



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110177540 B

(45) 授权公告日 2023. 02. 17

(21) 申请号 201780083294.0

(22) 申请日 2017.11.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110177540 A

(43) 申请公布日 2019.08.27

(30) 优先权数据
10-2016-0152163 2016.11.15 KR
10-2017-0015459 2017.02.03 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.07.12

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2017/012914 2017.11.15

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/093129 KO 2018.05.24

(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔市城北区安岩路145高丽大
学校(安岩洞五街)(邮递区号:02841)

(72) 发明人 金京宪 尹银珠 俞素萝 金东玄
李相贤 金净衍

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理
有限公司 11205
专利代理师 杨贝贝 臧建明

(51) Int.Cl.
A61K 8/73 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)

(56) 对比文件
JP 特开2002-29952 A, 2002.01.29
KR 010018802 A, 2015.03.01
KR 10-2007-0038182 A, 2007.04.09
CN 1285838 A, 2001.02.28
刘美英等. 琼脂寡糖生物活性的研究进展.
《药物生物技术》. 2008, 第15卷(第6期), 第493-
496页.

审查员 陈城

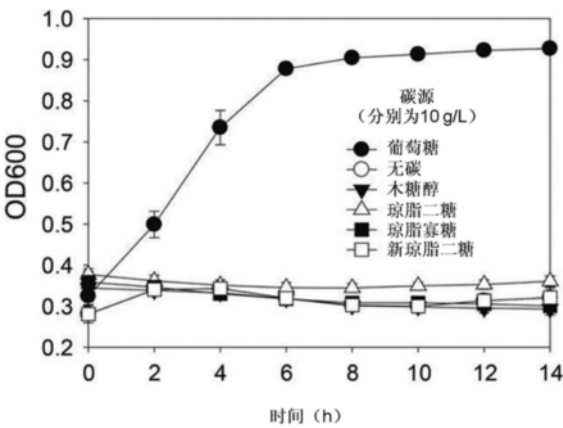
权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54) 发明名称

用于预防或减轻口腔疾病的药物组合物、口
腔卫生组合物及食品组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种用于预防或减轻口腔疾病的
药物组合物、口腔卫生组合物及食品组合物,
包含选自由琼脂二糖及琼脂寡糖组成的群组
的一种或多种, 口腔疾病是选自由龋齿、牙龈炎、牙
周炎、口腔粘膜溃疡、口臭及口腔干燥组成的群
组的任一种. 更具体来说, 浓度比木糖醇的浓度
低的琼脂二糖或琼脂寡糖抑制变形链球菌的生
长并抑制产酸, 且因此可用于防龋目的。



1. 一种琼脂二糖或琼脂寡糖在制备用于治疗口腔疾病的口服药物中的用途,其中所述口腔疾病是选自由龋齿、牙龈炎、牙周炎、口腔粘膜溃疡、口臭及口腔干燥组成的群组,所述琼脂寡糖是琼脂二糖、琼脂四糖、琼脂六糖及琼脂八糖的混合物,以及

其中所述口腔疾病由变形链球菌引起。

2. 一种琼脂二糖或琼脂寡糖在制备用于缓解口腔疾病的口腔卫生产品中的用途,其中所述口腔疾病是选自由龋齿、牙龈炎、牙周炎、口腔粘膜溃疡、口臭及口腔干燥组成的群组,

其中所述琼脂寡糖是琼脂二糖、琼脂四糖、琼脂六糖及琼脂八糖的混合物,以及

其中所述口腔疾病由变形链球菌引起。

3. 一种琼脂二糖或琼脂寡糖在制备用于缓解口腔疾病的食品组合物中的用途,其中所述口腔疾病是选自由龋齿、牙龈炎、牙周炎、口腔粘膜溃疡、口臭及口腔干燥组成的群组,所述琼脂寡糖是琼脂二糖、琼脂四糖、琼脂六糖和琼脂八糖的混合物,以及

其中所述口腔疾病由变形链球菌引起。

用于预防或减轻口腔疾病的药物组合物、口腔卫生组合物及食品组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种具有防龋活性的琼脂二糖或琼脂寡糖的用途,尤其涉及一种用于预防或减轻口腔疾病的药物组合物、口腔卫生组合物及食品组合物。

背景技术

[0002] 龋齿是人们看牙医的主要原因之一,且由于在现代社会中使用糖作为甜味剂,龋齿的发病率升高了。变形链球菌(*Streptococcus mutans*)是龋齿的主要致病菌(勒舍WJ等人(1975)感染与免疫11(6):1252-60)。变形链球菌是位于人类嘴中的细菌,其会使糖分解,并分泌葡萄糖基转移酶(glucosyltransferase, GTF),从而在牙齿表面上形成不溶性葡聚糖(glucan)。变形链球菌或各种其他细菌附着到牙齿表面以在牙齿表面上增殖。牙齿表面上的细菌会导致牙齿腐烂,因为牙齿表面的牙釉质会被有机酸破坏(达什珀S.G.等人(1996)微生物学142,33-29),有机酸例如乳酸,其为碳水化合物代谢物。氟化物及木糖醇(xylitol)为用于通过减少牙菌斑中的变形链球菌的数目来预防龋齿的代表性材料(特拉昂L等人(1985)龋齿研究19:53-63)。木糖醇是天然存在的5碳醇,具有与糖类似的甜味及其清爽感。由于这些优点,木糖醇目前以口香糖、牙膏等形式生产并广泛使用,但不利之处在于只有在包含高浓度的木糖醇的情况下才能抑制变形链球菌的生长。

[0003] 目前,对具有抗变形链球菌的抗微生物活性的天然材料的研究越来越多,且天然糖作为防龋甜味剂越来越受到关注。然而,对与木糖醇具有同样的防龋效果的天然糖的研究结果并不足够。当变形链球菌摄取木糖醇时,通过磷酸烯醇丙酮酸木糖醇磷酸转移酶系统(phosphoenolpyruvate-xylitol phosphotransferase system, PEP-木糖醇PTS)来形成木糖醇-5-磷酸。这会抑制糖酵解酶的活性且木糖醇的代谢不再发生,然后其会在细胞外排泄。通过这一过程,细菌生长及产酸会经由不产生能量而只消耗能量的无效循环而受到抑制。此时,变形链球菌的生长可仅用浓度为10g/L或高于10g/L的木糖醇来抑制,且研究还表明当变形链球菌在含木糖醇的培养基中连续培养时,会产生生长不受木糖醇抑制的抗性菌株(特拉昂L等人(1985)龋齿研究19:53-63,特拉昂L等人(1987)牙科研究杂志66:982-988)。

发明内容

[0004] 技术问题

[0005] 本发明的目的是提供琼脂二糖或琼脂寡糖的防龋用途。

[0006] 技术解决方案

[0007] 为实现以上技术目的,本发明提供一种用于预防或治疗口腔疾病的药物组合物,所述药物组合包含选自由琼脂二糖及琼脂寡糖组成的群组的一种或多种。

[0008] 本发明还提供制备用于预防或治疗口腔疾病的药物组合物的琼脂二糖或琼脂寡糖的用途。

[0009] 本发明还提供一种预防或治疗口腔疾病的方法,所述方法包括向受试者施用用于预防或治疗口腔疾病的药物组合物。

[0010] 本发明还提供一种用于预防或减轻口腔疾病的口腔卫生组合物,所述口腔卫生组合物包含选自由琼脂二糖及琼脂寡糖组成的群组的一种或多种。

[0011] 本发明还提供一种用于预防或减轻口腔疾病的食品组合物,所述食品组合物包含选自由琼脂二糖及琼脂寡糖组成的群组的一种或多种。

[0012] 琼脂寡糖可从琼脂糖的酸水解产物得到。更具体来说,琼脂寡糖可通过以下方式获得:使琼脂糖与0.1% (w/v) 到5% (w/v) 强酸在80℃到140℃下反应5分钟到30分钟,并向所得反应产物中添加强碱以中和为pH 5到pH 6。

[0013] 强酸可选自由磷酸、硫酸、盐酸及硝酸组成的群组。

[0014] 中和过程可通过向强酸处理的琼脂糖中添加强碱,以将其pH调节为5到6来执行。

[0015] 强碱可选自由NaOH、KOH、Ca(OH)₂及Ba(OH)₂组成的群组。

[0016] 琼脂寡糖可为琼脂二糖、琼脂四糖、琼脂六糖及琼脂八糖的混合物。

[0017] 琼脂二糖可通过经由凝胶渗透色谱法分离并纯化琼脂糖的酸水解产物而获得。

[0018] 琼脂二糖或琼脂寡糖可抑制作为口腔细菌的变形链球菌的生长以及由变形链球菌的碳源消耗而引起的产酸。

[0019] 口腔疾病可为选自由龋齿、牙龈炎、牙周炎、口腔粘膜溃疡、口臭及口腔干燥组成的群组的任一者。

[0020] 有利效果

[0021] 本发明的琼脂二糖或琼脂寡糖已被证实抑制变形链球菌的生长及产酸,且因此预期应用于口腔卫生产品、食品以及医药的开发领域,口腔卫生产品例如牙膏、漱口水、口腔喷雾等,食品例如口香糖、糖果等。

附图说明

[0022] 图1示出在基本培养基中,单一碳源对变形链球菌生长的影响,底物条件:10g/L葡萄糖;无碳;10g/L木糖醇;10g/L琼脂二糖;10g/L琼脂寡糖(聚合程度为2、4、6及8的寡糖的混合物);以及10g/L新琼脂二糖。

[0023] 图2A、图2B、图2C及图2D示出在含10g/L葡萄糖的基本培养基中,木糖醇(图2A)、琼脂二糖(图2B)、琼脂寡糖(图2C)及新琼脂二糖(图2D)对变形链球菌生长的浓度依赖性抑制效果。

[0024] 图3A、图3B、图3C及图3D示出当在各种浓度下向含有10g/L葡萄糖的基本培养基中添加木糖醇(图3A)、琼脂二糖(图3B)、琼脂寡糖(图3C)及新琼脂二糖(图3D)中的每一者时所消耗的葡萄糖的分析结果。

[0025] 图4A、图4B、图4C及图4D示出当在各种浓度下向含有10g/L葡萄糖的基本培养基中添加木糖醇(图4A)、琼脂二糖(图4B)、琼脂寡糖(图4C)及新琼脂二糖(图4D)中的每一者时所产生的乳酸的分析结果。

具体实施方式

[0026] 本发明的发明人通过琼脂糖的酸水解生产了琼脂寡糖作为聚合程度为2、4、6及8

的寡糖的混合物,然后将所述琼脂寡糖用作变形链球菌的碳源。此外,仅分离并纯化了由D-半乳糖及3,6-脱水-L-半乳糖组成的琼脂二糖双糖,并将其用作变形链球菌的碳源。本发明人通过观察使用利用高效液相色谱法HPLC的琼脂二糖量化方法准确量化的琼脂二糖是否抑制变形链球菌的生长及产酸,对琼脂二糖的防龋效果进行了研究。作为对照组,使用葡萄糖、木糖醇及新琼脂二糖作为碳源来进行比较实验。

[0027] 结果,证实了本发明的能够抑制细胞生长的琼脂二糖及琼脂寡糖,在比已知能够抑制变形链球菌生长的木糖醇的浓度低的浓度下,具有防龋效果。通过酸处理以及分离及纯化工艺生成了红藻衍生的琼脂寡糖及琼脂二糖,并接着用作碳源以通过与将葡萄糖、木糖醇或新琼脂二糖作为碳源对细胞生长的影响进行比较,观察其对变形链球菌生长的影响。另外,在各种浓度下向含有10g/L葡萄糖的培养基中添加了琼脂二糖、琼脂寡糖、木糖醇或新琼脂二糖,以观察在混合碳源条件下变形链球菌的生长及产酸。通过这些实验,首先证实了纯化的琼脂二糖对变形链球菌的生长具有高抑制效果,且在比通常已知的木糖醇的浓度低的浓度下具有抑制产酸的效果。还证实了,在特定浓度或高于特定浓度下,琼脂寡糖相比于木糖醇对变形链球菌的生长及产酸具有更强的抑制效果。

[0028] 因此,本发明提供一种用于预防或治疗口腔疾病的药物组合物,所述药物组合物包含选自由琼脂二糖及琼脂寡糖组成的群组的一种或多种。

[0029] 本发明还提供制备用于预防或治疗口腔疾病的药物组合物的琼脂二糖或琼脂寡糖的用途。

[0030] 琼脂寡糖可通过红藻生物物质衍生的琼脂糖的酸水解来获得。

[0031] 更具体来说,琼脂寡糖可通过以下方式来获得:使琼脂糖与0.1% (w/v) 到5% (w/v) 强酸在80℃到140℃下反应5分钟到30分钟,并向所得反应产物中添加强碱以中和为pH 5到pH 6。

[0032] 强酸的浓度可介于0.1% (w/v) 到5% (w/v)、更具体来说0.5% (w/v) 到2% (w/v) 的范围内。

[0033] 酸处理反应条件可为0.1% (w/v) 到5% (w/v) 强酸与琼脂糖之间在80℃到140℃下反应5分钟到30分钟,更具体来说0.5% (w/v) 到2% (w/v) 强酸与琼脂糖之间在100℃到140℃下反应5分钟到20分钟。

[0034] 强酸可为磷酸、硫酸、盐酸、硝酸等。更具体来说,强酸可为磷酸。

[0035] 以干重量计,用于强酸处理的琼脂糖的量可介于10% (w/v) 到37% (w/v)、具体来说15% (w/v) 到31% (w/v)、且更具体来说16.8% (w/v) 到30.7% (w/v) 的范围内。当琼脂糖的量处于以上范围内时,可获得90%、95%或98%或者高于98%的液化率。当琼脂糖的量处于以上范围之外时,可显著降低底物降解率。

[0036] 向强酸处理的琼脂糖中添加强碱以中和为pH 5到pH 6。

[0037] 作为强碱,可使用NaOH、KOH、Ca(OH)₂、Ba(OH)₂等,但本发明不限于此。

[0038] 通过琼脂糖的酸水解获得的琼脂寡糖可为琼脂二糖、琼脂四糖、琼脂六糖及琼脂八糖的混合物。

[0039] 在本发明的药物组合物中所使用的琼脂二糖可通过经由凝胶渗透色谱法分离并纯化琼脂糖的酸水解产物而获得。

[0040] 凝胶渗透色谱法可为生物凝胶P2色谱法。

[0041] 本发明的药物组合物还可包含药学上可接受的载体。

[0042] 药学上可接受的载体包括医学领域中常用的载体及媒介物,且其实例包括但不限于离子交换树脂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(例如,人血清白蛋白)、缓冲物质(例如,磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾及饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物)、水、盐或电解质(例如,硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠及锌盐)、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素系底物、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚芳酯、蜡及羊毛脂。

[0043] 此外,本发明的药物组合物除上述成分外,还可包含润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂等。

[0044] 在一个实施例中,根据本发明的药物组合物可采用适合于口服施用或肠胃外施用的各种制剂的形式配制。

[0045] 用于口服施用的制剂的非限制性实例包括片剂、锭剂(troches)、药片(lozenge)、水性悬浮液、油性悬浮液、制备的粉末、颗粒、乳剂、硬胶囊、软胶囊、糖浆及酏剂。

[0046] 为了配制用于口服施用的本发明的药物组合物,可使用粘合剂,例如乳糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、支链淀粉(Amylopectin)、纤维素(Cellulose)、明胶(Gelatin)等;赋形剂,例如磷酸二钙(Dicalcium phosphate)等;崩解剂,例如玉米淀粉、甘薯淀粉等;润滑剂,例如硬脂酸镁(Magnesium stearate)、硬脂酸钙(Calcium stearate)、硬脂酰基富马酸钠(Sodium stearyl fumarate)、聚乙二醇蜡(Polyethylene glycol wax)等;或类似物,且也可使用甜味剂、香料、糖浆等。

[0047] 此外,在胶囊的情况下,除上述物质外,还可进一步使用液体载体,例如脂肪油。

[0048] 用于肠胃外施用的制剂的非限制性实例包括注射剂、栓剂、呼吸吸入粉末、喷雾用气溶胶、口腔喷雾、口腔清洁剂、牙膏、药膏、敷用粉末、油及乳膏。

[0049] 为了配制用于肠胃外施用的本发明的药物组合物,可使用灭菌的水溶液、非水溶剂、悬浮液、乳液、冻干制剂、外敷用药剂等,且作为非水溶剂及悬浮液,可使用丙二醇、聚乙二醇、植物油、可注射酯等,植物油例如橄榄油,可注射酯例如油酸乙酯。

[0050] 此外,更具体来说,当本发明的药物组合物被配制成为注射剂时,本发明的组合物可在水中与稳定剂或缓冲液混合以制备成溶液或悬浮液,然后将其配制成单位剂型,例如安瓿(ampoule)或小瓶(vial)。此外,当本发明的药物组合物被配制成为气溶胶时,推进剂等可与添加剂混合以分散水分散的浓缩物或湿粉。

[0051] 此外,当本发明的药物组合物被配制成药膏、乳膏等时,所述药物组合物可使用以下载体配制:例如动物油、植物油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、二氧化硅、滑石、氧化锌等。

[0052] 本发明的药学有效量及有效剂量的药物组合物可依据配制方法、施用方法、施用时间和/或施用途等而变化,并可根据包括以下的各种因素而变化:将通过施用药物组合物实现的反应的类型及程度、施用组合物的个体的类型、年龄、体重、一般健康状况、疾病的症状或严重程度、性别、饮食、排泄、在对应个体中同时使用或在不同时间使用的药物、其他组合物的成分等以及在医学领域中众所周知的类似因素。有效剂量可容易由所属领域的一般技术人员针对期望的治疗来确定及规定。本发明的药物组合物可每天施用一次或若干次。因此,剂量不旨在以任何方式限制本发明的范围。

[0053] 本发明的药物组合物的施用途及施用方法可彼此独立,施用方法不受特别限

制,且施用途径及施用方法可为任意的施用途径及施用途,只要其能够使药物组合物到达对应部位即可。药物组合物可口服或肠胃外施用。

[0054] 肠胃外施用可例如,静脉内施用、腹膜内施用、肌内施用、透皮施用、皮下施用等,且组合物可施加或喷雾在疾病部位或者吸入,但本发明不限于此。

[0055] 本发明的药物组合物优选地可口服施用或通过注射施用。

[0056] 本文中所使用的用语“预防”意指经由向个体施用本发明的药物组合物来抑制或延缓口腔疾病的发生的所有动作。

[0057] 本文所使用的用语“治疗”意指经由向个体施用本发明的药物组合物来减轻或有益地改变口腔疾病的症状的所有动作。

[0058] 在本发明中,口腔疾病是囊括在口腔中发生的所有疾病而不管其症状的概念,且可包括例如主要由口腔病原微生物及属于念珠菌属的病原微生物引起的口腔疾病或者由口腔免疫下降引起的口腔疾病,口腔病原微生物例如变形链球菌 (*Streptococcus mutans*)、牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)、中间普雷沃菌 (*Prevotella intermedia*)、伴放线放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*),念珠菌属 (*Candida spp.*) 例如白色念珠菌 (*Candida albicans*) 等。口腔疾病的非限制性实例包括龋齿、牙龈炎、牙周炎、口腔粘膜溃疡、口臭及口腔干燥。

[0059] 本发明还提供一种预防或治疗口腔疾病的方法,所述方法包括向受试者施用用于预防或治疗口腔疾病的药物组合物。

[0060] 本文所使用的用语“受试者”包括所有动物,包括包含小鼠、牲畜、人类等在内的哺乳动物。

[0061] 在本发明的预防或治疗口腔疾病的方法中,药物组合物的剂量、施用途径、施用方法等的说明与上文结合本发明的药物组合物所述的说明相同。

[0062] 本发明还提供一种用于预防或减轻口腔疾病的口腔卫生组合物,所述口腔卫生组合物包含选自由琼脂二糖及琼脂寡糖组成的群组的一种或多种。

[0063] 在本发明中,琼脂二糖或琼脂寡糖、口腔疾病及预防的说明与上文结合本发明的药物组合物所述的说明相同。

[0064] 在本发明中,口腔卫生组合物包含可用于口腔卫生的所有类型及制剂。口腔卫生组合物的非限制性实例包括牙膏、漱口水、口腔喷雾剂、口腔药膏及口香糖。

[0065] 本发明的口腔卫生组合物可采用适合于将使用的口服施用或肠胃外施用的各种制剂形式来配制,且其相关说明与上文结合本发明的药物组合物所述的说明相同。

[0066] 本文中所使用的用语“减轻”意指至少降低与正在治疗的病症(例如,症状)相关的参数的程度的所有动作。

[0067] 本发明还提供一种用于预防或减轻口腔疾病的食品组合物,所述食品组合物包含选自由琼脂二糖及琼脂寡糖组成的群组的一种或多种。

[0068] 此处,琼脂二糖或琼脂寡糖、口腔疾病及预防以及减轻的说明与上文结合本发明的药物组合物所述的说明相同。

[0069] 本发明的食品组合物不受特别限制,且包括保健功能食品组合物。

[0070] 本文所使用的用语“保健功能食品”是指通过向例如饮料、茶、调味品、口香糖、甜食等食品物质中添加琼脂二糖或琼脂寡糖而制备的食品,或者以胶囊、粉末、悬浮液等形式

制备的食品,并且是指在摄入时赋予特定保健效果的食品。

[0071] 当本发明的保健功能食品组合物用作食品添加剂时,所述组合物可直接添加或可与其他食品或食品成分组合使用,并可根据一般方法适当使用。

[0072] 食品的类型不受特别限制,且在一般意义上包括所有食品。所述材料适用的食品的非限制性实例包括肉类、香肠、面包、巧克力、糖果、小吃、甜食、比萨、拉面、其他面条、口香糖、包括冰淇淋在内的乳制品、各种汤、饮料、茶、饮品、酒精饮料及维生素复合物。

[0073] 当本发明的保健功能食品组合物为饮料组合物时,饮料组合物可包含各种风味增强剂、天然碳水化合物等作为附加成分,例如普通饮料。天然碳水化合物的非限制性实例包括单糖,例如葡萄糖及果糖;双糖,例如麦芽糖及蔗糖;天然甜味剂,例如糊精及环糊精;以及合成甜味剂,例如糖精及阿斯巴甜。所添加的附加成分的比率可由所属领域中的一般技术人员适当选择及确定。

[0074] 此外,本发明的保健功能食品组合物可包含各种营养素、维生素、电解质、调味剂、着色剂、果胶酸及其盐、海藻酸及其盐、有机酸、保护胶体增稠剂、pH调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、醇、碳酸饮料中使用的碳酸化剂或者类似物质。此外,本发明的保健功能食品组合物可包含制备天然果汁、果汁饮料、蔬菜饮料等的果浆。这些成分可单独使用,或者可使用这些成分中的两种或更多种的组合。这些添加剂的比率也可由所属领域中的一般技术人员适当选择。

[0075] 以下,将参照以下实例进一步详细地阐述本发明,但这些实例不旨在限制本发明的范围。

[0076] 本发明的方式

[0077] <实例1>通过琼脂糖的磷酸水解来生成琼脂寡糖

[0078] 将琼脂糖在30.7% (w/v) 的浓度下溶解在2%磷酸中,且使用微波消化器在110℃下使琼脂糖与磷酸反应10分钟,然后使用5M NaOH中和酸水解的反应产物以使反应产物的pH为5到6。将反应产物冻干以获得粉末型琼脂寡糖。

[0079] <实例2>使用Aga16B及Aga50D来生成新琼脂二糖

[0080] 使用200mL 20mM三-HCl缓冲液(pH 7.0)制备了5%琼脂糖并在121℃下历时10分钟溶解在高压釜中,然后向其中添加了19.7mg Aga16B(参见韩国专利申请第2016-0006589号)以使琼脂糖降解,且使反应在55℃及200rpm下在其中进行了12小时,由此获得新琼脂四糖及新琼脂六糖作为反应产物。使每一反应产物与作为产生外切型双糖的酶的Aga50D(20mg)(参见韩国专利申请第2010-0040438号,在2010年4月20日公布)在25℃及200rpm下反应以分解这些反应产物,由此获得新琼脂二糖作为反应产物。

[0081] <实例3>使用生物凝胶P2色谱法来分离并纯化

[0082] 为分别从实例1及实例2的反应产物中仅分离并纯化琼脂二糖及新琼脂二糖,执行了作为凝胶渗透色谱法的生物凝胶P2色谱法。使用水作为流动相,且流动相的速度为0.1mL/min。一个级分的体积为1mL,且通过薄层色谱法TLC对由总计100个级分组成的样品进行了分析,然后其中仅收集并冻干含有琼脂二糖及新琼脂二糖中的每一者的级分,由此获得粉末型琼脂二糖及粉末型新琼脂二糖。

[0083] <实例4>通过HPLC来分析琼脂寡糖以及量化琼脂二糖及新琼脂二糖

[0084] 通过HPLC来分析根据实例1获得的琼脂寡糖。所使用的色谱柱为KS-802(昭和公

司),且在80℃的柱温度及0.5mL/min的流速下对各样品进行了分析。所使用的流动相为水。

[0085] 作为分析结果,确认到实例1的琼脂寡糖主要由聚合程度为2、4、6及8的寡糖的混合物组成。

[0086] 另外,通过HPLC对根据实例3生成的具有高纯度的琼脂二糖及新琼脂二糖进行了分析并量化。所述分析中所使用的色谱柱、柱温度、流速及流动相分别与琼脂寡糖的分析中所使用的这些条件相同,即KS-802(昭和公司)、80℃、0.5mL/min及水。

[0087] <实例5>细胞培养条件

[0088] 在本实验中所使用的菌株是变形链球菌(*Streptococcus mutans*) ATCC 25175。在脑-心脏输注(BHI)培养基中预先培养(pre-culture)了8小时,然后用2mM磷酸钾缓冲液洗涤了两次,然后在参照先前报导的文件(藤原等人(1978)口腔生物学档案23,601-602)制备的基本培养基中在37℃下进行了主要培养(main culture)。基本培养基在50mM三-HCl缓冲液(pH 7.4)中,含有2g/L L-谷氨酸、0.2g/L半胱氨酸盐酸盐、0.9g/L L-亮氨酸、1g/L氯化铵、3.5g/L磷酸氢钾、1.5g/L磷酸二氢钾、4.2g/L碳酸氢钠、1.2g/L硫酸镁七水合物、0.02g/L氯化锰四水合物、0.02g/L硫酸铁七水合物、0.6g/L丙酮酸钠、1mg/L核黄素、0.5mg/L盐酸硫胺素、0.1mg/L生物素、1mg/L烟酸、0.1mg/L对氨基苯甲酸、0.5mg/L泛酸钙及1mg/L盐酸吡哆醇。

[0089] <实例6>在单一碳源条件下对变形链球菌生长的抑制效果

[0090] 为证实在单一碳源条件下抑制变形链球菌生长的效果,将变形链球菌在含有各自为10g/L的琼脂二糖、琼脂寡糖、葡萄糖、木糖醇及新琼脂二糖的基本培养基以及无碳源基本培养基中进行了培养。利用实例5的方法将其主要培养(main culture)了14小时,且通过每2小时测量在600nm的波长下培养溶液的吸光度,测量了细胞生长的程度。

[0091] 结果,在葡萄糖条件下在变形链球菌进入固定相(stationary phase)后的8小时,将在600nm的吸光度测量为0.927。然而,在不包括葡萄糖的条件下,即在琼脂二糖、琼脂寡糖、木糖醇或新琼脂二糖的情况下,未观察到变形链球菌的生长。因此,确认到,琼脂二糖、琼脂寡糖及新琼脂二糖如木糖醇一样是变形链球菌的不可发酵的糖,且具有抑制变形链球菌生长的效果(图1)。

[0092] <实例7>在混合碳源条件下抑制变形链球菌生长的效果

[0093] 利用实例5的方法在200μl含有10g/L葡萄糖及琼脂二糖、琼脂寡糖、木糖醇或新琼脂二糖的基本培养基中在各种浓度下在96-孔板中对变形链球菌进行了培养,且通过测量随着时间过去在600nm的波长下的吸光度,观察了其生长抑制效果。琼脂二糖、琼脂寡糖、木糖醇及新琼脂二糖的处理浓度介于0g/L与20g/L之间。

[0094] 实验结果显示出在新琼脂二糖达20g/L的浓度条件下,变形链球菌的生长不存在显著变化。相比之下,在琼脂二糖的情况下,在2.5g/L到20g/L的浓度下观察到变形链球菌的生长受到抑制。还确认到,琼脂二糖抑制变形链球菌生长的效果随着其浓度变得越来越高而增加。此外,在木糖醇的情况下,在5g/L到20g/L的浓度下变形链球菌的生长受到抑制,且生长抑制效果随着木糖醇的浓度变得越来越高而显著增加。然而,当在培养14小时之后,比较最终吸光度值时,在相同的浓度下在琼脂二糖条件下比在木糖醇条件下,获得了更低的吸光度值。因此,确认到琼脂二糖抑制变形链球菌生长的效果大于木糖醇抑制变形链球菌生长的效果(图2A、图2B、图2C及图2D)。琼脂寡糖在5g/L到20g/L的浓度下也抑制变形链

球菌的生长。在5g/L琼脂寡糖下的最终吸光度相似于在5g/L木糖醇下的最终吸光度,但发现了在10g/L及20g/L浓度下的吸光度值在琼脂寡糖条件下比在木糖醇条件下更低。通过这些结果,确认到琼脂寡糖抑制变形链球菌生长的效果大于木糖醇抑制变形链球菌生长的效果(图2A、图2B、图2C及图2D)。

[0095] <实例8>在混合碳源条件下抑制变形链球菌产酸的效果

[0096] 为了确认琼脂二糖、琼脂寡糖、木糖醇或新琼脂二糖对变形链球菌产酸的影响,利用实例5的方法在200 μ l含有10g/L葡萄糖以及0g/L、2.5g/L、5g/L、10g/L或20g/L琼脂二糖、琼脂寡糖或新琼脂二糖或者0g/L、5g/L、10g/L或20g/L木糖醇的基本培养基中在96-孔板中对变形链球菌进行了培养。在14小时之后,通过HPLC测量了细胞外葡萄糖及所产生的乳酸的浓度。用于HPLC分析的色谱柱是安美纳斯Aminex HPX-87H。使作为流动相的0.01N硫酸在0.5mL/min的速率及65℃下流动。

[0097] 在仅包含葡萄糖作为碳源的条件下,在培养14小时后在600nm下的吸光度值为0.927。此时,消耗了8.37g/L葡萄糖,且所产生的乳酸的浓度被测量为8.13g/L(图2A、图2B、图2C及图2D、图3A、图3B、图3C及图3D及图4A、图4B、图4C及图4D)。

[0098] 在10g/L葡萄糖中包含2.5g/L琼脂二糖的条件下,在培养14小时后的吸光度值为0.55,且所消耗的葡萄糖及所产生的乳酸的浓度分别为6.78g/L及5.65g/L。这些值与在不包含琼脂二糖的情况相比分别降低了19%及32%。通过这些结果,确认到变形链球菌的生长从2.5g/L的浓度起受琼脂二糖抑制。另外,在10g/L琼脂二糖条件下,所消耗的葡萄糖及所产生的乳酸的量分别为4.05g/L及3.25g/L,这些值与0g/L琼脂二糖条件相比分别对应地降低了51.5%及60%。此外,在20g/L琼脂二糖条件下所消耗的葡萄糖及所产生的乳酸的量分别减少了58.76%及68%,由此确认到变形链球菌的产酸程度随着琼脂二糖的浓度增加而逐渐降低(图2A、图2B、图2C及图2D、图3A、图3B、图3C及图3D、图4A、图4B、图4C及图4D)。

[0099] 在10g/L葡萄糖中包含2.5g/L或5g/L琼脂寡糖条件下培养14小时之后所消耗的葡萄糖及所产生的乳酸的量与无琼脂寡糖条件相比,并未显示出显著差异。然而,在包含10g/L琼脂寡糖条件下所消耗的葡萄糖及所产生的乳酸的量分别为5.63g/L及5.4g/L,这些值与无琼脂寡糖条件相比分别对应地降低了32%及33.55%。还确认到,在20g/L琼脂寡糖条件下所消耗的葡萄糖及所产生的乳酸的量分别减少了44%及47.7%(图3A、图3B、图3C及图3D、图4A、图4B、图4C及图4D)。

[0100] 作为对照组,在各种浓度下向10g/L葡萄糖中添加了木糖醇。在包含5g/L木糖醇条件下减少的乳酸的量为30%,所述值低于在2.5g/L琼脂二糖条件下的值即32%。发现了在添加20g/L木糖醇条件下培养14小时之后在600nm下的吸光度值为0.595,所述值高于在相同浓度的琼脂二糖条件下的值。此外,所消耗的葡萄糖及所产生的乳酸的量分别减少了36.41%及35%。通过这些结果,确认到这些值低于在相同浓度的琼脂二糖条件下的值。当将木糖醇条件与琼脂寡糖条件进行比较时,在10g/L琼脂寡糖条件下所消耗的葡萄糖的量的降低为32%,所述值高于在相同浓度的木糖醇条件下的值,即23.98%。此时,在琼脂寡糖条件下所产生的乳酸的量的降低为33.55%,所述值相似于在木糖醇条件下的值,即35%。然而,在20g/L琼脂寡糖条件下所消耗的葡萄糖及所产生的乳酸的量分别减少了44%及47.7%,所述值与在木糖醇条件下的值即36.41%及35%相比对应地下降更多(图2A、图2B、图2C及图2D、图3A、图3B、图3C及图3D、图4A、图4B、图4C及图4D)。

[0101] 如在琼脂二糖的情况下一样,在各种浓度下向10g/L葡萄糖中添加了作为红藻衍生的双糖的新琼脂二糖,且在培养之后执行了比较。结果,确认到新琼脂二糖在至多为20g/L的浓度下与0g/L的情况相比,在最终吸光度值、所消耗的葡萄糖的量及所产生的乳酸的量方面并未表现出显著差异(参见图3A、图3B、图3C及图3D、图4A、图4B、图4C及图4D)。

[0102] 通过这些结果,确认到已知作为预防龋齿的糖的木糖醇在相同的浓度下不能像琼脂二糖那样抑制变形链球菌的生长及产酸。还确认到在5g/L琼脂二糖条件下对变形链球菌生长及产酸的抑制程度大于在10g/L木糖醇条件下对变形链球菌生长及产酸的抑制程度。此表明在比木糖醇的浓度低的浓度下,琼脂二糖抑制变形链球菌生长及产酸的效果更强。还确认到在相同的浓度下,琼脂寡糖抑制变形链球菌生长的效果相似于或强于木糖醇抑制变形链球菌生长的效果。相比之下,作为红藻衍生的双糖的新琼脂二糖不能抑制变形链球菌的生长及产酸,作为红藻衍生的双糖例如琼脂二糖。此表明在红藻衍生的双糖中,仅琼脂二糖具有抑制变形链球菌生长及产酸的效果。

[0103] 工业适用性

[0104] 本发明可应用于口腔卫生产品、食品及医药的开发领域,口腔卫生产品例如牙膏、漱口水、口腔喷雾等,食品例如口香糖、糖果等。

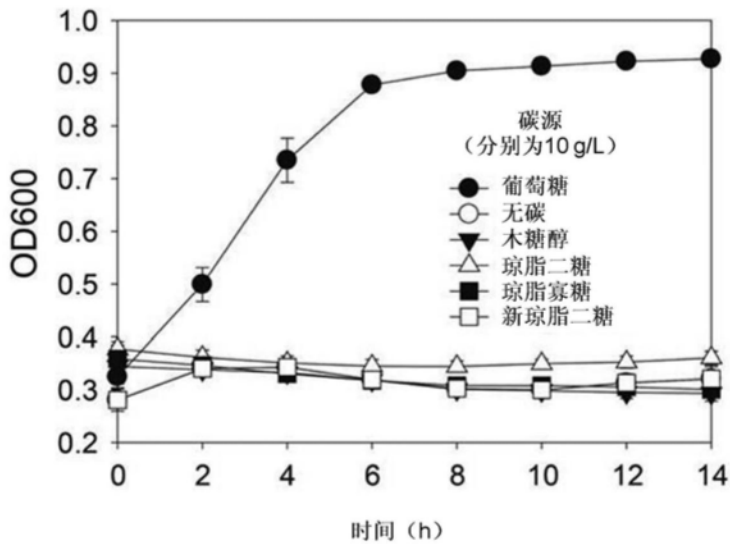


图1

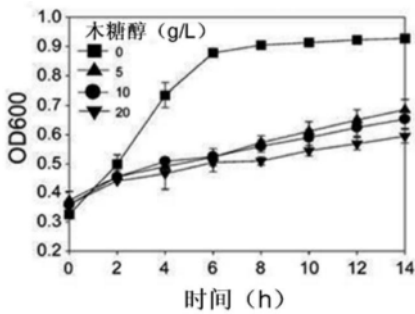


图2A

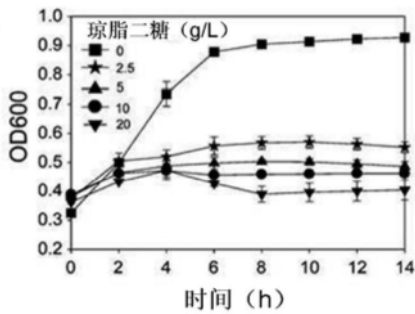


图2B

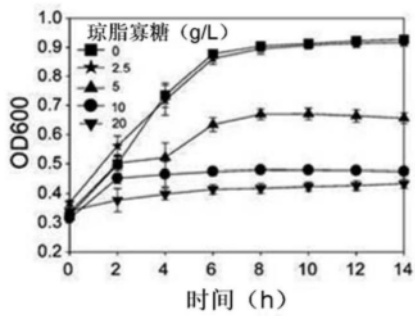


图2C

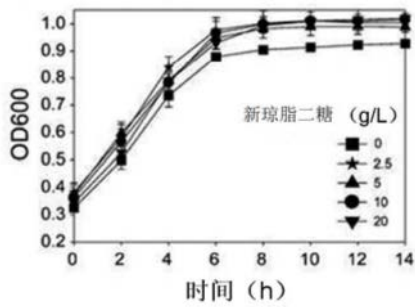


图2D

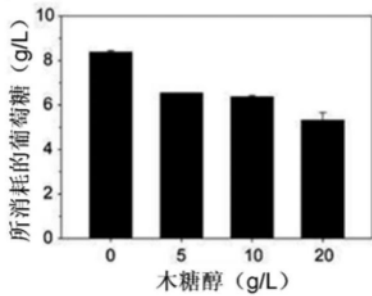


图3A

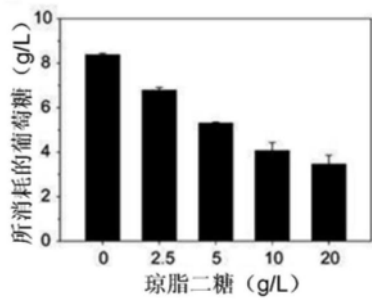


图3B

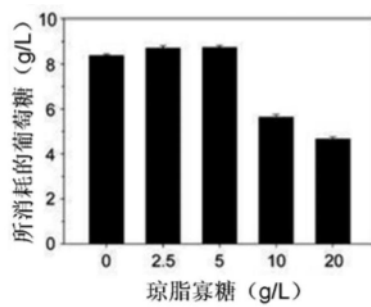


图3C

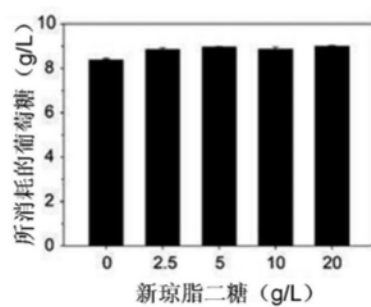


图3D

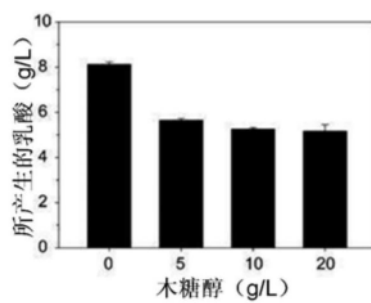


图4A

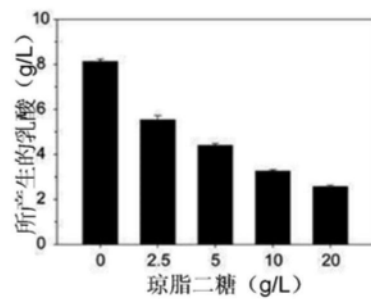


图4B

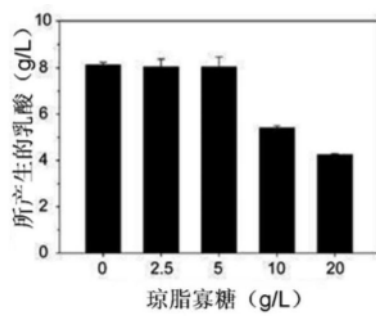


图4C

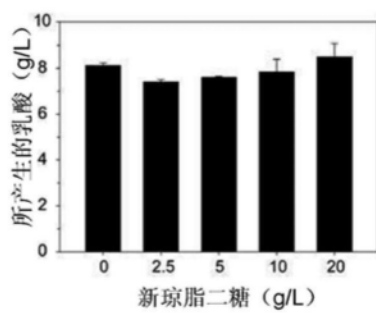


图4D