

Stufenweises Prüfschema für Zuckeraustauschstoffe – Vorprüfung mittels Enzymen

4. Glucosyltransferasen aus *Streptococcus mutans* AHT

F. Forsthuber und G. Siebert

Abteilung für Experimentelle Zahnheilkunde, Universität Würzburg

Zusammenfassung: Ein kontinuierliches Meßverfahren, das die Freisetzung von Fructose und Glucose gleichzeitig enzymatisch erfaßt, wird an die kinetischen Bedingungen der Polysaccharidsynthese aus Saccharose durch Glucosyltransferasen aus *Streptococcus mutans* AHT so angepaßt, daß die Anfangsgeschwindigkeit, die Michaelis-Konstante für Saccharose und die Effizienz der Glucanbildung bestimmt werden können. Durch Ermittlung von löslichem und unlöslichem Glucan in Langzeitversuchen wird die neue Methode mit einem etablierten Meßverfahren verglichen. Als Beispiele für den Einfluß von Zuckeraustauschstoffen auf Glucosyltransferasen werden die Effekte von Leucrose, Nystose, Palatinit, Xylit, Leucrit und Polyglucose PL-3 beschrieben. Die Ergebnisse tragen zur Vorbeurteilung der Eignung von Zuckeraustauschstoffen als nichtkariogenen Süßungsmitteln bei.

Summary: A continuous procedure for the simultaneous enzymatic measurement of the release of free fructose and glucose was adapted to the kinetic conditions of the synthesis of polysaccharides from sucrose by glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* AHT. Initial velocities, K_m of sucrose, and the efficiency of the formation of glucans from sucrose can be determined. Longtime incubations with the isolation of soluble and insoluble glucans as an established method were compared with the new procedure. As examples of the effect of sugar substitutes on glucosyltransferases, data on leucrose, nystose, Palatinit, xylitol, leucritol and polyglucose PL-3 are presented. The results provide a preliminary assessment of sugar substitutes such as non-cariogenic sweeteners.

Schlüsselwörter: Glucan, Glucosyltransferasen, Leucrose, Palatinit, Polyglucose PL-3, Saccharose, Xylit, Zuckeraustauschstoffe

Key words: glucan; glucosyltransferases; leucrose; Palatinit; polyglucose PL-3; sucrose; xylitol; sugar substitutes

Einleitung

In früheren Mitteilungen (1–3) ist die Verwendung ausgewählter Enzymtests für eine Vorprüfung von Zuckeraustauschstoffen beschrieben worden; für die ernährungswissenschaftliche (1, 3) und für die zahnmedizinische (2) Vorbeurteilung haben sich diese Tests als sehr nützlich erwiesen, wie inzwischen u. a. für Nystose (4) und für Leucrose (5, 6) gezeigt worden ist.

Saccharose hat ein hohes kariogenes Potential nicht nur wegen der Säurebildung durch Mundbakterien, sondern auch als Substrat bei der Bildung von Plaque-Polysacchariden, welche die klebrige Matrix der Zahnplaque darstellen (7). Extrazelluläre Glucosyltransferasen, vor allem aus Streptokokkenarten, sind für die Polysaccharid-(Glucan-)Synthese verantwortlich (Übersicht siehe bei (8)), doch stellt die Messung der Aktivität der Glucosyltransferasen noch ein Problem dar. Erfasst man Glucane als Reaktionsprodukt, so sind zwar Fällungsverfahren – mit (9) oder ohne (10) radioaktiv markierte Saccharose als Substrat – für synthetisierte Glucane mit niederen Alkoholen beschrieben, aber eine Trennung in lösliche und unlösliche Glucane bleibt unvollständig, solange man nicht mit hochgereinigten, $\alpha(1\rightarrow3)$ - bzw. $\alpha(1\rightarrow6)$ -spezifischen Glucosyltransferase-Fractionen arbeitet; diese Verfahren sind zudem zeit- und arbeitsaufwendig. Erfasst man dagegen die Zunahme an Fructose und Glucose als Folge der Glucanbildung, so sind diskontinuierliche Analysen (11) enteiweißter Proben der Reaktionsansätze umständlich.

Das Prinzip einer kontinuierlichen Verfolgung der Glucosyltransferase-Aktivität ist zuerst von Newbrun und Carlsson (12) für ein hochgereinigtes Enzym aus *S. sanguis* angegeben worden, wobei der Zuwachs an freier Fructose gemessen wurde; dies reicht bei den *S. mutans*-Enzymen nicht aus, weil neben Fructose auch eine kleinere Menge freier Glucose auftritt. Die gleichzeitige Messung von freier Glucose und freier Fructose haben Felgenhauer und Trautner (13) angegeben, aber bei pH 7,0 gearbeitet, wo die Michaelis-Konstante für Saccharose fast eine Größenordnung höher als bei pH 6,0, dem pH-Optimum der Glucosyltransferasen, ist. Nach bestmöglicher Kenntnis der Autoren sind beide Verfahren (12, 13) nicht in anderen Laboratorien angewendet worden.

Es ist das Ziel der hier berichteten Versuche, die kontinuierliche enzymatische Verfolgung der Glucosyltransferase-Aktivität auf eine solide kinetische Basis zu stellen, indem nahe der Michaelis-Konstante am pH-Optimum gemessen wird, und zur Prüfung von Zuckeraustauschstoffen einzusetzen, seien diese nun Substrate, Effektoren oder ohne Wirkung auf die Glucansynthese.

Material und Methoden

Die Herkunft der Substrate und Zuckeraustauschstoffe wurde l.c. (1) beschrieben; Nystose wurde von Dr. Hidaka, Kamagawa (Japan) zur Verfügung gestellt. Leucrit (hydrogenierte Leucose) und Polyglucose PL-3 (lineares $\alpha(1\rightarrow6)$ -Glucan mit 18,5 Glucoseresten als mittlerer Kettenlänge, Mol-Gewicht ca. 3000) wurden von Dr. Schwengers, Dormagen, erhalten. Alle übrigen Chemikalien waren von bester kommerziell erhältlicher Qualität.

S. mutans AHT wurde auf Tryptose-Hefeextrakt mit 0,5 % Glucose (14) angezogen; aus dem Kulturüberstand wurde die zwischen 0 und 55 % Ammoniumsulfat-Sättigung anfallende Proteinfraction gewonnen. Nach Dialyse gegen 50 mmol/l Phosphatpuffer pH 5,0 und Klärung auf der Zentrifuge wurde die teilgereinigte Glucosyltransferasen-Präparation (10) bei -30°C aufbewahrt; die Haltbarkeit beträgt etwa ein Jahr ohne wesentlichen Aktivitätsverlust. Protein wurde nach Lowry (15) bestimmt; die Aktivität betrug $v_{\max} = 0,17 \mu\text{mol/min} \times \text{mg Protein}$ bei 25°C .

Die Aktivitätsmessung der Glucosyltransferasen erfolgte in zwei Küvetten im Beckman-DU-8 Spektralphotometer, wobei das Reaktionsgemisch zur Bestimmung von Glucose (16) und Glucose plus Fructose (17) dem Inkubations-pH von pH 6,5 angepaßt wurde; jeder Teilschritt der enzymatischen Bestimmung – Hexokinase (Glucose und Fructose zu ihren 6-Phosphaten), Phosphoglucoseisomerase (F6P zu G6P) und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P zur NADP-Reduktion) – wurde separat auf seine pH-Abhängigkeit geprüft und durch Variation von Enzymmenge und Reaktionszeit so weit optimiert, daß die Bestimmung von Glucose und Fructose mit derselben Ausbeute und Wiederholbarkeit ablief wie unter Standard-Analysebedingungen (16, 17) bei pH 7,5. Aus diesen Vorversuchen ergab sich folgende Arbeitsvorschrift: Es werden in eine Küvette pipettiert (alle Angaben als Endkonzentration) Saccharose 20 mmol/l bzw. Saccharose-Prüfstoff-Gemisch, gelöst in 0,3 mmol/l Triethanolamin, pH 6,6, 3 mmol/l MgSO_4 ; 2 mg ATP und 2 mg NADP werden in 0,3 mmol/l Triethanolamin pH 6,6 gelöst; 2,8 U Hexokinase; 8,4 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; mit Triethanolamin-Puffer wird auf 3 ml aufgefüllt. In einer zweiten Küvette werden außer den eben genannten Enzymen noch 21 U Phosphoglucoseisomerase zugesetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von je 20 mU Glucosyltransferase zu beiden Küvetten gestartet. Die Reaktionstemperatur liegt bei 25 °C.

Die Aktivität der Glucosyltransferasen wurde aus der Differenz von freigesetzter Fructose und freigesetzter Glucose berechnet: Die Differenz ist die Menge an Glucose ($\mu\text{mol}/\text{min}$) aus Saccharose, die zu Glucan polymerisiert worden ist. Der Saccharoseverbrauch ist um den Betrag an freier Glucose größer und entspricht der Fructose-Freisetzung. Zur kinetischen Auswertung, insbesondere k_m -Wert, Maximalgeschwindigkeit und ggf. Hemmtyp und k_i dienen die in l.c. (1) genannten Verfahren.

Zur Gewinnung von Glucanen wurden 2 mmol Saccharose in 10,3 ml Triethanolamin-Puffer (0,3 mol/l) von pH 6,6 mit 3,4 mg Enzymprotein 20 Std. bei 25 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch 20 min Erhitzen im kochenden Wasserbad wurden unlösliche Glucane auf der Zentrifuge abgetrennt und dreimal mit Puffer gewaschen. Lösliche Glucane wurden bei 83 % Ethanol (v/v) gefällt, nach 16 Std. Stehen in der Kälte mit 83%igem Ethanol (v/v) dreimal gewaschen und ebenso wie die unlöslichen Glucane in einem hohen Überschuß von 0,3 mmol/l H_2SO_4 über 17–20 Std. bei 100 °C hydrolysiert. Nach Neutralisation mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ wurden Glucose (und Fructose) enzymatisch bestimmt (siehe oben).

Ergebnisse

Kinetische Konstanten

Der Reaktionsverlauf der Glucansynthese bei pH 6,5 ist in Abbildung 1 für eine Versuchsdauer von 20 min dargestellt; bis zu 60 min verlief die Reaktion linear proportional zur Zeit. Michaelis-Konstanten für Saccharose sind in Tabelle 1 für verschiedene pH-Werte der Inkubationsgemische angegeben; bei Auftragung von pk_m gegen pH ergab sich eine Gerade mit der Steigung $-1,0$. Wie Tabelle 1 zeigt, bestand zwischen den k_m -Werten bei pH 6,0, dem pH-Optimum des Enzyms (8), und pH 6,5 kein ins Gewicht fallender Unterschied.

Polysaccharidsynthese

Die Freisetzung von Monosacchariden, wie sie mit der hier beschriebenen Methode gemessen wird, bedarf des Beweises, daß sie als Folge der

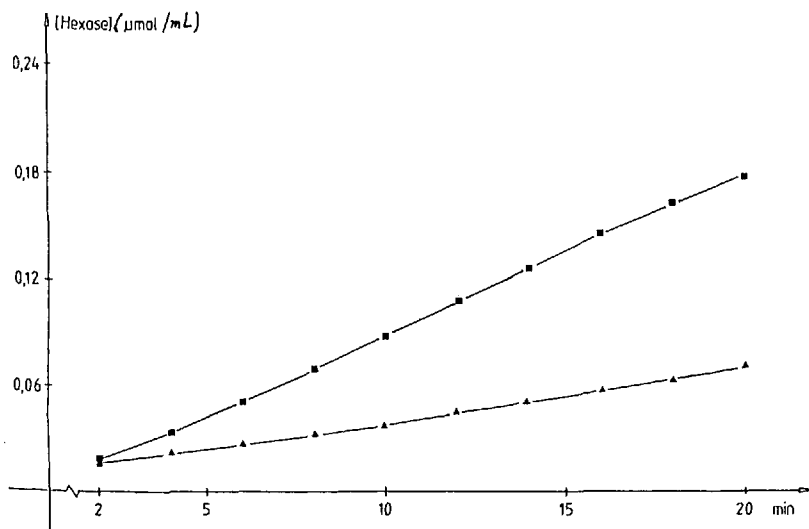


Abb. 1. Reaktionsverlauf der Glucosyltransferase-Aktivitätsbestimmung bei pH 6,5. Die Freisetzung von Glucose (▲—▲) und Fructose (■—■) aus 10 mmol/l Saccharose wird enzymatisch simultan und fortlaufend in zwei Photometerküvetten gemessen. Die Differenz zwischen Fructose und Glucose entspricht synthetisiertem Glucan. pH 6,5 in 0,3 mmol/l Triethanolamin-Puffer; Temp. 25 °C; 336 μ g Enzymprotein pro Küvette.

Polysaccharidsynthese auftritt und somit ein Maß der Glucanbildung ist. Nach 20 Std. Reaktionsdauer des Standard-Inkubationsansatzes (ohne Enzyme für die Monosaccharidanalysen) wurden unlösliche Glucane (ca. 90 % der Glucanbildung) und lösliche Glucane (ca. 10 % der Glucanbildung) bestimmt und in Relation zur Menge an freier Fructose, vermindert

Tab. 1. Michaelis-Konstante der Glucosyltransferase aus *S. mutans* AHT für Saccharose in Abhängigkeit vom pH.

pH	k_m (mmol/l)	$-\lg k_m (\triangleq pk_m)$	v (U/min \times mg)
7,5	41	-1,62	0,32
7,0	14	-1,15	0,30
6,5	$3,7 \pm 0,18^*$	-0,57	0,17
6,0**	2,0	-0,30	0,86

Als Glucosyltransferase diente die unter Methoden beschriebene teilgereinigte Enzympräparation mit $v_{\max} = 0,17 \pm 0,01$ μ mol/min \times mg Protein nach Lineweaver-Burk bzw. $0,17 \pm 0,003$ μ mol/min \times mg Protein nach Hanes-Woolf.

* Auswertung nach Lineweaver-Burk; nach Hanes-Woolf ergibt sich k_m zu $4,0 \pm 0,57$ mmol/l.

** Dieser Wert wurde ermittelt, indem nach der Inkubation bei 37 °C mit äquimolaren $ZnCl_2$ -NaOH-Lösungen enteiweißt wurde und Glucose sowie Fructose diskontinuierlich analysiert wurden (s.a. l.c. (8)).

um den Betrag an freier Glucose, gesetzt. Von der zugesetzten Saccharose waren ca. 25 % in freie Fructose umgesetzt worden; freie Glucose machte 3,3 % aus. Die nach Hydrolyse zu Glucose bestimmten Glucanmengen entsprachen ($n = 6$) 77 ± 4 % der aus der Monosaccharidfreisetzung errechneten, theoretisch möglichen Glucanmenge und standen damit, angesichts der fällungs- und hydrolysebedingten Verluste, in plausibler Relation zum Saccharoseumsatz.

Effizienz

Aus der Relation von polymerisierter zu freigesetzter Glucose ließ sich die Effizienz der Glucansynthese aus Saccharose abschätzen. Mit der Formel

$$\text{Effizienz} = \frac{\text{mol Glucose polymerisiert}}{\text{mol Glucose freigesetzt}} \quad (1)$$

$$\% \text{ Effizienz} = 1 - \left(\frac{1}{\text{Effizienz} + 1} \right) \times 100 \quad (2)$$

erhielt man im eben beschriebenen Versuch der 20stündigen Inkubation einen Wert von ca. 6,5 für die Effizienz gleich 87 %, während im kurzfristigen Standardtest in Abhängigkeit von der vorgelegten Substratkonzentration Werte zwischen 2,25 und 3,0 gleich 69–75 % Effizienz beobachtet wurden. Änderungen der Effizienz spielen bei Effektoren der Glucansynthesen eine Rolle (siehe unten).

Einfluß ausgewählter Zuckeraustauschstoffe

Zunächst war zu prüfen, ob Zuckeraustauschstoffe, soweit sie Glucosyl-Disaccharide oder -Oligosaccharide sind, Substratcharakter für Glucosyltransferasen haben und zur Glucanbildung führen. Dies war für jeweils 50 mmol/l Leucrose [D-Glucosyl- $\alpha(1 \rightarrow 5)$ -D-fructopyranose], Leucrit, Nystose [D-Glucosyl- $\beta(1 \rightarrow 2)$ -D-fructosyl- $\beta(1 \rightarrow 2)$ -D-fructosyl- $\beta(1 \rightarrow 2)$ -D-fructose], Palatinit® und Polyglucose PL-3 nicht der Fall.

Damit eröffnete sich die Möglichkeit, die genannten Zuckeraustauschstoffe auf Effektorwirkung gegenüber Glucosyltransferasen zu prüfen. Hierbei zeigte sich kein Einfluß von Leucrose (400 mmol/l) oder Nystose (50 mmol/l) auf die Initialgeschwindigkeit der Glucansynthese; dagegen war Polyglucose PL-3 ein Inhibitor der Glucosyltransferasen, Xylit-Palatinit und Leucrit waren Aktivatoren der Glucosyltransferasen.

Polyglucose PL-3 (Abb. 2) bewirkte eine Hemmung vom linear gemischten Typ mit $k_1 = 15$ mmol/l und $k'_1 = 19$ mmol/l. Halbmaximale Hemmung wurde durch etwa 24 mmol/l Polyglucose PL-3 erreicht, was einer 7,2%igen Lösung (w/v) dieses Oligosaccharids entsprach. Die Effizienz der Glucansynthese wurde durch 27 mmol/l Polyglucose PL-3 bei 3 mmol/l Saccharose etwa verdreifacht.

Leucrit (19 mmol/l) bewirkte etwa eine Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit (20 mmol/l Saccharose). Die Effizienz der Glucansynthese wurde hierbei etwa verdreifacht (siehe Tab. 2).

Einen geringen, aber signifikanten bzw. hochsignifikanten Effekt zeigte Xylit (Tab. 2). Durch Xylit (200 mmol/l) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit um 17 % und die Effizienz um 60 % erhöht.

Tab. 2. Aktivierung der Glucosyltransferasen aus *S. mutans* AHT.

	Reaktionsgeschwindigkeit (U/ml)		Effizienz	
	Kontrolle*	Prüfstoff	Kontrolle*	Prüfstoff
Leucrit 19 mmol/l	3,02	5,41	2,02	6,10
Xylit 50 mmol/l	3,02	3,17	2,06	2,61
100 mmol/l	3,02	3,30	2,06	2,64
200 mmol/l	3,02 ± 0,05	3,55 ± 0,13	2,06 ± 0,1	3,23 ± 0,15
	p = 0,0013 n = 3		p = 0,0001 n = 3	

* 20 mmol/l Saccharose

Süßstoffe wie Saccharin (5 mmol/l) und Cyclamat (40 mmol/l) sind bei 10 mmol/l Saccharose als Substrat ohne Effekt auf die Glucosyltransferasen.

Diskussion

Das hier dargestellte Verfahren zur Messung der Aktivität von Glucosyltransferasen ist durch zwei Merkmale gekennzeichnet: Wissenschaftliche Genauigkeit in Meßbedingungen und Meßergebnissen verbindet sich mit dem Charakter eines Schnelltests zur Reihenprüfung. Damit werden molare Dimensionen der Enzymaktivität angebar, die die weitere Bearbeitung wissenschaftlicher Fragen ermöglichen (Siebert & Forsthuber, unveröffentlicht); zugleich tritt für Fragen der Kariesentstehung und Kariesverhütung die Messung der Glucansynthese und ihrer Hemmbarkeit gleichwertig neben die Messung der Säurebildung (18) aus Saccharose und erlaubt es, die beiden für die Kariesentstehung wichtigsten Eigenschaften der Saccharose messend zu verfolgen.

Die in Tabelle 2 verzeichneten k_m -Werte zeigen, daß bei Abweichung vom pH-Optimum zum Neutralpunkt hin die Konzentrationen an Saccharose für Halbsättigung stark ansteigen; Zweifel an der Identität der oberhalb 15 mmol/l Saccharose gemessenen Aktivitäten (13) mit den bei 2–4 mmol/l erhaltenen Daten sind daher berechtigt; zu hohe Saccharosekonzentrationen können zudem Anlaß zu Begleitreaktionen geben, die nichts mit der Glucansynthese zu tun haben.

Eine Beeinträchtigung des hier beschriebenen Meßverfahrens durch Fremdaktivitäten der Glucosyltransferase-Präparation kann bei pH 6,5 ausgeschlossen werden: Hydrolytischer Abbau von Glucanen kann bei Reaktionsbeginn nicht erfolgen, da kein Glucan vorliegt und ein saccharosefreier Kontrollversuch keinen Glucosezuwachs anzeigt. Der über 60 min lineare Reaktionsverlauf (lt. Abb. 1) beweist, daß in dieser Zeitspanne kein Glucanabbau stattgefunden haben kann, da sonst eine mit der Zeit schnellere Glucose- als Fructosefreisetzung auftreten müßte. Da nach Glucanhydrolyse Fructose nicht auftritt, kann eine Fructosyltransferase (Lävansu-

crase) nicht vorgelegen haben. Ein hydrolytischer Abbau von Saccharose durch ein Enzym, das der Hefe-Invertase ähnelt (zur Literaturübersicht siehe l.c. (2)), kann nicht vorliegen, da sonst Leucrose (6) Effekte zeigen müßte, was nicht der Fall ist.

Das Meßverfahren ist zugleich geeignet, Inhibitorwirkungen auf Glucosyltransferasen zu erkennen sowie qualitativ und quantitativ in molaren Dimensionen zu beschreiben, wie für Polyglucose PL-3 (Abb. 2) gezeigt wird. Inhibitorwirkungen auf die Glucansynthese verleihen den Hemmstoffen eine potentiell antikariogene Eigenschaft, welche in anderer Versuchsanordnung weiterzuverfolgen wäre, ob sie z. B. bei Standardverfahren zur Ermittlung des kariogenen Potentials von Zuckeraustauschstoffen auftritt (19). Erhöhungen der Geschwindigkeit der Monosaccharidfreisetzung, z. B. durch Xylit oder Leucrit (Tab. 2), bedeuten nicht notwendigerweise erhöhte Glucanbildung, solange Kettenlänge und Löslichkeit der Glucane nicht separat bestimmt worden sind.

Neuartig ist die Anwendung des Effizienzbegriffes auf die Glucansynthese aus Saccharose; theoretisch kann die Effizienz hierbei nicht hundertprozentig sein, da hierfür das Energiegefälle der Glykosidbindungen von Saccharose zu Glucan thermodynamisch nicht ausreichen dürfte. Welche Ursachen für Änderungen der Effizienz maßgeblich sind, ist noch unklar; im Falle der Polyglucose PL-3 und anderer Substanzen wäre daran zu denken, daß zusätzliche Akzeptorfunktionen für die Glucosylübertragung eingebracht werden, was mit den Vorstellungen von Robyt et al. (20–22) über den Reaktionsmechanismus der extrazellulären Glucansynthese im Einklang stände.

Zur zahnmedizinischen Bedeutung dieser Untersuchungen sind drei Aspekte anzuführen: Einmal bedingt Glucosyltransferasewirkung ein Freiwerden von Monosacchariden, bei denen Fructose überwiegt (Abb. 1); damit werden erhöhte Raten der Säurebildung aus Saccharose plus Fructose möglich, was kürzlich experimentell belegt wurde (18). Nicht nur die

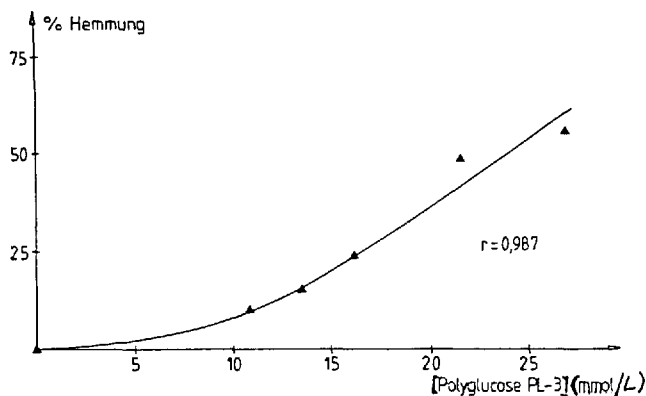


Abb. 2. Hemmwirkung von Polyglucose PL-3 auf Glucosyltransferase aus *S. mutants* AHT. Es wurden die relativen Hemmeffekte bei verschiedenen Konzentrationen von Polyglucose PL-3 eingetragen. Die Saccharosekonzentration betrug 20 mmol/l.

Synthese von Plaquepolysacchariden mit Freisetzung von Monosacchariden fördert die Kariesentstehung, sondern auch das nach Saccharoseverfütterung auftretende erhöhte Angebot an vergärbaren Zuckern (Ziesenitz & Siebert, unveröffentlicht). Weiterhin umfaßt die hier vorgestellte Aktivitätsbestimmung der Glucosyltransferase einen Zeitraum, der für die orale Zucker-Clearance von etwa 20 min (23) relevant ist; eine über Stunden verlaufende Reaktionsdauer wäre praxisfern.

Schließlich liegt der k_m -Wert für Saccharose bei der Glucansynthese mit 2–4 mmol/l (Tab. 1) unterhalb der Geschmacksschwelle für dieses Disaccharid. Genausowenig wie bei der Säurebildung (18) kann daher der Mensch „schmecken“, ob Saccharose von Mundbakterien zur Synthese von Plaquepolysacchariden herangezogen wird. Süßgeschmack kann also nicht als Warnindiz für mögliche Schmelzschäden dienen.

Danksagung

Herrn Prof. Gehring verdanken die Verfasser die Überlassung von *S. mutans* AHT. Finanzielle Unterstützung kam vom Universitätsbund Würzburg.

Literatur

1. Siebert G, Ziesenitz SC (1986) Stufenweises Prüfschema für Zuckeraustauschstoffe – Vorprüfung mittels Enzymen. 1. α -Glucosidase aus Hefe. Z Ernährungswiss 25:242–247
2. Ziesenitz SC (1986) Stufenweises Prüfschema für Zuckeraustauschstoffe – Vorprüfung mittels Enzymen. 2. β -Fructosidase aus Hefe. Z Ernährungswiss 25:248–252
3. Ziesenitz SC (1986) Stufenweises Prüfschema für Zuckeraustauschstoffe – Vorprüfung mittels Enzymen. 3. Carbohydrasen aus Jejunal mucosa des Menschen. Z Ernährungswiss 25:253–258
4. Ziesenitz SC, Siebert G (1987) In vitro assessment of nystose as a sugar substitute. J Nutr 117:846–851
5. Ziesenitz SC, Siebert G, Schwengers D, Lemmes R (1988) Nutritional assessment of leucrose [D-glucopyranosyl- α (1 \rightarrow 5)-D-fructopyranose] as a sugar substitute. Msr submitted
6. Ziesenitz SC, Siebert G, Imfeld T (1988) Cariological assessment of leucrose [D-glucopyranosyl- α (1 \rightarrow 5)-D-fructopyranose] as a sugar substitute. Msr submitted
7. Schraitle R, Siebert G (Hrsg) (1987) Zahngesundheit und Ernährung. Hanser-Verlag, München Wien
8. Ciardi JE (1983) Purification and properties of glucosyltransferase of *streptococcus mutans*: a review. In: Doyle RJ, Ciardi JE (eds) Glucosyltransferases, Glucans, Sucrose and Dental Caries. Sp Supp Chemical Senses, pp 51–64
9. Chludzinsky A, Germaine G, Schachtele C (1974) Purification and properties of dextranucrase from *streptococcus mutans*. J Bacteriol 118:1–7
10. Fukui K, Moriyama T, Miyake Y, Mizutani K, Tanaka O (1982) Purification and properties of glucosyltransferase responsible for water-insoluble glucan synthesis from *streptococcus mutans*. Infect Immun 37:1–9
11. Mayer R (1987) Dextranucrase: A glucosyltransferase from *streptococcus sanguis*. In: Ginsburg V (ed) Methods in Enzymology, Complex Carbohydrates, vol 138, part E. Academic Press, Orlando, pp 649–660
12. Newbrun E, Carlsson J (1969) Reaction rate of dextranucrase from *Streptococcus sanguis* in the presence of various compounds. Archs oral Biol 14:461–468

13. Felgenhauer B, Trautner K (1982) A comparative study of extracellular glucanhydrolase and glucosyltransferase enzyme activities of 5 different serotypes of oral *Streptococcus mutans*. Archs oral Biol 27:455-461
14. Hamada S, Torii M (1978) Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. Infect Immun 20:592-599
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275
16. Bergmeyer HU, Bernt E, Schmidt F, Stork H (1970) D-Glucose-Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. In: Bergmeyer HU (Hrsg) Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl Bd II. Verlag Chemie, Weinheim, S 1163-1168
17. Bernt E, Bergmeyer HU (1970) D-Fructose. In: Bergmeyer HU (Hrsg) Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Aufl Bd II. Verlag Chemie, Weinheim, S 1266-1269
18. Ziesenitz SC (1987) Zuckervergärung durch Mundbakterien. In: Siebert G (Hrsg) IV. Würzburger Zuckersymposium. Dtsch Zahnärztl Z 42 (Sonderheft):S30-S38
19. Hefferen JJ (ed) (1987) Scientific Consensus Conference on Methods for Assessment of the Cariogenic Potential of Foods. J Dent Res 65 (spec issue):1473-1543
20. Robyt JF, Corrigan AJ (1977) The mechanism of dextranucrase action. Activation of dextranucrase from *Streptococcus mutans* OMZ 176 by dextran and modified dextran and the non-existence of the primer requirement of the synthesis of dextran. Arch Biochem Biophys 183:726-731
21. Robyt JF, Kimble BK, Walseth TF (1974) The mechanism of dextranucrase action. Direction of dextran biosynthesis. Arch Biochem. Biophys 165:634-640
22. Robyt JF, Taniguchi H (1976) The mechanism of dextranucrase action. Biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextran. Arch Biochem Biophys 174:129-135
23. Dawes C (1983) A mathematical model of salivary clearance of sugar from the oral cavity. Caries Res 17:321-334

Eingegangen 28. Dezember 1987

Für die Verfasser:

Prof. Dr. G. Siebert, Abteilung für experimentelle Zahnmedizin, Pleicherwall 2, D-8700 Würzburg