

GD, GSo1 및 GDA에 의한
*Candida albicans*의 성장 억제 효과

연세대학교 대학원

치 의 학 과

염 미 정

GD, GSo1 및 GDA에 의한
*Candida albicans*의 성장 억제 효과

지도 김 종 열 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2000년 12월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

염 미 정

염미정의 치의학박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2000년 12월 일

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 사랑으로 세심하고 자상한 지도편달을 아끼지 않으신 김 종열 교수님과 바쁘신 중에도 많은 지도와 교열을 하여 주신 박 광균 교수님, 유 윤정 교수님, 연구과정에서 깊은 관심과 애정으로 지도하고 이끌어주신 최 봉규 교수님, 최 종훈 교수님께 심심한 감사를 드립니다. 또한 구강내과 교실원 선생님들에게도 감사의 마음을 전합니다.

그리고 따스한 사랑과 격려로 늘 함께 하여 주신 부모님들과 남편, 사랑스런 아들 정두와 딸 정원에게 한없는 사랑을 전합니다.

2000년 12월

저자 씀

목 차

도표목차	iii
국문요약	iv
 I. 서 론	 1
 II. 연구재료 및 방법	 3
1. 시료	3
2. 균주 및 배지	3
3. GD, GSol 및 GDA의 접촉시간에 따른 성장 억제효과	4
4. GD 및 GDA의 농도에 따른 성장 억제 정도 측정	4
5. 주사전자현미경과 투과전자현미경에 의한 피검균주의 형태 관찰	4
6. 통계처리	5
 III. 연구결과	 6
1. GD, GSol 및 GDA의 <i>C. albicans</i> 에서의 성장 억제 효과	6
2. GD 및 GDA의 농도에 따른 성장억제	8
3. 주사전자현미경 및 투과전자현미경으로 관찰한 <i>C. albicans</i> 의 형태	8
 IV. 총괄 및 고찰	 11
 V. 결 론	 15
 참고문헌	 16
Abstract	24

도표목차

Table 1. Inhibitory effect of GD, GSol, and GDA on growth of <i>Candida albicans</i>	6
Figure 1. <i>Candida albicans</i> grown on SD agar plate after contact to reagent with 120 minutes	7
Figure 2. Time dependent inhibitory effect of GD on growth of <i>Candida albicans</i>	7
Figure 3. Dose dependent inhibitory effect of GD and GDA	8
Figure 4. Scanning electrophotomicrograph of <i>Candida albicans</i>	9
Figure 5. Transmission electrophotomicrograph of <i>Candida albicans</i>	10
Figure 6. Transmission electrophotomicrograph of <i>Candida albicans</i>	10

국문요약

GD, GSol 및 GDA에 의한 *Candida albicans*의 성장 억제 효과

*Candida albicans*는 정상인의 구강, 위장관 및 질에서 정상균주의 하나로 존재하는 난원형의 출아성 효모양 단세포로 다형성의 기회감염균이다. 이는 숙주의 면역이 저하되거나 항생제 남용등으로 정상 미생물총의 현격한 변화 발생시 칸디다증을 유발한다. 칸디다증의 치료에는 nystatine, chlorhexidine, amphotericine B, clotrimazole, ketoconazole, miconazole, gentian violet이 추천되어 왔다. 이들은 모두 화학합성제제로 간기능 억제, 신독성, 오심, 구토, 설사, 혈액질환, 발진, 가려움증, 신경계 이상등 여러 문제점들이 보고되고 있다. 표재성 칸디다증에서 가장 보편적으로 사용중인 nystatine은 쓰고 역겨운 맛으로 인해 환자들이 사용하기 힘들어 하며 chlorhexidine은 미각 변화, 치아 착색등의 부작용이 보고되고 있다.

키토산은 키틴을 탈아세틸화하여 얻게되는 동물성 식이섬유의 일종인 다당류로 지구상에서 미이용자원으로서 셀룰로오스 다음으로 많이 생산되고 있으며 광범위한 미생물에서의 항균작용, 콜레스테롤 조절작용, 고혈압 조절작용, 항암작용등 여러 가지 생의학적 기능이 보고되고 있다. 미역이나 다시마등 해조류의 20 - 30%를 차지하는 점액성의 섬유질인 알긴산은 동맥 경화 예방, 혈압강화, 변비 해소, 몸안의 중금속 제거, 위장 기능 강화, 노화 억제 및 항균작용등 높은 생리활성이 보고되고 있다.

이에 본 연구에서는 천연물질인 키토산 유도체 GD, 알긴산 유도체 GSol, GD와 GSol의 중합체 GDA에 의한 *Candida albicans* KCTC7752에서의 성장억제 효과를 알아보고자 배양후 집락수를 관찰한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. GD 0.1%의 경우 5분, 30분, 120분 모두에서 GSol, GDA보다 *C. albicans*에 대한 높은 성장억제효과를 보였다.

2. GDA 0.1%에서는 5분 접촉에서 균감소율이 미미하였으나 30분, 120분에서는 *C. albicans*의 성장을 효과적으로 억제하였다.

3. GSol 0.1%는 30분 접촉에서만 *C. albicans*에 대한 성장억제효과를 나타내었다.

4. 성장억제효과가 높게 나타난 GD 및 GDA에서 희석농도에 따른 효과를 관찰한 바 GD에서는 0.001%에서 GDA에서는 0.01%에서 성장억제가 나타나기 시작하였다.

5. GD용액으로 처리한 *C. albicans*의 주사전자현미경 사진에서 분아포자의 크기 감소, 발아관의 소실, 세포와해물이 관찰되었고 투과전자현미경 사진에서는 세포벽외형의 불규칙화, 세포내 구조물의 열화, 공포발생이 관찰되었다.

이상의 결과를 종합해 볼때 키토산, 알긴산 추출물인 GD, GDA등이 *Candida albicans*에 대한 성장억제 효과등 항진균효과가 높게 나타나므로, 향후 생체 적용에 대한 안정성 검사를 거쳐 임상적으로 구강양치액, 질세정액, 외치소독제로 개발할 가치가 있다고 사료된다.

핵심되는 말 : GD, GDA, *Candida albicans*, 항진균력

GD, GSol 및 GDA에 의한 *Candida albicans*의 성장 억제 효과

(지도 김 종 열 교수)

연세대학교 대학원 치의학과

염 미 정

I. 서 론

*Candida albicans*는 가장 흔한 진균성 병원체로,⁴⁹⁾ 무성으로 단세포성으로 성장하며¹⁴⁾ 여러 *Candida*종 중에서 가장 독성이 강하다⁶⁾. 정상성인의 약 50%와³⁴⁾ 후천성 면역 결핍증 환자의 약 70%의¹⁷⁾ 구강, 소화관 및 질에서 정상 균총의 일부로 존재하며 모든 조직에서 기회감염을 일으킬 수 있다⁴¹⁾.

*C. albicans*에 의한 칸디다증은 임상적으로 표재성 칸디다증과 전신 칸디다증으로 나뉜다. 표재성 칸디다증은 국소에서의 칸디다의 증가나 피부 상피의 손상으로 효모나 가균사가 침입하여 발생한다. 이에는 구강 칸디다증, 칸디다 외음질염, 칸디다 간찰진 등이 있다. 전신 칸디다증은 칸디다의 혈액 순환내로의 침입과 식균 세포의 숙주방어가 부족하여 성장을 막지 못하고 효모가 파종될 때 일어나며 칸디다성 심내막염, 파종성 칸디다증등이 있다^{75,76)}. 구강 칸디다증에는 위막성 칸디다증¹⁸⁾, 위축성 칸디다증, 증식성 칸디다증이 있으며 자각 증상으로는 작열통, 압박감, 입맛의 변화, 자극성 음식 섭취시 불편감, 연하곤란¹⁷⁾등이 있다. 또한 최근에는 치아우식증²⁹⁾, 치근우식증⁶²⁾, 치주염, 급성 치주 농양⁵⁶⁾에서까지 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다. 구강 점막에서의 군집화는 흡입성 폐렴이나 위장관계 감염과 같은 파종성 감염의 저장소 역할¹⁶⁾을 하여 신체 전반에서 문제를 일으킬수 있다. 위장관과 성노기관의 감염시 소화불량, 심통, 나팔관염, 항문작열감, 질염, 천

식, 두통, 불안, 혼미, 기억력 저하등 정신적 문제까지 야기한다고 보고하고 있다⁵⁰⁾.

칸디다증의 치료에는 nystatine, chlorhexidine, amphotericine B⁶⁵⁾, miconazole⁶⁹⁾, clotrimazole, ketoconazole, gentian violet이 추천되어 왔다^{14,48)}. 그러나 Catalin등²⁰⁾과 Cauwenbergh등²¹⁾은 amphotericine B, Ketoconazole, Miconazole, Fluconazole에서의 간기능 억제¹⁷⁾를 보고 하였으며 Antoniskis등⁵⁾은 Amphotericine B의 신독성을 보고하였다. 표재성 칸디다증에서 가장 보편적으로 사용중인 nystatine은 쓰고 역겨운 맛으로 인해 환자들이 사용하기 힘들어 하며³¹⁾ chlorhexidine은 미각 변화⁴⁵⁾, 치아 착색²²⁾등의 문제점이 보고되고 있어 부작용없이 환자가 쉽게 사용할수 있는 항진균제의 개발이 필요하다.

키토산은 새우, 게등 갑각류 및 연체류의 껍질과 곤충류, 버섯류 및 사상균의 세포벽에 함유되어 있는 키틴의 탈아세틸화로 얻어진다.⁹⁾ 안정성은 식품에서 소금이나 설탕에 준한다고 하였다⁷²⁾. Nishimura등은 면역 글로불린의 증강을 보고하였고⁵⁸⁾ Cuero는 광범위한 미생물에서의 항균작용을²⁶⁾ Suzuki는 콜레스테롤 조절작용, 고혈압 조절작용, 항암작용⁶⁸⁾ 등 다양한 생리활성을 보고하고 있다. 그러나 기존의 키토산은 체내 흡수율이 크게 떨어지는 문제점이 지적되고 있고 키토산 올리고당은 체내 흡수율에서는 유리하나 항균력이 저하되는 것이 문제점으로 지적되어 왔다. 이에 이러한 문제점들을 해결하려 새로이 개발한 용액이 GD다.

알긴산은 미역이나 다시마 등의 20 - 30%를 차지하는 섬유질 성분³⁹⁾으로 칼륨, 나트륨, 칼슘과 결합하여 존재하고 있다. Yamori등은 동맥 경화 예방과 혈압강하를 보고하였으며⁴²⁾, Aminina등은 변비 해소, 몸안의 중금속 제거, 위장 기능강화, 노화 억제등⁶⁰⁾을 보고하였다. 그외에도 항균작용^{3,63)}, 항암작용³³⁾등 높은 생리활성이 보고되고 있으며 재생피화의 촉진^{1,35)}으로 피부이식술후의 처치에서 응용^{13,61)}이 시도되고 있다. 또한 경제성이 뛰어나 고부가 가치 제재로 떠오르고 있어, 이를 주원료로 하여 개발된 용액이 GSol이며 GD와 GSol의 중합체가 GDA다.

이에 본 논문에서는 진균 감염증 가장 흔하게 나타나는 칸디다증의 원인균인 *C. albicans*와 천연물질에서 추출된 GD, GSol 및 GDA와의 관계를 살펴 *C. albicans*에서의 성장억제정도를 알아보고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 시료

다음과 같이 세가지 용액을 사용하였다.

1) GD

키토산 유도체로 분자량은 2 kDa - 30 kDa이며 산도는 5.5 - 5.8의 물질이었다.

2) GSol

알긴산 유도체로 분자량은 5 kDa - 15 kDa이며 산도는 6.0 - 6.5의 물질이었다.

3) GDA

1)과 2)의 중합체로 분자량이 6 kDa - 40 kDa이며 산도 5.5 - 5.8의 물질이었다.

2. 균주 및 배지

피검균은 인체 병원성 효모로 *Candida albicans* KCTC7752를 사용하였다.

동결 상태로 보관된 균주를 SD (Sabouraud dextrose broth, DIFCO, Detroit, Michigan, USA) 한천배지에 접종하여 배양한 대수증식기에 있는 균주를 SD 액체 배지에 현탁하여 사용하였다.

3. GD, GSol 및 GDA의 접촉시간에 따른 성장 억제효과

1.5 ml의 microfuge tube에 800 μ l의 SD 액체배지, 대수증식기에 있는 균액 100 μ l 및 GD, GSol, 또는 GDA 100 μ l를 순서대로 넣어 0.1%로 맞춘 후, 임상에서의 사용시 약제사용의 제한점을 찾아보고자 5분, 30분, 120분동안 실온에 방치하였다. 대조군으로 인산완충액을 사용하였다.

피검균액을 10배로 단계희석하여 50 μ l를 SD 한천배지에 접종한 후 37℃에서 2일간 배양한 후 형성된 집락수(Colony Forming Unit)를 세어 균 감소율을 알아보았다. 균 감소율은 “ (키토산 미처리 균액 1mL의 배양 후 균수 - 키토산 처리 균액 1mL의 배양후 균수) / 키토산 미처리 균액 1mL 중의 배양 후 균수 ”를 백분율 (%) 로 표시하였다.

4. GD및 GDA의 농도에 따른 성장 억제 정도 측정

GD 및 GDA의 최종농도가 0.1%, 0.05%, 0.02%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%가 되도록 한 후 피검균과의 접촉시간을 120분으로 하였다. 피검균액을 10배로 단계희석하여 SD 한천배지에 접종하고 37℃에서 2일간 배양한 후 형성된 집락수를 세었다.

5. 주사전자현미경과 투과전자현미경에 의한 피검균주의 형태 관찰

GD 0.1%에 5분간 접촉시킨 피검균의 형태 변화를 주사전자현미경 및 투과전자현미경으로 관찰하였다.

30분간 GD 1%에 처리한 균과 대조군에서 *C. albicans*의 형태 변화를 관찰하기 위하여 시료를 0.1 M cacodylate buffer 완충액(pH 7.4)으로 조정된 Karnovsky

고정액(2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.5% CaCl_2)으로 6시간 이상 전 고정된 후 0.1 M cacodylate buffer로 2시간 수세후 1.33% OsO_4 로 2시간 후고정한다. 후고정된 시료는 0.1 M cacodylate로 10분간 수세후 저농도 alcohol에서 무수 alcohol까지 탈수(50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100%순)한후 propylene oxide에 10분간 치환한다. 이어서 EPON mixture (EPON 812, MNA, DDSA, DMP30)와 propylene oxide를 1:1로 혼합하여 약 18시간 정도 포매(EM OVEN에서 35℃ 6시간, 45℃ 12시간, 60℃ 24시간)한다. EM OVEN에서 꺼낸 시료를 1 μm 두께로 절편을 만들어서 1% toluidine blue로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 다음 전자 현미경으로 관찰하고자 하는 부위를 정하여 50nm정도의 두께로 자른다. 이를 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색을 한 후 투과전자현미경으로 관찰하였다. 같은 방법으로 시료를 고정, 수세, 후고정, 탈수시킨 후 isoamylacetate로 치환한 후 약 6시간 후에 임계점 건조 (CDP - critical point dry) 한 다음 ion coater (Eiko IB-3형)를 이용하여 300Å 두께로 금박처리한 후 주사전자현미경으로 세포의 내부 구조를 관찰하였다.

6. 통계처리

세가지 시료의 접촉시간별 집락형성수를 이용하여 군 감소율을 구하였으며 이 결과자료를 Statistical Packages for Social Science (SPSS)⁷⁴⁾를 이용하여 Kruskal-Wallis 검정과 Duncan 검정을 실시하였다.

III. 연구결과

1. GD, GSol 및 GDA의 *C. albicans*에서의 성장 억제 효과

각 용액의 최종농도를 0.1%로 하여 각각 *C. albicans*와 5분, 30분, 120분간 접촉시켜 배양한 후 집락수를 세어 각 물질에 의한 균 감소율을 구하였다. 각 실험 군간의 결과를 비교하기 위하여 Kruskal-Wallis 검정과 Duncan 검정에서 GD 0.1%는 5분, 30분, 120분의 접촉시간 모두에서 GSol, GDA보다 높은 항진균 효과를 나타내었다. GDA 0.1%에서는 5분 접촉에서 균감소율이 미미하였으나 30분, 120분에서는 *C. albicans*의 성장을 효과적으로 억제하였다. GSol 0.1%는 30분 접촉에서만 효과적인 성장억제를 나타내었다.(Tab. 1)

Table 1. Inhibitory effect of GD, GSol and GDA on growth of *C. albicans*

Reagent (0.1%)	n	Exposure Time (minutes)	Mean of Inhibition rate (%) Mean $\pm$ standard deviation
GD	8	5	94.0 $\pm$ 2.1
	8	30	99.5 $\pm$ 0.3
	8	120	99.8 $\pm$ 0.2
GSol	8	5	4.0 $\pm$ 6.7 *
	8	30	90.0 $\pm$ 1.5 *
	8	120	15.4 $\pm$ 8.6 *
GDA	8	5	6.0 $\pm$ 4.3 *
	8	30	90.1 $\pm$ 1.4 *
	8	120	91.3 $\pm$ 0.6 *

* : Significant difference($p < 0.05$)

GD 0.1%, GDA 0.1%, GSol 0.1% 처리군과 대조군의 회석배양에서 용액간의 뚜렷한 항균력의 차이를 관찰할 수 있었으며 (Fig. 1) GD 0.1%의 *C. albicans*에 대한 성장억제는 30분, 120분 접촉에서 매우 크게 나타났다(Fig. 2).

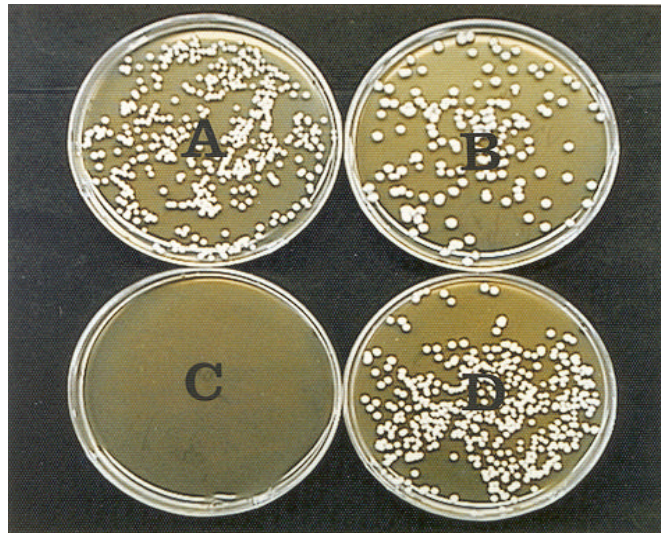


Figure 1. *C. albicans* grown on SD agar plates after contact to reagent with 120 minutes

(A : GSol 0.1%, B : GDA 0.1%, C : GD 0.1%, D : PBS)



Figure 2. Time dependent inhibitory effect of GD 0.1% on growth of *C. albicans*

(A : 5 minutes, B : 30 minutes, C : 120 minutes)

2. GD 및 GDA의 농도에 따른 성장억제

성장억제효과가 높게 나타난 GD 및 GDA에서 희석농도에 따른 효과를 관찰한바 GD에서는 0.001%에서 GDA에서는 0.01%에서 성장억제가 나타나기 시작하였다.

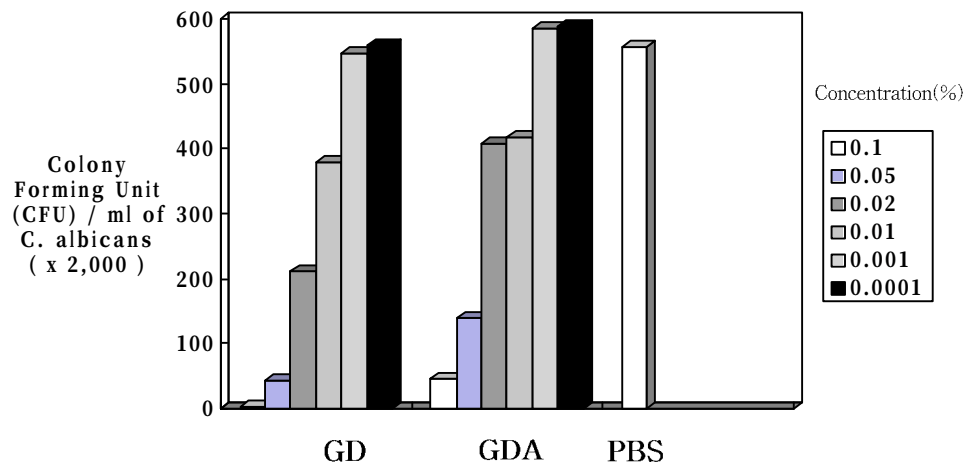
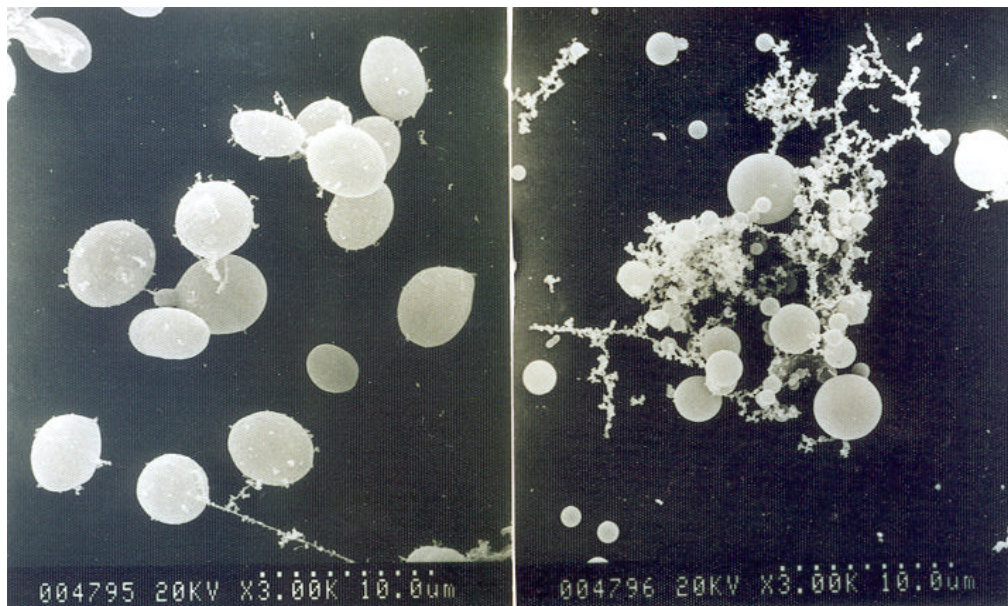


Figure 3. Dose dependent inhibitory effect of GD and GDA

3. 주사전자현미경 및 투과전자현미경으로 관찰한 *C. albicans*의 형태

주사전자현미경을 통한 관찰에서 분아포자의 수적감소와 함께 크기가 많이 줄어들어 있었으며 주변에는 세포가 와해되면서 흘러나온듯한 물질이 관찰되었고 상피표면의 부착에 가교역할을 하는 발아관이 소실됨을 관찰할수 있었다(Fig. 4).



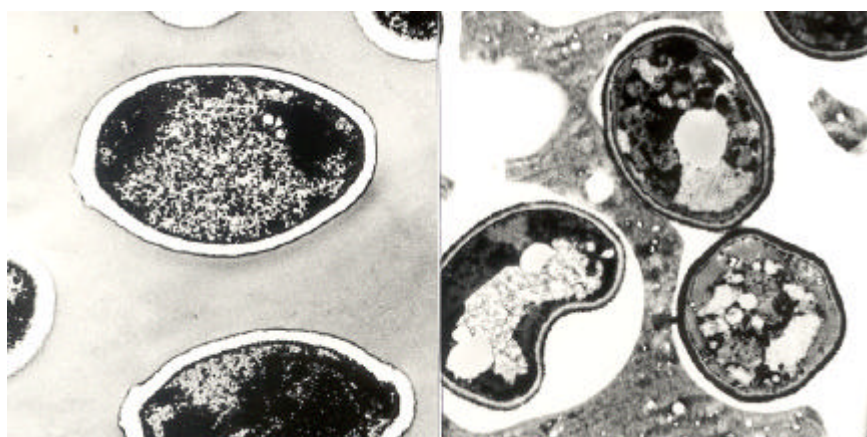
A

B

Figure 4. : Scanning electrophotomicrograph of *C. albicans*

(A : normal cells, B : cells after contact to GD 0.1%
with 5 minutes, x 31,000)

투과전자현미경을 통한 균체의 내부 구조를 관찰한 바, 세포벽의 불규칙한 변화와 세포내 성분들의 열화, 공포형성을 관찰할수 있었다(Fig. 5 및 Fig. 6).

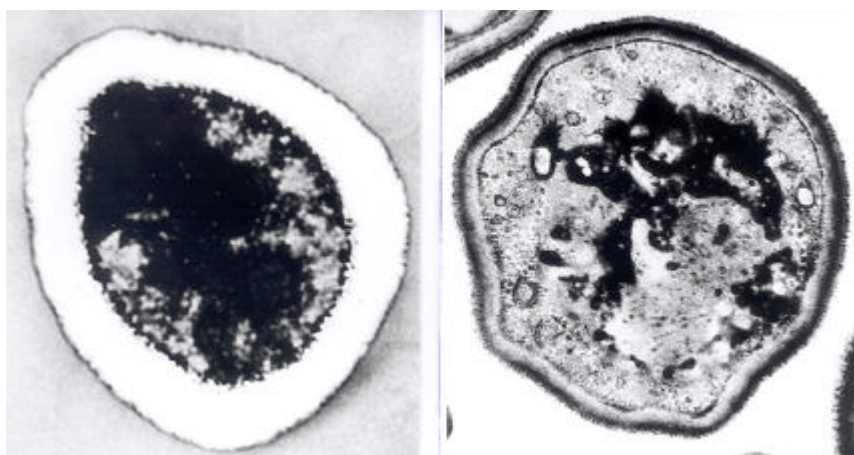


A

B

Figure 5 : Transmission electrophotomicrograph of *C. albicans*

(A : normal cells, B : cells after contact to GD 0.1% with
5 minutes, x 7,800)



A

B

Figure 6 : Transmission electrophotomicrograph of *C. albicans*

(A : normal cells, B : cells after contact to GD 0.1% with
5 minutes, x 31,000)

IV. 총괄 및 고찰

키토산은 키틴을 부분적으로 탈아세틸화하여 얻어지는 다양이온의 뮤코다당류(mucopolysaccharides)로 생물학적으로 매우 안정적이며^{2,43)} 연간 70 - 100억톤 정도로 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 많이 생산되고 있다⁷⁰⁾. 옛부터 폐수처리용 응집제, 중금속 흡착제로 활용되어 왔으며¹⁹⁾ 최근 여러 가지 생리활성이 보고되고 있다. 키틴과 키토산의 기본구조인 글루코사민은 우유, 계란, 효모와 같은 식품에 대량으로 존재하는 천연 아미노당으로서 뮤코다당류, 뮤코단백질(mucoprotein), 뮤코지질(mucolipid)의 구성성분으로 매우 안전한 물질이다^{19,44)}. 생체친화성이 우수하여 인공피부로 개발된 키틴 부직포는 이미 많은 임상적 이용이 진행되고 있으며 수술용 봉합사등에서도 제한적으로 이용되어 왔다. Kitamura등은 키틴 유도체인 0.25% 카르복시메틸키틴 나트륨염(sodium carboxylate salt)수용액이 마우스, 토끼 및 물모트에서 급성독성, 변이원성, 피부일차자극성, 피부누적 자극성, 안구점막 일차 자극성, 광독성, 경피감작성 및 광감작성등과 사람의 피부에 대한 패치 시험에서 아무런 문제가 없었다고 보고하였다⁴⁷⁾. 이외 여러 논문에서 그 안정성에 대한 보고가 되고 있다. 또한 장기복용시의 문제발생에 관한 연구에서도 아무런 이상 증상이 발견되지 않았으며, 체내에서 중금속이나 방사선 물질의 제거에도 시도되고 있다⁷¹⁾. 키토산은 동물 실험에서 장기투여시 체중감소와 장관내 유산균 감소가 보고되기는 하였으나⁴⁷⁾ 급성 독성이 없고 부작용이 없으며 LD₅₀을 측정할 수 없는 것으로 밝혀 졌다.⁷²⁾ 또한 구강내 연조직 재생을 자극하며^{11,52)} 구강겔에 혼합시 겔의 부착시간을 늘리고 약물배출 시간을 늘리는 것으로 보고되었다⁴³⁾. 동물실험을 통하여 대량 투여의 위험량을 인간에서 환산해보면, 하루 200 g 이상에 해당되어 실질적으로 우리가 섭취하는 양은 하루 0.5 - 1 g 인 것을 간주해 볼 때 대략 200 - 400 배에 달하여 이 정도의 양은 동물에 장기간 섭취시켜도 치명적으로 부작용이 나타나지 않는 것으로 보아 매우 안전한 천연 물질로 소금이나 설탕과 동일한 범주라 하겠다⁷²⁾. 이렇게 여러 가지 다양하고 강력한 능력에도 불구하고

고 독성이 거의 없어 현재 식품분야에서까지 적용을 시도하고 있다⁷¹⁾. 또한 키토산과 그 유도체는 치아우식증 억제 기능⁵⁴⁾과 *Streptococcus mutans*⁵⁷⁾를 비롯한 *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*등 여러 병원체에서의 항균 작용이 보고^{10,57,73)}되고 있으며 구강내 연조직의 재생 자극^{52,53)}, 세포독성 대식세포의 활성화⁵⁸⁾, 혈행성 항체의 생산자극^{8,9)}등도 보고되었다.

미역이나 다시마등에서 추출되는 알긴산은 섬유질 성분³⁹⁾으로 D - mannuronic acid와 L - guluronic acid로 이루어져 있으며 칼륨, 나트륨, 칼슘과 결합하여 존재하고 있다^{27,38)}. 현재 약물로써도 이용되고 있는데 소화관에서 방어막을 형성하여 위산과 섞여있는 음식물이 위벽이나 식도에 접촉하는 것을 막아준다. 흔히 제산제와 함께 쓰여 위와 식도에서 위산의 자극으로 인한 통증감소에 이용되고 있으며 아직까지 약물로써 알려진 부작용은 없으며 고분자 약물의 복용시 키토산과 함께 약물의 배출조절에 시도중이다.⁶⁶⁾ 또한 빠른 육아조직 형성과 재생피화를 유도한다고 보고되고 있다^{13,35)}.

*C. albicans*는 정상인의 구강, 위장관 및 질에서 정상균주의 하나로^{34,59)} 존재하는 난원형의 무성의 출아성 효모양 단세포로¹¹⁾ 다형성의 기회감염균이며 분아포자기에서 균사기로 전환할수 있고^{7,29,76)} 이로 인해 침투성이 커지며 균사기로의 성장을 나타내는 발아관은^{28,64)} 특히 많은수의 *C. albicans*가 상피 표면에 부착하는데 있어 중요한 가교 역할⁵⁵⁾을 한다.

*C. albicans*의 세포벽은 키틴(chitin), 베타글루칸(β -glucan), 인산화 단당성 단백질(phosphorylated mannoprotein), 푸지코트(fuzzy coat)등으로 구성되어 있다^{25,34)}. 이들은 조직내로의 침투에서 중요한 역할을 담당하고 약물이 세포막내로 침투함을 억제한다¹⁸⁾.

칸디다증의 발생에서 첫 번째 단계는 *C. albicans*의 부착으로⁵⁹⁾ 이를 촉진하는 기여요소가 발아관이다⁶⁷⁾. 부착은 *C. albicans*의 농도, 산성도, 당도, 타액유출율, 상피의 방어막, 타액성 면역글로불린 등에 의해 변화하며³⁰⁾ 부착능은 분아포자일 때보다 균사기일 때 더 높다⁴⁶⁾. 부착발생시 상피 조직을 통과하여 진피층이나 결합조직까지 침범할수 있다³⁷⁾. 구강과 소화관내 박테리아에 의한 부착과 영양분에서의 경쟁이 진균의 성장과 과증을 제한한다.

구강 칸디다증의 소인으로는 항생제, 스테로이드, 구강 건조등에 의한 구강 미생물 군총의 현격한 변화, 항균성 양치액의 과도한 사용, 부적절한 구강 위생, 만성적 국소적 자극, 잘못지 않는 보철물, 전신적 면역저하²³⁾, 영양 결핍, 후천성 면역 결핍증환자^{17,41)}, 내분비 이상, 암환자에서 화학치료, 두경부 방사선 치료, 고령, 과도한 흡연, 비타민 A, 엽산 결핍⁵⁹⁾, 입원³²⁾, 스트레스⁵⁰⁾등이 있다.

의치 장착의 경우 상악 총의치 장착 환자에서 가장 잘 나타나며 특히 여성에서 더 활발하고²⁴⁾ 80% 이상이 구각구순염을 동반¹⁵⁾한다. 밤에도 의치를 장착한 경우에는 낮에만 장착하는 경우보다 *C. albicans*의 집락수는 10배로 증가한다⁶⁹⁾. 의치 균막(denture plaque)에는 *C. albicans*가 특히 많으며⁴⁰⁾ 이는 구강 칸디다증 뿐 아니라 구각 구순염, 설염, 인두와 식도의 아구창¹⁵⁾만 아니라 지대치에서의 충치, 치근충치³⁶⁾, 치주염까지 유발하며 세균막으로 인한 미생물체의 지속적인 연하, 흡입은 면역기능이 저하된 경우나 고령인 경우에서 예상치 못한 감염을 유발할수 있다⁴⁰⁾. 그외 표재성 감염으로 흔히 나타나는 칸디다 외음질염, 칸디다 간찰진등이 있다.

이렇게 구강영역뿐만아니라 전신적으로도 여러 가지 문제를 야기할수 있는 *C. albicans*의 치료에는 nystatine, chlorhexidine, amphotericine B⁶⁶⁾,miconazole⁶⁹⁾, clotrimazole, ketoconazole 및 gentian violet이 추천되어 왔다^{14,48,71)}. 그러나 간독성, 신독성, 오심, 구토, 설사, 혈액질환, 발진, 가려움증, 신경계 이상, 사용시 역겨운 쓴맛등 여러 부작용들이 보고되고 있어⁴⁾ 부작용없이 환자가 쉽게 사용할수 있는 항진균제의 개발이 필요하다.

이에 본 연구에서는 천연 물질이면서 빠른 육아조직의 형성 및 상피의 재생 자극이 기대되는 키토산과 알긴산을 이용하여 개발된 GD, GDA, GSol의 *Candida albicans*에서의 성장 억제 효과를 알아보았다.

구강내는 타액의 희석효과와 구강근육계의 자정작용등 환경의 역동성으로 인해 항진균제의 구강내 농도는 일정치 못하며 병원체는 치료제에 제한적으로 노출되며 이들 치료제의 농도는 타액으로 인해 시간이 경과할수록 희석된다^{29,51)}. 따라서 항진균제를 짧게 노출시켜 그 효과를 알아보아야 한다. 본 실험에서는 5분, 30분의 짧은 노출과 120분의 긴 접촉 시간을 주었다. 5분 접촉에서는 키토산 용액인

GD만이 높은 성장억제효과를 나타내었으며 30분 접촉에서는 세가지 용액 모두가 매우 효과적으로 *C. albicans*에서 성장억제를 보였다. 120분 접촉에서는 키토산 유도체 용액인 GD가 가장 높은 성장억제효과를 나타내었고 알긴산 유도체 용액인 GSol에서는 그 효과가 매우 미미하여 30분에서보다 오히려 진균의 증가를 볼 수 있었다. 이는 GSol의 불안정성으로 알긴산이 진균의 영양분으로 작용한 것이 아닌가 추정된다. 그리고 사용 약제에서의 항진균력 활성이 다른 것은 각 시료의 전하 밀도 차이로 인한 *C. albicans* 표면에서의 흡착력 차이와 삼투압변화의 유발 정도에 차이가 생기기 때문으로 추정된다.

주사전자현미경과 투과전자현미경에 의한 GD처리군에서의 *C. albicans*의 형태 변화는 GD의 아민기가 세포막의 당단백질에 부착함으로 인해 삼투압 차이를 유발하고 영양분 공급을 차단함으로 인해 *Candida albicans*의 성장과 복제, 생명활동이 저해된 것으로 추정된다.

본 연구는 실험실내에서의 *C. albicans*배양을 통한 실험이었으나 향후 다양한 임상적 응용을 위해서는 협점막세포, 질점막세포에서의 *C. albicans*에 대한 직접적인 성장억제능의 검증과 생체내 유입시 안정성 확인을 위한 세포 독성 검사 시행이 필요하리라 사료된다.

5분 접촉시의 결과는 구강양치액이나 질세정제로의 응용이, 30분 접촉시의 결과는 항진균용 구강 정제(oral troche)나 질정제(vaginal troche)에의 적용이 가능하리라 보며 120분 접촉의 결과는 의치 소독액이나 의치의 일시적인 이장제 등에 적용하여 의치 균막(denture plaque)에서의 효과적인 항진균을 기대할수 있어 의치 장착자에서의 칸디다증 예방과 치료에의 응용도 가능하리라 본다.

V. 결 론

본 연구에서는 키토산과 알긴산 추출물에서 얻은 GD, GSol 및 GDA를 이용하여 *C. albicans*에서의 성장억제효과를 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. GD 0.1%의 경우 5분, 30분, 120분 모두에서 GSol, GDA보다 *C. albicans*에 대한 높은 성장억제 효과를 보였다.

2. GDA 0.1%에서는 5분 접촉에서 균감소율이 미미하였으나 30분, 120분에서는 *C. albicans*의 성장을 효과적으로 억제하였다.

3. GSol 0.1%는 30분 접촉에서만 성장억제효과를 나타내었다.

4. 성장억제효과가 높게 나타난 GD, GDA에서 희석농도에 따른 효과를 관찰한 바 GD에서는 0.001%에서 GDA에서는 0.01%에서 성장억제가 나타나기 시작하였다.

5. GD용액으로 처리한 *C. albicans*의 주사전자현미경 사진에서 분아포자의 크기 감소, 발아관의 소실, 세포와해물이 관찰되었고 투과전자현미경 사진에서는 세포벽 외형의 불규칙화, 세포내 구조물의 열화, 공포 발생이 관찰되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 키토산, 알긴산 추출물인 GD, GDA등이 *Candida albicans*에 대한 성장억제 효과등 항진균 효과가 높게 나타나므로, 향후 생체 적용에 대한 안정성 검사를 거쳐 임상적으로 구강양치액, 질세정액, 의치소독제로 개발할 가치가 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Agren, M.S. : Four alginate dressings in the treatment of partial thickness wounds : a comparative experimental study. BR. J. Plast. Surg. 49: 129 - 134, 1996
2. Akbuga, J., and Bergisadi, N. : 5-Fluorouracil - loaded chitosan microspheres : preparation and release characteristics. J. microencapsul. 13(2): 161-8, 1996
3. Akiyama, H.T., and Nakakita, K. : Effect of depolymerized alginates on the growth of bifidobacteria. Biosci. Biotech. Biochem. 56: 355-356, 1992
4. Alice, R.J., Craig, B., and Wesley, G.C. : Goth's medical pharmacology. Mosby Year Book. 13th edition. 681 - 685, 1992
5. Antoniskis, D., and Larsen, R.A. : Acute rapidly progressive renal failure with simultaneous use of amphotericin B and pentamidine. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 470, 1990
6. Arendorf, T.M., and Walker, D.M. : Denture stomatitis: A review of candidosis. J. Oral Rehabil. 14: 217 - 227, 1987
7. Audrey, C. : Sur l'evolution du champignon du muguet. Res. Med. 7: 586 - 595, 1987
8. Azuma, I., Nishi, N., Nishima, K., and Tokura, S. : Immunological activity of chitin and its derivatives. 2(1): 93 - 99, 1984
9. Azuma, I., Tamura, H., and Tokura, S. : Immunological aspects of chitin and chitin derivatives administered to animals. EXS. 87: 279 - 292, 1999
10. Baba, Y., Yamashita, T., and Kawano, Y. : Antifungal activity of aqueous soluble chitosan derivatives on Fusarium and Veticillium. The Chem. Soc. of

Japan. 48 - 53, 1996

11. Biagini, G., Baldassarre, V., and Castaldini, C. : Reconstruction of periodontal tissue with chitosan. *Biomaterials*. 10: 598 - 603, 1989
12. Biagini, G., Filippini, O., Giovanetti, E., Muzzarelli, R., and Tarsi, R. : Antimicrobial properties of N - carboxybutyl chitosan. *Antimicrob. Agents Chemothe.* 34 (10): 2019 - 2023, 1990
13. Blaine, G. : Experimental observations on absorbable alginate products in surgery. *Ann. Surg.* 125: 102 - 114, 1947
14. Bradley, G., and Peggy, T.M.S. : Invasive candida albicans infections of the oral cavity in immunocompromised patients. *J. Oral Med.* 9 - 13, 1986
15. Budtz, J.E., Bergendal, T. and MacFarlane, T.W.: A combined clinical, mycological and histological study of denture stomatitis. *Acta. Odontol. Scand.* 41: 33-44, 1983
16. Cannon, R.D., Holmes, A.R., Mason, A.B. and Monk, B.C. : Oral candida: clearance, locarization, or candidiasis ? *J. of Den. Res.* 74: 1152 - 1161, 1995
17. Callender, D. Chiou, C.C., and Gonzalez, C.E. : Esophageal candidiasis in pediatric acquired immunodeficiency syndrome: clinical manifestation and risk factors. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19(8): 729-34, 2000
18. Cassone, A. : Cell wall of pathogenic yeasts and implications for antimycotic therapy, *Drugs Exp. Cli. Res.*, 12 (7): 635 - 636, 1986
19. Castelianos, P.N., Maldanando, V.G., and Fernansez, V.G. : Chitin and chitosan. *Elsevier Applied Science*. 567 - 576, 1988
20. Catalin, J., Durand, A., Lacarelle, B., and Rajaonarison, J.F. : Comparative effects of antifungal agents on zidovudine glucuronidation by human liver microsomes. *Br. J. Clin. Pharmnacol.* 40(1): 83-6, 1995

21. Cauwenbergh, G., De Beule, K., Dhondt, A., Dhondt, F., and Ninane, J. : Oral candidosis: treatment with absorbable and non - absorbable antifungal agents in children. *Mycoses*. 35(1): 1 - 8, 1992
22. Charbonneau, D.L., and Snider, A.G. : Reduced chlorhexidine tooth stain coverage by sequential administration of monoperoxyphthalic acid in the beagle dog. *J. Dent. Res.* 76(9): 1596 - 1601, 1997
23. Chandraseelcar, M.D., John, A.M., and Pranatharthi, H. : Oral candidosis : Forerunner of acquired immunodeficiency syndrome ?. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 60: 532 - 534, 1985
24. Chew, C.L., and Jeganathan, S. : Denture stomatitis - A review of the aetiology, diagnosis and management. *Australian Dental Journal.* 37 (2): 107 - 114, 1992
25. Clerc, M.F., and Horisberger, M. : Ultrastructural localization of anionic sites on the surface of yeast, hyphal and germ - tube forming cells of *candida albicans*. *Eur. J. cell Biol.* 46(3): 444 - 452, 1988
26. Cuero, R.G. : Antimicrobial action of exogenous chitosan. *EXS.* 87: 315 - 333, 1999
27. Drummond, D.W., Hirst, E.L., and Percival, E. : The constitution of alginic acid. *J. of Chem. Society.* 1208 - 1216, 1962
28. Ellepola, A.N., and Samaranuyake, L.P. : The effect of brief exposure to sub-therapeutic concentration of chlorhexidine gluconate on the germ tube formation of oral *candida albicans* and its relationship to post - antifungal effect. *Oral Dis.* 6(3): 166 - 171, 2000
29. Ellepola, M., and Samaranayake L.P. : The effect of limited exposure to antifungal agents on the germ tube formation of oral *candida albicans*, *J. Oral Pathol. Med.* 27: 213 - 219, 1998

30. Epstein, J.B., Pearsall, N.N., and Truelove, E.L. : Oral candidiasis: effects of antifungal therapy and upon clinical signs and symptoms, salivary antibody and mucosal adherence of *Candida albicans*. *Oral Surg.* 51(1): 32 - 36, 1981
31. Farrelly P.J., Hardy P., and Martin M.V. : An investigation of the efficacy of nystatine for the treatment of chronic atrophic candidosis. *British. Dental Journal.* 160: 201- 204, 1986
32. Erkki, O. : Factors predisposing to oral yeast infections. *Acta.Odontol. Scand.* 48: 71 -74, 1990
33. Fujihara, M., and Nagumo, T. : The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity. *Carbohydr. Res.* 224: 343-7, 1992
34. Gail, H.C., Jerry, R.M., and Suzanne, M.M. : *Dental microbiology.* 1st edi. HARPER & ROW, 491, 660, 795 - 796, 804, 848 - 849. 1982.
35. Gilchrist, T., and Martin. A.M. : Wound treatment with Sorbsan - an alginate fibre dressing. *Biomater.* 4: 317 - 320, 1983
36. Hagihara. Y., and Ka, H. : Degradation of human dentine collagenolytic enzyme produced by the yeast *candida albicans*. *Oral Biology.* 33: 617 - 619, 1988
37. Hagihara, Y., and Kaminishi, H. : Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. *Infection and Immunology.* 53: 312 - 316, 1986
38. Haug, A., and Larsen, B. : Biosynthesis of alginate. Epimerisation of D-mannuronic to L-guluronic acid residues in the polymer chain. *Biochem. Biophys. Acta.* 192(3): 557-9, 1969
39. Haug, A., and Lagen, B. and Smidsrod, O : A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta. Chemica. Scandinavica.* 20: 183 - 190, 1966

40. Hiroki, N., Taico, H. and Takahara, Y. : Denture plaque - past and recent concerns. *Journal of Dentistry*. 26(4): 299 - 304, 1998
41. Holmstrup, P., and Samaranayake, L.P. : Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *J. Oral Pathol. Med.* 18: 554 - 564, 1989
42. Horie, R., Ikeda, K., Nara, Y., and Yamori, Y. : Dietary prevention of stroke and its mechanics in stroke-produced spontaneously hypertensive rats - prevention effect of dietary and palmitoleic acid. *J. Hypertens. Suppl*, 4(3): 449-52, 1986
43. Ikinici, G., Kas, S., and Senel, S. : Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int. J. Pharm.* 193(2): 197 - 203, 2000
44. Jeon, Y. J., and Kim, S. K. : Bioactivities of chitosan oligosaccharides and their derivatives, *Proceedings of the 3rd Asia-Pacific chitin and chitosan symposium*, Keelung, Taiwan, 328-333, 1998
45. Kenrad, B. : Toxin effects from chlorhexidine gluconate : case report, *Tandlaegebladet*. 94(12): 489 - 491, 1990
46. Kimura, L.H., and Pearsall, N.N. : Relationship between germination of *Candida albicans* and adherence to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* 28: 464 - 648, 1980
47. Kitamura, Y., Minami, S., Okamoto, Y., and Tanioka S. : Effects of chitin and chitosan particles on BALB/C mice by oral and parental administration. *Biomaterials*. 18(8): 591 - 595, 1997
48. Kozinn, P.J., and Wise, G.J. : Amphotericine B as a urologic irrigant in the management of noninvasive candiduria. *J. Urol.* 128(1): 82-4, 1982
49. Lamey, P.J., Samaranayake, L.P. : Oral candidosis: Clinicopathological aspects. *Dent. Update*. 227 - 231, 1988

50. Levine, P.M., and Stephen, A. : Oxygen - Nutrition for super health. Am. J. Cli. Nutr. 1(3): 145 - 149, 1986
51. Martin, M.V. : Antifungal agents. London wright. 238 - 255, 1990
52. Matsubash, A., Minami, S., Okamoto, Y., and Shibasaki K. : Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. J. Vet. Med. Sci. 57(5): 851 - 854, 1995
53. Matsumoto, T., Mikami, T., Syzuki, S., and Watanabe, T. : Immuno enhancing effects of N-acetylchitohexaose. In advances in chitin and chitosan, proceedings from the 5th international conference on chitin and chitosan. Elsevier Applied Science, London, 96-105, 1992
54. Matsukubo, T., Sano, H., Shibasaki, K., and Takaesu, Y. : Effects of low molecular chitosan on pH changes in humal dental plaque, Bull. Tokyo Dent. Coll., 35: 33 - 39, 1994
55. Meyers, P.G., Kaye, D., Levison, M.E., and Sobel, J.D. : Adherence of Candida albicans to human vaginal and buccal epithelial cells. J. Infect. Dis. 143: 76 - 83, 1981
56. Minah, G.E., and Perterson, D.E. : Microbiology of acute periodontal infection in the immunosuppressed cancer patients. Journal of clinical oncology. 5: 1461 - 1468, 1987
57. Muzzarelli, R.A.A., Pruzzo, C., and Tarsi, R. : Effect of low - molecular - weight chitosan on the adhesive properties of oral streptococci. Oral Microbiol. Immunol. 13: 217 - 224, 1998
58. Nishimura, K., Nishimura, S., Saikin, I., and Tokura, S. : Immunological activity of chitin and its derivatives. Vaccine. 2(1): 93-99, 1984

59. Odds, F.C. : *Candida and candidosis*. 2nd ed. 93 – 104, Bailliere Tindall, 1988
60. Podkorytova, A.V., and Aminina, N.M.: Functional properties of alginates and their use in therapeutic prophylactic nutrition. *Vopr. Pitan.* 3: 26-9, 1998
61. Porter, J. M. : A comparative investigation of re-epithelialization split skin graft donor areas after application of hydrocolloid and alginate dressings. *Br. J. Plast. Surg.* 44: 333 – 337, 1991
62. Ram, T.E., and Slots, J. : *Candida* biotypes in the severe adults periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*. 6: 191 – 192, 1991
63. Rehm, B.H., and Valla, S. : Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48(3): 281-8, 1997
64. Richardson, M.D. : Production of germ tubes by virulent and attenuated strains of *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.*, 144: 565 – 569, 1981
65. Seeling, M.S. and Koznin, P.J. : *Clinical manifestations and management of candidosis in the compromised host*. John Wiley and Sons. 1st ed. 49 – 92, 1982
66. Sezer, A.D. : Release characteristics of chitosan treated alginate beads : I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads. *J. Microencapsul.* 16(2): 195-203, 1999
67. Shepherd, M.G. : *Biology of Candida species: Oral candidosis*, London wright, 10 – 20, 1970
68. Suzuki, S. : Studies on biological effects of water soluble lower homologous oligosaccharides of chitin and chitosan *Frgrance J.* 15: 61-68, 1996
69. Williamson, J.S. : Diurnal variation of *Candida albicans* count in saliva, *Aust. Dent. J.*, 17: 54 – 60, 1972

70. 김세권, 김철호, 전유진 : 키틴, 키토산 올리고당의 제조, 한국 키틴, 키토산 연구회지. 3(2): 12-21, 1999
71. 김세권, 전 유진 : 식품 및 의약품으로서 이용을 위한 키틴, 키토산의 안정성, 한국 키틴, 키토산 연구회지. 2(2): 3-14, 1999
72. 김 세권, 전유진 : 키토 올리고당의 복용시 급성 독성에 관한 연구. 한국 키틴, 키토산 연구회지. 4(1): 15-27, 1999
73. 김 중수, 이 영남, 윤 영선 : 키토산의 항세균, 항진균 효과. 한국 키틴, 키토산 연구회지. 4(1): 8-14, 1999
74. 오세열, 박혜련, 최기창 : 실무자를 위한 통계학 - SPSS/WIN의 활용. 한울출판사. 초판. 286 - 318, 1999
75. 전국외과대학 교수 : 의학 미생물학. 한우리. 21판. 708 - 709, 1999
76. 대한 병리학회 : 병리학. 고문사. 4판. 283 - 285, 2000

= Abstract =

**Inhibitory effect of GD, GSol and GDA
on growth of *Candida albicans***

Mi-jung Yeom, D.D.S., M.S.D.

*Department of Dentistry,
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Prof. **Chong-Youl Kim**, D.D.S., M.S.D., Ph.D.)

Candida albicans is a pleomorphic, opportunistic pathogen that is found in the oral cavities, gastro-intestinal tracts and vaginal areas of persons. Candidosis is the most frequent fungal infection and is caused by *C. albicans*. Nystatin, chlorhexidine, amphotericine B, clotrimazole, ketoconazole, miconazole and gentian violet are recommended for candidosis treatment. These are chemical compounds that have many problems such as hepatotoxicity, renal toxicity, nausea, vomiting, diarrhea, hematologic disease, urticaria, itching sensations and neurologic problems. Nystatin that is used frequently for superficial candidosis has a bitter taste. Chlorhexidine has side effects such as taste alteration and staining.

Chitosan is a mucopolysaccharide derived by deacetylation of chitin that is the second most plentiful natural polymer. Alginic acid is a constituent of seaweeds. Chitosan and alginic acid are evaluated as biomedical materials in a number of food and pharmaceutical industries.

The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of GD, GSol

and GDA on the growth of *C. albicans*. GD, GSol and GDA are chitosan derivatives, alginic acid derivatives and their polymer, respectively.

We analyzed the inhibitory effect of GD, GSol and GDA on the growth of *C. albicans* and the following results were obtained ;

1. GD 0.1 % showed a higher inhibitory effect on growth of *C. albicans* than GSol and GDA at the contact time of 5, 30 and 120 minutes.

2. GDA 0.1 % showed minimal growth inhibitory effect at the contact time of 5 minutes, but effectively inhibited the growth of *C. albicans* at the contact time of 30 and 120 minutes.

3. GSol 0.1 % showed inhibitory effect on the growth of *C. albicans* only at the contact time of 30 minutes.

4. We observed a dose dependent effect of GD and GDA that exhibited high inhibitory effect. Growth inhibition began at 0.001 % in GD, and 0.01 % in GDA.

5. In scanning electrophotograph *C. albicans* treated with GD revealed a decrease in size of blastospore, disappearance of the germ tube and collapsed cell material. In transmission electrophotograph *C. albicans* treated with GD revealed irregularity of cell wall, deterioration of cell organelle and vacuoles in cell.

In conclusion, GD(chitosan extracts) and GDA(alginic acid extracts) showed high inhibitory effect on the growth of *C. albicans*.

After testing the safety of GD and GDA, these solution could be used as a mouthrinse, a vaginal cleansing solution and a denture disinfectant.