文章编号:1000-5404(2005)12-1211-02

论著

木糖醇对变形链球菌生长和产酸影响的体外实验研究

韩　旭,刘鲁川,张静哲,行勇军　　(第三军医大学大坪医院野战外科研究所口腔科,重庆 400042)

提　要:目的　研究木糖醇对变形链球菌生长和产酸的影响。**方法**　分别用含有 3%蔗糖、2%木糖醇的培养基厌氧条件培养变形链球菌,测量培养基的 D (600)值和 pH 值。**结果**　变形链球菌在木糖醇培养基内生长和产酸均受到明显抑制,在加木糖醇的蔗糖培养基内细菌的生长和产酸也下降。**结论**　木糖醇可以抑制变形链球菌的生长和产酸,可作为一种理想的防龋甜味剂。

关键词:木糖醇;变形链球菌;生长;产酸
中图法分类号:R378.12; R446.5; R914.3　　**文献标识码**:A

In vitro study of xylitol on growth and acid production of *Streptococcus mutans*

HAN Xu, LIU Lu-chuan, ZHANG Jing-zhe, XING Yong-jun (Department of Stomatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective　To study the inhibitory effect of xylitol on the growth and acid production of *streptococcus mutans*. **Methods**　*Streptococcus mutans* were incubated respectively in 3% sucrose culture medium and 2% xylitol culture medium under anaerobic conditions. The D (600) and pH value of the mediums were measured. **Results**　The growth and acid production of *streptococcus mutans* were inhibited significantly in the xylitol culture medium, and xylitol also retarded the growth and acid production of the bacteria in sucrose culture medium. **Conclusion**　Xylitol can inhibit the growth and acid production of *streptococcus mutans*, and can be used as a promising sweetener for preventing caries risk.

Key words: xylitol; *streptococcus mutans*; growth; acid production

木糖醇由于具有与蔗糖同等的甜度,相似的味度和理化性质,使其成为了一种应用十分广泛的糖代替品,而大量研究表明[1~3],长期食用含木糖醇的食品可以明显的降低龋的发病率,减少牙菌斑和唾液中的变形链球菌数量,故将木糖醇作为防龋物质也越来越受人们重视。本研究比较木糖醇和蔗糖对变形链球菌生长和产酸的影响,来论证木糖醇防龋方面发挥的作用,为人们进一步研究、使用木糖醇提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验菌株和培养基

1.1.1　实验菌株　Ingbritte 变形链球菌(血清 C 型),四川大学华西口腔医学院提供。

1.1.2　培养基　①蔗糖培养基:胰蛋白胨 1.5 g、大豆胨 0.5 g、NaCl 0.5 g、酵母提取物 0.5 g、盐酸半胱氨酸 0.04 g、蔗糖 3 g,加蒸馏水至 100 ml;②木糖醇培养基:以木糖醇代替蔗糖,使木糖醇浓度为 2%,其余成分同蔗糖培养基;③木糖醇-蔗糖培养基:在蔗糖培养基中加木糖醇,使后者浓度为 2%。上述 3 种培养基充分溶解后,调 pH 至 7.5,高温高压消毒 20 min,备用。

1.2　实验仪器

多功能离子计(pH 计)、净化工作台、厌氧培养箱、紫外分光光度计、电子分析天平、干热鼓风干燥箱。

1.3　实验方法

1.3.1　变形链球菌复苏、培养和菌悬液的制备　在无菌工作台内,接种冻干的变形链球菌 Ingbritte C 型至蔗糖培养基内,37 ℃,90%N_2、10%CO_2 条件下培养 48 h 后,取少量菌液接种在含蔗糖的琼脂平板上,相同条件下培养 48 h,再挑取单个菌落至蔗糖培养基内,厌氧培养 24 h 后在分光光度计上测 600 nm 处的吸光度为 1.5,此菌液为本实验的所需工作菌悬液。

1.3.2　变形链球菌在 3 种培养基内的生长、产酸情况的比较　取含上述 3 种培养 5 ml 试管各 10 支,每支接种 0.1 ml 的变形链球菌菌悬液,37 ℃,90%N_2、10%CO_2 条件下培养 24 h,在分光光度计上测量 D (600)值,并用离子计测量培养基的 pH 值。

1.4　统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计程序进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　木糖醇对变形链球菌生长情况的影响

3 种培养基培养变形链球菌 24 h 的 D(600)值见表 1,木糖

作者简介:韩　旭(1976-),女,辽宁省锦州市人,硕士研究生,医师,主要从事龋病学方面的研究。电话:(023)68719549
通讯作者:刘鲁川,电话:(023)68757738
收稿日期:2004-10-10;修回日期:2005-01-05

醇培养基内细菌的生长受到抑制，$D(600)$值明显低于其他两种，木糖醇-蔗糖培养基的 $D(600)$值低于蔗糖培养基，统计学上有非常显著差异（$P<0.01$）。

2.2 木糖醇对培养基 pH 值的影响

木糖醇培养基 pH 明显高于其他两组，木糖醇-蔗糖培养基 pH 高于蔗糖培养基，有非常显著性差异（$P<0.01$），见表 1。

表 1 变形链球菌在 3 种培养基的生长和产酸情况（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Growth of streptococcus mutans in 3 culture media ($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Substrate	$D(600)$	pH
Sucrose	1.65 ± 0.05	3.85 ± 0.03
Xylitol + sucrose	$1.34\pm0.09^{*}$	$4.03\pm0.05^{*}$
Xylitol	$0.15\pm0.04^{*\triangle}$	$7.30\pm0.08^{*\triangle}$

$F=1650.372$, $P=0.000$, *: $P<0.01$, *vs* sucrose; △: $P<0.01$, *vs* xylitol + sucrose

3 讨论

牙菌斑内的细菌代谢食物中的糖，在短时间内产生大量的乳酸等有机酸，使牙釉质中的无机盐发生溶解，是龋病发生的直接原因。变形链球菌是牙菌斑中最主要的致龋菌，对龋病的发生、发展起着决定性的作用。研究表明由于木糖醇的结构特点使其不能被牙菌斑中的变形链球菌等口腔内的主要微生物分解、利用，对牙菌斑 pH 的影响很小而被广泛认为是非龋性的糖代替品。但是它的确切防龋机制还不十分清楚，目前认为木糖醇主要通过抑制变形链球菌的产酸和生长而发挥其直接的防龋作用。本研究考察体外木糖醇对变形链球菌生长和产酸的影响，结果显示木糖醇培养基内细菌的生长明显下降，在加了木糖醇的蔗糖培养基内细菌的生长及产酸也受到了抑制。

培养基浊度的改变主要是由细菌的生长引起，故细菌的生长情况可以用 $D(600)$值即细菌浊度表示，$D(600)$值越高表明细菌生长的越旺盛。本实验中在经过 24 h 培养后木糖醇培养基仍比较清澈，仅在试管底部可见少量的白色沉积物，$D(600)$值最低，为 0.15，说明木糖醇不能为细菌生长提供营养来源，细菌的生长受到明显的抑制。这可能是由于变形链球菌的非特异性的果糖磷酸转移酶系统可以将木糖醇转运至细胞内，导致磷酸化的代谢产物的堆积，抑制变形链球菌的生长。同时 Hrimech 等[4]在实验中还发现，木糖醇可以干扰变形链球菌的蛋白合成及热休克蛋白 60、热休克蛋白 70 的表达，进而影响变形链球菌的生长。本实验的研究结果与 Sahni 等[5]研究一致。而经过 24 h 培养后，可见蔗糖培养基及蔗糖-木糖醇培养基则变得比较浑浊，蔗糖培养基的 $D(600)$值为 1.65，加了木糖醇的蔗糖培养基细菌的 $D(600)$值为 1.34，说明木糖醇还可以抑制细菌对蔗糖的吸收、利用，它的这种作用可能是通过竞争性抑制变形链球菌的磷酸烯醇式丙酮酸依赖性磷酸转化酶系统（PEP-PTS）而抑制对葡萄糖的吸收、转运。

培养基的最终 pH 值表示了细菌的代谢产酸水平，在本实验中 3 种培养基的 pH 均有所下降，但木糖醇培养基的 pH 最高为 7.30，蔗糖培养基 pH 最低为 3.85，而含木糖醇的蔗糖培养基 pH 介于两者之间为 4.03，这一结果表明木糖醇可以抑制细菌的糖代谢产酸。这可能是由于细菌通过 PEP-木糖醇-PTS 系统将木糖醇转运至细胞内部后，在细胞内木糖醇被磷酸化形成五木糖醇磷酸盐（X5P）和五木酮糖磷酸盐（Xy5P），它们能够抑制糖代谢所需的酶的活性，进而使变形链球菌的产酸力下降。Assev 等[6]发现细胞内的木酮糖磷酸盐是由五木糖醇磷酸盐经过脱氢后形成的，在脱氢的过程中，辅酶 I（NAD^+）被还原成还原型辅酶 I（NADH），使得糖酵解的其他环节可利用的 NAD^+ 减少，进而使糖酵解能力下降，产酸下降。同时，细胞内的 X5P 还可以进一步的脱磷酸还原为木糖醇而被释放到细胞外，木糖醇的这种磷酸-脱磷酸过程被称为“无效循环”，在这一循环过程会消耗大量的 PEP，而 PEP 是合成 ATP 的磷酰基的供体和 PEP-PTS 系统的能量来源。因此，“无效循环”的存在也可以减少细菌的生长和产酸量。

综上所述，变形链球菌在木糖醇培养基内生长、产酸均受到抑制，进一步证明了木糖醇作为糖代替品及一种新型防龋食品的良好应用前景。

参考文献：

[1] Alanen P, Isokangas P, Gutmann K. Xylitol candies in caries prevention: results of a field study in Estonian children [J]. Community Dent Oral Epidemiol, 2000, 28(3): 218 - 224.

[2] Hayes C. The effect of non-cariogenic sweeteners on the prevention of dental caries: a review of the evidence [J]. J Dent Educ, 2001, 65(10): 1106 - 1109.

[3] Soderling E, Trahan L, Tammiala Salonen T, *et al*. Effects of xylitol, xylitol-sorbitol, and placebo chewing gums on the plaque of habitual xylitol consumers [J]. Eur J Oral Sci, 1997, 105(2): 170 - 177.

[4] Hrimech M, Mayrand D, Grenier D, *et al*. Xylitol disturbs protein synthesis, including the expression of HSP-70 and HSP-60, in Streptococcus mutans [J]. Oral Microbiol Immunol, 2000, 15(4): 249 - 257.

[5] Sahni P S, Gillespie M J, Botto R W, *et al*. *In vitro* testing of xylitol as an anticariogenic agent [J]. Gen Dent, 2002, 40(4): 340 - 343.

[6] Assev S, Rolla G. Further studies on the growth inhibition of Streptococcus mutans OMZ 176 by xylitol [J]. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B], 1986, 94(2): 97 - 102.

（编辑 陈聪连）