

Antimicrobial Activity of Oleanolic Acid, Ursolic Acid, and Sophoraflavanone G against Periodontopathogens

Soon-Nang Park and Joong-Ki Kook*

Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Chosun University, Gwangju, Korea

(received September 22, 2013; revised December 18, 2013; accepted December 18, 2013)

In general, oleanolic acid (OA) and ursolic acid (UA) have antimicrobial effect against Gram-positive bacteria but not Gram-negative bacteria whereas sophoraflavanone G has antimicrobial activity against both bacterial types. However, the antimicrobial effects of OA, UA, and sophoraflavanone G against periodontopathogens have not been studied to any great extent. The aim of this study was to investigate antimicrobial effect of OA, UA, and sophoraflavanone G against 15 strains (5 species) of oral Gram-negative bacteria, which are the major causative bacteria of periodontal disease. The antimicrobial activity was evaluated by minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) determinations. OA and UA showed antimicrobial effects against all of the *Porphyromonas gingivalis* strains tested and also *Prevotella intermedia* ATCC 25611^T. Interestingly, *P. intermedia* ATCC 49046 showed greater resistance to OA and UA than *P. intermedia* ATCC 25611^T. In contrast, sophoraflavanone G had antimicrobial activity against all strains, with MIC and MBC values below

32 µg/ml, except *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. These results indicate that sophoraflavanone G may have potential for use in future oral hygiene products such as dentifrices and gargling solution to prevent periodontitis.

Key words: antimicrobial effect, oleanolic acid, periodontopathogens, sophoraflavanone G, ursolic acid

서 론

치주질환은 치아 주위 조직의 염증에 의한 질병으로 치은연하치면세균막에 존재하는 그람 음성 혐기성세균들이 주요한 원인 인자이며 동맥경화증등과 같은 심혈관질환과 밀접한 관련성이 있는 것으로 알려져 있다[1-3]. 치은연하치면세균막에는 약 400 여종의 세균이 서식하고 있으며, 이들 중 *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* 등이 주요한 원인균종인 것으로 보고 되고 있다[4-6]. 그러므로 치주질환의 예방 및 치료에 있어서 치주질환 원인균종을 제거하는 것이 가장 효과적이라 생각된다. 여러 항균물질 중 항생제들은 구강미생물들의 내성을 유발할 수 있는 단점이 있기 때문에 비교적 안전성이 확보된 천연추출물을 이용한 치주질환 원인균종에 대한 항균물질 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[7,8].

Oleanolic acid (3β-3-hydroxyolean-12-en-28-oic acid, OA)

*Correspondence to: Joong-Ki Kook, Korean Collection for Oral Microbiology and Department of Oral biochemistry, College of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea.
Tel.: 82-62-230-6877, Fax: 82-62-224-3706
E-mail: jkkook@chosun.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

와 ursolic acid ((3 β)-hydroxy-urs-12-en-28-oic acid, UA)는 triterpenoid saponins 유도체로서 항균 및 항염증 등의 효과가 있는 것으로 보고되었다[9-14]. 이러한 OA와 UA는 주로 그람 양성 세균에 대해 항균력이 뛰어나다고 알려져 있다[12]. 본 연구팀도 OA와 UA가 치아우식증의 주요한 원인균종인 *Streptococcus mutans* 및 *Streptococcus sobrinus*에 대해서도 항균 활성이 매우 뛰어나다고 보고하였다[13,14]. OA의 경우 그람 음성 세균인 *Escherichia coli*와 *Enterobacter cloacae*에도 항균 활성이 높다는 보고도 있었다[10,15]. 이는 OA와 UA가 그람 음성 혐기성 세균이 대부분을 차지하는 치주질환 원인균종에 대해서도 항균 활성을 가질 수 있음을 시사한다.

고삼은 항균 및 항염증 기능을 갖는 대표적인 천연물이다[16]. 최근 고삼 뿌리에서 sophoraflavanone G ((2S)-2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-[(2R)-5-methyl-2-(prop-1-en-2-yl)hex-4-en-1-yl]-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one)라는 화합물이 추출되어 치주질환 원인균종인 *P. gingivalis* (ATCC 33277^T), *P. intermedia* (ATCC 49046), *A. actinomycetemcomitans* (ATCC 43717) 및 *F. nucleatum* (ATCC 51190^T)에 대한 항균활성이 있음이 보고되었다[17]. 하지만, 이들의 연구에서는 4가지 세균 종에 대해 한 균주만을 대상으로 실험을 하였기 때문에 sophoraflavanone G를 구강위생용품 개발에 이용할 때 적절한 농도를 정하기에 한계가 있다. 왜냐하면 같은 세균 종에 속하는 균주들이라도 천연추출물에 대한 감수성을 보이는 농도가 다양하게 나타나기 때문이다[7].

본 연구는 OA, UA 및 sophoraflavanone G의 치주질환 원인균종(5종 15 균주)에 대한 항균능을 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 및 최소살균농도(minimum bactericidal concentration, MBC) 값을 측정하여 알아보기 위하여 실시하였다. 이러한 결과는 향후 이들 화합물을 이용한 치주질환 예방 및 치료보조제 개발에 기초적인 자료를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

재료 및 방법

Sophoraflavanone G의 추출

Sophoraflavanone G는 선행연구에서 실시한 방법으로 추출하여 사용하였다[18]. 이를 간략히 기술하면 다음과 같다. 건조된 고삼(Donguihanbang, Youngchun, Korea)을 분쇄기에 갈아 파우더 상태로 만든 후 100 g당 메탄올(DA JUNG, Korea) 500 ml을 넣은 후 24~48시간 동안 실온에서 shaking incubator로 추출 하였다. 추출액은 Whatman filter paper (Whatman 1Ps, UK)로 여과하여 회

전농축기(IKA, RV 10, Suwon, Korea)로 40°C, 80 rpm으로 농축하고 농축물을 다시 동결건조(LABCONCO, Kansas City, MO, USA) 하여 고삼 메탄올 추출물을 얻었다.

고삼 메탄올 추출물은 Silica gel (Silica gel 60, Merck, Darmstadt, Germany) 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 다시 분획화하였다[18]. 메탄올 추출물 20 g을 메탄올 50 ml에 녹인 후 ethyl acetate (HPLC solvent, DA JUNG, Seoul, Korea) 50 ml을 혼합하였다. 침전물을 제거하기 위하여 원심분리(1,500 rpm, 10분) 한 후 상층액을 유리 비이커에 넣고 40 g의 silica gel을 넣어 잘 섞은 후 후드장치에 넣고 실온에서 10시간 동안 용매를 기화시켜 파우더 상태로 건조시켰다. 추출물-silica gel 파우더에 n-Hexane 100 ml을 넣어 잘 섞은 후 컬럼 충전물 위에 조심히 넣었다. 이동상 용액은 n-Hexane:ethyl acetate 비율이 10:0, 1:9, 2:8, 3:7, 5:5, 0:10이 되도록 만든 후 순서대로 컬럼에 흘려주었다. 각 비율의 용액을 500 ml씩 3번 분획하여 회전 농축기로 40°C, 80 rpm으로 농축하고 농축물을 다시 동결건조(LABCONCO, UK) 하여 건조시켰다. 항균 활성이 있는 15번째 silica gel chromatography 분획물을 얻어 동결 건조하였다. 건조된 분획물을 Demethyl sulfoxide (SIGMA-ALDRICH, D-5879)로 100 mg/ml 농도로 녹이고 70% methanol을 첨가해 10 mg/ml로 희석시킨 후 15,000 rpm으로 30분 동안 원심분리(BECKMAN, J2-MC, USA) 하고 syringe filter (30 mm, 0.2 μ m)로 여과하여 HPLC 장치(Shimadze, SPD-20A, STC-20A, LC-6AD, CBM-20A, Japan)에 주입하였다. HPLC 이동상은 물과 메탄올을 혼합하여 사용하였고, 분리조건은 methanol의 비율을 70%에서 100%로 40분 동안 증가시키면서 흘려주고 100% methanol을 10분간 더 흘려주었다. 이때 이동상 속도는 2 ml/min로 컬럼 온도는 40°C, 250 nm에서 검출하여 시행하였다. 이러한 HPLC 분획물들 중 항균능이 뛰어난 3번째 분획물을 얻어 동결 건조하였고, Electrospray Ionization Mass Spectrometer (ESI-MS) 스펙트럼으로 분자량을 확인하여 sophoraflavanone G임을 확인하여 다음 실험에 사용하였다.

세균 및 배양

본 연구에서 사용한 균주는 *P. gingivalis* ATCC 33277^T, *P. gingivalis* ATCC 49417, *P. gingivalis* ATCC 53978, *P. intermedia* ATCC 25611^T, *P. intermedia* ATCC 49046, *P. nigrescens* ATCC 33563^T, *P. nigrescens* ATCC 25261, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586^T, *F. nucleatum* subsp. *polymorphum* ATCC 10953^T, *F. nucleatum* subsp. *vincentii* ATCC 49256^T, *F. nucleatum*

subsp. *fusiforme* ATCC 51190^T, *F. nucleatum* subsp. *animalis* ATCC 51191^T, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43717 및 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718이었다. 이들 균주들은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였다.

본 연구에 사용된 모든 균주들은 Tryptic Soy broth에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H₂O, 0.5 mg/ml hemin 및 2 µg/ml vitamin K₁가 포함된 배지에 접종하여, 37°C anaerobic chamber (Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, USA)와 혐기성 조건(10% H₂, 5% CO₂, 85% N₂)에서 배양하였다.

MIC 및 MBC 값 측정

MIC와 MBC 측정은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [19]에서 제시한 미세희석(micro-dilution)법을 이용하여 실시하였다. 세균들은 앞에서 소개한 배지에 접종하여 37°C 에서 24-48 시간 동안 세균배양기에서 배양한 후 1×10⁶ CFU/ml가 되도록 희석하여 96-well plate에 분주하였다. Sophoraflavanone G는 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, µg/ml가 되도록, oleanolic acid (Sigma, St Louis, MO, USA), 또는 ursolic acid (Sigma)는 4, 8, 16, 32, 64, 128 µg/ml가 되도록 세균 배양액에 첨가(세균배양액의 1%가 되도록 첨가)하였다. 이때 이들 세가지 화합물은 모두 Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma)에 녹여 사용하였다. 실험의 음성대조군은 DMSO를 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하였고, 양성대조군

은 ampicillin (100 mg/ml)를 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하였다. 이들을 96 well plate에 200 µl씩 분주한 후 37°C에서 24시간 동안 배양 하였다. 실험군 및 대조군은 모두 3반복씩 실험하였다. 분주한 세균배양액은 37°C에서 24 시간 동안 세균배양기에서 배양한 후 96-well plate상에서 육안으로 확인하였을 때 세균 성장이 없는 well의 농도 중 최소 농도를 MIC 값으로 결정하였다. MBC 값은 위의 세균배양액에서 10 µl를 취하여 10² 또는 10⁴ 배 희석한 뒤 한천배지에 도말하여 37°C 에서 48 시간 동안 배양한 뒤 형성된 균락을 확인하여 99.99% 이상 세균이 자라지 않는 최소 농도로 결정하였다. 각 반응은 3회 반복 실시하였다.

결과

선행연구[18]에서 실행한 방법을 따라 고삼 뿌리 메탄올 추출물을 silica gel 크로마토그래피와 HPLC를 실시하여 흰색 결정체인 sophoraflavanone G를 추출하였다 (data not shown). 이때 최종적으로 ESI-MS 스펙트럼을 분석하여 추출한 sophoraflavanone G의 분자량을 확인하여 본 실험에 사용하였다(data not shown).

사포닌 유도체인 OA 및 UA에 대한 치주질환 원인균 종(5종 15 균주)에 대한 항균능은 MIC 및 MBC 값을 측정하여 알아보았다(Table 1). 본 연구에서 사용된 OA 및 UA 농도에서는 3균주의 *P. gingivalis* 와 1 균주의 *P. intermedia*에서만 MIC 및 MBC 값을 구할 수 있었다

Table 1. Antimicrobial effects of sophoraflavanone G, oleanolic acid, and ursolic acid against periodontopathogens

Species and strains	MIC/ MBC (µg/ml)		
	oleanolic acid	ursolic acid	sophoraflavanone G
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 ^T	16/16	16/16	1/1
<i>P. gingivalis</i> ATCC 49417	32/32	16/16	<0.5/1
<i>P. gingivalis</i> ATCC 53978	32/32	16/16	<0.5/0.5
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611 ^T	64/128	32/64	0.5/2
<i>P. intermedia</i> ATCC 49046	>128/>128	>128/>128	2/2
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563 ^T	>128/>128	>128/>128	2/2
<i>P. nigrescens</i> ATCC 25261	>128/>128	>128/>128	2/4
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> ATCC 25586 ^T	>128/>128	>128/>128	8/8
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953 ^T	>128/>128	>128/>128	8/8
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> ATCC 49256 ^T	>128/>128	>128/>128	16/16
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>fusiforme</i> ATCC 51190 ^T	>128/>128	>128/>128	8/8
<i>F. nucleatum</i> subsp. <i>animalis</i> ATCC 51191 ^T	>128/>128	>128/>128	8/8
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 33384 ^T	>128/>128	>128/>128	>64/>64
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	>128/>128	>128/>128	32/32
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718	>128/>128	>128/>128	64/>64

Table 2. Summary of antimicrobial activity of sophoraflavanone G, oleanolic acid, and ursolic acid against periodontopathogens

	MIC ₉₀ /MBC ₉₀ (μg/ml)		
	oleanolic acid	ursoilc acid	sophoraflavanone G
Periodontopathgens (n=15)	>128/>128	>128/>128	32/32

MIC₉₀: the minimum inhibitory concentration needed to inhibit the growth of 90% of the strains of periodontopathogens.

MBC₉₀: the minimum bactericidal concentration needed to kill 90% of the strains of periodontopathogens.

(Table 1 and 2). UA는 *P. gingivalis* ATCC 49417, *P. gingivalis* ATCC 53978 및 *P. intermedia* ATCC 25611^T에 대하여 OA에 비해 2배 낮은 MIC 및 MBC 값을 나타냈다(Table 1).

Sophoraflavanone G는 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T를 제외한 모든 균주에서 64 μg/ml 이하의 농도에서 MIC 값을 보였으며, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T와 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43718 균주를 제외한 나머지 균주들에 대해서 64 μg/ml 이하의 농도에서 MBC 값을 가졌다(Table 1). 본 연구에서 사용된 *P. gingivalis*, *P. intermedia* 및 *P. nigrescens* 균주들은 다른 세균 종에 비해 sophoraflavanone G에 대한 감수성이 비교적 높은 것으로 조사되었다.

고 찰

본 연구결과에 의하면, sophoraflavanone G는 본 연구에서 사용된 균주들의 90%에서 32 μg/ml 이하의 농도에서 항균활성을 보였다(Table 2). Cha 등[17]에 의하면, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43717, *F. nucleatum* ATCC 51190^T, *P. intermedia* ATCC 49046 및 *P. gingivalis* ATCC 33277^T에 대하여 sophoraflavanone G의 MIC/MBC 값이 각각 3.2/3.2 μg/ml, 6.4/12.8 μg/ml, 3.2/6.4 μg/ml 및 0.2/0.8 μg/ml인 것으로 조사되었다. 이는 본 연구의 결과와 비교할 때, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43717에 대한 결과는 10배의 차이가 있었으나 나머지 균주들의 것과는 2-3배 차이를 보였다. 이러한 결과의 차이는 현재로서는 명확히 알 수 없지만, 실험자에 따른 판정의 기준 차이와 실험 오차에 의한 것으로 생각된다. 즉, 두 연구에서 모두 “육안으로 세균 성장이 없는 well의 농도 중 최소 농도”를 MIC 값으로 결정하였다. 이는 항균물질의 색깔에 의한 비색정량기의 흡광도 오차를 줄일 수 있는 장점은 있지만, 실험자의 주관적 판단에 따라 결과가 달라지는 원인이 된다. 특히 본 연구자의 경험에 의하면 반응 초기에 자라났던 균주들이 시간이 지남에 따라 성장이 억제되면서 국소적으로 응집되어 있는 경우

가 있어서 이를 잘 보지 못할 경우 MIC 값이 2-4배 정도 더 낮은 값에서 정해지는 경우가 있다. 또한, MBC 값의 경우 본 연구에서는 “99.99%” 세균이 죽는 최소농도로 정의했지만, Cha 등[17]은 “99.9%”를 기준으로 하였다. 이러한 이유로 본 연구의 결과는 *F. nucleatum* ATCC 51190^T에 대한 값을 제외하고는 다른 균주들에 대해서는 Cha 등[17]의 연구 결과보다 더 높은 MBC 값을 가졌다(Table 1). 하지만, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43717에 대한 MIC/MBC 값의 차이가 10배 차이가 나기 때문에 다시 실험을 해 본 결과 동일한 결과를 얻었고(data not shown), 다른 2 균주의 *A. actinomycetemcomitans*들의 MIC/MBC 값이 ATCC 43717 균주의 것과 비슷한 점을 미루어 볼 때 본 연구에서 얻은 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 43717에 대한 MIC/MBC 값은 이상이 없는 것으로 판단되었다. Sophoraflavanone G는 일종의 플라보노이드 화합물로 항균능뿐만 아니라 항염증 활성도 갖는 것으로 보고되었다[20,21]. 이러한 결과는 sophoraflavanone G가 32-64 μg/ml의 농도에서 치주질환병원성 세균에 대한 항균능을 갖는 것으로 생각된다.

기존의 연구 결과물들에 의하면 사포닌 유도체인 OA 및 UA는 그람 양성 세균 종에 대해서 강한 항균력이 있고, 그람 음성 세균 종에 대해서는 *E. coli*나 *E. cloacae*와 같은 특정 세균 종을 제외하고는 항균력이 없는 것으로 보고되었다[10,12,15]. 그람 양성 세균과 그람 음성 세균의 여러 차이점들 중에서 가장 특징적인 것이 펩티도글리칸 층의 두께이다. 본 연구팀은 이러한 점들을 고려하여 OA 및 UA의 항균기전의 일단을 밝히기 위하여 OA 및 UA 처리 시 *S. mutans* UA159 세균의 펩티도글리칸 층의 합성에 관여하는 유전자들의 전사체 발현 변화를 살펴보았다(data not shown). 그 결과 OA 및 UA에 의해 대부분의 펩티도글리칸 층의 합성에 관여하는 유전자들의 발현이 억제됨을 실시간 중합효소연쇄반응법으로 밝혔다(in submission). 하지만, 이러한 펩티도글리칸 층은 그람 음성 세균에도 있기 때문에 주로 그람 음성 세균인 치주질환 원인균종들도 OA 및 UA에 감수성을 보일 것이라는 생각으로 본 연구를 시행하였

다. 그 결과 OA 및 UA는 *P. gingivalis* 균주들과 *P. intermedia* ATCC 25611^T 균주에서만 본 연구에서 사용된 농도에서 항균능을 보이는 것을 알 수 있었다(Table 1). *P. gingivalis*는 *T. forsythia*, *T. denticola*와 더불어 가장 강력한 치주질환 원인균종으로 알려졌다[22]. 그리고, 한국인에 있어서 *P. intermedia*는 치주질환 치료의 예후 판정에 있어서 중요한 세균학적 지표로 이용할 수 있음이 보고되었다[23]. 즉, 치주치료 전에 *P. intermedia*가 존재했던 부위의 치주 병소의 경우 스케일링 및 치은연 하소파술을 시행한 초기 치주치료의 예후가 좋지 않았다. 그러므로, 본 연구에서 OA 및 UA가 본 연구에서 사용한 농도에서 *P. gingivalis* 균주들과 *P. intermedia* ATCC 25611^T 균주에서만 항균능을 보였지만, 두 세균 종이 치주질환의 발병 및 진행 또는 치주치료 예후와 밀접한 연관성이 있다는 점과 OA 및 UA가 초기 치면 세균막 형성에 관여하는 그람 양성 세균 종에 대한 항균 활성이 높다는 점을 고려할 때, 어느 정도 치주질환 예방 효과를 가질 것으로 생각된다.

이상의 연구결과들을 종합할 때, 항균 및 항염증 기능을 갖는 플라보노이드인 sophoraflavanone G는 64 μ g/ml의 농도로 치약, 구강양치용액 등에 첨가되어 치주질환 예방 및 치료보조제로 사용할 목적의 항균 및 항염증 기능이 부여된 구강위생용품 개발에 이용 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 이 논문은 2013년도 재단법인 조선대학교 치과대학교육문화재단 학술연구기금의 지원을 받아 연구되었음.

References

1. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1979;6:351-382.
2. Gupta S. Chronic infection in the aetiology of atherosclerosis-focus on *Chlamydia pneumoniae*. *Atherosclerosis.* 1999;143:1-6.
3. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol.* 2000;71:1554-1560.
4. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5:78-111.
5. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000. 1997;14:12-32.
6. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001;183:3770-3783.
7. Lee ES, Ahn TY, Yoon JJ, Kook JK, Lee BR, Kim DK. Restraint effect on leaf-extract from *Camellia sinensis* and seed-extract from *Casia tora* against periodontopathogens. *J Korean Acad Dent Health.* 2003;27:569-569.
8. Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, Kook JK. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe.* 2012;18:369-372.
9. Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol.* 1995;49:57-68.
10. Hichri F, Jannet JC, Cheriaa J, Jegham S, Mighri Z. Antibacterial activities of a few prepared derivatives of oleanolic acid and of other natural triterpenic compounds. *C R Chimie.* 2003;6:473-483.
11. Horiuchi K, S. Shiota, T. Hatano, T. Yoshida, T. Kuroda, and T. Tsuchiya. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull.* 2007;30:1147-1149.
12. Fontanay S, Grare M, Mayer J, Finance C, Duval RE. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. *J Ethnopharmacol.* 2008;120:272-276.
13. Kim MJ, Kim CS, Ha WH, Kim BH, Lim YK, Park SN, Cho YJ, Kim M, Ko JH, Kwon SS, Ko YM, Kook JK. Antimicrobial effects of oleanolic acid against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* isolated from a Korean population. *Int J Oral Biol.* 2010;35:191-195.
14. Kim MJ, Kim CS, Park JY, Lim YK, Park SN, Ahn SJ, Jin DC, Kim TH, Kook JK. Antimicrobial effects of ursolic acid against mutans streptococci isolated from Koreans. *Int J Oral Biol.* 2011;36:7-11.
15. Kuete V, Wabo GF, Ngameni B, Mbaveng AT, Metuno R, Etoa FX, Ngadjui BT, Beng VP, Meyer JJ, Lall N. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). *J Ethnopharmacol.* 2007;114:54-60.
16. Han C, Guo J. Antibacterial and anti-inflammatory activity of traditional Chinese herb pairs, *Angelica sinensis* and *Sophora flavescens*. *Inflammation.* 2012;35:913-919.
17. Cha JD, Jeong MR, Jeong SI, Lee KY. Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;17:858-864.
18. Kim CS, Park SN, Ahn SJ, Seo YW, Lee YJ, Lim YK, Freire MO, Cho E, Kook JK. Antimicrobial effect of sophoraflavanone G isolated from *Sophora flavescens* against mutans streptococci. *Anaerobe.* 2013;19:17-21.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard-Sixth Edition. CLSI document M7-A6. Wayne Pennsylvania USA. 2005.

20. Kim DW, Chi YS, Son KH, Chang HW, Kim JS, Kang SS, Kim HP. Effects of sophoraflavanone G, a prenylated flavonoid from *Sophora flavescens*, on cyclooxygenase-2 and *in vivo* inflammatory response. Arch Pharm Res. 2002;25:329-335.
21. Wun ZY, Lin CF, Huang WC, Huang YL, Xu PY, Chang WT, Wu SJ, Liou CJ. Anti-inflammatory effect of sophoraflavanone G isolated from *Sophora flavescens* in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. Food Chem Toxicol. 2013;62:255-261.
22. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998;25:134-144.
23. Kook JK, Sakamoto T, Nishi K, Kim MK, Seong JH, Son YN, Kim DK. Detection of *Tannerella forsythia* and/or *Prevotella intermedia* might be useful for microbial predictive markers for the outcome of initial periodontal treatment in Koreans. Microbiol Immunol. 2005;49:9-16. Erratum in: Microbiol Immunol. 2005;49:295.