

右旋糖酐酶的吸附和固定方法及其对生物膜的影响

蒋明星¹, 张 钰¹, 何禧梦¹, 赵云洁¹, 李 翠¹,
易梦镏¹, 李黎仙², 刘 萍², 毕晓旭^{1*}

(1. 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214;
2. 云南白药集团健康产品有限公司, 云南 昆明 650214)

摘要: 为较好地消除生物膜, 采用 BCA 法和 DNS 法分别探索羟基磷灰石吸附和固定化右旋糖酐酶的最适条件及酶活, 以吸附和固定化右旋糖酐酶的羟基磷灰石干预变异链球菌生物膜。结果显示: 最佳吸附比为 1:20, 吸附时间为 1 h, 吸附率可高达 23.9%; 最佳的固定化条件为 0.02% 戊二醛交联 2 h, 固定化率最高可达 17.6%, 最高酶活分别为 0.32 U/mg 和 0.35 U/mg。在上述条件下, 吸附和固定化右旋糖酐酶的羟基磷灰石均能较好地清除变异链球菌生物膜的完整性。

关键词: 右旋糖酐酶; 羟基磷灰石; 吸附和固定化; 变异链球菌生物膜

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639 (2021) 06-0078-06

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2021.06.012

Adsorption and Immobilization Methods of Dextranase and Effects on Biofilm

JIANG Mingxing¹, ZHANG Yu¹, HE Ximeng¹, ZHAO Yunjie¹, LI Cui¹,
YI Mengzhuo¹, LI Lixian², LIU Ping², BI Xiaoxu^{1*}

(1. School of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;
2. Yunnan Baiyao Group Health Products Co., Ltd., Kunming, Yunnan, China 650214)

Abstract: In order to eliminate biofilm better, the adsorption of hydroxyapatite and immobilization of dextranase were studied respectively with the methods of BCA and DNS to get the optional condition and enzyme activities, then the hydroxyapatite adsorbed or immobilized by dextranase was used to interfere the biofilm of Streptococcus mutans. The results showed that the best adsorption ratio of hydroxyapatite to dextranase was 1:20; the adsorption time was 1 h, and the adsorption rate reached 23.9%. The best immobilization condition was 0.02% glutaraldehyde cross-linked for 2 h, and the immobilization rate reached 17.6%. The highest enzyme activity reached 0.32 U/mg and 0.35 U/mg, respectively. Under the above conditions, hydroxyapatite that adsorbed or immobilized by dextranase can better eliminate the integrity of biofilm of Streptococcus mutans.

Key words: dextranase; hydroxyapatite; adsorption and immobilization; streptococcus mutans biofilm

龋齿作为口腔最常见的疾病之一, 在人群中的发病率一直居高不下。研究^[1-2]表明, 变异链球菌是引起龋齿的最主要致病菌, 其会在牙齿的表面形成牙菌斑生物膜, 从而形成一个局部的微生态环境。此外, 由于其能够充分利用碳水化合物并代谢

为乳酸, 且这些酸性物质会在局部环境中持续产生腐蚀牙齿的主要结构物质—磷酸钙^[3]。目前, 虽然市场上已有针对这类口腔致病菌, 且具有显著作用的杀菌剂, 但由于其杀菌的广谱型, 可能会进一步破坏口腔生态菌群的平衡, 以及增加细菌的抗药

收稿日期: 2021-04-13

基金项目: 昆明学院引进人才科研项目 (YJL18006, YJL18004); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2021J0709); 云南省大学生创新训练项目 (S201911393034, 202011393002)。

作者简介: 蒋明星 (1988—), 男, 江苏盐城人, 讲师, 博士, 主要从事口腔致病菌抑制剂研究。

*通信作者: 毕晓旭 (1986—), 女, 云南昭通人, 讲师, 博士, 主要从事天然产物活性研究, E-mail: bxx2797@163.com.

性^[4]和对宿主细胞的细胞毒性^[5]。然而, 生物酶制剂与这类抑菌化合物相比较, 则显得更加安全、有效。

右旋糖酐酶是一种能够裂解高分子右旋糖酐中的 α -1, 6 葡萄糖酐键的水解酶^[6], 其变异链球菌生物膜的主要成分是葡聚糖, 为生物膜结构的建筑支架。由于右旋糖酐酶能够有效地水解葡聚糖, 从而破坏生物膜结构、抑制牙菌斑的形成^[7]。而羟基磷灰石 (HAP) 是一种具有生物活性和生物相容性的材料, 其化学组成与人类牙釉质的磷灰石晶体很相似^[8]。研究^[9-11]表明, 羟基磷灰石可以吸附到牙齿表面, 促进牙釉质和牙本质表面再矿化, 增强釉质的抗龋力。此外, 羟基磷灰石具有特殊的孔状结构和表面化学性质, 从而具有良好的吸附性能^[12], 且对蛋白质也具有较好的吸附作用^[13-14]。因此, 可尝试利用羟基磷灰石吸附和固定化右旋糖酐酶, 以消除牙菌斑生物膜, 缓解龋齿。

本文对羟基磷灰石吸附和固定化右旋糖酐酶的方法进行探索, 并通过体外模拟变异链球菌生物膜, 以及使用吸附右旋糖酐酶的羟基磷灰石进行干预, 旨在为生物酶牙膏研发提供一种方法。

1 材料与方法

1.1 材料

右旋糖酐酶 (宁夏夏盛实业集团有限公司); 羟基磷灰石和羟基磷灰石圆片 (云南白药集团健康产品有限公司惠赠); 葡聚糖 T40 (源叶生物公司); 异麦芽糖 (合肥巴斯夫生物科技有限公司); TaKaRa BCA Protein Assay Kit (宝生物工程(中国)有限公司); LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher 科技公司); 变异链球菌 ATCC25175 (广东省微生物研究所)。

1.2 仪器

酶标仪 (SPECTRA MAX 190); 水浴震荡培养箱 (上海一恒); 高速冷冻台式离心机 (Eppendorf 5810R); 24 孔细胞培养板 (Corning-Costar); 厌氧培养罐 (日本三菱); 水浴锅 (常州国华); 超高分辨共聚焦显微镜 (Leica TCS SP8 STED)。

1.3 方法

1.3.1 右旋糖酐酶的吸附和吸附率

称取一定质量的羟基磷灰石置于 10 mL 离心管中, 向其中加入 2 mL 的右旋糖酐酶溶液 (质量浓

度为 15 mg/mL), 涡旋混匀后将离心管置于 37 °C 水浴中 100 r/min 震荡吸附 1, 8, 16, 24 h, 随后 5 000 r/min 离心 20 min, 将酶液倒入干净的离心管中, 用 1 mL PBS 缓冲液漂洗羟基磷灰石 3 次, 5 000 r/min 离心 20 min 将上清液转入酶液离心管中, 涡旋混匀后, 利用 BCA 法测定其蛋白质量浓度, 根据体积计算蛋白质量, 计算公式如下:

羟基磷灰石所吸附的蛋白量 = 总蛋白质量 - 上清液中蛋白质量;

吸附率 = (羟基磷灰石所吸附的蛋白质量/所加入右旋糖酐酶的质量) \times 100%。

1.3.2 右旋糖酐酶的固定和固定化率

称取 100 mg 羟基磷灰石置于 10 mL 离心管中, 向其中加入 5 mL 体积分数分别为 0.02%、0.10%、0.20%、0.25% 的戊二醛溶液, 25 °C 100 r/min 震荡交联 2 h 和 8 h。交联结束后, 用 ddH₂O 漂洗载体 3 次, 再加入 2 mL 酶液, 37 °C 水浴下, 100 r/min 震荡交联 1 h。

固定化条件优化: 称取 100 mg 羟基磷灰石, 首先在 5 mL 0.2 mol/L NaOH 溶液中 40 °C 水浴震荡活化 90 min, 活化结束后, 用 ddH₂O 漂洗载体 3 次。再重复上述戊二醛交联实验步骤。固定化率的计算公式如下:

固定化率 = (羟基磷灰石所固定的蛋白质量/所加入右旋糖酐酶的质量) \times 100%。

1.3.3 右旋糖酐酶的吸附和固定化酶活

酶活测定方法: 取 2% 的葡聚糖 T40 溶液 950 μ L, 加入吸附或固定化右旋糖酐酶后的羟基磷灰石载体, 37 °C 水浴反应 30 min 后, 5 000 r/min 离心 20 min 后取上清液, 根据 DNS 法并参照文献 [15] 测定酶活。

右旋糖酐酶水解葡聚糖, 产物为异麦芽糖。将酶活定义为 1 mg 羟基磷灰石载体、1 min 水解得到 1 μ mol 异麦芽糖的量为 1 个酶活单位 (U), 活力单位为 1 U/mg 或 1 000 U/g。

1.3.4 唾液收集与预处理

唾液收集: 选择 10 名 18~30 岁的健康志愿者收集其唾液 (要求志愿者无吸烟史, 在收集前 1 h 内没有进食、饮水、饮酒等; 没有生病、服用药物, 尤其 1 个月内未服用抗生素类药物; 3 d 内未食用酸奶、益生菌饮料; 无龋病、牙周病等口腔疾病患者), 健康成人在进食 2 h 后用清水漱口, 口

含棉棒 10 min 左右,用 50 mL 离心管收集无刺激性唾液。

唾液预处理:4 ℃ 8 000 r/min 离心 15 min 后取上清液,与 PBS 等体积混合后,添加终质量分数为 0.2% 的蔗糖,过滤除菌后分装,保存于 -20 ℃ 备用。

1.3.5 变异链球菌生物膜模拟及干预

变异链球菌生物膜模拟:高压灭菌的羟基磷灰石片置于 24 孔细胞培养板中(每孔中一个圆盘,圆盘不可接触孔壁),用上述预处理好的唾液(1.0 mL/孔)37 ℃ 包衣 4 h 后,1.0 mL PBS 漂洗 2 次。变异链球菌在 37 ℃ 接种两代至生长对数期,5 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,PBS 洗涤 2 次,悬浮于 1.0 mL 预处理的唾液中,37 ℃ 40 r/min 厌氧培养 1 h 后,置于 37 ℃ 厌氧培养罐中静置培养 24 h 形成生物膜。

羟基磷灰石载体干预:向 100 mg 吸附右旋糖酐酶的羟基磷灰石载体中加入 1.0 mL PBS,悬浮载体后加入模拟好的变异链球菌生物膜羟基磷灰石圆片上,40 r/min 厌氧培养 1 h 后,PBS 洗涤 2~3 次,洗去羟基磷灰石载体。

1.3.6 激光共聚焦显微镜检测生物膜

生物膜样本使用 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit 进行染色,加入 1.0 mL PBS 后,再加入混合染料 2 μ L,染色时间为 10 min,染色后再用 PBS 漂洗 2~3 次,洗去染料。

将羟基磷灰石圆片固定在激光共聚焦显微镜平台上,采用 488 nm Ar/Ar-Kr 激光共聚焦显微镜进行共聚焦成像。使用 40 \times 物镜观察,对羟基磷灰石片上的中间区域 5 mm 范围进行扫描,选择至少 3 个独立且具有代表性的位置进行测量,通过图像处理软件 TCS SP8 STED 3X 量化和表征生物膜的三维结构。

2 结果

2.1 吸附和固定化条件

2.1.1 最佳载体量和吸附时间

为了探索不同量的羟基磷灰石载体在不同时间条件下的最佳吸附效率。固定右旋糖酐酶体积为 2 mL(酶质量浓度为 15 mg/mL),在离心管中分别添加 10, 50, 100 mg 羟基磷灰石,在 37 ℃ 水浴中分别吸附 1, 8, 16, 24 h,比较不同量的

羟基磷灰石在不同时间条件下的吸附率,每个实验重复 3 次。

实验结果如图 1 所示,100 mg 羟基磷灰石在 2 mL 酶液中吸附 1, 8, 16 h 的吸附率均高于 10 mg 和 50 mg 羟基磷灰石在 2 mL 酶液中吸附率,并且在 1 h 时 100 mg 羟基磷灰石吸附率最高,达到 23.9%,随着时间的延长,吸附效率逐渐下降,可能是由于时间延长,羟基磷灰石上吸附的蛋白又出现了脱落。

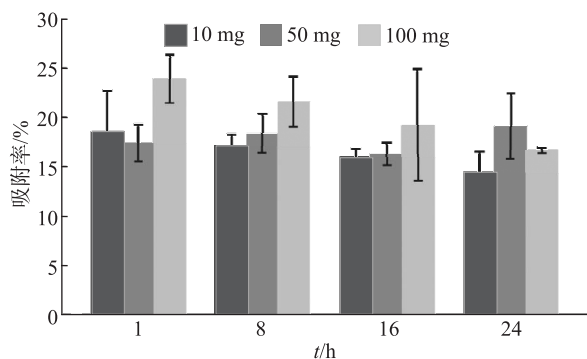


图 1 不同质量的羟基磷灰石在不同时间条件下的吸附率

2.1.2 离子强度对吸附率的影响

研究^[16]表明,离子强度的变化会改变羟基磷灰石的 ζ 电位,从而影响其对蛋白的吸附量。因此,实验中分别添加终浓度为 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mol/L 的 NaCl,探索不同离子强度下羟基磷灰石对右旋糖酐酶的吸附率。

如图 2 所示,在 NaCl 终浓度为 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mol/L 时,吸附率分别为 26.6%、25.6%、27.7% 和 26.8%,均高于直接吸附的最大吸附率 23.9%。当 NaCl 终浓度为 0.25, 0.30 mol/L 时,吸附率为 22.0% 和 20.6%。这与文献^[13~14]报道的一致,离子强度对羟基磷灰石的 Zeta 电位的影响具有双重性,低浓度的离子强度有利于其形成双电层,增加羟基磷灰石表面的吸附作

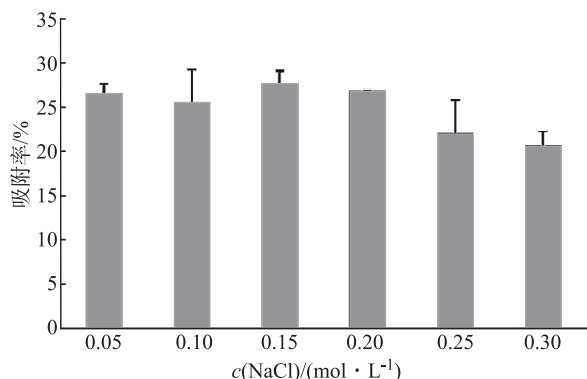


图 2 不同离子强度下羟基磷灰石对右旋糖酐酶的吸附率

用, 高离子强度又压缩了双电层, 从而抑制了羟基磷灰石表面的吸附作用。

2.1.3 戊二醛体积分数和交联时间

戊二醛作为一种广泛使用的蛋白质交联剂, 能够使蛋白质紧密的交联在载体上, 相比普通的化学吸附, 其更加牢固, 且不容易脱落^[17]。实验中探索了 100 mg 羟基磷灰石在体积分数分别为 0.02%、0.10%、0.20%、0.25% 的戊二醛溶液中分别交联 2 h 和 8 h, 随后再交联右旋糖酐酶, 比较不同体积分数的戊二醛及交联时间对羟基磷灰石固定化右旋糖酐酶效率的影响。

结果如图 3 所示, 羟基磷灰石在不同时间、不同体积分数的戊二醛交联下, 对右旋糖酐酶的固定化率影响不大。当戊二醛体积分数为 0.02%, 交联时间为 2 h 的固定化率达到最高, 为 17.6%, 而其余体积分数的戊二醛及交联时间下固定化效率则略低于此值, 并且最高的固定化率低于直接吸附的吸附率, 可能是羟基磷灰石表面的羟基数较少, 导致交联上去的蛋白量较低。

2.2 羟基磷灰石吸附和固定化右旋糖酐酶酶活比较

为了进一步比较羟基磷灰石吸附和固定化右旋

糖酐酶的效果, 对吸附和固定化右旋糖酐酶的羟基磷灰石载体的酶活力进行测定。因为改变离子强度与直接吸附右旋糖酐酶的效率相差不大, 所以分别比较了 100 mg 羟基磷灰石直接吸附法和戊二醛交联法的酶活。

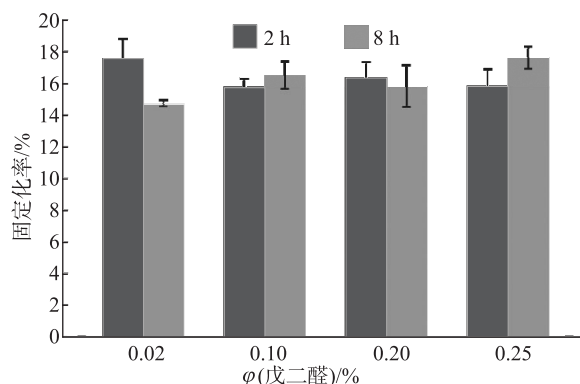
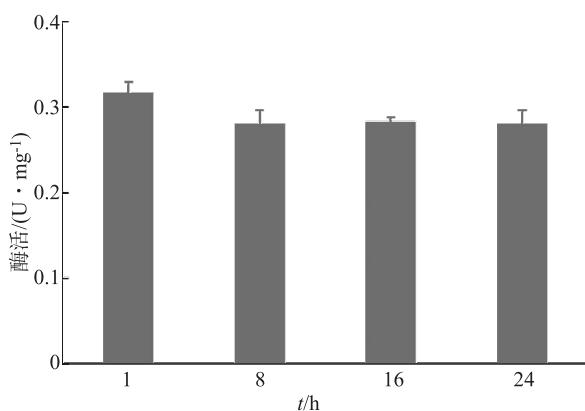
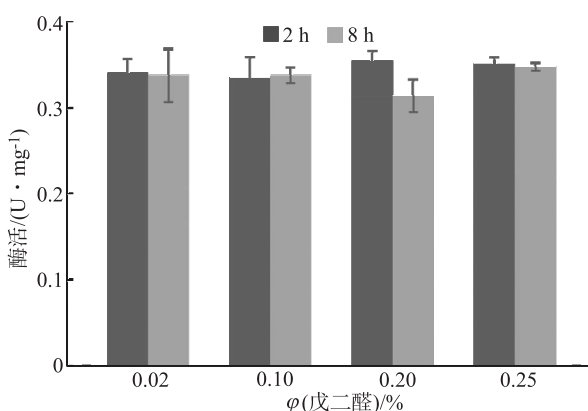


图3 不同体积分数戊二醛及交联时间下羟基磷灰石对右旋糖酐酶的固定化率

采用直接吸附法, 则 100 mg 羟基磷灰石吸附 1 h 的酶活力最高, 为 0.32 U/mg (图 4a)。使用戊二醛交联法, 不同体积分数的戊二醛、不同时间交联, 固定化右旋糖酐酶后的酶活力相差不大, 最高为 0.35 U/mg, 最低为 0.33 U/mg (图 4b)。



(a)不同时间羟基磷灰石吸附右旋糖酐酶的酶活



(b)不同时间羟基磷灰石固定化右旋糖酐酶的酶活

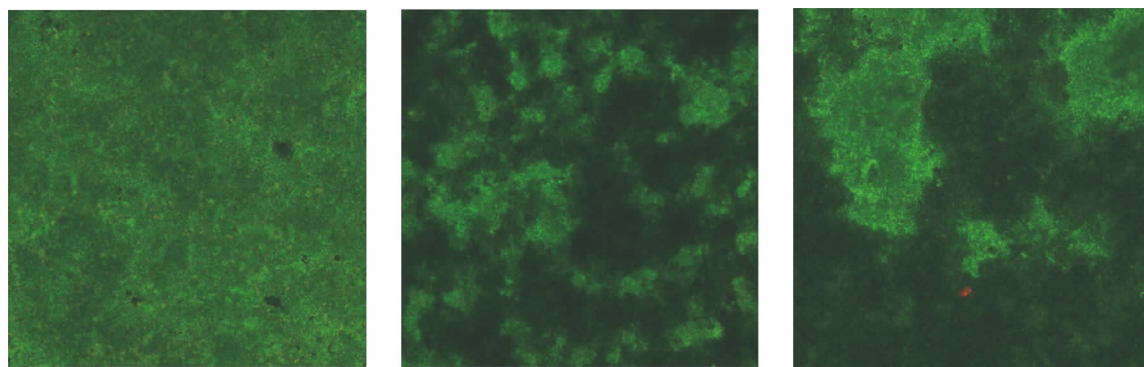
图4 羟基磷灰石吸附和固定化右旋糖酐酶的酶活

2.3 吸附和固定化右旋糖酐酶的载体对生物膜的影响

为了进一步验证吸附和固定化右旋糖酐酶的羟基磷灰石对变异链球菌生物膜的影响, 在羟基磷灰石圆片上模拟了变异链球菌生物膜模型, 使用吸附和固定化右旋糖酐酶的羟基磷灰石载体对变异链球菌生物膜进行干预。

结果如图 5 所示, 通过激光共聚焦显微镜对羟

基磷灰石圆片中 5 mm 范围内进行扫描, 吸附右旋糖酐酶的羟基磷灰石 (图 5b) 和固定化右旋糖酐酶的羟基磷灰石 (图 5c) 与未干预对照组 (图 5a) 相比, 生物膜的结构完整性遭到了破坏, 生物膜的菌体之间更加稀疏, 说明吸附和固定化右旋糖酐酶的羟基磷灰石载体能够有效清除变异链球菌生物膜的完整性。



(a) 未干预对照组

(b) 吸附右旋糖酐酶的羟基磷灰石

(c) 固定化右旋糖酐酶的羟基磷灰石

图5 吸附右旋糖酐酶的羟基磷灰石对变异链球菌生物膜的影响

3 讨论

羟基磷灰石对右旋糖酐酶具有较好的吸附效果,最佳吸附比为 1:20 (m/V),吸附时间为 1 h,吸附率可达 23.9%。通过戊二醛交联进行固定化,固定化率低于吸附率,可能是由于羟基磷灰石表面的羟基数有限,不能固定较多的右旋糖酐酶。

羟基磷灰石对右旋糖酐酶的固定化率低于吸附率,但是固定化酶活与直接吸附的酶活相当,可能是通过固定化后,酶活性中心的构象发生了略微变化,导致其更加容易与底物分子接触,从而酶活有所提高。也可能是由于羟基磷灰石载体吸右旋糖酐酶的数量较多,从而压缩了酶的生存空间,其与底物接触的空间位阻增加,因此酶活并未出现显著提高。

右旋糖酐酶通过水解变异链球菌生物膜基质葡聚糖的 α -1, 6 糖苷键,从而破坏生物膜的结构,阻止其在牙齿表面附着^[18]。羟基磷灰石可以通过封堵牙小管本质^[19],促进牙釉质表面再矿化,增强釉质的抗龋能力^[20]。将羟基磷灰石吸附或固定化右旋糖酐酶后,不仅能增加抗龋力,而且能够显著抑制口腔致龋菌对牙齿的附着,降低牙菌斑,预防龋病和牙周病。研究^[7]表明,将具有防龋作用的 NaF 和右旋糖酐酶联合使用也能显著抑制变异链球菌生物膜的形成。羟基磷灰石与氟化钠的再矿化和预防脱矿作用并没有显著差别^[21-22],但是 NaF 不能吸附或固定化右旋糖酐酶,而羟基磷灰石由于具有多孔性质,不仅能吸附或固定化右旋糖酐酶,而且具有一定的缓释性能,能够保证右旋糖酐酶持续发挥作用^[23]。

目前,牙膏中应用较多的生物酶主要为溶菌

酶、葡聚糖酶和右旋糖酐酶等。溶菌酶通过水解细菌细胞壁,从而抑制致病菌;葡聚糖酶通过切断 α -1, 6 糖苷键来分解牙菌斑。将葡聚糖酶添加到牙膏中能够较好地去除牙菌斑^[24],如溶菌酶牙膏能有效地抑制口腔致病菌^[25],海藻酸钠微球包埋右旋糖酐酶能有效地抑制变异链球菌生物膜的形成^[26]。通过在牙膏中添加复合酶和功效成分,可以使其具有多重功效,如 FE 生物酶复合牙膏,同时添加了溶菌酶、蛋白水解酶和氯化锶,不仅能增强抑菌作用,还具有抗牙本质敏感作用^[27]。隆力奇 DL 复合酶牙膏,同时添加了溶菌酶和葡聚糖酶,不仅能够降低变异链球菌的粘附性,还能有效抑制伴放线杆菌、牙龈卟啉单胞菌和黏性放线菌^[28]。

吸附和固定化右旋糖酐酶的羟基磷灰石载体都能够较好地消除变异链球菌生物膜的完整性,这将为更好地消除牙菌斑生物膜、促进牙釉质和牙本质再矿化、提高釉质的抗龋力提供一种可行的方法。但是,目前仅做了单一酶的吸附和固定化,后续工作还将尝试使用多种酶,以期赋予其更多的功效。

[参考文献]

- [1] WEN Z T, YATES D, AHN S J, et al. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model [J]. BMC Microbiol, 2010, 10 (1): 111-112.
- [2] AHN S J, AHN S J, WEN Z T, et al. Characteristics of biofilm formation by *streptococcus mutans* in the presence of saliva [J]. Infect Immun, 2008, 76 (9): 4259-4268.
- [3] KURAMITSU H K. Virulence factors of *mutans streptococci*: role of molecular genetics [J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1999, 4 (2): 159-176.

- [4] VERSPECHT T, RODRIGUEZ H E, KHODAPARAST L, et al. Development of antiseptic adaptation and cross-adaptation in selected oral pathogens in vitro [J]. Sci Rep, 2019, 9 (1): 8326.
- [5] MÜLLER H D, EICK S, MORITZ A, et al. Cytotoxicity and antimicrobial activity of oral rinses in vitro [J]. Bio Med Res Int, 2017 (1): 1–9.
- [6] WANG D, LU M, WANG S, et al. Purification and characterization of a novel marine *Arthrobacteroxydans* KQ11 dextranase [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 106: 71–76.
- [7] 喻譞, 田媛媛, 杨英明, 等. 不同蔗糖浓度下外源性右旋糖酐酶协同氟化钠对 *S. Mutans* 生物膜形成的影响 [J]. 临床口腔医学杂志, 2017, 33 (6): 326–330.
- [8] MEYER F, AMAECHI B T, FABRITIUS H O, et al. Overview of calcium phosphates used in biomimetic oral care [J]. Open Dent J, 2018, 12 (1): 406–423.
- [9] ESTEVES O M, SANTOS M, MEYER L H, et al. Caries-preventive effect of anti-erosive and nano-hydroxyapatite-containing toothpastes in vitro [J]. Clin Oral Investig, 2017, 21 (1): 291–300.
- [10] TSCHOPPE P, ZANDIM D L, MARTUS P, et al. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes [J]. J Dent, 2011, 39 (6): 430–437.
- [11] JUNTAVEE N, JUNTAVEE A, PLONGNIRAS P. Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on enamel and cementum surrounding margin of computer-aided design and computer-aided manufacturing ceramic restoration [J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13: 2755–2765.
- [12] 殷海荣, 杨明珍. 碳羟基磷灰石的吸附性能研究 [J]. 材料导报, 2010, 24 (15): 73–76.
- [13] 殷钢, 詹劲, 刘铮, 等. 羟基磷灰石对牛血清白蛋白的吸附特性研究 [J]. 高等学校化学学报, 2001, 22 (5): 771–775.
- [14] KANDORI K, SAITO M, TAKEBE T, et al. Adsorption of bovine serum albumin on synthetic carbonate calcium hydroxyapatite [J]. J Colloid Interface Sci, 1995, 174 (1): 124–129.
- [15] 李皎, 杨国武, 汪大敏, 等. DNS 法测定带有保护剂的 β -葡聚糖酶酶活研究 [J]. 陕西农业科学, 2014, 60 (7): 6–7.
- [16] 徐勇, 安良, 曾丹林, 等. 羟基磷灰石纳米带作为蛋白质药物载体的研究 [J]. 功能材料, 2018, 49 (3): 3124–3129.
- [17] 曹正国, 李成章. 常用蛋白交联方法及其对胶原的影响 [J]. 国外医学 (生物医学工程分册), 2001, 24 (4): 187–191.
- [18] 问清江, 慕娟, 孙晓宇, 等. 右旋糖酐酶酶学性质研究 [J]. 陕西农业科学, 2019, 65 (5): 50–53.
- [19] 郑娟, 谢晓芳. 不同含量的羟基磷灰石牙膏对牙本质小管的封堵作用研究 [J]. 口腔护理用品工业, 2018, 144 (2): 21–24.
- [20] 杨越雄. 羟基磷灰石牙膏的研究 [J]. 华中理工大学学报, 2000, 28 (1): 89–92.
- [21] SCHLAGENHAUF U, KUNZELMANN K, HANNIG C, et al. Impact of a non-fluoridated microcrystalline hydroxyapatite dentifrice on enamel caries progression in highly caries-susceptible orthodontic patients: A randomized, controlled 6-month trial [J]. J Invest Clin Dent, 2019, 10 (2): 1239–1248.
- [22] AMAECHI B T, ABDULAZEES P A, ALSHAREIF D O, et al. Comparative efficacy of a hydroxyapatite and a fluoride toothpaste for prevention and remineralization of dental caries in children [J]. BDJ Open, 2019, 5 (1): 18–27.
- [23] 艾凡荣, 张如华, 马葵祥. 中空层状羟基磷灰石微球对溶菌酶的吸附与缓释研究 [J]. 功能材料, 2012, 43 (17): 2373–2376.
- [24] 青木優子, 郑苏江, 野村安雄, 等. 含葡聚糖酶牙膏对牙菌斑模型的分解和去除研究 [J]. 口腔护理用品工业, 2018 (3): 12–14.
- [25] 耿帅峰, 褚夫江, 徐天生, 等. 含溶菌酶的儿童牙膏研究开发 [J]. 口腔护理用品工业, 2020, 30 (5): 20–23.
- [26] JUNTARACHOT N, SIRILUN S, KANTACHOTE D, et al. Anti-*Streptococcus mutans* and anti-biofilm activities of dextranase and its encapsulation in alginate beads for application in toothpaste [J]. Peer J, 2020, 8 (1): 165–176.
- [27] 徐志良, 邵枫. FE 生物复合酶功效牙膏的研发 [J]. 口腔护理用品工业, 2015, 25 (3): 12–13.
- [28] 刘怡然, 曹灵, 陈霄迟, 等. 隆力奇 DL 复合酶牙膏对部分口腔微生物体外抑菌作用的实验研究 [J]. 口腔生物医学, 2012 (4): 205–207.