Check for updates

대한치과재료학회지 47(2) : 63-70, 2020
Korean Journal of Dental Materials (*Korean J Dent Mater*)
ISSN:2384-4434 (Print); 2384-3268 (Online)
Available online at http://www.kadm.org
http://dx.doi.org/10.14815/kjdm.2020.47.2.63

항균물질과 혼합한 실험용 불소바니쉬의 *Streptococcus mutans*에 대한 항균의 지속성

손주리[1], 배지명[2,*]

[1]원광보건대학교 치위생과,
[2]원광대학교 치과대학 치과생체재료학교실 및 생체재료 · 매식연구소

Sustainability of the antibacterial activity of experimental fluoride varnish mixed with antibacterial agents against *Streptococcus mutans*

Ju-Lee Son[1], Ji-Myung Bae[2,]*

[1]Department of Dental Hygiene, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea
[2]Department of Dental Biomaterials and Institute of Biomaterials · Implant, Wonkwang University, Iksan, Korea

This study aimed to assess the sustainability of antibacterial agents mixed with experimental fluoride varnish (EFV) against *S. mutans*. Five antibacterial agents [Xanthorrhizol (XAN), Bakuchiol (BAK), Bavachalcone (BCC), Isobavachromene (IBC), and Bavachromene (BCM)] were used and incorporated into the EFV to make the final concentration of 10 mM. Then, 5 μL of antibacterial agents mixed with EFV were applied on polyethylene terephthalate film disc (5 mm diameter). The positive and vehicle control were ampicillin and DMSO mixed with EFV, respectively. Each group was stored in distilled water in a 37℃ shaking water bath at 80 rpm for 0 hour, 4 hours, 1 day, 2 days, 3 days, 5 days, 10 days, 20 days and 30 days. The sustainability of the antibacterial activities was evaluated with the inhibition zone by the agar diffusion test. The antibacterial activities of all antibacterial agents were sustained for 30 days. Among them, BCC showed relatively higher antibacterial activities up to 30 days compared to other groups. This study suggests that antibacterial agents including BCC can be used with fluoride varnish to have sustained antibacterial activities.

Key words : Sustainability of antibacterial activity, Antibacterial agents, Fluoride varnish, *Streptococcus mutans*

Ju-Lee Son (ORCID: 0000-0003-4611-8891)

Correspondence: Ji-Myung Bae (ORCID: 0000-0002-8607-8604)
460 Iksan-daero, Iksan City, Jeonbuk 54538, Republic of Korea
Affiliation: Department of Dental Biomaterials and Institute of Biomaterials · Implant, College of Dentistry, Wonkwang University, Iksan City, Jeonbuk 54538, Korea
Tel: +82-63-850-6859, Fax: +82-63-850-6859
E-mail: baejimy@wku.ac.kr

Received: Mar. 04, 2020; Revised: Mar. 27, 2020; Accepted: Apr. 02, 2020

서 론

치면세균막 내의 연쇄상 구균은 치아우식의 주요 원인균이다. 그 중 *Streptococcus mutans (S. mutans)*는 주 원인균으로 통성 혐기성균이며, 치면세균막에 부착 후 자당에서 만들어진 포도당을 글루칸 및 프럭탄을 세포외 다당류로 변환시켜 글리코실 전달효소(glycosyl transferase)라는 효소에 의해 세균이 치아 표면에 부착하며, 섭취한 음식물에 포함되어 있는 자당(sucrose)이나 포도당(glucose)을 분해하는 과정에서 젖산을 생성하여 치아우식을 일으킨다고 알려져 있다(1-3). 치아우식의 예방에 불소는 효과적인데, 치아표면에 결합하여 수산화인회석을 불화인회석 구조로 전환시켜 치질의 내산성을 증가시킴으로써 젖산에 의한 치아 탈회를 억제시키는 효과가 있다(4-6).

불소는 수돗물 불소농도조정사업, 불소정제, 불소시럽, 불소겔, 불소용액, 불소치약, 불소바니쉬 등 다양한 불소제품으로 활용되고 있다(5, 6). 그 중 불소바니쉬는 유럽에서 1960년 처음으로 개발되어 수많은 임상연구를 통해 안전하고 효과적인 불소제제로 인정받았다(7, 8). 불소바니쉬는 보통 레진 또는 합성제제를 혼합하여 사용되는 불소 도포제이다(9). 불소바니쉬는 임상에서 적용이 간단하고, 0.5 ml 정도로 적은 소량으로 도포되며, 삼켜도 안전한 낮은 독성을 가진다(10). 또한 체내 흡수율이 낮아 다른 불소 제재들보다 안정성이 높다(11, 12). 불소바니쉬는 도포 시 치아표면에 얇은 막 형태로 부착 유지하면서 장시간 불소를 천천히 방출하는데(13, 14), 불소바니쉬 각각의 성분에 따라 불소농도의 지속성에 영향을 준다(15). 각 시판 제품마다 성분에 따라 단시간동안 불소를 방출하기도 하고, 오랜 시간 동안 서서히 불소를 방출하여 성분에 따른 불소 방출량과 지속성의 차이가 보고되었다(13).

본 연구에서 사용된 실험용 불소바니쉬는 우치 표면에 적용시 30일까지 유효불소 농도인 0.03 ppm 이상의 불소방출량을 유지하였다(14). 지속성이 뛰어난 항균성 불소바니쉬를 개발하기 위해 한국화합물은행(Korea Chemical Bank)에서 100여종 이상의 단일 성분 화합물을 제공받아 스크리닝을 진행하였다. 그 중 보골지*(Psoralea corylifolia)* 화합물질들이 *S. mutans* 억제에 효과적임을 발견하여 그 중 항균성이 뛰어난 Bakuchiol (BAK), Bavachalcone (BCC), Isobavachromene (IBC)과 Bavachromene (BCM)을 선택하였다. 이 물질들을 기존에 *S. mutans*의 억제에 효과적이라고 알려진 Xanthorrhizol (XAN)과 비교하였다(16). 기존의 연구에서는 항균물질을 불소바니쉬에 응용하여 그 항균의 지속성을 평가한 연구는 없었다. 이에 본 연구에서는 항균의 지속성을 평가할 수 있는 모델을 수립하고, 위의 5가지 항균물질을 실험용 불소바니쉬에 혼합하여 항균력의 지속성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험용 불소바니쉬 제작

45 wt.% 로진(KR-610, Arakawa Co, Tokyo, Japan)을 베이스로 하여, 50 wt.% 에탄올(≥ 99.7%, Merck, Kenilworth, NJ)과 5 wt.% NaF를 첨가하여 실험용 불소바니쉬(EFV)를 제작하였다(17). 이 성분들을 물중탕 하에서 80~100℃의 핫 플레이트(RCH-3, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) 위에서 오버헤드 교반기(RW20DZM.n, IKA Korea. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 240 rpm으로 30분간 혼합하였다.

2. 항균물질과 실험용 불소바니쉬의 혼합 제작

Xanthorrhizol (XAN; CAS No. 30199-26-9, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Bakuchiol (BAK; CAS No. 10309-37-2, Santa Cruz Biotechnology), Bavachalcone (BCC; CAS No. 28448-85-3, Chemfaces, Hubei, China), Isobavachromene (IBC; CAS No. 52801-22-6, Chemfaces, Hubei, China), Bavachromene (BCM; CAS No. 41743-38-8, Chemfaces, Hubei, China)을 각각 DMSO (Dimethyl sulfoxide)로 희석하여 각각 20 mM 항균물질 제작 후 불소바니쉬와 1:1로 혼합하여 10 mM 불소바니쉬의 혼합시료 [항균물질+불소바니쉬]를 제작하였다. 양성대조군은 20 μg/mL의 ampicillin (CAS No. 69-52-3)을 불소바니쉬와 혼합하여 10 μg/mL의 [ampicillin+불소바니쉬]를 제작하였고, vehicle 대조군으로는 불소바니쉬와 DMSO를 1:1로 혼합하여 사용하였다.

3. 항균의 지속성 시험

실험용 불소바니쉬와 혼합한 항균물질들을 5 μl씩 디스크(직경 5 mm) 형태의 필름(polyethylene terephthalate film) 위에 도포한 후 클린벤치 내에서 UV mode로 30분 동안 살균하였다. 그 후 직경 35 mm의 페트리디쉬에 증류수(2 mL)를 필름이 잠길 수 있도록 넣은 후(Figure 2), 37℃ 진동수조(shaking water bath)에서 0시간, 1시간, 2시간, 3시간, 8시간, 12시간, 24시간, 2일, 5일, 10일, 20일, 30일 동안 120 rpm으로 보관하였다.

각각의 시간 동안 필름 디스크를 보관 후 *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)를 균주로 사용하여 한천중층배지 시험(agar diffusion test)을 실시하였다. *S. mutans*의 농도가 1.1×10^{10} CFU/mL가 되도록 희석하여 top 아가에 균을 혼합한 후 base 아가 위에 접종하였다. 각 시간 별로 실험 물질이 도포된 필름 디스크를 페트리디쉬에서 꺼낸 후 물질이 묻은 면이 아래로 향하도록 아가 위에 위치시켰다. 이를 다시 37℃ 배양기에서 24시간 배양 후 디스크 주변에 형성된 *S. mutans* 억제대(inhibition zone)의 직경을 직각 방향으로 각각 측정하여 그 평균을 억제대로 구하였다. 각 기간별로 측정된 억제대로 항균성의 지속성을 평가하였다(Figure 1).

4. 통계분석

통계 분석은 SPSS 프로그램(SPSS 24.0; SPSS GmbH, Munich, Germany)을 이용하였다. 시간에 따른 항균의 지속성 비교와 각 군별 항균성을 비교하기 위해 각각 one-way ANOVA를 시행하였고(α=0.05), 사후 검정으로는 Tukey의 다중비교법을 이용하여 사후 검정을 실시하였다(α=0.05).

결 과

모든 물질들은 증류수에 보관했던 기간이 길어질수록 항균성은 감소하였다. 양성대조군과 vehicle 대조군인 실험용 불소바니쉬는 10일까지 항균의 지속성이 관찰되었고, 20일 이후부터는 항균성이 관찰되지 않았다(Table 1, Figure 2). 반면, 5가지 항균물질들은 모두 30일까지 항균의 지속성이 관찰되었다. 그 중 BCC, IBC, BCM 물질의 항균성은 XAN와 BAK 물질보다 5일부째부터 유의성있게 컸다($P<0.05$). BCC, IBC, BCM 물질 중에서 BCC는 30일까지 가장 높은 항균성을 유지하였다($P<0.05$).

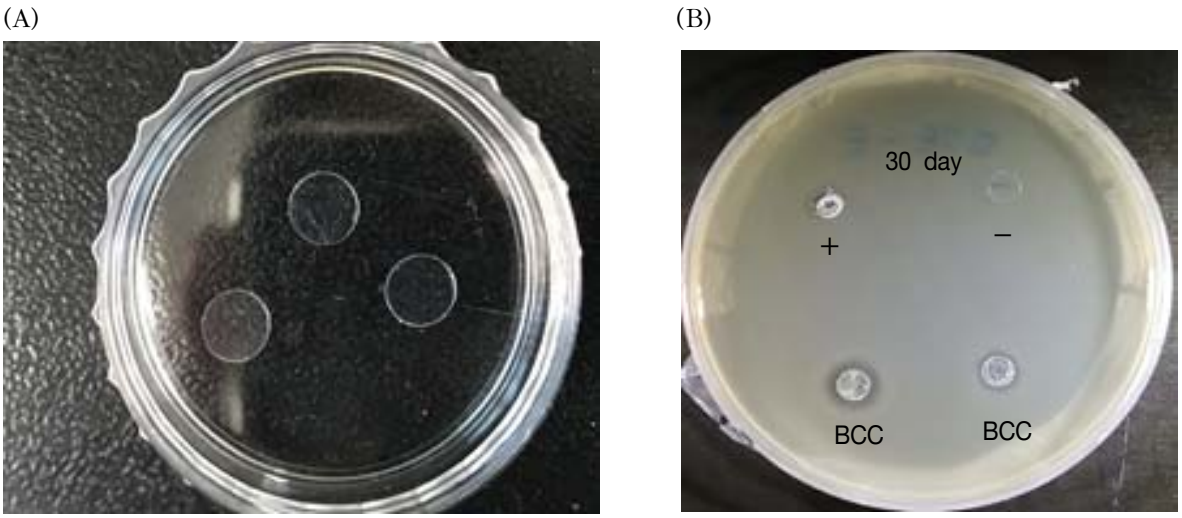

Figure 1. Storage of materials on film discs in distilled water and agar diffusion test to evaluate the sustainability of antibacterial activity after each period time: (A) Polyethylene terephthalate film discs applied with antibacterial agents and experimental fluoride varnish that were stored in a shaking water bath, and (B) agar diffusion test of Bavachalcone (BCC) after 30 days' storage.

Table 1. Sustainability of antibacterial activities of antibacterial agents incorporated into experimental fluoride varnish expressed as inhibition zone (mm)

	0 hour	4 hours	1 day	2 days	3 days	5 days	10 days	20 days	30 days
+ cont*	15.08^{aC} (1.47)	14.61^{bC} (1.43)	15.60^{aCD} (2.17)	10.83^{cBC} (2.06)	7.90^{cdBC} (0.55)	6.54^{dAB} (0.44)	7.22^{cdB} (0.58)	5^{eD} (0.00)	5^{eD} (0.00)
V cont**	12.30^{bE} (0.60)	13.59^{abD} (1.56)	8.98^{cE} (1.96)	8.06^{cD} (0.06)	6.50^{dD} (0.13)	6.26^{dB} (0.04)	5.54^{dD} (0.01)	5^{eD} (0.00)	5^{eD} (0.00)
XAN	17.63^{aB} (0.90)	17.59^{aAB} (0.62)	16.51^{bBC} (2.02)	10.46^{cBC} (0.12)	8.12^{cB} (0.07)	5.39^{dCD} (0.68)	5.57^{dD} (0.05)	5.19^{dCD} (0.02)	5.14^{eCD} (0.22)
BAK	16.24^{abBC} (2.04)	16.27^{abB} (0.79)	18.44^{aAB} (0.33)	10.38^{cBC} (0.96)	7.03^{dC} (0.12)	5.84^{eBC} (0.80)	5.35^{eD} (0.20)	5.12^{fCD} (0.12)	5.16^{fCD} (0.02)
BCC	19.68^{abA} (0.80)	18.94^{abA} (1.44)	20.42^{aA} (1.12)	13.28^{cA} (1.71)	9.66^{dA} (0.79)	7.45^{eA} (0.54)	9.27^{dA} (0.10)	7.12^{eA} (0.10)	7.12^{eA} (0.10)
IBC	17.92^{aB} (1.07)	17.05^{aAB} (0.07)	15.24^{bCD} (0.42)	8.44^{cD} (0.75)	8.08^{cB} (0.36)	7.66^{cdA} (0.70)	7.84^{cdB} (0.07)	7.10^{dA} (0.23)	6.54^{eB} (0.55)
BCM	20.29^{aA} (3.68)	16.01^{bBC} (1.48)	16.11^{bC} (2.24)	11.46^{cB} (1.52)	7.95^{dBC} (0.96)	7.61^{dA} (0.14)	6.12^{deC} (0.06)	5.82^{eB} (0.14)	6.29^{eBC} (0.20)

Different lowercase letters are significantly different among periods within materials (row) and different uppercase letters are significantly different among materials within each period time (column) by ANOVA and Tukey's multiple comparison test at a=0.05.
*Ampicillin in experimental fluoride varnish. **Experimental varnish mixed with DMSO.

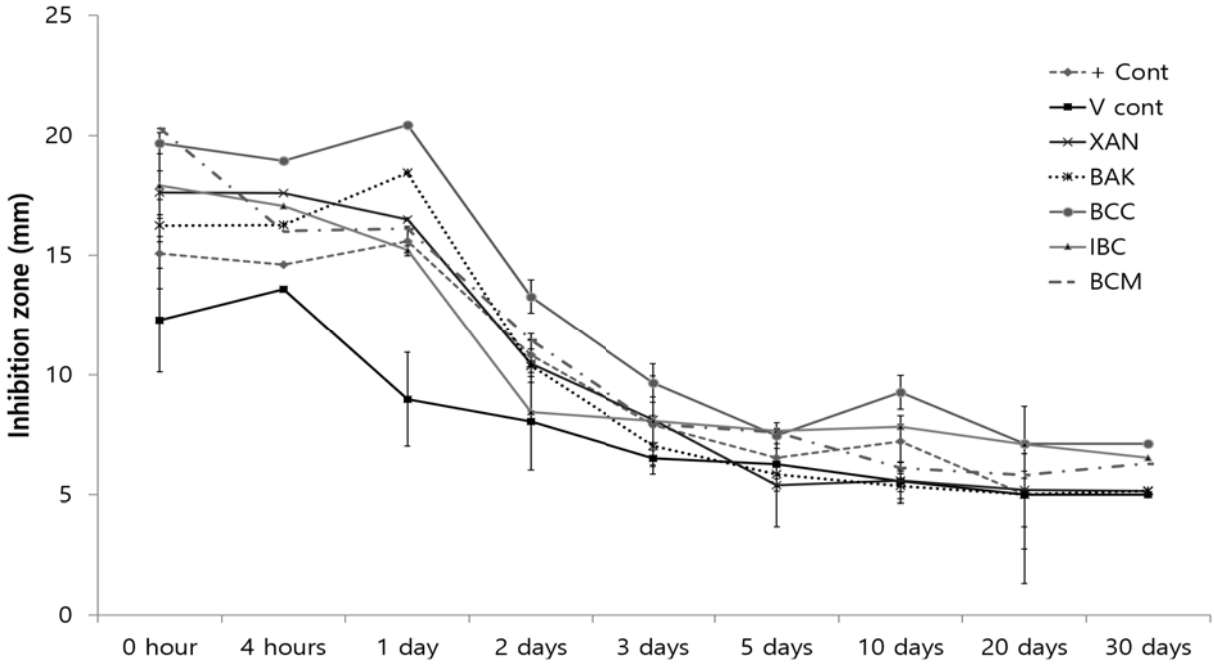

Figure 2. Sustainability of antibacterial activities of antibacterial agents incorporated into experimental fluoride varnish. '+ cont': Ampicillin in experimental fluoride varnish. 'V cont': Experimental varnish mixed with DMSO.

고 찰

본 연구에서는 항균의 지속성을 평가하기 위하여 5가지 항균물질을 실험용 불소바니쉬에 혼합하고 필름 디스크 위에 도포하여 0시간, 4시간, 1일, 2일, 3일, 5일, 10일, 20일, 30일 동안 그 항균의 지속성이 얼마나 되는지를 억제대로 측정하였다. 30일에 걸친 실험결과, 본 연구의 실험방법을 통해 항균의 지속성을 평가할 수 있어서 항균의 지속성 시험방법이 수립되었다고 볼 수 있다. 모든 항균물질들은 시간이 지남에 따라 항균성이 감소하였고, 항균물질별로 항균의 지속성이 다른 결과를 보였다. 특히 양성대조군으로 사용된 항생제와 vehicle 대조군으로 사용된 실험용 불소바니쉬가 20일부터는 항균의 지속성을 보이지 않은데 비해, 5가지 항균물질들은 모두 30일까지 항균의 지속성을 나타내었다. 5가지 물질 중 BCC, IBC, BCM이 XAN, BAK보다 5일 이후에도 높은 항균성을 보였으며, 그 중에서도 BCC가 30일까지 가장 높은 항균성을 나타내었다.

Bavachalcone, Isobavachromene, Bakuchiol과 같은 보골지 식물의 성분들과 안트라퀴논 성분의 화학구조식을 보이는 물질이 *S. mutans* 균주 억제에 효과가 있었다(17). 보골지의 성분 중 Bakuchiol은 구강미생물에 효과적이었고, 항박테리아 제재의 개발에 유용한 화합물이며 치아우식의 예방 및 치료를 위한 식품첨가물 및 구강세정제에 사용될 가능성이 있다고 보고되었다(18). Bavachalcone은 구강 내 세균 억제에 대하여 최소억제농도에서 가장 낮은 결과를 보였으며(19), 파골세포 성장을 억제시켜 뼈 흡수 관련 질병에 대한 치료 약물로 유용하다고 보고되었다(20). 본 연구에서 사용된 항균물질 중 보골지의 성분 중 BCC, IBC, BCM들이 다른 식물의 성분인 XAN보다는 항균의 지속성이 높았다. 보골지의 성분 중에서는 BCC의 항균성이 컸는데, 이는 항균물질들의 화학적 구조 및 분자량의 차이로 기인한 것으로 보인다. 위 5가지 물질들의 화학구조식에는 벤젠고리 및 OH기가 존재하는데, OH기가 많고 벤젠고리의 사슬 길이가 길수록 *S. mutans* 균주에 항균력이 더 뛰어난 것으로 보이지만, 벤젠고리와 OH기 사슬의 길이의 특이성으로 항균력이 커진 것인지, 아니면 다른 요인이 있는 것인지는 비슷한 구조를 가진 화합물을 탐색하여 지속적인 실험을 진행하여 규명할 필요성이 있다. 최근 항생제에 대한 부작용 문제가 많이 나타나고 있어 구강 미생물의 억제에 효과가 일시적이고 내성이 생길 수 있는 항생제보다는 본 연구에서처럼 오히려 항균의 지속성이 뛰어난 천연항균물질을 불소바니쉬에 혼합하여 사용하면 치아우식 예방에 지속적인 효과를 나타낼 수 있을 것이라 사료된다.

추후 연구에서는 필름 디스크가 아닌 실제 치아 성분과 비슷한 우치나 hydroxyapatite에 불소바니쉬를 도포하여 항균의 지속성 시험 및 재광화 효과의 평가가 필요하다고 사료된다. 물질의 세포독성을 확인 후 최적의 농도를 결정하여 불소바니쉬뿐만 아니라 구강양치용액, 치약, 사탕 껌 등에 천연물질을 혼합하여 다양한 구강예방용품으로 사용할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 *S. mutans*의 억제에 효과적인 항균물질을 실험용 불소바니쉬에 첨가하여 항균의 지속성을 측정하였고, 항균의 지속성이 가장 뛰어난 BCC를 포함하는 항균성 불소바니쉬를 임상에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 *S. mutans*의 억제에 효과적인 5가지 항균물질과 불소바니쉬를 혼합하여 항균의 지속성을 평가할 수 있는 모델을 수립하고, 각 항균물질의 항균의 지속성을 평가하고자 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 항균물질과 불소바니쉬를 혼합한 항균성 불소바니쉬의 항균의 지속성을 평가할 수 있는 모델이 수립되었다.
2. 모든 항균물질은 30일까지 항균의 지속성을 보였다.
3. 항균의 지속성을 평가 하였을 때 항균성이 가장 큰 물질은 BCC였다($p<0.05$).

사 사

이 성과는 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2018R1A2B6002088). The chemical library used in this study was kindly provided by the Korea Chemical Bank (http://www.chembank.org/) of the Korea Research

Institute of Chemical Technology. 본 연구에 사용된 생물자원은 KCTC로부터 제공받았음 (http://kctc.kribb.re.kr/).

참고문헌

1. Kolenbrander PE. Oral microbial communities biofilms, interaction and genetic system. Annu Rev Microbiol 2000;54(10):413-37.
2. Kang MK, Kim MA, Kim EH, Kim IS, Kim JD, Kim HY, et al. Oral microbiology. 1st ed. Seoul: KMS; 2017. p. 240-90.
3. Mikkelsen L, Jensen SB, Jakobsen J. Microbial Studies on Plaque from Carious and Caries-Free Proximal Tooth Surfaces in a Population with High Caries Experienc. Caries Res 1981;5(15):428-35.
4. Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E. Dental caries: The Disease and Its Clinical Management. 3rd ed. Oxford: Wiley Blackwell; 2015. p. 245-76.
5. Featherstone JD, Ten Cate JM. Physicochemical aspects of fluoride-enamel interactions. Fluoride in dentistry. 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1988. p. 125-49.
6. Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. Community dentistry and oral epidemiology. 1999;27(1):31-40.
7. Todd MA, Staley RN, Kanellis MJ, Donly KJ, Wefel JS. Effect of a fluoride varnish on demineralization adjacent to orthodontic brackets. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1999;116(2):159-67.
8. Koch G, Petersson LG. Caries preventive effect of a fluoride-containing varnish (Duraphat) after 1 year's study. Community Dent Oral Epidemiol. 1975;3(6): 262-6.
9. Weintraub JA. Fluoride varnish for caries prevention: comparisons with other preventive agents and recommendations for a community-based protocol. Spec Care Dentist. 2003;23(5):180-6.
10. Marinho VC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Database Syst Rev. 2013;11(7):CD002279
11. Autio-Gold JT, Courts F: Assessing the effect of fluoride varnish on early enamel carious lesions in the primary dentition. J Am Dent Assoc. 2001;132(9):1247-53.
12. Ritwik P, Aubel JD, Xu X, Fan Y, Hagan J. Evaluation of short term fluoride release from fluoride varnishes. J Clin Pediatr Dent. 2012;36(3):275-8.
13. Bawden JW. Fluoride varnish: a useful new tool for public health dentistry. J Public Health Dent. 1998; 58(4):266-9.
14. Shin KS, Kim AJ, Oh SH, Bae JM. Development of fluoride varnish with sustained fluoride release and biocompatibility. Korean J Dent Mater. 2017;44(1):21-31.
15. Riwik P, Aubel JD, Xu X, Fan Y, Hagan J. Evaluation of short-term fluoride release from fluoride varnishes. J Clin Pediatr Dent. 2012;36(3):275-8.
16. Rukayadi Y, Hwang JK. In vitro activity of xanthorrhizol against Streptococcus mutans biofilms. Lett Appl Microbiol 2006;42(4):400-4.
17. Son JL. Inhibitory effect of antibacterial agents and fluoride varnish against S. mutans and P. gingivalis. [dissertation]. Iksan: Wonkwang University; 2018.
18. Katsura H, Tsukiyama RI, Suzuki A, Kobayashi M. In vitro antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(11):3009-13.
19. Son JL, Kim AJ, Oh SH, Bea JM. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of antibacterial fluoride varnish. Korean J Dent Mater. 2018;45(2):139-46.
20. Park CK, Lee Y, Chang EJ, Lee MH, Yoon JH, Ryu JH, Kim HH. Bavachalcone inhibits osteoclast differentiation through suppression of NFATc1 induction by RANKL. Biochem Pharmacol. 2008;75 (11):2175-82.

항균물질과 혼합한 실험용 불소바니쉬의 *Streptococcus mutans*에 대한 항균의 지속성

손주리[1], 배지명[2,*]

[1]원광보건대학교 치위생과,
[2]원광대학교 치과대학 치과생체재료학교실 및 생체재료 · 매식연구소

본 연구는 *S. mutans*의 억제에 효과적인 항균물질을 실험용 불소바니쉬에 혼합하여 그 항균의 지속성을 어느 정도 유지하는지 평가하고자 하였다. *S. mutans*의 억제에 효과적인 5가지 항균물질[Xanthorrhizol (XAN), Bakuchiol (BAK), Bavachalcone (BCC), Isobavachromene (IBC), Bavachromene (BCM)]을 사용하여 실험용 불소바니쉬에 각각 혼합하여 10 mM 농도로 제작하였다. Polyethylene terephthalate 필름 디스크(직경 5 mm) 위에 혼합한 물질을 각각 5 μL씩 적용하였다. 양성대조군은 ampicillin을, vehicle 대조군은 DMSO를 각각 불소바니쉬에 혼합하여 사용하였다. 이들을 증류수 2 mL에 넣은 후 37℃ 진동수조(80 rpm)에서 보관하였다. 0시간, 4시간, 1일, 2일, 3일, 5일, 10일, 20일 30일 후 agar diffusion test를 실시하여 항균의 지속성이 유지되는지 평가하였다. 모든 항균물질은 30일까지 항균효과가 지속되었으며, 그 중 BCC의 항균효과가 30일까지 유의성 있게 높게 지속되었다($p<0.05$). 불소바니쉬에 BCC를 비롯한 항균 물질을 첨가함으로써 항균의 지속성이 뛰어난 불소바니쉬를 임상에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

색인 단어 : 항균의 지속성, 항균물질, 불소바니쉬, *Streptococcus mutans*