

## Antimicrobial Effects of Oleanolic Acid against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* Isolated from a Korean Population

Min Jung Kim<sup>1,3†</sup>, Chun Sung Kim<sup>1,3†</sup>, Woo-Hyung Ha<sup>2</sup>, Byung-Hoon Kim<sup>2</sup>, Yun Kyong Lim<sup>1</sup>, Soon-Nang Park<sup>1,3</sup>, Yu Jin Cho<sup>1</sup>, Myungmi Kim<sup>1</sup>, Jang-Hyuk Ko<sup>2</sup>, Soon-Sung Kwon<sup>2</sup>, Yeong-Mu Ko<sup>2,3</sup>, and Joong-Ki Kook<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Biochemistry, and <sup>2</sup>Department of Dental Materials, and <sup>3</sup>Oral Biology Research Institute, School of Dentistry, Chosun University, 375 Seosuk-Dong, Dong-Gu, Gwangju 501-759 Korea

(received November 3, 2010 ; revised December 7, 2010 ; accepted December 16, 2010)

Oleanolic acid is a natural triterpenoid that exists widely in foods and some medicinal herbs. The purpose of this study was to determine the antimicrobial activity of oleanolic acid against *Streptococcus mutans* strains isolated from a Korean population. Antimicrobial activity against these bacteria was evaluated by minimal inhibitory concentration (MIC) and time kill curves. The tolerance of human gingival fibroblasts and human periodontal ligaments to oleanolic acid was tested using a methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The MIC<sub>90</sub> value of oleanolic acid for both *S. mutans* and *S. sobrinus* isolated from Koreans was 8 µg/ml. Oleanolic acid showed bactericidal effects against *S. mutans* ATCC 25175<sup>T</sup> and *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup> at 1 × MIC (8 µg/ml) and had no cytotoxic effects against KB cells at this dose. The results suggest that oleanolic acid could be useful in the future development of oral hygiene products for the prevention of dental caries.

**Key words:** Antimicrobial effect; oleanolic acid; *Streptococcus mutans*

### 서 론

치아우식증은 구강 내에서 발생하는 양대 구강병의 하나로 알려져 있다. 치아우식증의 발생에 있어서 미생물의 존

재가 필수적임이 무균 동물을 이용한 실험(Orland, 1959)에서 밝혀진 이후, 여러 연구에 의하면 치면세균막 내의 세균 중 뮤탄스 그룹에 속하는 연쇄상구균들이 주요한 원인 세균 종으로 알려졌다(Asmussen, 1984; Weiner 등, 1997). 뮤탄스 연쇄상구균에는 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus rattus*, 그리고 *Streptococcus cricetus* 종들 포함된다(Kahkonen 등, 1999). 최근 사람의 구강 내에서 *S. downei*가 서식하는 것이 보고되었지만(Yoo 등, 2005), 주로 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*가 사람의 구강에 서식하는 것으로 알려져 있다.

현재 치아우식증을 예방하기 위해 치약 및 구강양치용액을 포함한 다양한 구강위생용품이 개발되고 있다. 이러한 구강위생용품의 개발에 있어서 중요한 첨가제가 불소화합물이나 클로헥시딘으로, 이들은 모두 치아우식증의 원인균 종인 뮤탄스 연쇄상구균에 대한 항균작용을 보이는 화합물들이다. 하지만, 불소화합물의 과도한 섭취 시 복통을 유발하거나 반점치를 유발시킬 수 있다(Spencer와 Do, 2008). 또한, 클로헥시딘을 빈번하게 사용할 경우에는 치아가 변색이 되거나 구강 점막의 작열감을 유발시킨다(Tredwin 등, 2005). 이러한 화학물들의 부작용들이 보고되고 있어서 오랫동안 민간요법이나 한방에서 사용되어온 천연물로부터 뮤탄스 연쇄상구균에 대한 항균능을 보이는 추출물을 이용하려는 연구가 진행되고 있다(Lim 등, 2003; Petti와 Sully, 2009). Oleanolic acid (3β-3-hydroxyolean-12-en-28-oic acid)는 식용 및 의약품용 허브의 식물에 존재하는 pentacyclic triterpenoid 화합물로 algycones 또는 유리 산 형태로 존재하며 항세균, 항염증, 및 항산화 효과 등이 있는 것으로 알려져 있다(Liu, 1995; Nishino 등, 1998; Sato 등, 2007). 최근의 연구에 의하면, oleanolic acid는 병원성 기회감염

\*Corresponding author: Dr. Joong-Ki Kook, Department of Oral Biochemistry, School 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

†Contributed equally

의 주요한 원인균들인 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginos* 등에 대한 항균력이 있는 것으로 보고되었다(Fontanay 등, 2008).

현재 국내에서 천연추출물을 이용하여 뮤탄스 연쇄상구균의 성장을 억제하고 제거하는 방법들이 많이 연구되고 있으나, 대부분의 연구들은 서양인에서 분리 동정된 균주들을 이용하여 실험이 이루어지고 있다. 본 연구자들의 선행연구에 의하면, 한국인에서 분리 동정된 임상균주와 서양인에서 분리 동정된 표준균주에 대한 녹차 추출물의 항균력 실험에서 표준균주와 임상균주들에 대한 최소억제농도(MIC)값이 서로 상이한 결과를 나타내었다(Lee 등, 2003; Lim 등, 2003). 그러므로, 본 연구에서는 뮤탄스 연쇄상구균의 표준균주 및 한국인에서 분리 동정된 임상균주들에 대한 oleanolic acid의 항균능을 알아보고, 그 결과를 바탕으로 구강세정제 등의 구강위생품 개발에 있어서 oleanolic acid의 적정 농도 결정에 응용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 세균 및 세균 배양

본 연구에 사용된 *S. mutans* ATCC 25175<sup>T</sup> 및 *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup>는 America type culture collection (ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 한국인에서 분리 동정된 40균주의 *S. mutans* (KCOM 1054, KCOM 1085, KCOM 1087, KCOM 1088, KCOM 1091, KCOM 1092, KCOM 1095, KCOM 1097, KCOM 1111, KCOM 1112, KCOM 1113, KCOM 1116, KCOM 1117, KCOM 1118, KCOM 1123, KCOM 1124, KCOM 1126, KCOM 1127, KCOM 1128, KCOM 2762, KCOM 1136, KCOM 1137, KCOM 1139, KCOM 1142, KCOM 1143, KCOM 1145, KCOM 1146, KCOM 1197, KCOM 1200, KCOM 1201, KCOM 1202, KCOM 1203, KCOM 1207, KCOM 1208, KCOM 1209, KCOM 1212, KCOM 1214, KCOM 1217, KCOM 1219, KCOM 1226) 및 15균주의 *S. sobrinus* (KCOM 1061, KCOM 1150, KCOM 1151, KCOM 1152, KCOM 1153, KCOM 1157, KCOM 1158, KCOM 1159, KCOM 1185, KCOM 1191, KCOM 1193, KCOM 1196, KCOM 1221, KCOM 1228, KCOM 1218)들은 한국구강미생물자원은행(Korean Collection for Oral Microbiology, KCOM)에서 분양 받아 사용하였다. 이들 세균들은 Todd Hewitt (Difco, Lab., USA) 한천배지에 도말 하여, 37°C 세균배양기에서 1-2일간 배양한 후 다음 실험에 사용하였다.

### KB 세포 배양

구강 상피세포 암세포인 KB 세포는 ATCC에서 구입하였으며, Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL,

USA)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco BRL)과 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco BRL)이 혼합된 세포배양액을 이용하여 37°C 에서 5% CO<sub>2</sub>가 첨가되고, 100% 습도가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다.

### 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

뮤탄스 연쇄상구균 균주들에 대한 oleanolic acid (Sigma, USA)의 항균성을 알아보기 위해 MIC를 측정하여 분석하였다. TH 액체배지를 이용하여 37°C 세균배양기에서 뮤탄스 연쇄상구균을 24시간 배양한 후, 파장 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 1 × 10<sup>6</sup> CFU/ml가 되도록 액체배지로 희석하였다. Oleanolic acid를 1, 2, 4, 8, 16 µg/ml가 되도록 세균 배양액에 첨가 (세균배양액의 1%가 되도록 첨가)하였다. 이때 oleanolic acid는 Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma)에 녹여 사용하였다. 실험의 음성대조군은 DMSO를 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하였고, 양성대조군은 ampicillin (100 mg/ml)를 세균배양액의 1%가 되도록 첨가하였다. 96 well plate에 200 µl씩 분주한 후 37°C 에서 24시간 동안 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험군 및 대조군은 모두 3반복씩 실험하였다. MIC<sub>50</sub>과 MIC<sub>90</sub>은 각각 균주의 50%와 90%의 성장을 억제하는 oleanolic acid의 농도를 나타낸 것이다.

### Time kill 분석

Oleanolic acid를 첨가한 후 시간이 경과함에 따른 *S. mutans* ATCC 25175<sup>T</sup> 및 *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup>에 대한 항균활성을 조사하여, oleanolic acid가 뮤탄스 연쇄상구균에 대해 정균제 또는 살균제로 작용하는 지를 알아보기 위해 time kill 분석을 시행하였다. 활성 검사를 통해 얻은 MIC값을 기준으로 0.5 × MIC, 1 × MIC, 2 × MIC 및 4 × MIC의 농도에서 0, 3, 6, 12 및 24h 경과함에 따른 활성을 측정하였다. 파장 600 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 1 × 10<sup>7</sup> CFU/ml가 되도록 TH 액체배지로 희석하고 96 well plate에 액체배지 270 µl에 활성물질은 각각의 농도가 되도록 희석하여 희석된 균주를 30 µl를 첨가하여 반응시켰다. 반응 시간에 따라 10 µl를 취하여 각각의 TH 한천배지에 도말하여 48시간 동안 배양한 후 형성된 균락을 계수화 하였다. 이 때, 6시간 이하 배양한 그룹은 10<sup>2</sup> 및 10<sup>3</sup>배 희석하였고, 나머지 그룹은 10<sup>3</sup> 및 10<sup>5</sup>배 희석하였다. 각 반응은 모두 세 번 반복하여 평균하였다.

### Oleanolic acid의 세포 생존율 평가

MIC 측정에 사용된 oleanolic acid의 농도 값을 참고하여, 32, 16, 8, 4, 2 µg/ml의 oleanolic acid 농도에서 KB 세포에 대한 세포 생존율을 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) 분석법을 통하여 측정하였다. 24-well의 세포 배양접시에 분주

**Table 1.** Minimum inhibitory concentration of oleanolic acid against clinical isolates of *S. mutans* and *S. sobrinus* isolated from Koreans.

Species & Strains	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Species & Strains	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>S. mutans</i> ATCC <sup>1</sup> 25175 <sup>1</sup>	8	<i>S. mutans</i> KCOM 1200	4
<i>S. mutans</i> KCOM <sup>2</sup> 1054	8	<i>S. mutans</i> KCOM 1201	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1085	4	<i>S. mutans</i> KCOM 1202	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1087	4	<i>S. mutans</i> KCOM 1203	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1088	4	<i>S. mutans</i> KCOM 1207	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1091	4	<i>S. mutans</i> KCOM 1208	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1092	4	<i>S. mutans</i> KCOM 1209	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1095	8	<i>S. mutans</i> KCOM 1212	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1097	8	<i>S. mutans</i> KCOM 1214	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1111	8	<i>S. mutans</i> KCOM 1217	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1112	8	<i>S. mutans</i> KCOM 1219	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1113	4	<i>S. mutans</i> KCOM 1226	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1116	4	<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478 <sup>T</sup>	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1117	8	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1061	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1118	4	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1150	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1123	4	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1151	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1124	4	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1152	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1126	4	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1153	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1127	4	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1157	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1128	4	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1158	4
<i>S. mutans</i> KCOM 2762	8	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1159	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1136	8	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1185	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1137	4	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1191	4
<i>S. mutans</i> KCOM 1139	4	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1193	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1142	4	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1196	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1143	4	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1221	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1145	4	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1228	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1146	4	<i>S. sobrinus</i> KCOM 1218	8
<i>S. mutans</i> KCOM 1197	4		

<sup>1</sup>ATCC, America Type Culture Collection; <sup>2</sup>KCOM, Korean Collection for Oral Microbiology

된 세포에서 배양액을 제거하고 각 농도의 oleanolic acid 용액 (세포 배양액의 1%가 되도록 첨가) 및 DMSO가 1% 함유된 세포 배양액 1 ml씩 (음성대조군)을 각각의 well에 분주하였다. 이들 세포들은 전술한 세포배양조건에서 24시간 동안 배양 후 기존의 세포 배양액을 모두 제거하고, 10% MTT 용액이 첨가된 배지를 각 well의 세포에 500  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 전술한 세포배양 조건에서 3시간 동안 배양시켰다. 그 후 반응액을 제거하고, isopropanol (Sigma)을 각 well에 300  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 형성된 formazan결정을 용해시켜 배양접시를 잘 흔든 후 96-well에 200  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 파장 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 실험군 및 대조군은 각각 3 well씩 배당하였고, 이를 독립적으로 3회 반복 시행하였다.

## 결 과

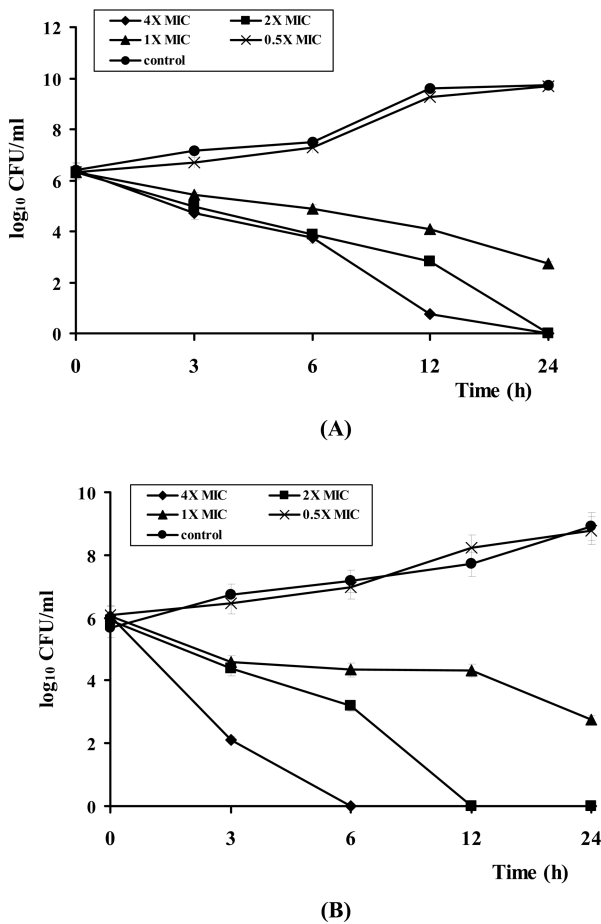
*S. mutans* ATCC 25175<sup>T</sup> 및 *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup>

에 대한 oleanolic acid의 MIC 값은 두 균주 모두 8  $\mu\text{g/ml}$ 이었다(Table 1). Oleanolic acid의 MIC를 측정한 결과, 한국인에서 분리 동정된 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*에 대한 oleanolic acid의 MIC<sub>50</sub> 값은 각각 4 또는 8  $\mu\text{g/ml}$ 이었고, MIC<sub>90</sub>의 값은 두 세균 모두 8  $\mu\text{g/ml}$ 이었다(Table 2). Oleanolic acid의 *S. mutans* ATCC 25175<sup>T</sup> 및 *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup>에 대한 항균 작용이 정균작용에 의한 것인지 살균작용에 의한 것인지를 알기 위해 time kill 분석을

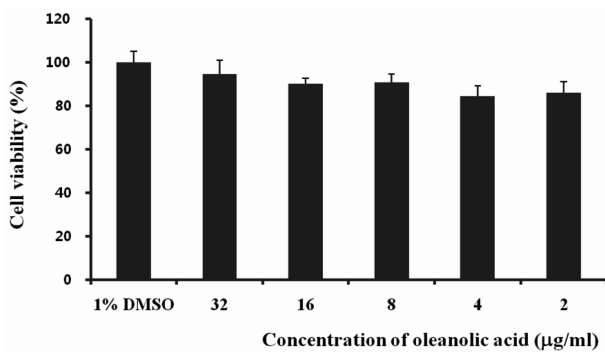
**Table 2.** Inhibitory effects of oleanolic acid on clinical isolates of *S. mutans* and *S. sobrinus* isolated from Koreans.

Species (n = No. of strains)	Concentration of oleanolic acid (mg/ml)		
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>100</sub>
<i>S. mutans</i> (n = 40)	4	8	8
<i>S. sobrinus</i> (n = 15)	8	8	8
Total (n = 55)	4	8	8

MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, and MIC<sub>100</sub> minimal inhibitory concentration required to inhibit the growth of 50, 90, and 100% of mutans streptococci, respectively.



**Fig 1.** Time kill curves of oleanolic acid on (A) *S. mutans* ATCC25175<sup>T</sup> and (B) *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup> at different oleanolic acid concentrations.



**Fig. 2.** Cell viability of oleanolic acid on KB cells.

시행하였다. Oleanolic acid의 1×MIC의 이상의 농도에서 *S. mutans* ATCC 25175<sup>T</sup>와 *S. sobrinus* ATCC 33478<sup>T</sup>에 대해 bactericidal effects를 나타내었다(Fig. 1).

Oleanolic acid가 KB 세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT 분석법을 실행하였다. 그 결과 본 실험에서 사용한 oleanolic acid의 최고 농도(32 µg/ml)에서도 KB 세포들에 대한 세포독성이 없었다(Fig. 2).

## 고 찰

본 연구 결과에 의하면, 치아우식증의 주요한 원인균종인 *S. mutans* 및 *S. sobrinus*뿐만 아니라 전신질환과 연관된 구강정상세균 중 폐렴 및 세균성 심내막염 등의 원인균종들인 mitis 그룹의 연쇄상구균들도 그람 양성세균들이기 때문에 oleanolic acid를 구강양치용액 및 치약 등의 구강위생용품에 첨가하여 사용할 경우 치아우식증뿐만 아니라 여러 전신질환의 예방에도 효과가 있을 것으로 생각된다.

최근 병원성 기회감염의 주요한 원인균들에 대한 참고균주 및 항생제 내성을 보이는 임상균주들을 대상으로 oleanolic acid에 대한 항균평가를 실시하였다(Fontanay 등, 2008). 그들의 연구 결과 oleanolic acid는 그람 음성 세균인 *E. coli*와 *P. aeruginosa* 균주들에게는 항균 효과가 없었고, 그람 양성 세균인 *S. aureus*와 *E. faecalis* 참고균주들에서는 각각 8 µg/ml와 4 µg/ml의 농도에서 MIC 값을 보였다. 하지만 메티실린에 대한 내성을 갖는 *S. aureus* 균주와 반코마이신에 대한 내성을 갖는 *E. faecalis* 균주에 대해서는 항균 효과가 없었다. 하지만 다른 연구 결과에 의하면 8 µg/ml의 oleanolic acid 농도에서 반코마이신에 내성을 갖는 *E. faecalis* 균주에 대한 항균 작용을 갖는 것으로 보고되었다(Horiuchi 등, 2007). 이러한 두 연구결과의 차이를 현재로서는 알 수가 없기 때문에 앞으로 oleanolic acid의 특정 항생제에 대한 내성을 보이는 세균에 대한 항균작용 기전을 연구하면, 항생제를 대신해서 oleanolic acid를 임상에 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

Oleanolic acid의 사람 각화세포(HaCaT) 및 사람 폐 배아 섬유모세포(MRC-5)들에 세포 생존을 실험 결과에 의하면, 52.4 µg/ml 와 25.2 µg/ml 농도의 oleanolic acid를 24시간 동안 HaCaT 세포와 MRC-5 세포 각각에 처리할 경우 50%의 생존율(the half maximum inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)을 보였다(Fontanay 등, 2008). 본 연구에서 KB 세포는 32 µg/ml 농도에서도 94.5% 생존율을 보였다. 또한, 구강 정상 각화상피세포를 일차 배양하여 oleanolic acid에 대한 생존율을 조사한 결과 32 µg/ml 농도에서 오히려 27.2% 증가하였다(data not shown). 이러한 결과의 조직의 기원에 따른 세포들 간의 oleanolic acid에 대한 생존율 차이가 있음을 시사해 준다.

구강 내에는 약 500여 종의 세균이 서식하고 있고, 구강 내 발생하는 대표적인 질병들인 치아우식증, 치주질환, 치수 및 치근단 질환 및 구강 악골에 발생하는 골수염 등의 원인도 대부분 구강 내 존재하는 정상 세균총의 세균에 의한 기회감염의 결과로 알려져 있다(Paster 등, 2001). 이러한 구강 질환의 치료를 위해 항생제를 사용하기도 하지만, 항생제 투여에 의해 구강 내 세균들의 특정 항생제에 대한 내성획득 등의 문제 때문에 한계가 있다. 그러므로, 많은 연구자들은 오랫동안 음식으로 사용되고 있거나, 인체에 부작용이 없는 것으로 알려진 천연물 중에서 항균작용을 보

이는 물질을 추출하여 치아우식증을 비롯한 세균성 질환의 예방 및 치료에 응용하려는 연구가 진행되었다(Kähkönen 등, 1999; Kim 등, 2003; Kobo 등, 1992; Kwon 등, 2004; Salomão 등, 2004). 본 연구에서 사용된 oleanolic acid의 경우도 여러 가지 식물성 음식과 의약품 허브와 식물에 존재하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 앞으로 oleanolic acid를 어떤 식물에서 추출할 것인지를 정하고, 경제적으로 추출할 수 있는 방법을 찾고, 여러 감염성 질환의 주요한 원인균종들에 대한 항균 효과를 검증하는 연구를 진행할 필요가 있다고 생각된다.

이상의 결과에 의하면, 치아우식증의 원인 세균 종에 대한 항균작용을 갖는 oleanolic acid의 농도에서는 구강 각 화상피 세포에 대한 세포독성은 보이지 않기 때문에 치아우식증 예방을 위한 구강양치용액, 치약, 치실 등의 구강위생용품 개발에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

---

## 감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (과제고유번호: A091074).

---

## 참 고 문 헌

- Asmussen, E. Softening of BISGMA-based polymers by ethanol and by organic acids of plaque. *Scand J Dent Res.* 1984;92: 257-61.
- Fontanay S, Grare M, Mayer J, Finance C, Duval RE. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *J Ethnopharmacol.* 2008;120:272-6.
- Horiuchi K, Shiota S, Hatano T, Yoshida T, Kuroda T, Tsuchiya T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull.* 2007;30:1147-9.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 1999; 47:3954-62.
- Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J Agri Food Chem.* 2003;51:6509-15.
- Kubo I, Muroi H, Himejima M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. *J. Agri. Food Chem.* 1992;40:245-8.
- Kwon YS, Kim SS, Sohn SJ, Kong PJ, Cheong IY, Kim CM, Chun W. Modulation of suppressive activity of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by glycosidation of flavonoids. *Arch Pharm Res.* 2004;27:751-6.
- 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;27:569-79.
- Lim SH, Seo JS, Yoon YJ, Kim KW, Yoo SO, Kim HS, Kook JK, Lee BR, Cha JH, Park JY. Effect of Leaf-Extract from *Camellia sinensis* and Seed-Extract from *Casia tora* on Viability of Mutans Streptococci isolated from the interface between orthodontic brackets and tooth surfaces. *Korea J Orthod.* 2003;33:381-9.
- Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol.* 1995;49:57-68.
- Nishino H, Nishino A, Takayasu J, Hasegawa T, Iwashima A, Hirabayashi K, Iwata S, Shibata S. Inhibition of the tumor-promoting action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate by some oleanane-type triterpenoid compounds. *Cancer Res.* 1988;48:5210-5.
- Orland FJ. A review of dental research using germfree animals. *Ann N Y Acad.* 1959;78:285-9.
- 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;183:3770-83.
- Petti S, and Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *J Dent.* 2009;37:413-23.
- Salomão K, Dantas AP, Borba CM, Campos LC, Machado DG, Aquino Neto FR, de Castro SL. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Lett Appl Microbiol.* 2004;38:87-92.
- Sato H, Genet C, Strehle A, Thomas C, Lobstein A, Wagner A, Mioskowski C, Auwerx J, Saladin R. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem. Biophys Res Commun.* 2007;362:793-8.
- Spencer AJ, Do LG. Changing risk factors for fluorosis among South Australian children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2008;36:210-8.
- Tredwin C, Scully C, Bagan-Sebastian J. Drug-induced disorders of teeth. *J Dent Res.* 2005;84:596-602.
- Weiner R., Millstein P, Hoang E, Marshall D. The effect of alcoholic and non-alcoholic mouthwashes on heat-treated composite resin. *Oper Dent.* 1997;22:249-53.
- Yoo SY, Kim KJ, Lim SH, Kim KW, Hwang HK, Min BM, Choe SJ, Kook JK. First isolation of *Streptococcus downei* from human dental plaques. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 249:323-6.