

ADRIAN WIATER<sup>1</sup>, MAŁGORZATA PLESZCZYŃSKA<sup>1</sup>, JANUSZ SZCZODRAK<sup>1</sup>, TERESA BACHANEK<sup>2</sup>

## Usuwanie płytki protez przez wybrane enzymy glukanolityczne

### Removal of Denture Plaque by Selected Glucanolytic Enzymes

<sup>1</sup> Zakład Mikrobiologii Przemysłowej UMCS w Lublinie

<sup>2</sup> Katedra Stomatologii Zachowawczej AM w Lublinie

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Glukany, a szczególnie mutan, spełniają ważną rolę w powstawaniu płytki nazębnej lub płytki protez, ponieważ umożliwiają adhezję drobnoustrojów do twardych powierzchni oraz inicjują wiele innych procesów fizykochemicznych, które warunkują próchnicotwórczość powstającego biofilmu.

**Cel pracy.** Ocena skuteczności niektórych enzymów glukanolitycznych w rozkładzie mutanu oraz biofilmów tworzących z jego udziałem na powierzchni płytek stanowiących imitację aparatów protetycznych.

**Materiał i metody.** W doświadczeniach użyto enzymów glukanolitycznych pochodzenia grzybowego, egzomutanazy (EC 3.2.1.84) i dekstranazy (EC 3.2.1.11) oraz endomutanazy bakteryjnej (EC 3.2.1.59), oddzielnie lub w mieszaninie. Skuteczność enzymatycznej degradacji mutanu oceniono na podstawie stopnia scukrzenia oraz upłynniania tego biopolimeru. Płytki protez formowano z udziałem 9 gatunków bakterii i jednego gatunku drożdży, a ich enzymatyczny rozkład dokumentowano fotograficznie.

**Wyniki.** Wykazano, że efektywne usuwanie mutanu (wolnego i związanego z powierzchnią płytki) następuje w przypadku synergicznego działania mutanazy i dekstranazy, przy czym endomutanaza szybciej upłynnia ten polimer, egzoenzym natomiast jest bardziej skuteczny w jego scukrzeniu. Mieszanina tych enzymów usuwała również całkowicie utworzone na powierzchni płytek akrylowych biofilmy. Działania takiego nie wykazywał preparat handlowy przeznaczony do oczyszczania ruchomych aparatów protetycznych.

**Wnioski.** Testowane w pracy enzymy glukanolityczne mogą być z powodzeniem zastosowane do usuwania płytki protez (**Dent. Med. Probl. 2005, 42, 2, 241–247**).

**Słowa kluczowe:** płytka protez, mutanaza, dekstranaza.

#### Abstract

**Background.** Glucans, especially mutan, play an important role in dental or denture plaque as they enable adhesion of microorganisms to hard surfaces and initiate a series of other physico-chemical phenomena which condition the caries-causing nature of the biofilm being formed.

**Objectives.** An assessment of the effectiveness of some glucanolytic enzymes in the dissolution of mutan and mutan-based biofilms on the surface of plates imitating dental prostheses.

**Material and Methods.** Glucanolytic enzymes of fungal origin, exomutanase (EC 3.2.1.84) and dextranase (EC 3.2.1.11) and bacterial endomutanase (EC 3.2.1.59) – separately or in a mixture – were used in this study. The effectiveness of their action on mutan was assessed on the basis of saccharification and solubilization of this biopolymer. Denture plaque on the plates had been formed with nine species of bacteria and one species of yeast and its enzymatic dissolution was documented photographically.

**Results.** It has been demonstrated that removal of mutan (both native and adherent to the surface of the plate) is effective when mutanases and dextranase act synergically. Also, endomutanase is faster at dissolving the polymer, while the exoenzyme is more effective in its saccharification. A mixture of the enzymes also thoroughly removed biofilms formed on the surface of the acrylic plates, which was not the case with a commercial preparation used for cleaning removable dental prostheses.

**Conclusions.** The tested glucanolytic enzymes can be successfully used for removal of denture plaque (**Dent. Med. Probl. 2005, 42, 2, 241–247**).

**Key words:** denture plaque, mutanase, dextranase.

W skład płytki nazębnej wchodzi głównie drobnoustroje oraz pewna ilość materiału pozakomórkowego. Węglowodany stanowią około 20% suchej masy, przy czym dominują wśród nich przede wszystkim glukany (dekstrany i mutany) oraz fruktany. Nadrzędną rolę w utrzymaniu właściwej struktury oraz próchnicotwórczości płytki pełnią zewnątrzkomórkowe glukany, których udział wynosi około 10% jej suchej masy, w tym mutanu 1,35–1,4% [1, 2]. Badania strukturalne dowiodły, że polimery te zawierają głównie wiązania  $\alpha$ -1,3-;  $\alpha$ -1,6- i  $\alpha$ -1,4-glikozydowe. Nierozpuszczalne w wodzie mutany ( $\alpha$ -1,3-;  $\alpha$ -1,6-glukany) odgrywają istotną rolę w adsorbowaniu się bakterii do powierzchni szkliwa, doprowadzając do wytworzenia stabilnego połączenia między paciorkowcami a błoną nazębną, a także umożliwiając agregację bakterii występujących w niezależnych łańcuchach. W ten sposób odpowiadają zarówno za zwiększanie masy płytki i jej ścisłe połączenie ze szkliwem, jak i za dalszą kolonizację i agregację bakterii [3, 4]. Dekstrany ( $\alpha$ -1,6-glukany), ze względu na swoją rozpuszczalność w wodzie, stanowią głównie rezerwę do dalszych przemian metabolicznych w przypadku niedoboru cukru w żywieniu oraz ułatwiają agregację bakterii w płytce [5]. Mutany i dekstrany tworzą łącznie swoisty szkielet (*matrix*), który spaja poszczególne elementy płytki. Zniszczenie lub naruszenie struktury tego szkieletu może znacznie ułatwić mechaniczne usuwanie biofilmu. Wykazano skuteczność enzymów, zwłaszcza mutanaz hydrolizujących wiązania  $\alpha$ -1,3-glikozydowe oraz dekstranaz rozkładających wiązania  $\alpha$ -1,6-glikozydowe, dlatego jest możliwe ich zastosowanie do enzymatycznej degradacji płytki, a tym samym do łatwiejszego usuwania z powierzchni zębów [6–9].

We współczesnym społeczeństwie duży odsetek osób korzysta z ruchomych uzupełnień protetycznych. Osoby takie są narażone na występowanie licznych zakażeń błony śluzowej jamy ustnej, szczególnie zakażeń grzybiczych. Niewłaściwa higiena jamy ustnej i protez, zaleganie resztek pokarmu oraz mikroporowata struktura uzupełnień protetycznych jest przyczyną tworzenia się płytki protez. Akryl stosowany do uzupełnień protetycznych jest idealnym siedliskiem dla grzybów i bakterii, które zasiedlając je, upośledzają zmysł smaku, są przyczyną nieprzyjemnego zapachu oraz stanów zapalnych o podłożu protetycznym. Jak wykazują liczne badania, głównym źródłem tego typu zakażeń są grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*, a w szczególności z gatunku *Candida albicans*, które izoluje się od 50–100% pacjentów ze zmianami podłoża protetycznego. Gatunek ten uważa się za najbardziej inwazyjny wśród drożdżaków bytujących w jamie ustnej [10–12].

Obecnie są znane i rekomendowane dwie metody usuwania materiału nagromadzonego na płytach protez – oczyszczanie mechaniczne lub chemiczne albo połączenie obu sposobów [13]. Metody te powinny zapewniać usunięcie nagromadzonej już płytki oraz zapobiegać powstawaniu nowej. Nie zawsze jednak uzyskuje się pożądany efekt, ponieważ oczyszczanie mechaniczne jest z reguły mało skuteczne, a środki chemiczne mogą uszkadzać materiał, z którego są wykonane uzupełnienia lub wywoływać skutki uboczne u pacjentów używających ruchomych uzupełnień. Metodą alternatywną może być użycie do czyszczenia protez enzymów, które w sposób swoisty rozkładają makrocząsteczki budujące niekomórkowy szkielet płytki protez. Wykazano, że enzymy lityczne drożdży, enzymy proteolityczne oraz glukanaazy naruszają strukturę płytki, zmniejszają jej przyczepność i ułatwiają mechaniczne usuwanie [14–16].

Celem pracy była ocena skuteczności niektórych enzymów glukanolitycznych w rozkładzie mutanu oraz biofilmów tworzonych z jego udziałem na powierzchni płytek akrylowych, będących imitacją uzupełnień protetycznych.

## Materiał i metody

Do badań użyto trzech enzymów glukanolitycznych, egzomutanazy z *Trichoderma harzianum* CCM F-340 (Czeska Kolekcja Mikroorganizmów, Brno), endomutanazy z *Paenibacillus* sp. (Kolekcja Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej UMCS, Lublin) oraz dekstranazy firmy Sigma-Aldrich®. Oceniono ich skuteczność w działaniu na mutan (oddzielnie lub w mieszaninie), określając stopień scukrzenia oraz solubilizacji (upłynniania) tego biopolimeru. Mutan użyty do doświadczeń otrzymano z hodowli *Streptococcus sobrinus* OMZ 176 (Kolekcja Uniwersytetu w Goeteborgu, Szwecja). Hydrolizę mutanu prowadzono w temperaturze 40°C w ciągu 120 minut. Stopień scukrzenia określano na podstawie ilości uwolnionych z glukanu cukrów redukujących, które oznaczano metodą Somogyi-Nelsona [17, 18]. Solubilizację mierzono metodą turbidymetryczną, badając przy długości fali 560 nm spadek zmętnienia wywołanego obecnością w próbce nierozpuszczalnego w wodzie polisacharydu [19]. Oceniono również przydatność badanych enzymów do usuwania mutanu lub biofilmów tworzonych z jego udziałem i osadzonych *in vitro* na płytkach akrylowych (Probase, Ivoclar Vivadent, Niemcy, wykonane w Laboratorium Protetycznym REMA-DENT w Lublinie). Płytki wstępnie opłaszczano jałową śliną i w celu osadzenia na nich mutanu umie-

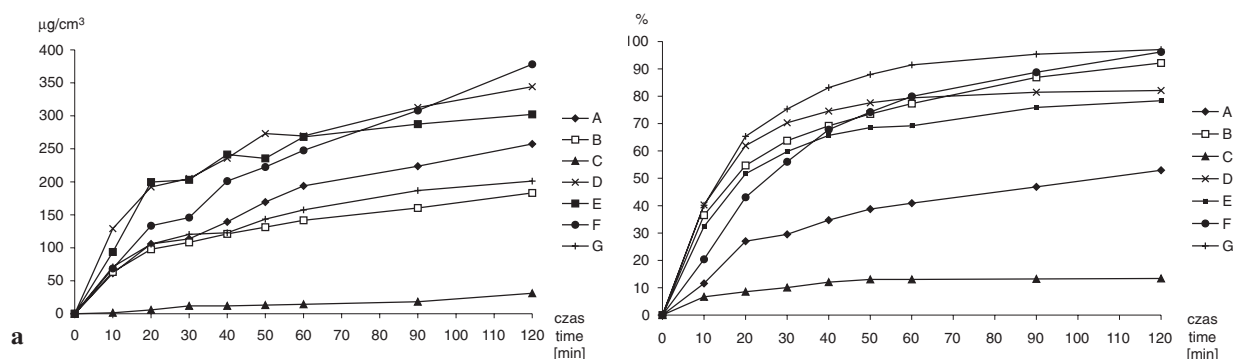
szczano w płynie pohodowlanym *S. sobrinus* OMZ 176 z dodatkiem 3% sacharozy. Aby wytworzyć biofilm – płytki zanurzano w podłożu BHI (Brain Heart Infusion) z 3% sacharozą, zaszczerpionym 9 gatunkami bakterii: *Streptococcus sobrinus* OMZ 176, *S. sobrinus* CKMZ 6070, *S. mutans* CKMZ 6067 (Czeska Kolekcja Mikroorganizmów Zoopatogennych w Brnie), *S. mutans* DSM 20381 (Niemiecka Kolekcja Mikroorganizmów w Braunschweig), oraz *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus magnus*, *Propionibacterium acnes* i jednym gatunkiem drożdży *Candida albicans* (Kolekcja Zakładu Mikrobiologii Jamy Ustnej AM w Gdańsku dzięki uprzejmości prof. dr hab. Anny Kędzi). Po 24-godzinnej inkubacji płytki pokryte mutanem lub biofilmem przepłukiwano wodą i umieszczano w temperaturze 40°C na 12 godzin w roztworach buforowych zawierających poszczególne enzymy lub ich mieszaniny. Kontrolę stanowiły płytki zanurzone w samym buforze lub w wodzie z dodatkiem preparatu handlowego do czyszczenia protez. Wyniki badań archiwizowano fotograficznie. Stężenie enzymów we wszystkich doświadczeniach wynosiło odpowiednio: 0,1 U/cm<sup>3</sup> dla egzo- i endomutanazy oraz 1 U/cm<sup>3</sup> dla dekstranazy. Za jednostkę aktywności (U) przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu minuty uwalnia z glukanu cukry redukujące równoważne 1 μmol glukozy.

## Wyniki

W przeprowadzonych badaniach oceniano skuteczność enzymatycznej degradacji mutanu w warunkach *in vitro*. W pierwszym etapie doświadczeń zbadano przydatność wybranych enzy-

mów glukanolitycznych do hydrolizy mutanu otrzymanego z hodowli *S. sobrinus* OMZ 176. Mutan ten w swojej strukturze miał 59,1% wiązań α-1,3 oraz 40,9% wiązań α-1,6 i dlatego do jego rozkładu użyto egzo- i endomutanazy oraz dekstranazy. Ze względu na nierozpuszczalność w wodzie badanego glukanu, efektywność jego enzymatycznej hydrolizy określano badając stopień scukrzania lub upłynniania substratu (ryc. 1a i b). Analiza uzyskanych wyników wskazuje, że wydajny rozkład mutanu następuje w przypadku synergicznego działania mutanazy i dekstranazy (mieszanina D, F i G). W tych warunkach już po 60 minutach hydrolizy mutan został upłynniony w 79–92% (ryc. 1b). Uwidocznia się również różnica w mechanizmie rozkładu polimeru przez egzo- i endomutanazę. Po dwugodzinnej hydrolizie, egzomutanaza uwalniała z 1 mg mutanu większe ilości cukrów (0,26 mg) w porównaniu z endomutanazą (0,18 mg). Po upływie tego samego czasu endoenzym skuteczniej upłynniał mutan (w 92%) niż egzomutanaza (53%). Działanie samej dekstranazy było mało efektywne (po 2 godzinach scukrczenie wyniosło 2,8%, a solubilizacja 13,4%), ale jej dodatek wyraźnie wzmacniał działanie obu mutanaz. Ograniczone działanie dekstranazy na mutan jest prawdopodobnie wynikiem małej dostępności wiązań α-1,6 dla tego enzymu.

Do dalszych badań wykorzystano efektywną pod względem rozkładu mutanu mieszaninę mutanazy i dekstranazy w wersjach: egzomutanaza + dekstranaza (C), endomutanaza + dekstranaza (D) oraz egzomutanaza + endomutanaza + dekstranaza (E). W celu lepszej obserwacji tworzenia się mutanu i biofilmów na twardych powierzchniach, skonstruowano imitację uzupełnienia protetycznego w postaci płytki akrylowej (3 × 3 cm), którą po opłaskczeniu śliną „pokrywano” warstwą mutanu



**Ryc. 1.** Enzymatyczna hydroliza wolnego (niezwiązanego z płytką) mutanu: **a** – scukrzanie, **b** – solubilizacja: A – egzomutanaza, B – endomutanaza, C – dekstranaza, D – egzomutanaza + endomutanaza + dekstranaza, E – egzomutanaza + endomutanaza, F – egzomutanaza + dekstranaza, G – endomutanaza + dekstranaza

**Fig. 1.** Enzymatic hydrolysis of native mutan: **a** – saccharification, **b** – solubilization: A – exomutanase, B – endomutanase, C – dextransase, D – exomutanase + endomutanase + dextransase, E – exomutanase + endomutanase, F – exomutanase + dextransase, G – endomutanase + dextransase

bądź biofilmu. Na tak przygotowanych płytkach testowano następnie działanie ww. mieszanin enzymatycznych.

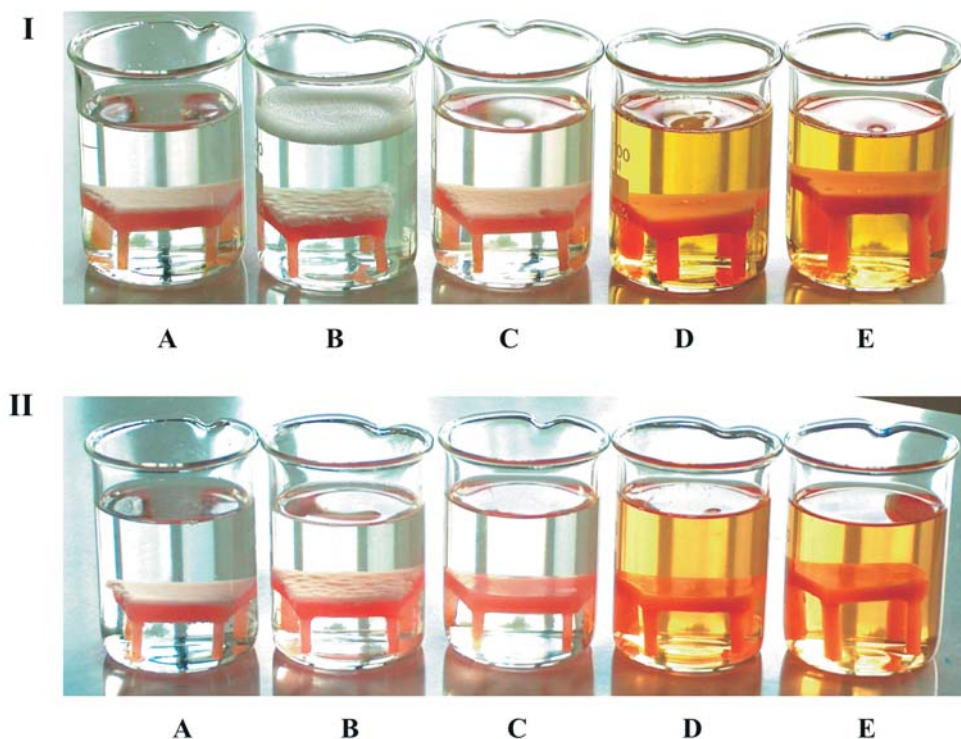
Na rycinie 2 przedstawiono płytki pokryte mutanem, przed i po 12-godzinnej hydrolizie. Działanie mieszanin enzymatycznych w każdym przypadku (C, D i E) było podobne – polimer osadzony na powierzchni płytek został całkowicie rozłożony. Na płytce kontrolnej zanurzonej w samym buforze (A) lub roztworze handlowego preparatu do czyszczenia protez (B) mutan pozostał nienaruszony.

Skuteczność, z jaką mieszanina mutanazy i dekstranazy rozkłada zarówno mutan wolny, jak i związany z twardą powierzchnią, została ostatecznie wykorzystana do usuwania biofilmu uformowanego na płytkach akrylowych (ryc. 3). Po 12-godzinnej hydrolizie mutan będący spoiwem biofilmu został rozłożony, co widać na rycinie 3II. Na płytkach C, D i E pozostała warstwa nieprzylegającego, delikatnego osadu, który stanowiły przede wszystkim wolne komórki drobnoustrojów, co udowodniono mikroskopowo oraz przez kilkakrotne przepłukanie płytek wodą destylowaną (ryc. 3III). Działanie poszczególnych mutanaz z dodatkiem dekstranazy (płytki C i D) spowodowało wyraźne (w stosunku do kontroli niezawierającej enzymu, płytka A) naruszenie struktury bio-

filmu, mieszanina natomiast wszystkich trzech enzymów (E) zhydrolizowała mutan całkowicie (co widać na zdjęciach w postaci bardzo cienkiej warstwy osadu). Pozostałości biofilmu można było usunąć przez płukanie płytek wodą. W wyniku tego zabiegu nienaruszona, przylegająca biowarstwa pozostała na płytce kontrolnej (A) i poddanej działaniu preparatu handlowego (B).

## Omówienie

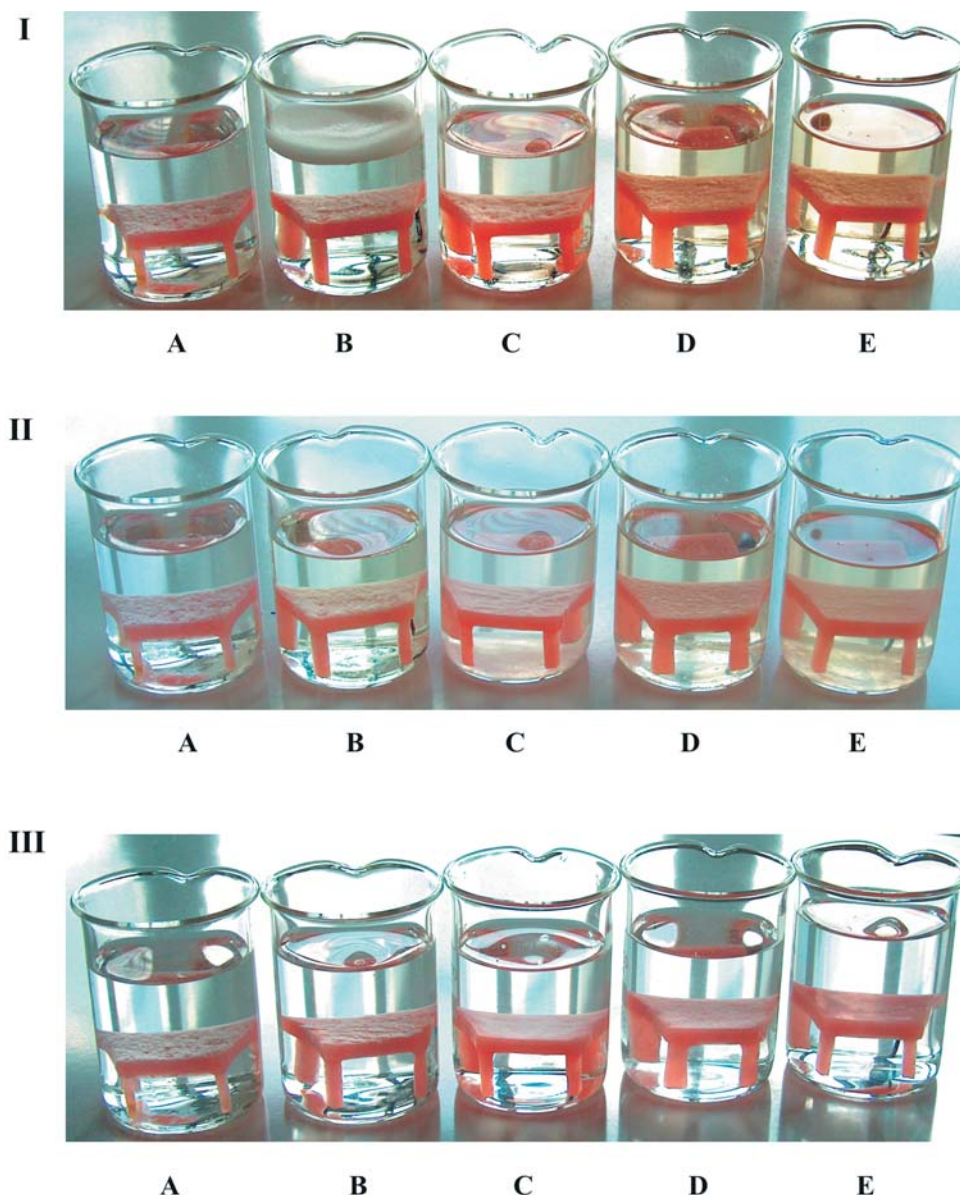
Glukany, a szczególnie mutan, spełniają ważną rolę w powstawaniu płytki nazębnej lub płytki protez. Umożliwiają adhezję drobnoustrojów do powierzchni zębów oraz inicjują wiele innych procesów fizykochemicznych, które warunkują próchnicotwórczość tworzonego biofilmu [20, 21]. Badania dowodzą, że u szczurów gnotobiotycznych zakażonych mutantami *Streptococcus mutans* niezdolnymi do syntezy mutanu, mimo bogatej w sacharozę diety nie stwierdzono zmian próchnicowych [22, 23]. Stąd nasuwa się wniosek, że hydroliza mutanu może zniszczyć integralność płytki, i ułatwić jej mechaniczne usunięcie. Wydaje się, że glukanaazy, a przede wszystkim mutanazy i dekstranazy, są użyteczne w usuwaniu



**Ryc. 2.** Enzymatyczne usuwanie mutanu związanego z płytką akrylową. Widok przed (I) i po 12-godzinnej hydrolizie (II): A – kontrola bez dodania enzymu, B – preparat handlowy, C – egzomutanaza + dekstranaza, D – endomutanaza + dekstranaza, E – egzomutanaza + endomutanaza + dekstranaza

**Fig. 2.** Enzymatic removal of mutan adherent to the acrylic plate. The view before (I) and after 12-h hydrolysis (II): A – control without enzyme, B – commercial preparation, C – exomutanase + dextranase, D – endomutanase + dextranase, E – exomutanase + endomutanase + dextranase





**Ryc. 3.** Enzymatyczne usuwanie biofilmu związanego z płytką akrylową. Widok przed (I), po 12-godzinnej hydroli-  
zie (II) i kilkakrotnym płukaniu wodą (III): A – kontrola bez dodania enzymu, B – preparat handlowy, C – egzomu-  
tanaza + dekstranaza, D – endomutanaza + dekstranaza, E – egzomutanaza + endomutanaza + dekstranaza

**Fig. 3.** Enzymatic removal of biofilm adherent to the acrylic plate. The view before (I) and after 12-h hydrolysis (II) and after repeated washing with water (III): A – control without enzyme, B – commercial preparation, C – exomuta-  
nase + dextranase, D – endomutanase + dextranase, E – exomutanase + endomutanase + dextranase

biofilmów zawierających glukany pochodzenia paciorkowcowego.

W latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX wieku nadzieje na zwalczanie próchnicy wią-  
zano głównie z dekstranazą. W badaniach *in vitro* [24], *in vivo* [25] i w próbach klinicznych [26] te-  
stowano wpływ dekstranaz różnego pochodzenia na rozkład glukanów płytki nazębnej, formowanie  
się biofilmu i rozwój próchnicy. Prace te nie przy-  
niosły jednak spodziewanych wyników. Okazało  
się, że enzym skutecznie rozkładał tylko rozpu-  
szczalne glukany (dekstrany), a to nie zapewniało  
zniszczenia płytki. Dopiero zastosowanie przez

badaczy szwedzkich [27] innej glukanazy – muta-  
nazy otrzymanej z *Trichoderma harzianum* OMZ  
779 dało wymierny efekt w postaci zmniejszenia  
płytki nazębnej. Skuteczność tej mutanazy wyka-  
zali również Kelstrup et al. [9], stosując ją jako do-  
datek do gum do żucia. Formowanie się płytki na-  
zębnej na powierzchniach przednich zębów było  
skutecznie hamowane także za pomocą płynów do  
płukania jamy ustnej zawierających mutanazę wy-  
tworzaną przez *Pseudomonas* [28]. Ograniczenie  
ilości płytki, dzięki mutanazie zastosowanej jako  
dodatek do płukanek jamy ustnej, potwierdzili  
również Nanako et al. [29].

Ze względu na złożoną strukturę związków budujących zrab płytki, ich enzymatyczne usuwanie z biofilmu może być bardziej skuteczne, jeżeli środki czyszczące będą zawierały mieszaninę różnych enzymów. Doniesień na ten temat jest jednak niewiele. Budtz-Jørgensen [30, 31] oraz Budtz-Jørgensen i Kelstrup [27] zastosowali do oczyszczania protez środek zawierający duże stężenia mutanazy, dekstranazy i proteaz, uzyskując znaczne zmniejszenie ilości płytki wraz z efektem terapeutycznym w postaci zmniejszenia liczby stanów zapalnych o podłożu protetycznym u osób korzystających z ruchomych uzupełnień protetycznych, co zapewne wiąże się z ograniczeniem ilości grzybów drożdżopodobnych *Candida albicans* na ich powierzchni.

W badaniach własnych zastosowano po raz pierwszy mieszaninę trzech enzymów, które jak wykazano, w różnym stopniu hydrolizowały wolny, niezwiązany z płytką akrylową mutan. Synergiczne działanie glukanaz spowodowało całkowite usunięcie zarówno mutanu, jak i biofilmu osadzonego na modelu protezy. Należy przy tym podkreślić, że zastosowane stężenia poszczególnych glukanaz były znacznie niższe (10 000 razy w przypadku mutanazy i 1000 razy dla dekstranazy) niż w badaniach prowadzonych przez zespół Budtz-Jørgensena.

Preparat handlowy użyty w badaniach do usuwania warstwy mutanu lub biofilmu z płytek akrylowych był nieskuteczny, tzn. w obu przypadkach struktura mutanu pozostała nienaruszona. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze obserwacje poczynione przez Budtz-Jørgensen i Kelstrup [27], z których wynika jednoznacznie, że testowany preparat handlowy Corega Tabs® nie wykazywał żadnego działania na osadzoną na protezach płytkę.

Zastosowanie do oczyszczania protez preparatów zawierających enzymy, charakteryzujące się swoistym i łagodnym działaniem, jest rozwiązaniem biotechnologicznym będącym konkurencją dla innych metod eliminacji biofilmu. Ze wstępnego rozeznania wynika, że w naszym kraju istnieje duże zapotrzebowanie na tego typu preparaty, a szczególnie byłoby nimi zainteresowani producenci gum do żucia, płynów do płukania jamy ustnej, żeli stosowanych na dziąsła i past do zębów. Preparatów takich nie ma jeszcze na polskim rynku, a w krajach zachodnich istnieją jedynie pojedyncze wzmianki na temat patentów receptur środków higieny jamy ustnej zawierających oprócz wysoko skoncentrowanej mutanazy dodatkowo jeszcze inne enzymy. Wydaje się więc, że nadszedł odpowiedni moment na rozwinięcie tego typu badań w kraju, a uzyskane wyniki należałoby jak najszybciej praktycznie wykorzystać.

## Piśmiennictwo

- [1] GUGGENHEIM B., HALLER R.: Purification and properties of an  $\alpha$ -(1-3) glucanohydrolase from *Trichoderma harzianum*. J. Dent. Res. 1972, 51, 394–402.
- [2] HOTZ P., GUGGENHEIM B., SCHMID R.: Carbohydrates in pooled dental plaque. Caries Res. 1972, 6, 103–121.
- [3] MIKKELSEN L.: Effect of sucrose intake and growth conditions on numbers of dental plaque bacteria expressing proteolytic activity. Microbial Ecol. Health Dis. 1996, 9, 31–320.
- [4] JAŃCZUK, Z.: Stomatologia zachowawcza. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1999.
- [5] EBISU S., MISAKI A., KATO K., KOTANI S.: The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *S. mutans* formed in the absence and presence of dextranase. Carbohydr. Res. 1974, 38, 374–381.
- [6] MAROTTA M., MARTINO A., DE ROSA A., FARINA E., CARTENI M., DE ROSA M.: Degradation of dental plaque and prevention of glucan formation using commercial enzymes. Proc. Biochem. 2002, 38, 101–108.
- [7] RYU S., KIM D., RYU H., CHIBA S., KIMURA A., DAY D. F.: Purification and partial characterization of a novel glucanhydrolase from *Lipomyces starkeyi* KSM 22 and its use for inhibition of insoluble glucan formation. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000, 64, 223–228.
- [8] WIATER A., SZCZODRAK J., ROGALSKI J.: Hydrolysis of mutan and prevention of its formation in streptococcal films by fungal  $\alpha$ -D-glucanases. Proc. Biochem. 2004, 39, 1481–1489.
- [9] KELSTRUP J., HOLM-PEDERSEN P., POULSEN S.: Reduction of the formation of dental plaque and gingivitis in humans by crude mutanase. Scand. J. Dent. Res. 1978, 86, 93–102.
- [10] MIERZWIŃSKA-NASTALSKA E., RUSINIAK K., GONTEK R., OKOŃSKI P.: Wpływ higieny uzupełnień protetycznych na powstawanie infekcji grzybiczej błony śluzowej jamy ustnej. Nowa Stomat. 2000, 14, 52–55.
- [11] SŁOTWIŃSKA S. M., PIERZYŃSKA E., FOIK T.: Występowanie grzybów z rodzaju *Candida* w jamie ustnej u pacjentów z zapaleniem dziąseł i zapaleniem przyzębia. Nowa Stomat. 2000, 13, 51–54.
- [12] DOROCKA-BOBKOWSKA B., KONOPKA K.: Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa. Dent. Med. Probl. 2003, 40, 405–410.
- [13] SHAY K.: Denture hygiene: a review and update. J. Contem. Dent. Practice, 2000, 1, 1–8.
- [14] TAMAMOTO M., HAMADA T., MIYAKE Y., SUGINAKA H.: Ability of enzymes to remove *Candida*. J. Prosthet. Dent. 1985, 53, 214–216.
- [15] BUDTZ-JØRGENSEN E., KELSTRUP J., POULSEN S.: Reduction of formation of denture plaque by a protease (Alcalase®). Acta Odontol. Scand. 1983, 41, 93–98.
- [16] HAHN-BERG I. C., KALFAS S., MALMSTEN M., ARNEBRANT T.: Proteolytic degradation of oral biofilms *in vitro* and *in vivo*: potential of proteases originating from *Euphausia superba* for plaque control. Eur. J. Oral. Sci. 2001, 109, 316–324.

- [17] NELSON N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 1944, 153, 375–380.
- [18] SOMOGYI M.: A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem. 1945, 160, 61–68.
- [19] KURAMITSU H., WONDRAK L.: Insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans* serotype c strains. Infect. Immun. 1983, 42, 763–770.
- [20] GUGGENHEIM B.: Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*. Helv. Odont. Acta. 1970, 14, 89–108.
- [21] CRITCHLEY P.: The microbiology of dental plaque with special reference to polysaccharide formation. Dtsch. Zahnärztl. Z. 1971, 26, 1155–1161.
- [22] DE STOPPELAAR J. D., KÖNIG K. G., PLASSCHAERT A. J. M., HOEVEN J. S.: Decreased cariogenicity of a mutant of *Streptococcus mutans*. Archs. Oral Biol. 1971, 16, 971–975.
- [23] TANZER J. M., FREEDMAN M. L., FITZGERALD R. J., LARSON R. H.: Diminished virulence of glucan synthesis-defective mutants of *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 1974, 10, 197–203.
- [24] GIBBONS R. J., BANGHART S. B.: Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. Arch. Oral Biol. 1967, 12, 11–24.
- [25] FITZGERALD R. J., KEYES P. H., STOUTT T. H., SPINELL D. M.: The effects of a dextranase preparation on plaque and caries in hamsters, a preliminary report. J. Am. Dent. Ass. 1968, 76, 301–304.
- [26] LOBENE R. R.: A clinical study of the effect of dextranase on human dental plaque. J. Am. Dent. Ass. 1971, 82, 132–135.
- [27] BUDTZ-JÖRGENSEN E., KELSTRUP J.: Enzymes as denture cleansers. Scand. J. Dent. Res. 1977, 85, 209–215.
- [28] INOUE M., YAKUSHIJI T., MIZURO J., YAMAMOTO Y., TANII S.: Inhibition of dental plaque formation by mouthwash containing an endo- $\alpha$ -1-3-glucanase. Clin. Prevent. Dent. 1990, 12, 10–14.
- [29] NAKAKO H., SAJI K., KIKUCHI Y.: Effect of mutanase containing mouthwash on plaque formation in a double-blind test. J. Dent. Health 1981, 31, 20–23.
- [30] BUDTZ-JÖRGENSEN E.: Prevention of denture plaque formation by an enzyme denture cleanser. J. Biol. Buccale. 1977, 5, 239–244.
- [31] BUDTZ-JÖRGENSEN E.: A 3-months' study of enzymes as denture cleansers. J. Oral Rehabil. 1978, 5, 35–39.

### Adres do korespondencji:

Adrian Wiater  
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii  
Zakład Mikrobiologii Przemysłowej UMCS  
ul. Akademicka 19  
20-033 Lublin  
tel.: +48 81 5375960  
e-mail: adrianw2@wp.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 13.01.2005 r.  
Po recenzji: 24.01.2005 r.  
Zaakceptowano do druku: 24.01.2005 r.

Received: 13.01.2005  
Revised: 24.01.2005  
Accepted: 24.01.2005

