

# 唾液链球菌抑制变形链球菌生物膜作用的 发酵条件优化

Optimal cultivation conditions for *Streptococcus salivarius* BD3900 to express substances capable of inhibiting *Streptococcus mutans* biofilm formation

于亚男<sup>1,2</sup> 吴正钧<sup>2,3</sup> 韩 璠<sup>3,4</sup>

YU Ya-nan<sup>1,2</sup> WU Zheng-jun<sup>2,3</sup> HAN Jin<sup>3,4</sup>

(1. 乳业生物技术国家重点实验室, 上海 200436; 2. 上海乳业生物工程技术研究中心, 上海 200436;  
3. 光明乳业股份有限公司光明乳业研究院, 上海 200436; 4. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

(1. State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Shanghai 200436, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Dairy Biotechnology, Shanghai 200436, China; 3. Dairy Research Institute, Bright Dairy & Food Co., Ltd., Shanghai 200436, China; 4. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**摘要:**为提高唾液链球菌 BD3900 代谢产物对变形链球菌生物膜的抑制作用,以变形链球菌生物膜形成量的抑制率为指标,分别考察了培养时间、培养温度、碳源种类、蔗糖浓度、接种量 5 个因素对 BD3900 抑制变形链球菌生物膜的影响。结果表明,优化后的培养条件为:培养时间 16 h、培养温度 34 ℃、蔗糖浓度 1 g/100 mL。经过发酵条件优化后, BD3900 代谢产物对变形链球菌生物膜的抑制作用相比优化前提高了 10%,其作用机制可能是减少变形链球菌生物膜中不溶性胞外多糖的产生。

**关键词:**唾液链球菌 BD3900; 变形链球菌; 生物膜形成量; 培养条件; 不溶性胞外多糖

**Abstract:** In order to increase the metabolites of the strain BD3900 inhibiting the *S. mutans* biofilm formation, the inhibition rate of biofilm formation by *Streptococcus mutans* was used as indexes. The effects of the cultivation time and temperature, the carbon resources, the concentration of sucrose and the inoculum amount were investigated. The results showed that optimal cultivation conditions were composed of a cultivation period of 16 h, a cultivation temperature of 34 ℃, and a sucrose concentration of 1 g/100 mL. Under the optimized cultivation conditions, the inhibitory ability of the strain BD3900 on the formation of *S. mutans* biofilm was in-

creased by 10%, compared with the results before optimization. The mechanism involved in the inhibiting of *S. mutans* biofilm formation by the strain BD3900 was probably decreasing the insoluble exopolysaccharides synthetization.

**Keywords:** *Streptococcus salivarius* BD3900; *Streptococcus mutans*; biofilm formation; cultivation conditions; insoluble exopolysaccharide

龋齿是一种普遍存在于儿童和成人中的慢性口腔传染病,其成因与变形链球菌(*Streptococcus mutans*)在牙齿表面的定殖有着密切的联系<sup>[1]</sup>。其中,变形链球菌生物膜吸附其他细菌在牙釉表面所形成的牙菌斑也是致龋的关键因素之一,减少或抑制生物膜的形成同样可达到防治龋齿的目的。目前抗生素疗法是临床上治疗龋齿的主要手段,但长期使用抗生素容易造成耐药菌株的出现,造成二次感染。因此,寻找一种副作用小、认可度高的治疗手段已迫在眉睫。

随着益生菌在肠道疾病方面的疗效逐渐被认可,很多学者开始将其转而应用于口腔疾病的防治上<sup>[2]</sup>。*S. salivarius*不但可作为口服益生菌来使用,还可通过阻止化脓性链球菌的定殖,调节支气管和咽上皮细胞中的 IL-8 分泌与先天免疫应答来保持口腔的健康<sup>[3]</sup>,被认为是牙周病原体(牙龈卟啉单胞菌 ATCC 33277 和放线菌 ATCC 43718)的潜在拮抗剂<sup>[4]</sup>。郭夏蕾等<sup>[5]</sup>发现,植物乳杆菌 K25 不仅对变形链球菌菌膜有较高的抑制率,还显著降低变形链球菌的黏附率。由此可见,这种以菌(益生菌)治菌(变形链球菌)的方式规避了抗生素疗法弊端,从而达到安全、无害防治龋齿的目的。

*S. salivarius* BD3900 (CGMCC13308) 是一株筛选自健康人体口腔的唾液链球菌,这类微生物是婴儿出生后最先定

**基金项目:**上海市闵行区重大产业技术攻关项目(编号:2015MH093);上海乳业生物工程技术研究中心(编号:16DZ2280600)

**作者简介:**于亚男,女,上海海洋大学在读硕士研究生。

**通信作者:**吴正钧(1955—),男,光明乳业股份有限公司教授级高级工程师,硕士。E-mail: wuzhengjun@brightdairy.com

**收稿日期:**2017-08-09

殖在口腔的乳酸菌之一<sup>[6]</sup>。前期研究发现, BD3900 可代谢产生影响变形链球菌生物膜形成的抑制物。目前国内外鲜有关于唾液链球菌合成抑制变形链球菌生物膜形成的物质的相关研究, 本试验拟对影响唾液链球菌 BD3900 在代谢过程中产生抑制变形链球菌生物膜形成的物质的培养条件及其作用机理进行研究, 为今后进一步阐明相关生物效应分子的化学结构提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

变形链球菌 (*Streptococcus mutans* CGMCC1.2499): 中国普通微生物保藏中心 (CGMCC);

唾液链球菌 BD3900 (*Streptococcus salivarius* CGMCC13308): 由乳业生物技术国家重点实验室提供;

BHI 合成培养基、M17 合成培养基: 英国 Oxoid 公司;

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaCl}$ 、99% 乙醇、结晶紫试剂: 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

高压蒸气灭菌锅: HVE-50 型, 日本 Hirayama 公司;

厌氧培养箱: Bug Box DUAL 型, 英国 Ruskinn 公司;

电子天平: XW-80A 型, 上海青浦沪西仪器厂;

小型冷冻离心机: 5417R 型, 德国 Eppendorf 公司;

pH 计: PHS-25 型, 美国奥立龙公司;

多功能酶标仪: M5 型, 美国 Molecular Devices 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化 将 *S. mutans*、*S. salivarius* BD3900 的冻存菌种分别划线于 BHI 和 M17 固体培养基, 37 °C 厌氧培养 24 h, 挑取单菌落传代备用。

1.2.2 种子液的制备 将活化 2 代的 BD3900 接种于 M17 液体培养基中, 37 °C 过夜静置培养, 取发酵液 9 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 菌体用 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 遍, 除去残留的培养基, 最后将菌体悬浮于少量 M17 液体培养基中, 调整其活菌数为  $10^8$  CFU/mL 作为种子液, 备用。

1.2.3 *S. mutans* 生物膜形成量的测定 根据文献 Barira Islam 等<sup>[7]</sup>的方法, 修改如下: 将新鲜培养的 *S. mutans* 用液体 BHI 制备成  $10^5$  CFU/mL 菌悬液, 备用。将采用不同培养条件获得的 BD3900 发酵液用硫酸铵沉淀后, 沉淀物用 pH 6.8 的 PBS 复溶, 经 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤后作为待测样品。在 96 孔培养板中分别加入 50  $\mu\text{L}$  *S. mutans* 菌悬液、50  $\mu\text{L}$  待测样品和 100  $\mu\text{L}$  含 0.25 g/100 mL 蔗糖的 BHI 液体, 以加入 100 °C 加热 5 min 后的待测样品为阴性对照。37 °C 厌氧培养 24 h 后, 去除培养液, 用去离子水将培养小孔洗涤 3 次, 去除游离细菌; 自然干燥后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  1 g/L 的结晶紫溶液, 室温下染色 15 min 后去除染色液, 以去离子水冲洗去除未吸附的结晶紫, 自然干燥后每孔加入 200  $\mu\text{L}$  99% 乙醇使染料充分释放, 使用酶标仪检测各孔的  $OD_{600}$  值, 按式(1) 计算生物膜形成量的抑制率。

$$I = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

$I$ ——变形链球菌生物膜形成量的抑制率, %;

$A_1$ ——阴性对照组在波长 600 nm 下的吸光度;

$A_2$ ——试验组在波长 600 nm 下的吸光度。

1.2.4 培养时间对 BD3900 抑膜物质产量的影响 将 BD3900 种子液 ( $10^8$  CFU/mL) 按 1 mL/100 mL 接种量接种于添加 1 g/100 mL 蔗糖的 M17 液体培养基中, 37 °C 静置培养 12, 16, 20, 24 h 后取出发酵液, 9 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 置于磁力搅拌器上, 缓慢添加研成细粉状的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 直至硫酸铵饱和度为 20%, 9 000 r/min 离心 30 min, 取沉淀 (保留上清液), 以原发酵液 1/100 体积的 PBS 复溶, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 再用 0.22  $\mu\text{m}$  无菌滤膜过滤后即得饱和度为 20% 的硫酸铵沉淀复溶物 (ASP)。向上述保留的上清液中继续添加  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  至 40% 饱和度, 依次得到 40%, 60%, 80%, 100% 饱和度下的 ASP。按照 1.2.3 方法测定不同 ASP 样品下 *S. mutans* 生物膜的形成量, 以 100 °C 加热 5 min 后的样品为阴性对照。计算各样品对 *S. mutans* 生物膜形成量的抑制率, 确定最佳的培养时间和硫酸铵饱和度。

1.2.5 碳源种类对 BD3900 抑膜物质产量的影响 分别添加浓度为 1g/100mL 不同的碳源 (葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖) 于 M17 液体培养基中, 在 37 °C、接种量 1 mL/100 mL、培养时间 16 h、60% 饱和度硫酸铵沉淀的条件下, 按照 1.2.3 方法计算各样品对 *S. mutans* 生物膜形成量的抑制率。

1.2.6 蔗糖浓度对 BD3900 抑膜物质产量的影响 分别添加不同浓度 (0.25, 1.00, 2.00, 3.00 g/100 mL) 的蔗糖于 M17 液体培养基中, 在 37 °C、接种量 1 mL/100 mL、培养时间 16 h、60% 饱和度硫酸铵沉淀的条件下, 按照 1.2.3 方法计算各样品对 *S. mutans* 生物膜形成量的抑制率。

1.2.7 培养温度对 BD3900 抑膜物质产量的影响 在接种量 1 mL/100mL, 蔗糖浓度 1 g/100 mL, 分别于 30, 37, 42 °C 培养 16 h, 以 60% 硫酸铵饱和度进行沉淀, 按照 1.2.3 方法计算各样品对 *S. mutans* 生物膜形成量的抑制率。

1.2.8 接种量对 BD3900 抑膜物质产量的影响 分别按照 1, 3, 5, 7 mL/100 mL 的接种比例, 在 37 °C、蔗糖浓度 1 g/100 mL、培养时间 16 h、60% 饱和度硫酸铵沉淀的条件下, 按照 1.2.3 方法计算各样品对 *S. mutans* 生物膜形成量的抑制率。

1.2.9 响应面优化 对上述单因素试验结果进行显著性分析, 选取 3 个最显著的影响因素, 以 *S. mutans* 生物膜形成量的抑制率为响应值, 设计响应面试验。每组试验重复 3 次。

1.2.10 优化后样品生物膜形成量的测定 取优化前 (最佳单因素培养条件: 蔗糖浓度 1 g/100 mL, 培养时间 16 h, 培养温度 37 °C, 接种量 1 mL/100 mL) 和优化后的 BD3900 发酵上清液的 ASP, 将对应样品 100 °C 处理 5 min 后为各自的阴性对照, 分别测其对 *S. mutans* 生物膜的抑制率。

1.2.11 作用机理的研究 将培养条件优化前、后发酵上清

液采用 60% 饱和度硫酸铵沉淀的 ASP 按 1.2.3 方法培养、洗涤、自然干燥后,向小孔中加入 200  $\mu\text{L}$  1 mol/L 的 NaOH, 3 000 r/min 离心 10 min,取上清,按苯酚硫酸法<sup>[8]</sup>测定不溶性胞外多糖的含量。

### 1.3 数据处理

采用 Design Expert 8.0 与 SPSS 17.0 软件进行数据处理和显著性分析,其中  $P < 0.05$  表示具有显著性差异, $P > 0.05$  表示无显著性差异;运用 Excel 进行图表绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验

**2.1.1 培养时间对 BD3900 抑膜物质产量的影响** 由图 1 可知,相同的培养条件下,不同饱和度的 ASP 对 *S. mutans* 生物膜形成的抑制效果差异显著。以培养时间 16 h 为例,采用 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 分级沉淀得到的 ASP 样品,测其对 *S. mutans* 的生物膜的抑制率分别为 0.94%, 12.10%, 69.00%, 8.40%, 8.60%, 可见,60% 硫酸铵饱和度获得的 ASP 的抑膜效果显著优于其他饱和度下的。相同的情况出现在其他培养时间(12, 20, 24 h)的发酵上清液中(除 ASP<sub>60%</sub> 外,其他饱和度下的 ASP 对 *S. mutans* 生物膜均无明显抑制活性),因此,60% 是优选的硫酸铵饱和度,下述试验均采用 ASP<sub>60%</sub> 为待测样品。

其次,在确定了最适硫酸铵饱和度后,比较不同培养时间(12, 16, 20, 24 h)发酵液的 ASP<sub>60%</sub> 与 *S. mutans* 共培养后生物膜的形成量,发酵初期(12 h) ASP<sub>60%</sub> 样品测得的生物膜的抑制率略低(54.6%),中期(16 h)样品的抑制率最高(69.0%),后期(20, 24 h)样品逐渐失去抑膜活性(63.5%, 17.8%),可能是培养基中营养物质比例失衡,导致细菌合成有害的代谢产物从而使抑膜物质的活性降低<sup>[9]</sup>。因此, BD3900 产抑膜物质的最适发酵时间为 16 h。

**2.1.2 碳源对 BD3900 抑膜物质产量的影响** 由图 2 可知,以葡萄糖、麦芽糖、乳糖分别为碳源时, BD3900 发酵液与对应灭活对照组的生物膜形成量几乎处于同一水平(抑制率分别为 2.9%, 10.1%, 5.8%),均无显著抑膜活性,而从含有蔗糖的 M17 发酵液所得到的 ASP 样品明显抑制了 *S. mutans* 生物膜的产量(抑制率为 64.6%),表明培养基中添加蔗糖可

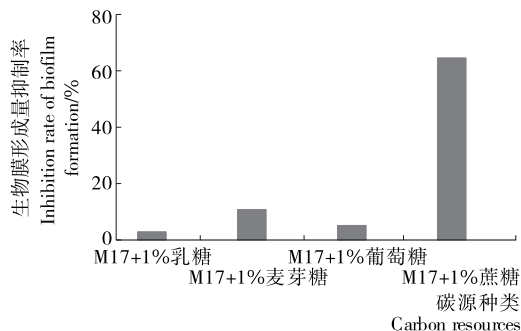


图 2 碳源对抑膜物质合成的影响

Figure 2 Effect of carbon resources on synthesis of anti-biofilm substances

有效诱导 BD3900 抑膜物质的合成。因此,蔗糖是诱导 BD3900 产生抑膜物质的必要碳源。在研究唾液链球菌抑制牙周菌斑生物膜的形成因素时, Ayako Ogawa 等<sup>[10]</sup>发现了类似的现象,可能是蔗糖诱导其产生大量分解蔗糖的水解酶造成的。

**2.1.3 蔗糖浓度对 BD3900 抑膜物质产量的影响** 由图 3 可知,加入从低浓度蔗糖(0.25, 1.00 g/100 mL)的 M17 培养基中所获得 BD3900 抑膜物质后,变形链球菌生物膜的形成量分别降低了 64.9%, 67.6%;随着 M17 培养基中蔗糖含量的提高(2.00, 3.00 g/100 mL), BD3900 代谢产物对生物膜的抑制率分别下降为 8.1%, 5.8%, 抑制膜活性几乎完全消失。可能是当培养液中蔗糖浓度过高时, BD3900 自身也会合成浓度较高的高分子胞外多糖,其中部分胞外多糖会被硫酸铵沉淀带入样品,掩蔽 ASP 对变形链球菌生物膜形成的抑制作用。因此,后期还需做进一步的试验加以论证。

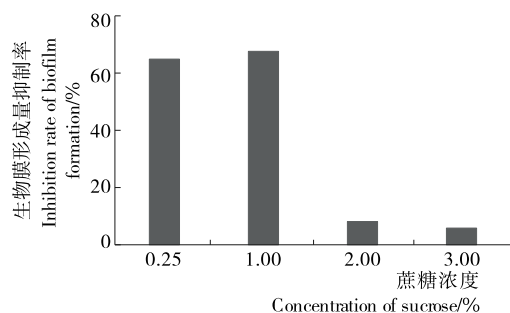


图 3 蔗糖浓度对抑膜物质合成的影响

Figure 3 Effect of sucrose concentration on the synthesis of anti-biofilm substances

**2.1.4 培养温度对抑膜物质合成的影响** 温度是影响微生物生长的重要因素之一,会影响部分代谢产物的积累及合成相关物质的酶的表达。由图 4 可知,从 30, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养所获得 BD3900 抑膜物质对 *S. mutans* 生物膜形成的抑制作用显著高于从 42  $^{\circ}\text{C}$  培养所获得的,表明在较低的温度下进行培养更有利于 BD3900 抑膜物质积累抑制 *S. mutans* 生物膜的形成,培养温度过高会影响菌体胞内蛋白质、核酸等大分子的基本活性与功能,从而造成细胞膜功能受损以及胞内酶生物活性的降低,最终导致抑膜物质合成的不足甚至缺失<sup>[11]</sup>。相比于 30  $^{\circ}\text{C}$  和 42  $^{\circ}\text{C}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  的样品具备更强抑膜活性(生物

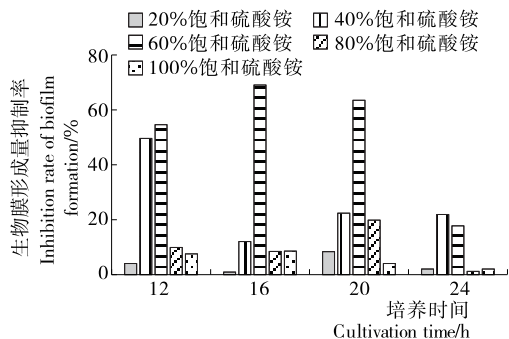


图 1 不同培养时间和硫酸铵分级沉淀下 ASP 对生物膜形成量的影响

Figure 1 Effect of cultivation time and ammonium sulfate at different saturation of ASP on biofilm formation

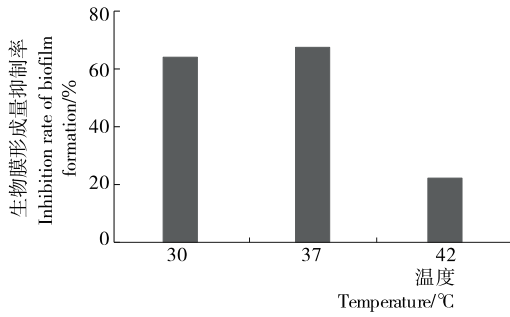


图4 培养温度对抑膜物质合成的影响

Figure 4 Effect of cultivation temperature on the synthesis of anti-biofilm substances

膜抑制率 67.5%), 因此, 在后续条件优化时, 选择 37 °C 作为温度的中心点。

2.1.5 接种量对抑膜物质合成的影响 由图 5 可知, 从不同接种量(1, 3, 5, 7 mL/100 mL)培养所获得 BD3900 抑膜物质对 *S.mutans* 生物膜形成的抑制作用分别为 67.7%, 66.2%, 66.9%, 65.0%。表明在培养 16 h 时, 不同接种量之间的差异性不大, 接种量与 BD3900 抑膜物质的产量无直接关系, 所以不作为响应面的考察因素, 后续试验均采用 1 mL/100 mL 的接种量。

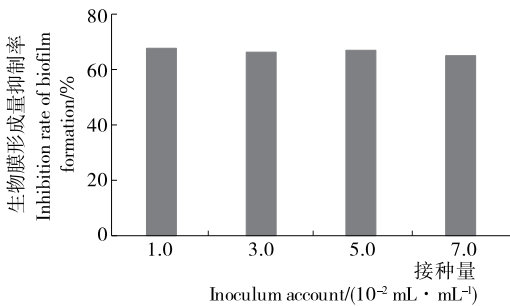


图5 接种量对抑膜物质合成的影响

Figure 5 Effect of inoculum account on the synthesis of anti-biofilm substances

2.2 抑膜物质产量的响应面优化

2.2.1 试验结果 将上述优化的单因素(培养时间、培养温度、蔗糖浓度以及接种量)结果经 SPSS17.0 分析得培养时间、培养温度和蔗糖浓度 P 值均 < 0.05, 因此选取培养时间、培养温度和蔗糖浓度 3 个显著因素, 以对变形链球菌生物膜形成量的抑制率为响应值, 采取三因素三水平的优化试验(见表 1), 结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 试验设计因素水平及编码

Table 1 Factors levels and their coded in Box-Behnken design

水平	A 培养时间/h	B 培养温度/°C	C 蔗糖浓度/%
-1	12	30	0.25
0	16	36	1.13
1	20	42	2.00

表 2 发酵条件优化的中心组合设计试验及结果

Table 2 Experimental design and results of central composite design for optimization of fermentation conditions

试验号	A	B	C	生物膜形成量抑制率/%
1	1	0	-1	48.9
2	0	0	0	61.6
3	0	0	0	62.7
4	-1	0	-1	50.9
5	1	1	0	5.5
6	0	-1	-1	45.2
7	1	-1	0	48.1
8	-1	0	1	45.5
9	0	-1	1	48.4
10	-1	-1	0	50.0
11	0	1	1	6.4
12	0	0	0	62.3
13	1	0	1	43.4
14	0	1	-1	10.9
15	0	0	0	63.3
16	0	0	0	65.3
17	-1	1	0	7.8

2.2.2 回归模型建立与显著性分析 对表 2 中的试验数据通过 Design Expert 8.0 软件进行回归拟合, 得二次多项式回归模型方程:

$$Y = 63.04 - 1.04A - 20.14B - 1.52C - 0.100AB - 0.025AC - 1.92BC - 7.87A^2 - 27.32B^2 - 8.00C^2 \quad (2)$$

该模型的 P < 0.000 1, 说明模型差异及其显著, 失拟项 P = 0.130 7, 表明不具有显著性。综合分析可知该模型具有可适用性。回归模型的决定系数为 0.996 1, 说明该模型有一定代表性, 可解释 99.61% 的变化。表 3 列出了采用上述

表 3 抑膜物质发酵条件优化的回归分析(方差分析)

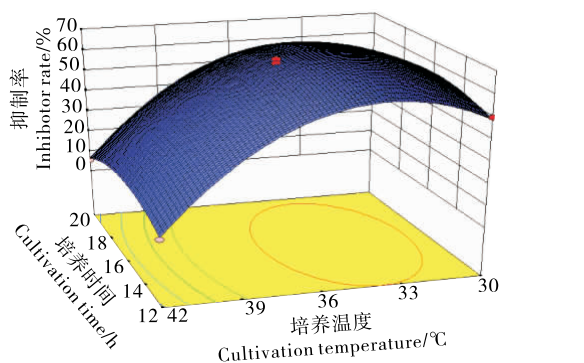
Table 3 Regression analysis(ANOVA) for optimization of fermentation conditions of anti-biofilm substances

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	7 214.00	9	801.56	197.12	<0.000 1
A	8.61	1	8.61	2.12	0.188 9
B	3 244.15	1	3 244.15	797.80	<0.000 1
C	18.60	1	18.60	4.58	0.069 7
AB	0.04	1	0.04	9.83E-003	0.923 8
AC	2.50E-03	1	2.50E-03	6.14E-004	0.980 9
BC	14.82	1	14.82	3.65	0.097 9
A <sup>2</sup>	260.79	1	260.79	64.13	<0.000 1
B <sup>2</sup>	3 142.66	1	3 142.66	772.84	<0.000 1
C <sup>2</sup>	269.14	1	0.02	269.14	<0.000 1
残差	28.46	7	4.07		
失拟项	20.55	3	6.85	3.46	0.130 7
纯误差	7.91	4	1.98		
总和	7 272.46	16			

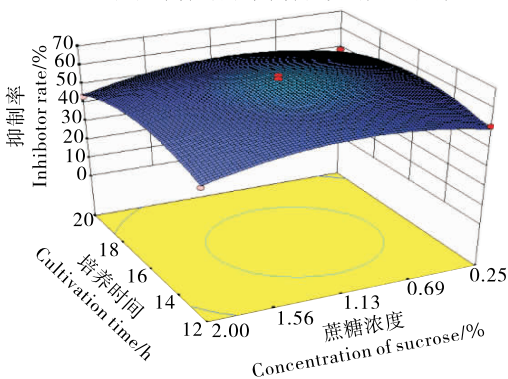
模型对 BD3900 产抑膜物质培养条件进行的分析和预测结果,通过比较其中的  $F$  值可知,各因素对抑膜物质合成量的影响顺序为:培养温度>蔗糖浓度>培养时间。

2.2.3 响应面分析 由图 6(a)、(c)可知,培养时间与培养温度,培养温度与蔗糖浓度之间的交互影响作用比较强,而图 6(b)中的培养时间和培养温度的交互作用较弱。

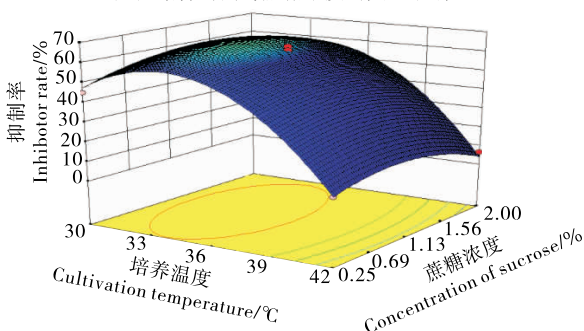
2.2.4 条件优化后的验证实验 通过 Design Expert 8.0 分析得 BD3900 产抑膜物质的最佳条件为:培养时间 15.75 h、培养温度 33.80 °C、蔗糖浓度 1.08 g/100 mL,在此条件下发酵液生物膜形成量抑制率为 69.8%。为了实验操作方便,将培养条件稍作调整:培养时间 16 h、培养温度 34 °C、蔗糖浓度 1 g/100 mL。按照调整后的培养条件进行发酵,测该条件下的生物膜形成抑制率为 71.5%,相比预测值提高了 2.4%,可见该模型能够较好地预测试验结果。由图 7 可知,优化后的 ASP 样品生物膜的抑制率为 71.5%,相比优化前(最佳单



(a) 培养时间与培养温度的交互影响



(b) 培养时间与蔗糖浓度的交互影响



(c) 培养温度与蔗糖浓度的交互影响

图 6 3 种因素对 BD3900 抑膜物质产量影响的响应面

Figure 6 Response surface for the effects of three factors on anti-biofilm substances by BD3900

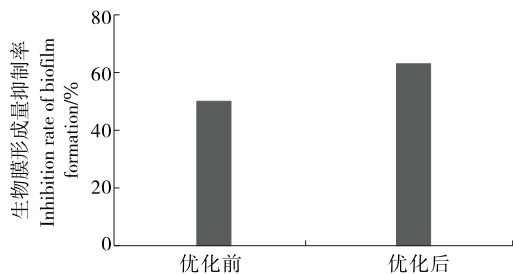


图 7 优化前与优化后的 ASP 对生物膜形成量的影响  
Figure 7 Effect of ASP on biofilm formation before and after optimization

因素培养条件:蔗糖浓度 1 g/100 mL,培养时间 16 h,培养温度 37 °C,接种量 1 mL/100 mL;抑制率为 65.0%)抑制率提高了 10%。

2.2.5 BD3900 抑制变形链球菌生物膜作用机理的探索 变形链球菌致龋过程为:*S.mutans* 细胞在其表面蛋白的介导下特异性附着在牙釉表面的获得性膜上;随后以口腔内的蔗糖为底物利用自身分泌的葡糖基转移酶合成不溶性葡聚糖紧密附着在牙齿表面,形成牙菌斑生物膜<sup>[12]</sup>。变形链球菌生物膜的形成是导致致龋的关键因素之一,通过抑制或减少变形链球菌生物膜形成,可以达到防治龋齿的目的。Wu 等<sup>[13]</sup>确定了 2 种唾液乳杆菌(*L. salivarius*K35 和 *L. salivarius*K43),不仅对变异链球菌生物膜形成具有抑制作用,而且通过电镜扫描和 qRT-PCR 分析发现可降低变形链球菌不溶性胞外多糖的产量。由于不溶性多糖是牙菌斑生物膜中至关重要的物质,因此,本试验从不溶性多糖含量的角度衡量优化前后 ASP 抑膜能力的差异。由表 4 可知,优化前反应体系中不溶性多糖的含量为 85.0  $\mu\text{g/mL}$ ,优化后为 44.1  $\mu\text{g/mL}$ ,相比于优化前不溶性胞外多糖的合成量降低了 51.6%,可以推测 BD3900 的抑膜机理与其能够减少不溶性胞外多糖的含量存在一定的关系。

表 4 优化前后生物膜中不溶性多糖的含量

Table 4 The content of insoluble polysaccharides in the biofilm before and after optimization

组别	不溶性胞外多糖/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
优化前	85.0
优化后	44.1
对照组	250.0

### 3 结论

为提高唾液链球菌 BD3900 在 M17 培养基中合成抑膜物质的能力,本研究首先通过考察了单因素(培养时间、培养温度、蔗糖浓度、接种量)试验对 BD3900 合成抑膜物质的影响,确定了 3 个影响显著的因素,即培养时间、培养温度、蔗糖浓度。然后通过 Design Expert 8.0 利用响应面法对培养条件进行优化获得 BD3900 在 M17 培养基中产生抑制变形链球菌生物膜形成物质的优化培养条件。优化的条件为培

(下转第 51 页)

- both gas and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1 079(s1/2): 136-145.
- [17] BRAUNRATH R, CICHNA M. Sample preparation including sol-gel immunoaffinity chromatography for determination of bisphenol A in canned beverages, fruits and vegetables [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1 062(2): 189-198.
- [18] 李丽莎, 杨湘霞, 汪莉. 高效液相色谱法检测桶装饮用水中双酚 A[J]. 实用预防医学, 2006, 13(2): 429-430.
- [19] IMANAKA M, SASAKI K, NEMOTO S, et al. Determination of bisphenol A in foods using GC/MS[J]. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 2001, 42(2): 71-78.
- [20] 陈啟荣, 魏岩, 郎爽, 等. 加速溶剂萃取/气相色谱-质谱法测定糖果包装材料中的双酚 A[J]. 食品科学, 2010(6): 165-167.
- [21] FLOOD H, KNAPP W J. Comparison of Elisa-and LC-MS-based methodologies for the exposure assessment of bisphenol A[J]. Toxicology Mechanisms & Methods, 2006, 16(8): 427-430.
- [22] ZHENG Jie, ZHANG Kun, ZHAO Su-qing. Study on Spectral and immune identification of artificial antigen of bisphenol A[J]. Spectroscopy & Spectral Analysis, 2008, 28(7): 1 583-1 586.
- [23] ZHAO Mei-ping, LI Yuan-zong, GUO Zhen-quan, et al. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of estrogenic bisphenols[J]. Talanta, 2002, 57(6): 1 205-1 210.
- [24] ZHU Xiao-li, HAN Kun, LI Gen-xi. Magnetic nanoparticles applied in electrochemical detection of controllable DNA hybridization[J]. Analytical Chemistry, 2006, 7(4): 285-289.
- [25] HUI W, ERKANG W. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles as peroxidase mimetics and their applications in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glucose detection.[J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(6): 2 250-2 254.
- [26] TSAI H Y, HSU C F, CHIU I W, et al. Detection of C-reactive protein based on immunoassay using antibody-conjugated magnetic nanoparticles [J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(21): 8 416-8 419.
- [27] ZHANG Jia-jia, DAI Pei-qing, LI Chao, et al. A symmetrically split g-quadruplex DNAzymes biosensor based on magnetic nanoparticles for the rapid detection of Hg<sup>2+</sup> [J]. Acta Chimica Sinica, 2014, 72(9): 1 029-1 035.
- [28] TANG Dian-ping, LIU Bing-qian, Niessner R, et al. Target-induced displacement reaction accompanying cargo release from magnetic mesoporous silica nanocontainers for fluorescence immunoassay[J]. Analytical chemistry, 2013, 85(21): 10 589-10 596.
- [29] YUNJ S, SUK H J, SUNG H Y, et al. Novel antibody/gold nanoparticle/magnetic nanoparticle nanocomposites for immunomagnetic separation and rapid colorimetric detection of Staphylococcus aureus in milk[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 43(1): 432-439.
- [30] AMBROSI A, CASTANEDA M T, KILLARD A J, et al. Double-codified gold nanolabels for enhanced immunoanalysis [J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(14): 5 232-5 240.

(上接第 38 页)

养时间 16 h、培养温度 34 °C、蔗糖浓度 1 g/100 mL,该条件下 BD3900 产生的抑制物质对变形链球菌生物膜形成抑制达到 71.5%,比未优化前提高了 10%。通过对比优化前后样品以及对对照组样品对变形链球菌合成的不溶性多糖的产量,推测 BD3900 所产生的物质可能是通过减少 *S.mutans* 不溶性多糖的合成,从而抑制其生物膜的形成量,但影响变形链球菌生物膜形成的因素众多,还需进一步的试验进行论证。

### 参考文献

- [1] BURTON J P, DRUMMOND B K, CHILCOTT C N, et al. Influence of the probiotic Streptococcus salivarius strain M18 on indices of dental health in children; a randomized double-blind, placebo-controlled trial [J]. Journal of Medical Microbiology, 2013, 62(6): 875-884.
- [2] WESCOMBE P A, HALE J D, HENG N C, et al. Developing oral probiotics from Streptococcus salivarius[J]. Future Microbiology, 2012, 7(12): 1 355-1 371.
- [3] KACI G, GOUDERCOURT D, DENNIN V, et al. Anti-Inflammatory Properties of Streptococcus salivarius, a Commensal Bacterium of the Oral Cavity and Digestive Tract[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(3): 928-934.
- [4] VAN Hoogmoed C G, GEERTSEMA-DOORNBUSCH G I, TEUGHELIS W, et al. Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains[J]. Oral Microbiology Immunology, 2008, 23: 43-48.
- [5] 郭夏蕾, 张健, 杨贞耐. 抑制口腔变异链球菌的乳酸菌筛选及其抑菌机理[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 117-122.
- [6] KACI G, GOUDERCOURT D, DENNIN V, et al. Anti-inflammatory properties of Streptococcus salivarius, a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(3): 928-934.
- [7] BARIRA I, KHAN S N, HAQUE I, et al. Novel anti-adherence activity of mulberry leaves: inhibition of Streptococcus mutans biofilm by 1-deoxynojirimycin isolated from Morus alba[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 62(4): 751-757.
- [8] 池源, 王丽波. 苯酚-硫酸法测定南瓜籽多糖含量的条件优化[J]. 食品与机械, 2014, 30(1): 89-92.
- [9] 李润静. 产果聚糖蔗糖酶菌株筛选及酶的分离纯化、酶学性质研究和 levan 果聚糖的酶法合成[D]. 无锡: 江南大学, 2013: 43.
- [10] OGAWA A, FURUKAWA S, FUJITA S, et al. Inhibition of Streptococcus mutans Biofilm Formation by Streptococcus salivarius FruA [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2011, 77(5): 1 572-1 580.
- [11] 范文姬, 吴正钧, 郭本恒. 响应面法优化干酪乳杆菌 LC2W 代谢产 α-葡萄糖苷酶抑制剂的发酵条件[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(10): 228-231.
- [12] 梁景平. 牙菌斑生物膜特性研究进展[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2007, 27(2): 123-127.
- [13] WU C C, LIN C T, WU C Y, et al. Inhibitory effect of Lactobacillus salivarius on Streptococcus mutans biofilm formation [J]. Molecular Oral Microbiology, 2015, 30(1): 16-27.