 漱口水处理后生长 96 h 体外菌斑 pH 值。植物乳杆菌漱口水组与对照组存在显著差异性($P < 0.01$), 植物乳杆菌漱口水组与商用漱口水组不存在显著差异性($P > 0.05$), 因此, 与商用的漱口水相比, 植物乳杆菌漱口水对初期的牙菌斑抑制效果优于后期的。

总而言之, 通过体外菌斑模型, 可以发现植物乳杆菌漱口水对预防龋病具有一定效果, 与商用的漱口水相比具有同样的防龋效果, 而且对于早期的龋病更有优势, 可以作为预防龋病的口腔护理产品, 当然, 作为一个产品, 还需要做更多的功能性试验和安全性试验, 同时需要进行临床试验进一步确定其功能。

4. 讨论

体外菌斑的代谢产酸过程是一个动态的、连续的、可逆的过程, 随着生长时间的延长, 产酸液的 pH 值总体呈现下降趋势, 反映了体外菌斑的代谢活性和酸性环境的变化。本研究中, 植物乳杆菌漱口水有效的抑制体外菌斑代谢产酸, 从而保护牙齿和口腔组织的健康。植物乳杆菌漱口水与商用漱口水的效果有所不同, 可能与它们的成分和作用机制有关[18]。植物乳杆菌漱口水含有植物乳杆菌, 它是一种有益的微生物, 能够抑制致龋菌的生长, 促进口腔微生态平衡, 增强口腔免疫力。商用漱口水则含有一些化学成分, 它们能够杀灭口腔中的细菌, 同时也破坏了口腔正常的微生态平衡, 影响口腔健康, 也会导致口腔中的细菌的耐药性, 影响杀菌效果[19]。因此, 植物乳杆菌漱口水更适合长期使用, 而商用漱口水则需要适度使用。

5. 结论

本文利用实验室分离筛选的一株对变异链球菌具有抑制作用的植物乳杆菌为主要成分研制一种绿色健康的漱口水, 通过正交试验确定最佳配比, 最佳条件是卡拉胶 0.03 mg, 阿斯巴甜 0.2 mg, 低聚果糖 0.4 mg, 甘油 15 mL, 漱口水具有稳定性好, 口感合适等优点。经过体外菌斑代谢产酸试验发现, 植物乳杆菌漱口水对生长 48 h 及 96 h 人工体外菌斑代谢产酸都出现明显的抑制作用, 具有一定的防龋效果, 因此, 植物乳杆菌可以作为一种新型的安全有效的口腔护理清洁液的原料制备漱口水, 防止龋病的发生。

基金项目

省级大学生创新创业训练计划项目(项目编号: S202313023056)。

参考文献

- [1] 王兴. 第四次全国口腔健康流行病学调查报告[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.

- [2] 陈智, 陈瑞甜. 龋病再认识[J]. 口腔医学研究, 2020, 36(1): 1-6.
- [3] Rugg-Gunn, A. (2013) Dental Caries: Strategies to Control This Preventable Disease. *Acta Medica Academica*, **42**, 117-130. <https://doi.org/10.5644/ama2006-124.80>
- [4] Chen, D.R. and Lin, H.C. (2022) [Research Updates: Cariogenic Mechanism of *Streptococcus mutans*]. *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*, **53**, 208-213.
- [5] Kilian, M., Chapple, I.L.C., Hannig, M., *et al.* (2016) The Oral Microbiome—An Update for Oral Healthcare Professionals. *British Dental Journal*, **221**, 657-666. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>
- [6] 周学东. 龋病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [7] Senadheera, D. and Cvitkovich, D.G. (2008) Quorum Sensing and Biofilm Formation by *Streptococcus mutans*. In: Utsumi, R., Ed., *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 631, Springer, New York, 178-188. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78885-2_12
- [8] Krzysciak, W., Jurczak, A., Koscielniak, D., *et al.* (2014) The Virulence of *Streptococcus mutans* and the Ability to Form Biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **33**, 499-515. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1993-7>
- [9] 胡佩男. 口腔微生物与龋病防治的研究进展[J]. 现代医药卫生, 2022, 38(9): 1531-1535.
- [10] 黄银. 植物乳杆菌 FB-T9 对龋病的防治作用研究[D]: [硕士学位论文]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [11] 陈敏珊, 郑娟, 李平. 口腔微生态的研究进展及益生菌在口腔护理中的应用研究[J]. 口腔护理用品工业, 2023, 33(1): 4-12.
- [12] 乔荣更, 贾宇, 张红星, 等. 可抑制口腔致病菌的乳酸菌筛选及其抑菌特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(11): 75-81.
- [13] 肖蒙, 孟昭旭, 彭悦, 等. 益生菌对治疗口腔疾病的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(17): 373-377.
- [14] 尚颜, 石晓峰, 张景华, 等. 漱口水抑制牙齿菌斑和牙龈炎的临床效果观察[J]. 泰山医学院学报, 2012, 33(4): 298-299.
- [15] 张环, 尹利娟, 陆瑜, 等. 益生菌在口腔中的应用研究[J]. 口腔护理用品工业, 2021, 31(2): 18-20.
- [16] 杨志雷, 刘宝盈. 龋病牙菌斑微生态研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2020, 47(5): 506-514.
- [17] 李劲峰, 高鹰, 宁科功, 等. 益生菌漱口水悬浮体系的开发研究[J]. 口腔护理用品工业, 2021, 31(2): 14-17.
- [18] 徐丽丽. 不同漱口水对口腔细菌抑制效果的实验研究[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- [19] Bonez, P.C., dos Santos Alves, C.F., Dalmolin, T.V., *et al.* (2013) Chlorhexidine Activity against Bacterial Biofilms. *American Journal of Infection Control*, **41**, E119-E122. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.05.002>