Korean Journal of Clinical Dental Hygiene

Original Article

*Streptococcus mutans*의 성장 및 구강 바이오필름 형성에 대한 wasabi 유래 성분 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate의 효과

조하랑, 김기림*
경북대학교 일반대학원 치위생학과

Effects of Wasabi-Derived 6-(Methylsulfinyl)hexyl Isothiocyanate on Growth and Oral Biofilm Formation by *Streptococcus mutans*

Received: November 14, 2025
Revised: December 02, 2025
Accepted: December 03, 2025

Ha-Rang Jo, Ki-Rim Kim*
Department of Dental Hygiene, Graduate School, Kyungpook National University, Sangju, 37224, Korea

*Corresponding Author: 김기림, (37224) 경상북도 상주시 경상대로 2559 경북대학교 상주캠퍼스 치위생학과, Tel: (054) 530-1422, Fax: (054) 530-1429, E-mail: kirim0804@gmail.com

Abstract

Objective: This study evaluated the antibacterial and antibiofilm activities of the wasabi-derived compound 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate (6-MITC) against *Streptococcus mutans*. **Methods:** The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of 6-MITC against *S. mutans* were determined. Antibiofilm activity of 6-MITC was confirmed by human saliva-coated biofilm formation assay. Plates were incubated for 48 h in 1% sucrose-containing saliva medium with bacteria and 6-MITC. After staining with 0.1% crystal violet, the biofilms were dissolved in 20% acetic acid, and absorbance was measured. **Results:** The MIC and MBC of 6-MITC against *S. mutans* were 0.125 mg/mL and 0.5 mg/mL, respectively. Biofilm formation was reduced in a concentration-dependent manner by 6-MITC, and, with statistically significant inhibition observed at concentrations ≥0.25 mg/mL (p<0.05). **Conclusions:** Wasabi-derived 6-MITC exhibits antibacterial and antibiofilm activities against *S. mutans*. These findings suggest that 6-MITC has potential as a natural candidate for the development of oral hygiene products, antibacterial agents, and infection-control formulations.

Key words: 6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate, Antibacterial, Antibiofilm, *Streptococcus mutans*

색 인: 6-(메틸설피닐)헥실 이소티오시아네이트, 항균, 항바이오필름 스트렙토코쿠스 뮤탄스

Copyright © 2025 by Korean Journal of Clinical Dental Hygiene. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0)

1. 서론

Streptococcus mutans (*S. mutans*)는 다양한 구강 질환을 야기하는 치면세균막인 구강 바이오필름을 형성하는데 주된 역할을 하는 대표적인 구강상재균으로, 당 대사를 통해 세포외다당류(Extracellular polysaccharides, EPS)를 합성하여 치면에 대한 미생물들의 초기 부착을 유도한다(1, 2). 또한, 유기산을 생성하여 치아 경조직의 탈회를 일으키고 구강을 산성 환경으로 조성하여 치아우식(Dental caries)을 유발한다(3). 다양한 구강미생물들의 부착과 증식으로 두꺼워진 바이오필름은 성숙하면서 병원성이 증가하며, *S. mutans*가 생성한 EPS는 확산 장벽(Diffusion barrier) 역할을 하여 항균제의 침투를 저해하는 등 약제에 대한 저항성을 높인다(4). 이와 같이 구강미생물총이 집락을 이루어 형성된 바이오필름인 치면세균막(Dental plaque)을 효과적으로 관리하는 것은 다양한 구강질환을 예방하는데 매우 중요하다.

현재 임상에서는 치면세균막 관리, 치은염 예방, 발치 및 치주수술 후 감염관리 등을 위해 클로르헥시딘(Chlorhexidine, CHX) 용액이 대표적인 구강용 항균제로 널리 사용되고 있다(5). CHX는 강력한 살균 및 항균 효과를 나타내지만, 장기 사용 시 구강미생물총 불균형, 치아 착색, 미각 변화, 구강점막 자극 등 다양한 부작용을 일으키기 때문에 사용 기간과 빈도가 제한된다. 또한 세틸피리디늄 염화물(Cetylpyridinium chloride), 트리클로산(Triclosan) 등 기타 화학적 살균 성분을 활용한 구강위생용품들도 단기간에는 우수한 항균 효과를 보이지만, 반복 또는 장기 사용 시 유사한 부작용이 발생하여 임상적 활용에 제약이 따른다(6). 이러한 화학적 항균제의 한계를 보완하기 위하여 최근에는 독성이 낮고 생체안전성이 높은 식물 유래 천연물 기반의 약제 개발이 바이오 산업에서 중요한 연구 분야로 자리매김하고 있다. 여러 연구에서 효과가 입증된 천연물 유래 성분들은 세포막 구조 교란, EPS 합성 저해, 쿼럼 센싱(Quorum sensing) 간섭 등 다표적 기전을 통해 *S. mutans*를 포함한 구강병원균의 성장과 바이오필름 형성을 억제하는 것으로 보고되었다(7, 8). 특히 계피, 정향, 레몬그라스 등의 정유성분은 식중독균 및 구강병원균에서 농도 의존적인 바이오필름 억제 효과를 보였으며, 최소억제농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)와 최소살균농도(Minimum bacteriocidal concentration, MBC)의 범위가 제시되어 상업적 활용 가능성이 시사되었다(9).

와사비(*Eutrema japonicum*)는 일본과 대한민국을 포함한 동아시아 일부 지역에 자생하는 식물로, 모든 부위가 식용 가능하지만 그중 줄기에서 발달한 뿌리줄기(Rhizome) 부분은 독특한 매운맛과 향으로 인해 식재료로 널리 사용되고 있다. 와사비 줄기 에테르 추출물에서 분리·동정된 성분들은 *Escherichia coli* (*E. coli*)과 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)에 대한 항균 활성을 보이는 것으로 보고되었다(10). 와사비의 주요 생리활성 성분 중 하나인 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate(6-MITC)는 Isothiocyanate (ITC) 계열 화합물로, 강력한 항염증, 항(죽상)동맥경화, 항산화 활성을 포함한 다양한 약리학적 특성이 알려져 있으며, 심혈관·대사성 질환 예방 및 신경 보호 작용 등 전신 건강을 위한 다양한 생리학적 잠재력이 보고되었다(11, 12). 한편, 와사비에 풍부한 또다른 ITC 계열 화합인 Ally isothiocyanate (AITC)는 *S. mutans*의 성장을 억제하고, 우식 형성에 관여하는 당 대사, EPS 합성, 산 생성 및 산 내성, 바이오필름 형성 등 우식 형성과 관련된 주요 병원성 유전자의 발현을 광범위하게 조절하는 것으로 보고되었다(13). 이러한 연구 결과는 ITC 계열 화합물이 *S. mutans*의 병원성 인자에 직접 작용하여 항균 및 항바이오필름 활성을 나타낼 수 있음을 시사하며, 동일 계열에 속하는 6-MITC 역시 유사한 효과를 지닐 가능성을 보여준다.

그러나 현재까지 구강미생물에 대한 6-MITC의 항균 활성이나 구강 바이오필름에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 6-MITC의 구강미생물에 대한 생물학적 활성 평가는 천연물 유래 ITC 계열 화합물의 구강 병원균 조절 가능성에 대한 새로운 근거를 제시한다는 점에서 연구적 가치와 독창성이 높다. 이에 본 연구에서는 *in vitro* 상에서 *S. mutans*에 대한 6-MITC의 MIC 및 MBC를 평가하고, 사람 타액을 이용한 바이오필름 형성 모델을 이용하여 6-MITC의 항바이오필름 효과를 검증하고자 하였다.

2. 연구대상 및 방법

2.1. 실험 균주 및 연구재료

S. mutans KCTC 3065 균주는 생물자원센터(Korean collection for type cultures, KCTC)에서 구입하여, Brain Heart Infusion (BHI; Difco BD; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) 배지에 접종하여 37°C에서 배양하였다.

6-MITC (≥98%, in ethanol)는 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였으며, -20°C에서 냉동 보관하여 사용하였다.

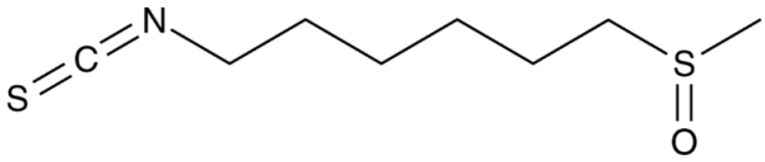


Figure 1. Chemical structure of 6-MITC ($C_8H_{15}NOS_2$).

2.2. 최소억제농도(MIC)와 최소살균농도(MBC) 측정

*S. mutans*에 대한 6-MITC의 MIC는 96-well plate에서 액체 배지 희석법(Broth dilution method)으로 측정하였다(14). 6-MITC는 BHI 배지로 최고 농도 1 mg/mL에서부터 1/2씩 희석하여 0.5 mg/mL 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL, 그리고 최저 농도가 0.0625 mg/mL가 되도록 하였고, *S. mutans*는 1×10^6 CFU/mL 농도로 분주하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 육안으로 확인하고 Microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균의 성장이 억제된 최소 농도를 MIC로 정하였다. 이후, MIC로 확인된 농도부터 최고 농도에 해당하는 균배양액을 BHI 고체배지에 도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 형성된 colony를 확인하고 계수하여 MBC를 정하였다.

2.3. 바이오필름 형성 실험

바이오필름 형성 실험은 타액 기반 획득피막 형성을 기반으로 한 *in vitro* 실험 모델을 활용하여 수행하였다(15). 타액 샘플은 최소 1주일 동안 약물을 복용하지 않고, 8시간 금식했으며, 실험 전 6시간 동안 어떠한 구강위생용품도 사용하지 않은 건강한 성인으로부터 채취하였다. 본 실험 절차는 OO대학교 연구윤리위원회(Institutional review board, IRB)로부터 승인받았으며(No. 2023-0246), 모든 참여자로부터 서면 동의서를 받았다. 파라핀을 저작하여 얻은 전 타액 샘플을 멸균 튜브에 담아 얼음 위에서 보관하며 진행하였다. 수집된 샘플은 4°C에서 10분 동안 3,000 rpm으로 원심분리 후, 상층액을 실험용 타액 배지로 사용하였다. 96-well plate 바닥을 타액 유래 피막으로 코팅하기 위해 타액 배지를 각 well에 분주하고 37°C에서 6시간 동안 100 rpm으로 진탕 배양 하였다. 기존 배지를 제거하고 1% sucrose를 포함한 신선한 타액배지에 *S. mut*ans 10^8 CFU/mL를 분주하고 6-MITC를 농도별로 처리한 후 37°C에서 48시간 동안 100 rpm으로 진탕 배양하였다. 부유 세포 및 배지를 제거하고 Phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척한 후 0.1% Crystal violet 용액으로 상온에서 30분 동안 염색하였다. 염색된 바이오필름은 사진 촬영 후, PBS로 2회 세척하고 20% Acetic acid를 사용하여 용해하였다. Microplate reader로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 분석하였다. 바이오필름 형성 억제율(%)은 0 mg/mL 6-MITC 군 흡광도를 control로 설정하고, 각 농도의 흡광도를 다음의 공식에 따라 계산하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = \left(1 - \frac{A_{sample}}{A_{control}}\right) \times 100$$

2.4. 통계분석

모든 실험은 3회 이상 독립적으로 반복 수행하였으며, 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계분석은 SPSS Statistics version 29.0(IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하여 수행하였다. 그룹 간 비교는 Student's t-test 또는 일원 분산 분석(One-way analysis of variance)을 실시하였으며, 분산분석 후에는 Tukey 사후 검정을 수행하였다. 통계적 유의 수준은 α=0.05로 설정하였다.

3. 연구결과

3.1. *S. mutans*에 대한 6-MITC의 최소억제농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)

와사비 유래 활성 성분인 6-MITC의 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 평가하기 위해 MIC와 MBC를 측정하였다. 액체 배지 희석법을 통해 6-MITC 농도 의존적으로 *S. mutans*의 성장이 억제되는 것을 확인하였고, 6-MITC의 MIC는 0.125 mg/mL로 나타났다(Figure 2). 또한, 0.125 mg/mL를 포함하여 최고 0.5 mg/mL 6-MITC가 포함된 균배양액을 고체 배지에 도말하여 배양한 결과, 0.5 mg/mL의 농도에서 *S. mutans*의 colony가 관찰되지 않았다. 따라서 *S. mutans*에 대한 6-MITC의 MBC는 0.5 mg/mL로 확인되었다.

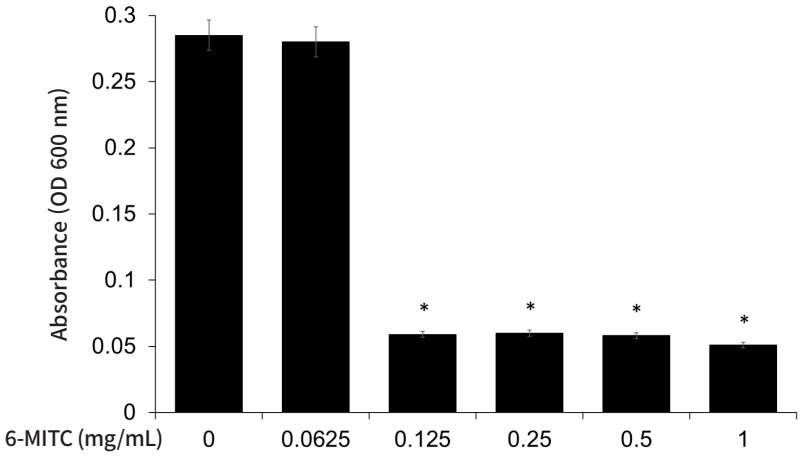


Figure 2. Antibacterial activity of 6-MITC against *Streptococcus mutans*. MIC and MBC tests were performed to evaluate the antibacterial activity of the wasabi-derived 6-MITC against *Streptococcus mutans*. Bacterial growth was measured at 600 nm after 24 h of incubation with different concentrations of 6-MITC (0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, and 1 mg/mL). Data are presented as the mean±standard deviation from three independent experiments. *p<0.05 versus the 0 mg/mL 6-MITC group.

3.2. *S. mutans*에 의한 바이오필름 형성에 대한 6-MITC의 효과

사람의 타액으로 획득피막 형성을 유도한 후, *S. mutans*에 의한 바이오필름 형성 실험을 수행하였다. *S. mutans*에 대한 6-MITC의 MIC인 0.125 mg/mL 이상의 농도를 처리하여 실험한 결과, 6-MITC의 농도에 따라 바이오필름 형성이 확연하게 억제되었다(Figure 3). 염색된 바이오필름을 정량 분석하여, 6-MITC의 농도별 바이오필름 형성 억제율을 구하였다. 그 결과, 6-MITC 0.125 mg/mL 농도에서 16.14%, 0.25 mg/mL와 0.5 mg/mL에서 각각 34.47%, 51.61%의 억제율을 보여 농도 의존적 감소가 확인되었다. 특히 6-MITC 0.25 mg/mL 이상의 농도에서 바이오필름 형성이 통계적으로 유의하게 억제하였다 (p<0.05).

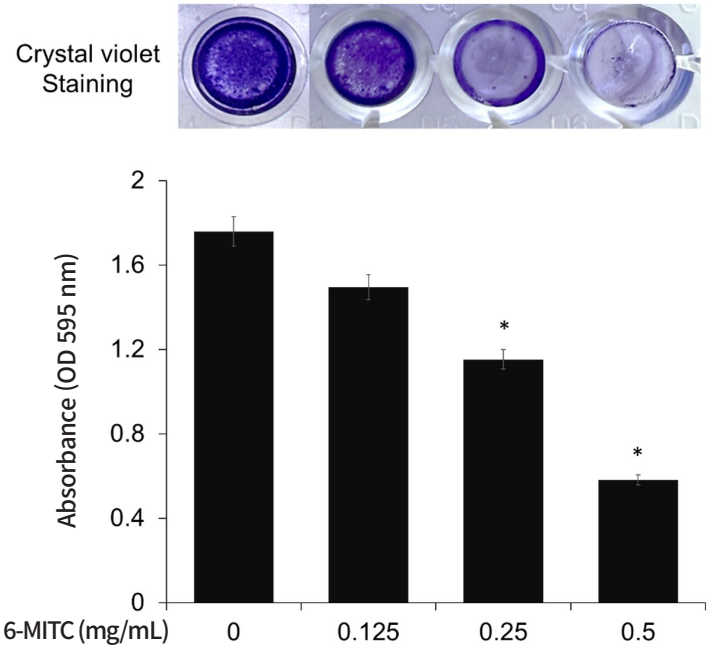


Figure 3. Antibiofilm effects of 6-MITC against *Streptococcus mutans*. After coating the bottom of a 96-well plate with human saliva medium, the plates were treated with *S. mutans* and 6-MITC(0, 0.125, 0.25, and 0.5 mg/mL) and cultured with shaking for 48 h. The formed biofilm was stained with 0.1% crystal violet, imaged, solubilized in 20% acetic acid, and quantified by measuring absorbance at 595 nm. Data are presented as the mean±standard deviation from three independent experiments. *p<0.05 versus the 0 mg/mL 6-MITC group.

4. 고안

구강 내에는 다양한 미생물이 공존하며 복잡한 생태계를 형성하고, 구강미생물총의 균형은 숙주의 구강 건강 유지에 중요한 역할을 한다(16). 그러나 면역력 저하, 구강위생관리 불량 등 다양한 요인에 의해 이 균형이 깨지면 치아우식증 및 치주질환을 비롯한 여러 구강질환이 유발될 수 있다(4, 16). 구강 내 가장 흔한 상재균 중 하나인 *S. mutans*는 당대사를 통해 산을 생성하여 법랑질 탈회를 유도하고, 불용성 글루칸을 포함한 EPS를 합성함으로써 바이오필름 초기 집락 형성에 중요한 역할을 한다(1). 6-MITC는 와사비의 독특한 향미와 관련된 주요 활성 성분이며, 배추과 식물에 풍부한 ITC 계열 화합물에 속한다(11, 12). ITC는 –N=C=S 작용기를 가진 유황 화합물로, 식물 내에서는 글루코시놀레이트(Glucosinolate, GSL) 전구체로 저장되어 있다가 저작되거나 잘리는 등 물리적인 손상이 생기면 미로시나아제(Myrosinase)에 의해 가수분해되어 생성된다(12,

17). 이 과정에서 생성되는 불안정한 아글리콘은 조건에 따라 주로 ITC형태로 전환되고, 대표적인 ITC로 AITC와 6-MITC가 보고되어 있다(11, 17). ITC계열 화합물은 티올기(-SH)에 대한 높은 반응성을 기반으로 강력한 항균 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 다양한 병원성 미생물에서 항균 효과가 보고되어 있다(18). 실제로 상업용 와사비 분말 역시 *E. coli* O157:H7과 *S. aureus*에 대해 농도 의존적 정균 및 살균 효과를 보였다(19). 와사비 또는 특정 ITC가 *Helicobacter pylori*를 살균하고 병원균의 부착 및 운동성을 억제함으로써 바이오필름 형성을 감소시킨다는 연구들도 보고된 바 있다(19, 20).

본 연구에서 와사비 유래 활성 성분인 6-MITC의 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 평가한 결과, MIC 0.125 mg/mL, MBC 0.5 mg/mL로 확인되었다. Ono H et al.(10)은 6-MITC가 *E. coli*와 *S. aureus*에 대해 각각 0.05-0.1 mg/mL 수준의 MIC를 나타낸다고 보고하였다. Lu Z et al.(19)은 상업용 와사비 분말이 *E. coli* O157:H7과 *S. aureus*에서 0.1-0.2 mg/mL 범위에서 살균 효과를 보인다고 하였다. 이러한 결과들은 본 연구에서 확인된 *S. mutans*에 대한 항균 농도와 유사한 범위에 속하며, 균종 간 감수성 차이와 배양 조건의 변화를 고려하더라도 6-MITC가 여러 세균에서 비교적 일관된 항균 활성을 나타냄을 시사한다.

*S. mutans*는 초기 성장 단계부터 EPS를 빠르게 생성하고 산 생성 능력 및 산 내성이 높아 낮은 pH 환경에서도 생존이 용이한 것으로 알려져 있는데, 이는 항균제에 대한 저항성을 증가시키는 주요 요소로 작용한다(1, 3-4). 본 연구에서 6-MITC는 농도 의존적으로 바이오필름 형성을 억제하였으며, 특히 0.25 mg/mL 이상의 농도에서 통계적으로 유의한 감소가 나타났다. 즉 정균 효과를 나타내는 MIC이상에서 확연한 항바이오필름 효과가 확인되었다. 이는 본 연구에서 BHI 와 같은 세포 실험에 사용된 단순 배양 배지 기반이 아닌, 사람 타액을 이용한 획득피막 모델과 당이 포함된 타액 배지를 사용하여 보다 실제 구강 환경에 근접한 조건에서 실험이 수행되었기 때문으로 해석된다. 실제 사람의 구강에서는 타액의 성상 및 구성성분, 구강 미생물의 다양성, 구강질환의 유무 등 복합적인 생리·미생물학적 요인이 존재하며, 특히 타액 단백질은 항균 물질과 결합하거나 중화하여 유효 농도를 감소시킬 수 있다(4, 21). 또한 EPS 기반 바이오필름 구조는 항균제의 내부 확산을 제한하며, 복합 균주 환경에서는 미생물 간 상호작용으로 인해 항균 민감도가 단일 균주 기반 실험과 다르게 나타날 수 있다(2, 21).

본 연구는 *S. mutans*에 대한 6-MITC의 항균 및 항바이오필름 효과를 입증하였으며, 이는 다른 구강 병원균에도 적용 가능한 새로운 천연물 기반 항우식 후보물질로서의 가능성을 제시한다. 또한 6-MITC가 구강질환 예방 및 치료를 위한 약재, 구강위생용품, 치과용 소독제 및 항균제에 활용될 수 있는 잠재력을 지님을 보여준다. 추후 구강미생물에 대한 항균 효과가 입증되어 활용되고 있는 천연물 성분뿐만 아니라 CHX 같은 기존 화학적 항균제와 비교 분석하여 6-MITC에 대한 농도 및 활용성을 좀더 고려해 볼 필요가 있다. 한편, 본 연구에서는 MIC가 0.125 mg/mL로 나타났으나, 0.0625-0.125 mg/mL 구간에서 *S. mutans* 성장이 급격하게 억제되는 경향이 관찰되었다. 따라서 해당 농도 범위를 보다 세분화하여 항균력의 경향을 파악할 필요가 있다. 또한 본 연구는 단일 균주 기반의 *in vitro* 모델로 수행되었기 때문에 실제 구강 환경과 차이가 존재한다는 한계가 있다. 향후 연구에서는 복합 균주 기반 바이오필름 모델을 활용하여 6-MITC의 항바이오필름 활성에 대한 심층적 평가가 이루어져야 한다. 뿐만 아니라, 6-MITC의 임상적 활용 가능성을 높이기 위해, 구강 상피세포 및 면역세포를 이용한 세포독성 평가와 치주염 및 구강암 등의 구강질환 모델에서의 효능 검증 등을 포함한 후속 실험이 필요할 것으로 판단된다.

5. 결론

본 실험에서는 와사비(*Eutrema japonicum*) 유래 활성 성분인 6-MITC의 치아우식증 및 바이오필름 형성의 주 원인균인 *S. mutans*에 대한 항균 활성과 바이오필름 형성 억제 효과를 평가하였다. *S. mutans*에 대한 6-MITC의 MIC는 0.125 mg/mL, MBC는 0.5 mg/mL로 확인되었으며, 농도 의존적인 항균 활성을 보였다. 또한, 6-MITC 0.25 mg/mL이상의 농도에서 바이오필름 형성이 통계적으로 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 상대적 억제율은 0.25 mg/mL의 농도에서는 34.47%, 0.5 mg/mL 에서 51.61%로 나타나, 6-MITC가 농도 의존적으로 *S. mutans*에 의한 바이오필름 형성을 효과적으로 억제하였음을 확인하였다. 하지만, 이는 *in vitro* 기반의 단일 균주 모델이라는 제한점을 갖기 때문에, 6-MITC의 임상적 활용을 위해서는 CHX 등 표준 항균제와의 비교, 복합 바이오필름 모델 적용 및 세포 독성 평가 등 추가 연구가 필요하다.

Author contributions

Conceptualization: KR Kim. Data curation: HR Jo. Formal analysis: HR Jo. Funding acquisition: KR Kim. Methodology: HR Jo. Supervision: KR Kim. Writing—original draft: HR Jo. Writing—review & editing: KR Kim.

References

1. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. Caries Res 2011;45(1):69-86. 10.1159/000324598.
2. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates III JR, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. PLoS Pathog 2012;8(4):e1002623. 10.1371/journal.ppat.1002623.
3. Bedoya-Correa CM, Rincón-Rodríguez RJ, Parada-Sanchez MT. Acidogenic and aciduric properties of *Streptococcus mutans* serotype c according to its genomic variability. Eur J Oral Sci 2021;129(6):e12824. 10.1111/eos.12824.
4. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. Trends Microbiol 2018;26(3):229-242. 10.1016/j.tim.2017.09.008.
5. James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. Cochrane Database Syst Rev 2017;3(3):CD008676. 10.1002/14651858.CD008676.pub2.
6. Tartaglia GM, Tadakamadla SK, Connelly ST, Sforza C, Martín C. Adverse events associated with home use of mouthrinses: a systematic review. Ther Adv Drug Saf 2019;10:2042098619854881. 10.1177/2042098619854881.
7. Mishra R, Panda AK, De Mandal S, Shakeel M, Bisht SS, Khan J. Natural anti-biofilm agents: strategies to control biofilm-forming pathogens. Front Microbiol 2020;11:566325. 10.3389/fmicb.2020.566325.
8. Lu L, Hu W, Tian Z, Yuan D, Yi G, Zhou Y, et al. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. Chin Med 2019;14:11. 10.1186/s13020-019-0232-2.
9. Kim HE, Kim YS. Inhibitory effects of cinnamon, clove and lemongrass essential oils against biofilm formation by food poisoning bacteria. J. Food Hyg. Saf. 2021;36(5):430-439. 10.13103/JFHS.2021.36.5.430.
10. Ono H, Tesaki S, Tanabe S, Watanabe M. 6-Methylsulfinylhexyl isothiocyanate and its homologues as food-originated compounds with antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Biosci Biotechnol Biochem 1998;62(2):363-365. 10.1271/bbb.62.363.
11. Bartkowiak-Wieczorek J, Malesza M, Malesza I, Hadada T, Winkler-Galicki J, Grzelak T, et al. Methylsulfinyl hexyl isothiocyanate (6-MSITC) from wasabi is a promising candidate for the treatment of cancer, Alzheimer's disease, and obesity. Nutrients 2024;16(15):2509. 10.3390/nu16152509.
12. Uto T, Hou DX, Morinaga O, Shoyama Y. Molecular mechanisms underlying anti-inflammatory actions of 6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate derived from wasabi (*Wasabia japonica*). Adv Pharmacol Sci 2012;2012:614046. 10.1155/2012/614046.
13. Akitomo T, Kaneki A, Ogawa M, Ito Y, Hamaguchi S, Ikeda S, et al. Inhibitory effect of allyl Isothiocyanate on cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Int J Mol Sci 2025; 26(15):7443. 10.3390/ijms26157443.

14. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc 2008;3(2):163-175. 10.1038/nprot.2007.521.
15. Kim HE, Liu Y, Dhall A, Bawazir M, Koo H, Hwang G. Synergism of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* reinforces biofilm maturation and acidogenicity in saliva: an in vitro study. Front Cell Infect Microbiol 2021;10:623980. 10.3389/fcimb.2020.623980.
16. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. BMC Oral Health 2006;6(Suppl 1) 1:S14. 10.1186/1472-6831-6-S1-S14.
17. Truong TQ, Park YJ, Jeon JS, Choi J, Koo SY, Choi YB, et al. Myrosinase isogenes in wasabi (*Wasabia japonica* Matsum) and their putative roles in glucosinolate metabolism. BMC Plant Biol 2024;24(1):353. 10.1186/s12870-024-05057-w.
18. Dufour V, Stahl M, Baysse C. The antibacterial properties of isothiocyanates. Microbiology (Reading) 2015;161(2):229-243. 10.1099/mic.0.082362-0.
19. Lu Z, Dockery CR, Crosby M, Chavarria K, Patterson B, Giedd M. Antibacterial activities of wasabi against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. Front Microbiol 2016;7:1403. 10.3389/fmicb.2016.01403.
20. Shin IS, Masuda H, Naohide K. Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. Int J Food Microbiol 2004;94(3):255-261. 10.1016/s0168-1605(03)00297-6.
21. Abouassi T, Hannig C, Mahncke K, Karygianni L, Wolkewitz M, Hellwig E, *et al.* Does human saliva decrease the antimicrobial activity of chlorhexidine against oral bacteria? BMC Res Notes 2014;7:711. 10.1186/1756-0500-7-711.