Candida parapsilosis による黄色色素産生

正 古 良 夫 玉 村 富 山 口 福 光
高 田 治

日本大学歯学部 細菌学教室*

〔受付：昭和50年3月8日〕

抄録：当教室保存の *Candida parapsilosis* S₁ 株が水溶性の黄色色素を産生することを見いだしたので、本色素産生の培養条件を検討し、好気培養を要すること、培養温度は28°C よりも37°C が適していること、培地組成としては糖の種類に関係があり、sucrose, maltose が glucose よりも適していることなどがわかった。また本色素は、濾紙クロマトグラフィーを行った結果では riboflavin またはこれと近似の物質であると推定された。

Candida parapsilosis (以後 *C.p.* と略す) はヒトの口腔、気管、消化管、膣などから検出されることがあり、またときに病原性を示すことは周知のとおりである。当教室保存の本菌種数株中、S₁ 株のみに次の現象が認められた。すなわち、酵母エキス・サブロー寒天斜面で37°C、7日以上培養することによって斜面の肉薄部が緑色を帯び、また、同液状培地で振盪培養すれば48時間で培地が緑色を帯びるが、これは鉄の存在によるもので本来は黄色色素であることがわかった。

C.p. に以上のような培養性状を示す株があるという報告は文献に見当らなかったもので、この現象の究明を試み、二、三の知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 酵母エキス・糖ペプトン培地における S₁ 株の黄色色素産生

供試菌株：*C.p.* の6菌株 (S₁, A₁~A₅ 株)

使用培地：組織成分として Polypepton (大五) は1%, 糖は glucose, maltose, sucrose の3種類でそれぞれ2%および1%の2濃度、酵母エキスは0.3%とした。使用培地として、3種類の糖についての各2濃度と酵母エキスの有無とで組み

合せた12種類の液状培地を調製した。培地 pH は5.6~5.8であった。なお、培地量は20.0 ml とし振盪用L字管を用いた。

方法：菌をサブロー・ブドウ糖寒天で37°C、48時間培養し、その1白金耳を5.0ml の精製水に懸濁した菌液の1白金耳を各使用培地に移植した。これを水浴振盪培養器 (Comic MT-18, Yokoshima) で37°C、48時間培養 (1分間の振盪回数約100回) を行った後、3,000rpm、15分間遠心沈殿した。沈殿菌体については容量を測り、上清については pH メーターで pH を測定し、次いで NaOH で pH 7.4に修正してから3% FeSO₄・7H₂O 水溶液をピペットで3滴加えた。緑色を帯びたものについては比色計 (Ito's Klett-Fisher type) で530mμ フィルターによる透過率 (%) を測定した。対照として菌を移植しない培地を同様に処理した。なお、振盪培養条件、培養上清の修正 pH および硫酸第一鉄添加量は予備実験で定めた。ただし、振盪回数は綿栓がぬれない上限とした。

2. S₁ 株の産生する黄色色素の濾紙クロマトグラフィー

試料：Casamino acids technical (Difco) は1%, K₂HPO₄ は0.1%, MgSO₄・7H₂O は0.05

Production of yellow pigment by *Candida parapsilosis*.

Yoshio SCHÖBL, Tomi TAMAMURA, Fukumitsu YAMAGUCHI and Osamu TAKADA (Department of Bacteriology, Nihon University School of Dentistry, Tokyo)

* 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13 (〒101)

Jap. J. oral Biol., 17: 194-197, 1975.

%, biotin は培地に対し 0.2 $\mu\text{g}/\text{dl}$ とし, 糖は maltose および sucrose のそれぞれを 2%とした 2 種類の培地を用いた (培地 pH 5.4)。前記の 6 菌株について同様に振盪培養を行なって得た上清を大試験管に入れ, -20°C で凍結し, 次いで室温で試験管を傾斜し, その初めに滴下する 5 滴を小試験管にとって濃縮試料とした。対照には riboflavin 水溶液 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いた。

クロマトグラム用濾紙: 東洋濾紙 No. 51A (2 $\times$ 40cm)

展開溶媒: 表 2 に示した 4 種類の溶媒

方法: 展開・乾燥後, 紫外線照射で蛍光を発するスポットについて Rf 値を算出した。

成 績

1. 酵母エキス・糖ペプトン 培地における S₁ 株の黄色物質産生

A₁~A₅ 株の培養上清は対照培地と同様に pH 修正後に硫酸第一鉄溶液を加えても緑色を帯びなかったの, S₁ 株についてのみその成績を表 1 に示し, これについて以下要約する。

1) 菌収量については, 全体として酵母エキス加培地が無酵母エキス培地よりも 3 倍以上の収量を示した。

2) 終末 pH については, 糖の種類別では酵母

エキス加培地また無酵母エキス 培地のいずれの場合も糖 1%の場合が 2%の場合よりも pH が高い傾向を示した。

3) 培養上清の色については, 酵母エキス加培地において sucrose の両濃度および maltose の 1%の場合に黄色であり, 同対照培地は薄黄色であった。したがって前者では黄色色素産生が明らかに認められた。なお, 無酵母エキス培地の場合は同対照培地とほぼ同様にすべて微黄色であった。

4) pH の修正によって, 無酵母エキス培地のうちで glucose の両濃度および sucrose の 2%の場合のみ培養上清は微緑色を帯びたが, その他のすべての上清は緑変しなかった。

5) 硫酸第一鉄添加によって, 前記の微緑色を帯びたものは薄緑色になり, その他はすべて緑変した。

6) これらすべての上清の最終緑色の濃淡を比較してみた結果は次のようになる。全体としては酵母エキス加培地の場合が無酵母エキス培地の場合よりも濃かった。また, 糖の種類別では酵母エキスの有無いずれの場合でも糖濃度が 1%の場合が 2%の場合よりも濃かった。糖濃度別ではそれぞれ酵母エキス加培地の場合は sucrose>maltose>glucose の順に, 無酵母エキス培地の場合は maltose>sucrose>glucose の順に薄かった。

表 1 酵母エキス・糖ペプトン培地における S₁ 株の黄色色素産生

培地中の酵母エキスと糖の濃度				菌 収 量	終 末	培 地 色	
酵母エキス	glucose	maltose	sucrose			pH 7.4 修正	硫酸第一鉄添加
0.3%	2%	2%	2%	0.7	4.5	薄 黄	卅 (59.5)
				0.9	5.2	薄 黄	卅 (57.0)
				0.8	4.7	黄	卅 (47.2)
	1%	1%	1%	0.6	7.1	薄 黄	卅 (59.2)
				0.7	7.2	黄	卅 (44.2)
				0.6	5.2	黄	卅 (41.0)
—	2%	2%	2%	0.2	5.2	±	＋ (78.0)
				0.2	5.3	微 黄	＋ (75.2)
				0.15	6.4	±	＋ (77.0)
	1%	1%	1%	0.15	5.8	±	＋ (74.5)
				0.2	6.2	微 黄	＋ (72.1)
				0.1	6.3	微 黄	＋ (73.0)

注: ± 微緑, + 薄緑, ++ 緑, +++ 濃緑

() 内数字は緑色フィルター 530 μm による透過率(%)を示す

7) 予備実験の結果として pH 修正と第一鉄添加との順を逆にしても最終的には同じであった。また最終的に緑色化したものを pH 5.0 にすれば緑色は全く消失し, pH 7.4 にすれば再び緑色になった。

2. S₁ 株の産生する黄色物質の濾紙クロマトグラフィー

1) 培養上清の色は S₁ 株の場合は薄黄色であり, A₁~A₅ 株の場合および対照培地では無色であった, 凍結状態では S₁ 株上清の場合のみ表層が濃黄色であり, これから得た試料も濃黄色であった。

なお, 予備実験では, 既述した pH 修正と第一鉄添加を S₁ 株上清に行えば緑変し, これを凍結すれば表層が濃緑色になった。

2) 濾紙の原点においては S₁ 株試料と対照の riboflavin 試料の場合のみ紫外線照射で蛍光を発し, 展開によって移動し, 1 個のスポットのみを示した。その Rf 値は表 2 に示したとおりである。

表 2 S₁ 株の産生する黄色色素の Rf 値

展 開 溶 媒	Rf 値		
	試料 A	試料 B	Riboflavin
n-butanol: acetic acid: water (4:1:5)	0.67	0.68	0.68
n-butanol: phenol: water (3:16:10)	0.68	0.70	0.69
n-butanol: pyridine: water (3:4:5)	0.85	0.86	0.85
5% Na ₂ HPO ₄ solution	0.09	0.09	0.06

試料 A: maltose 2% } の糖カザミノ酸培地からの試料
試料 B: sucrose 2% }

考 察

微生物のうちで FMN, FAD を有するものは riboflavin を合成できるか, またはこれを要求する。文献によれば, riboflavin を合成するものでも過剰合成によって培地内にこれを放出するものは少なく, それも主として真菌である。その主なものは酵母に属する *Candida guilliermondii*¹⁾, *C. flareri*²⁾, *C. robusta*³⁾, *Torulopsis famata*⁴⁾, *Debaryomyces subglobosus*⁵⁾, および酵母に類似し

ている *Eremothecium ashbyii*⁶⁾, *Ashbya gossypii*⁷⁾ である。*C. parapsilosis* についてはこのような報告は見当らなかった。なお, *C. guilliermondii* は *C. parapsilosis* と同様にヒトに病原性を示すことがある。

本実験の供試株 *C. parapsilosis* S₁ 株の黄色色素産生と上記の諸酵母の riboflavin 産生とについて培養条件を比較する。まず, これらの物質はいずれも好気培養でのみ産生される点では一致している。培養温度については諸酵母 (以後, 上述の 5 酵母種を指す) の場合は 27°~30°C が好適で, それらのうち *C. guilliermondii*¹⁾ の場合は 36°C では riboflavin を産生しないという。予備実験で S₁ 株の黄色色素産生は 28°C で見られず, 37°C で見られた点で異なる。培地の頭初 pH は諸酵母の場合も 5.0~6.0 であるが, 終末 pH については記載がなかった。

次に培地組成に関しては, 諸酵母の場合は主として合成培地が用いられているので, S₁ 株の場合と厳密な比較はできないが, 諸酵母の場合に同化しうる糖のうちでもその種類と濃度とによって増殖は良好であっても riboflavin 産生は不良である場合があり, とくに *C. guilliermondii*¹⁾ では maltose および galactose は riboflavin 産生に不適であるという。なお, これらには好んで glucose の 2% が用いられている。S₁ 株の場合は glucose よりも maltose が黄色色素産生に良好な成績を示した点で異なる。しかし, 酵母エキス加培地の場合に明らかなように, sucrose または maltose については菌収量が少ない場合に黄色色素産生が良好であった。また酵母エキス²⁾ は *C. flareri* の, peptone⁴⁾ は *Torulopsis famata* の riboflavin 産生を低下させるという。S₁ 株の場合は酵母エキス添加によって黄色色素産生が良好になった点で異なる。

以上のように諸酵母の産生する riboflavin と S₁ 株の産生する黄色色素とは培地組成や培養条件に関して異なった点がいくつか見られる。また S₁ 株の場合は黄色色素産生と pH 7.4 における第一鉄塩の添加による緑変とは密接な関係にあるが, この現象については上記の諸文献に記載がない。したがって黄色色素が riboflavin であるか, また

はそれに近縁な物質であるかの点等についても今後合成培地によって追究したい。

結 論

当教室保存の *Candida parapsilosis* S₁ 株が水溶性の黄色色素を産生することを見だし、この色素産生の培養条件を検討し、また本色素の濾紙クロマトグラフィーを行ない、次の結論を得た。

1. 本色素産生には、peptone を1%とした場合には、糖を1%、酵母エキスを0.3%、の割合とし、糖の種類は sucrose、次いで maltose が glucose の場合よりもよかった。培養温度は28°C よりも37°C が適し、好気培養を要した。

2. 培養上清における本色素は 硫酸第一鉄の存在において pH で約7.4で緑色を帯び、この緑色は約5.0で再び黄色になった。なお、この場合緑色の濃さと本色素による黄色の濃さとは関連が認められ。

3. 本色素は紫外線照射で蛍光を発し、濾紙クロマトグラフィーを行なった結果では riboflavin またはこれに近似の物質であると推定された。

文 献

1) BURKHOLDER, P. R.: Synthesis of ribofla-

vin by a yeast. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **29**: 166-172, 1943.

2) TANNER, F. W. Jr., VOJNOVICH, C. and VAN LANEN, J. M.: Riboflavin production by *Candida* species. *Science*, **101**: 180-181, 1945.

3) TAKAO, S.: Riboflavin biosynthesis by *Candida robusta*, I. Identification of riboflavin and several conditions for its production. *Agr. Biol. Chem.*, **28**(8): 559-565, 1964. II. Comparison of riboflavin-producing abilities of *C. robusta* and *C. guilliermondii* and some conditions for its production. *Ibid.* 566-570.

4) DIKANSKAYA, E. M.: Increased biosynthesis of riboflavin by yeast. *Chemical abstracts.*, **57**: 3872 i, 1962.

5) ANDERSON, F. B., and HARRIS, G.: The production of roboflavin and D-arabitol by *Debaryomyces subglobosus*. *J. Gen. Microbiol.*, **33**: 137-146, 1963.

6) GUILLIERMOND, A., FONTAINE, M., and RAFFY, A.: Sur l'existence dans l'*Eremothecium ashbyii* d'un pigment jaune se rapportant au groupe des flavines. *Comp. Rend. Hebd. Séan. Acad. Sci.*, **201**: 1077-1080, 1935.

7) WICKERHAM, L. J., FLICKINGER, M. H., and JOHNSTON, R. M.: The production of riboflavin by *Ashbya gossypii*. *Arch. Biochem.*, **9**: 95-98, 1946.