

Staphylococcus epidermidis 色素産生株 の色素の性状について

岡山大学医学部細菌学教室

小 合 一 輝

主任 金政泰弘教授

(昭和60年5月29日受稿)

Key words : *S. epidermidis*. Carotenoid.
Pigment. Lipid composition.
HPLC.

緒 言

Staphylococcus が黄色、橙色あるいはレモン色色素を生産することは、*Staphylococcus* 発見当初から認められている特性である。従って Rosenbach, Passet 以来、その産生する色素の肉眼的所見により *S. aureus*, *S. albus*, *S. citreus* に分類され、この分類が Bergey 7 版まで踏襲されて来た。しかし、*Staphylococcus* の色素産生能は不安定で変異しやすいこともあり¹⁾、近年色素産生性で分類することは不適當と考えられるようになった。そして Bergey 8 版以来生物性状および生化学性状を基盤にした分類に改正され、*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, その他10菌種に分類されている。

S. aureus は橙黄色の色素産生が強く、病原性の強いこともあって、その色素の性状や、色素産生性と病原性との関連について多くの研究と報告がなされており、その生理的意義についても解明されつつある²⁻⁶⁾

従来、病原性が弱く、しかも人の皮膚、粘膜の常在菌である *S. epidermidis* は、医学的にも研究が限られ、産生のメカニズム、色素性状や産生能については極めて報告が少ない。しかしこの *S. epidermidis* も近年、日和見感染や院内感染の起因菌として注目を集め再認識される様になっ

た。そこでレモン色を呈する *S. epidermidis* について、色素の性状、色素の産生能を追究することは意義深いものと思われる。

篠井らは、*S. aureus* の産生するカロテノイド色素の分析、同定を行い、特にその主要色素が C₃₀ カロテノイドであることの新知見を得、さらにこれらカロテノイドが膜の透過性に関与していることを報告している⁷⁾ その事実をふまえて、病原性の強い *S. aureus* と病原性の弱い *S. epidermidis* の産生する色素には如何なる差があるかを調べるため、*S. epidermidis* 産生色素の物理化学的性状について分析し、その産生に影響を与える培養温度と色素組成の関係について検討した。

材料および方法

I 供試菌と培養方法

教室保存の *Staphylococcus epidermidis* を nutrient agar および broth で馴化継代したものを供した。培養は nutrient broth (日水) で 0.1% 接種により 37℃ における振盪法 (モノ一振盪管 200ml) により行った。なお培養時間については、24, 48 時間培養後の色素産生量およびその組成を比較したが、色素産生量とその組成には有意な差は認められなかった。そのため、ことわりのない限り、24 時間培養でおこ

なった。培養温度については、25℃、37℃または42℃の温度選定をした。色素の物性を検定するためには、色素が大量に必要であったので、その目的のために0.5%グリセリンモノアセテートを nutrient broth に加え培養した²⁾ 培養した菌は7000×g、15分間の遠沈集菌を行い、3回生理食塩水で遠沈洗浄した。

II 脂質の抽出、精製

集菌したペレット量 (ml) の75倍量のクロロホルム/メタノール (2/1, V/V) を加え室温(25℃)、暗所で攪拌しながら24時間抽出し、その後、Folch 静置法により総脂質画分を精製した⁸⁾ 物理化学的性状を見るための色素は総脂質画分からカラムクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィー (TLC) により精製を行った。カラム (500mm×20mm) にはワコーゲル C-100 (40-100 mesh) を使用し、充填はベンゼンで行い、総脂質は少量のベンゼンに溶かしてカラムにロードし、溶出はベンゼン(200ml)、クロロホルム (600ml)、エーテル(150ml)、メタノール (100ml) の順に行った³⁾ 全ての色素はクロロホルム溶出分に回収された。クロロホルムを留去した色素画分は、一次元 TLC(Merk Art 5721, 20cm×20cm) により、イソプロピルエーテル/酢酸 (144/6, V/V) で展開し、着色している色素部分をかき取り、クロロホルム/メタノール (4/1, V/V) 25ml で抽出して、精製色素を得た。

III 色素の高速液体クロマトグラフィー(HPLC) 分画

Folch 静置法により精製した総脂質はカラム YMC pack A-313 (6mm×150mm) を使用した島津 LC-50 HPLC により分画した。試料は、1mg/0.1ml になるよう溶出液に溶かし、その10 μ l をロードしクロロホルム/メタノール/水 (5/4/1, V/V/V) で流速0.6ml/min で溶出した。溶出物のピークは440nm の吸収で検出した。

IV 可視および赤外吸収スペクトル

可視吸収スペクトルは、島津 MSP-5000 を用いてクロロホルム溶液 (試料1.5mg/ml) で測定した。赤外吸収スペクトルは、K Br 錠剤法により、日立赤外分光光度計 IR-215 を用い

て測定した。

V ガスクロマトグラフィー—マススペクトロメトリー (GC-MS)

Taler と Davies の方法⁹⁾ に従って、Pigment 4mg. Pt O₂ 100mg. CHCl₃ 50ml を攪拌しながら、室温で H₂ ガスにより2.5時間還元した後濾過し、水添試料2.6mg を得、島津 GC-MS9020 DF を使用し測定した。また試料不足のものは、直接 MS により測定した。

VI 糖の呈色反応

濾紙上に試料を吸着させ、アンスロン、 α -ナフトール、硝酸銀法による呈色反応により検出した¹⁰⁾

結 果

I 主要色素の物理化学的性質

Folch 静置法で純化精製した総脂質を、カラムクロマトグラフィーで分画し、その各溶出画分について、一次元 TLC 展開を行った(図1)。図はヨード発色したパターンであり色素以外の脂質もスポットとして認められる。主要色素はクロロホルム溶出画分に pig. 1, pig. 2 のスポットとして認められ、他にも微量ながらマイナーな色素スポットが存在した。これらをさらに、TLC により精製した標品の物性を表1に示した。表に示すごとく pig. 1, pig. 2 の Rf 値は近接しており、pig. 2 の方がやや極性が強い。

可視吸収スペクトル¹¹⁾ (図2) では、pig. 1 は428nm に、pig. 2 は447nm にそれぞれ主ピークをもち、ともにカロテノイド色素特有の3ピーク型の吸収を示している¹²⁾

精製した pig. 1 および pig. 2 について、アンスロン法、 α -ナフトール法および硝酸銀法により糖の検出を試みたところ、両者とも糖の存在が明らかに確認された。

赤外吸収スペクトル¹³⁾ (図3) では pig. 1 は1740 cm⁻¹ にカルボン酸エステル (-COO⁻) の吸収、3460 cm⁻¹ に会合水酸基 (-OH) の吸収、2940 cm⁻¹, 2860 cm⁻¹, 1460 cm⁻¹, 1380 cm⁻¹ にメチル基 (-CH₃) の吸収を示し、1200 cm⁻¹-1150 cm⁻¹ に糖のエーテル酸素 (-C-O-C-) および糖の水酸基 (-OH) の吸収帯が複雑にあらわれている。pig. 2 はほぼ同様の位置に吸

Analytical data of the fractionated pigments.

	TLC (Rf)	Absorbance Peak in CHCl ₃ (nm)	Infrared spectrum (cm ⁻¹)	Mass spectrum
pigment 1	0.44	405	3460	MW 698 (hydrogenation)
		428	1740	
		455	1200-1050	
pigment 2	0.38	424	3460	1200-1050
		447		
		476		

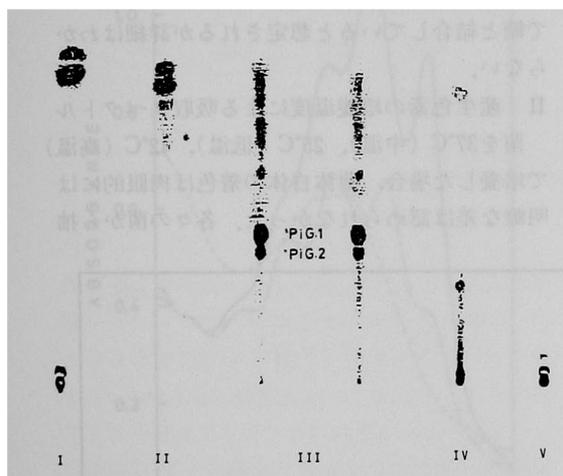


Fig. 1) TLC patterns of individual fractions derived from Silica Gel column chromatography.

I : benzen fraction
 II : chloroform fraction (colorless).
 III : chloroform fraction (color).
 IV : ether fraction.
 V : methanol fraction.
 Plate : Merck Art 5721
 Development : isopropyl ether/acetic acid
 (144/6, V/V)
 Spots were revealed by iodine vapor.

収をもつが、精製の際、pig. 1を優先してかき取ったために、pig. 1の混入で1740cm⁻¹に-COO⁻の弱い吸収が見られ、また1200cm⁻¹-1150cm⁻¹の糖の吸収帯の分離が悪くなっている。

GC-MSの結果を図4に示す。pig. 1の水添物の分子量は698で、m/e193は糖の1番目の炭素

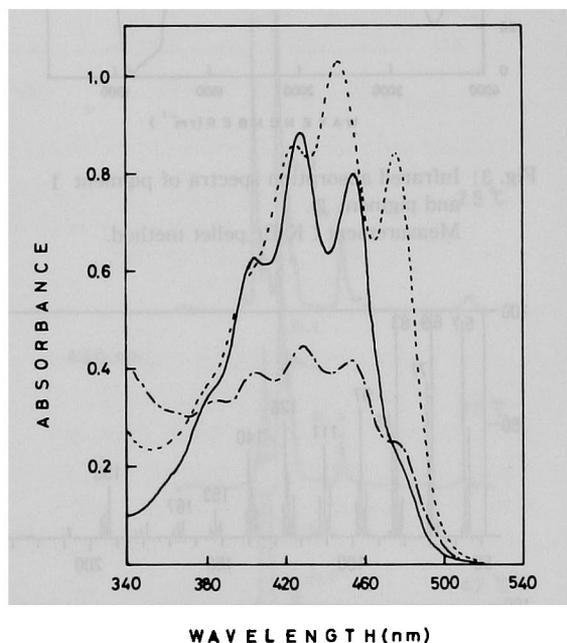


Fig. 2) Visible light absorption spectra of pigment 1, pigment 2 and total lipid.

— pigment 1.
 pigment 2.
 - - - total lipid.

とカルボキシル基との結合部で離脱した3分子脱水糖骨格のフラグメントイオンピークを示し、m/e 167, 153, 140, 126, 111, 97, 83, 69, 57に炭化水素特有のフラグメントイオンピークを示している。また m/e 432 以上の高質量部にはそれぞれの炭化水素に相対するフラグメント

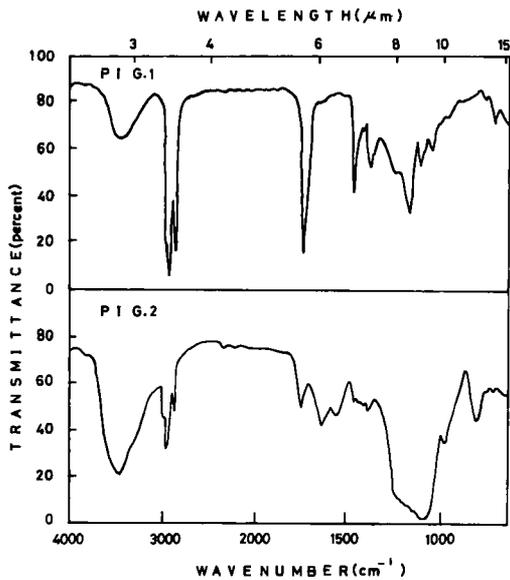


Fig. 3) Infrared absorption spectra of pigment 1 and pigment 2.
Measurement: K Br pellet method.

イオンピークが見られる。なお pig. 2 は試料が微量のため、水添を行わず直接 MS 分析をおこなったが、明確な結果は得られなかった。

以上の分析結果より、pig. 1 は図 5 に示すごとくイソプレノイドを単位とした重合体を骨格とし、末端位のカルボキシル基で糖と結合し、二重結合を 7 個もった構造 glucopyranosyl-1-0-(4,4'-diapo-7'.8'.11'.12'-tetrahydrolycopen-4-oate)-6-0-(2-methyl butanoate) が推定される。

fig. 2 は pig. 1 に比較すると可視吸収極大波長が 20 nm 長波長にずれ、赤外吸収スペクトルで -COO^- の吸収を示さないことから、共役二重結合が 2 個増し、末端は $\text{-CH}_2\text{-O-}$ の様な基で糖と結合していると想定されるが詳細はわからない。

II 産生色素の培養温度による吸収スペクトル
菌を 37°C (中温), 25°C (低温), 42°C (高温) で培養した場合、菌体自体の着色は肉眼的には明瞭な差は認められなかった。各々の菌から抽

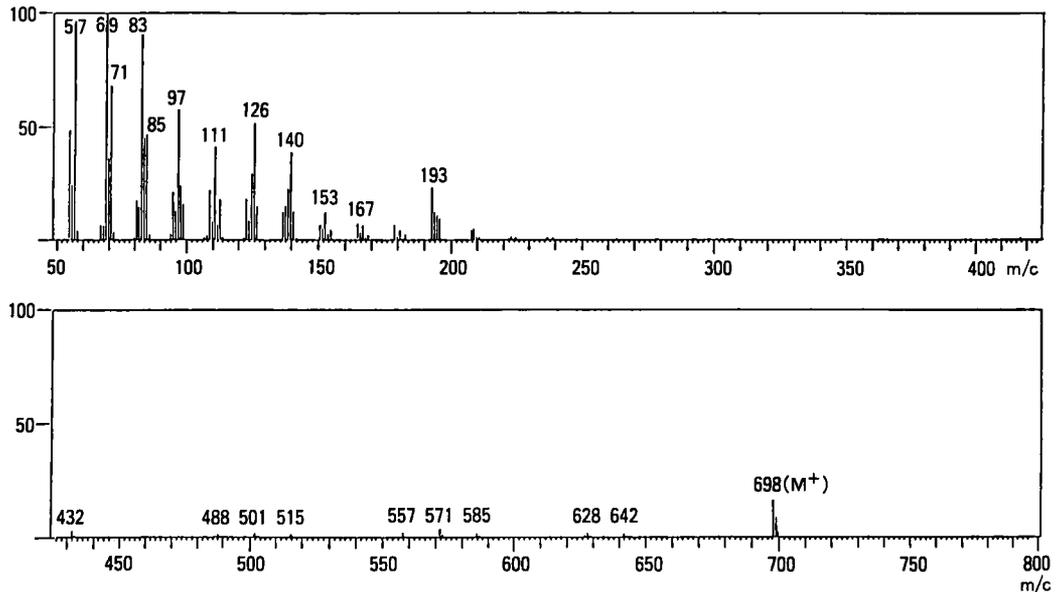


Fig. 4) GC-MS spectrum of hydrogenated pigment 1.

The operating conditions were as follows: column temperature, 250–300°C, temperature program rate, 4°C/min; isobutane flow rate, 30 ml/min; injector block temperature, 300°C; ion source temperature, 250°C; electron energy, 100 eV.

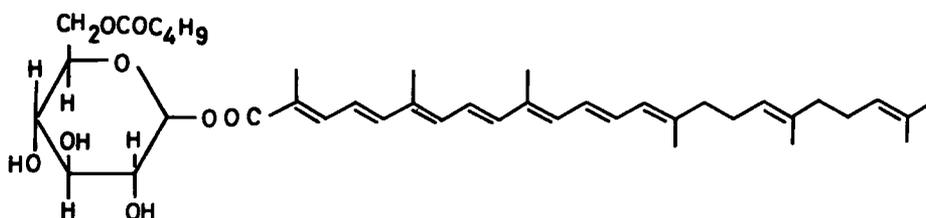


Fig. 5) Expected structure of pigment 1.

Formula: glucopyranosyl-1-O-(4,4'-diapo-7', 8', 11', 12'-tetrahydrolycopen-4-oate)-6-O-(2-methyl butanoate).

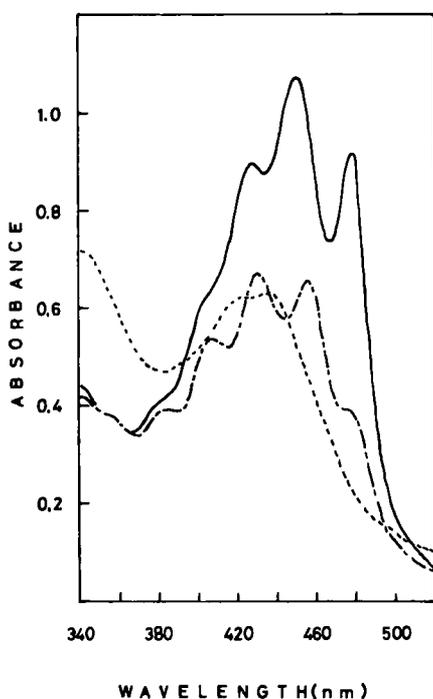


Fig. 6) Visible light spectra of total lipids derived from 25°C, 37°C and 42°C grown cells.

Solvent: chloroform.

— Spectrum of pigment from cells cultured at 37°C.

— Spectrum of pigment from cells cultured at 25°C.

----- Spectrum of pigment from cells cultured at 42°C.

出した総脂質の可視吸収スペクトルを図6に示す。37°C培養では第1ピークを432nm, 第2ピークを458nm, 第3ピークを408nmにもち、全体としては明黄色を呈している。これに比し、

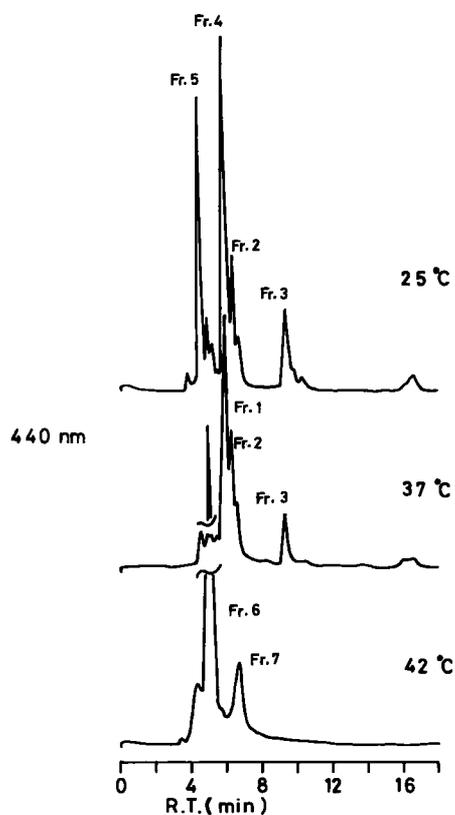


Fig. 7) HPLC patterns of total lipids derived from 25°C, 37°C and 42°C grown cells.

Column: YMC pack A-313.

Elution: chloroform/methanol/water (5/4/1, V/V/V).

25°Cでは同様に3ピークを呈するものの、それぞれのピークは約20nm長波長側にシフトし、37°C培養のものより赤味を帯びた黄色を呈してくる。それに対し42°Cでは436nmに幅広い吸収をもちカロテノイド特有の3ピーク型吸収は認

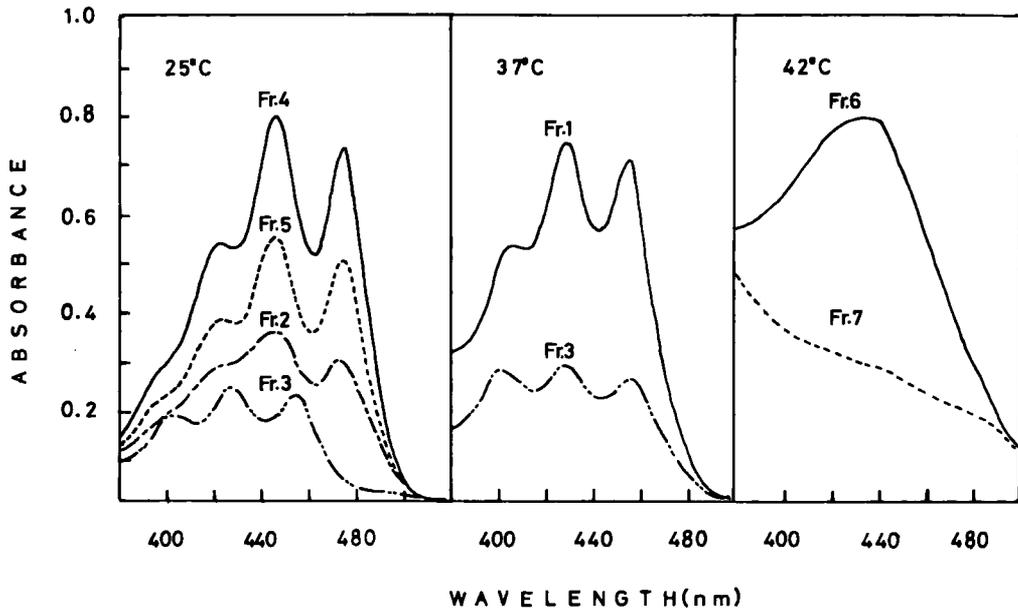


Fig. 8) Visible light absorption spectra of individual HPLC peaks of total lipids derived from 25°C, 37°C and 42°C grown cells.

められなかった。

III 各培養温度における色素画分の HPLC 解析

HPLCは固相(カラム), 移動相(溶媒)を適当に選択することにより, 分子極性の相違で色素を短時間に分画することが出来るので, 光, 酸素, 熱等に弱い菌体抽出色素の分離, 分析には有用である⁵⁾. 各温度培養菌からの総脂質画分を HPLC で分画したパターンが図 7 である。

37°C培養菌での HPLC パターンは, 図の如く Fr-1 : RT. 6.00 min., Fr-2 : RT. 6.37 min., Fr-3 : RT. 9.33 min. の 3 つの主要ピークを示した。Fr-1 の吸収スペクトル(図 8)は前述の pig. 1 に一致した。Fr-2 は次の 25°C での Fr-2 と RT が一致することから pig. 2 と推定される。Fr-3 およびその他の微量なピークは TLC でも検出された(図 1 参照)マイナー色素に相当するものと思われる。

25°C培養菌では最も主要なピークは Fr-4 : RT. 5.82 min. および Fr-5 : RT. 4.47 min. である。これらの画分の吸収スペクトルは図 8 に示すとおりであり, Fr-4, Fr-5 とともに 447 nm に吸収極大をもち, スペクトル上では区別でき

ない。しかしレテンションタイムが明らかに異なることから, おそらく主鎖のイソプレノイド部分は同一であるが分子内極性を異にするものと思われる。しかも Fr-4 は 37°C でみられる Fr-1 とは HPLC 値は極微の差であるにもかかわらず可視吸収スペクトルは大きく異なり, 25°C 培養により特徴的に出現するものと推察される。

42°C培養菌では主要ピークは Fr-6 : RT. 4.84 min. および Fr-7 : RT. 6.63 min. と全く異なったパターンを示す。この画分の吸収スペクトルは図 8 に示すとおりで, Fr-6 は 436 nm に極大をもったブロードな単一吸収スペクトルでカロテノイド特有の 3 ピーク性の吸収極大は示さなかった。Fr-7 は紫外部に吸収を有するもので長波長側の広がり可視部にのびたものであった。すなわち, 42°C とする過酷温度域で培養すると, 色素の産生は著しく変化していることを示している。この温度変化実験は 3 回繰返したが HPLC とその Fraction 吸収スペクトルは何れも再現性が確認された。

IV 培養温度の途中変換による産生色素の変化 各温度(低, 中, 高温)培養による色素の質

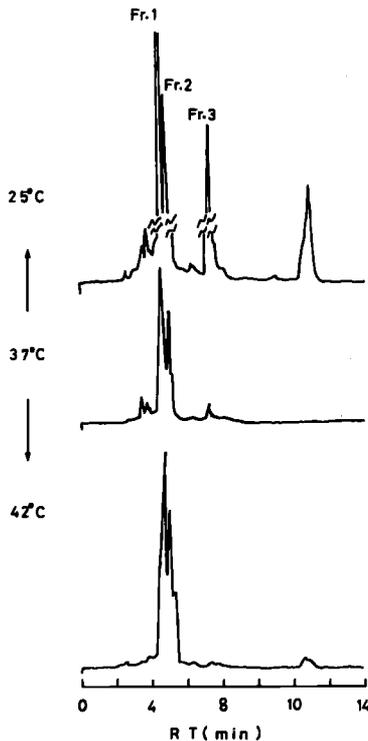


Fig. 9) HPLC patterns of total lipids derived from cells which were cultivated at 37°C for 24 h and then at 25°C or 42°C for another 24 h.

的变化は前述の結果で明らかであるが、一般に *Staphylococcus* 類の色素は、至適条件37°Cで培養後、室温に放置すると色調が増強するとされている¹⁴⁾。この点を明らかにするために、37°Cで静止期まで培養した菌を異った温度に移行させて産生色素におよぼす影響を調べた。すなわち、37°Cで24時間培養したのち、25°Cないし42°Cに温度シフトして、さらに24時間培養した。その後同様に HPLC 解析したものが図9である。そしてそれらの各フラクションの可視吸収スペクトルを図10に示す。

高温側にシフトしても、低温側にシフトしても、37°Cで一度形成された色素は温度に対応して変化することは認められなかった。37°Cで培養した菌を、25°Cないし42°Cに移行して培養すると、増殖は極めて遅く24時間ではほとんど増殖せず、静止菌状態にある。このことから、37°C

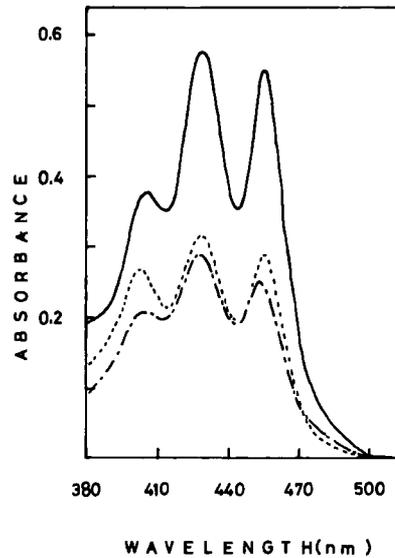


Fig. 10) Visible light absorption spectra of individual HPLC peaks of total lipids derived from cells which were cultivated at 37°C for 24 h and then at 25°C or 42°C for another 24 h.

で形成された pig. 1, pig. 2 の色素は、菌体内の酵素系により25°Cで認められる Fr-4, Fr-5 (図7) や42°Cで認められる Fr-6, Fr-7 物質 (図7) に代謝、転換されることはないことが推測された。

考 察

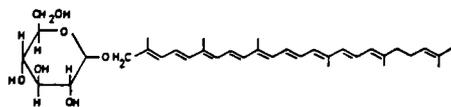
現在、*S. epidermidis* と分類命名されている菌種のうち、レモン色の色素を産生する株は過去 *S. citreus* と言われていたもので、この色素の性状について解析、同定を試みた。

本研究では先ず至適温度である37°C培養菌について、総脂質からカラムクロマトグラフィー、TLCにより色素を分画し可視吸収スペクトル、赤外吸収スペクトルおよびGC-MS解析等により同定と分析を行った結果、本菌は主要色素が2種類であることを確認した。

すなわち、pig. 1 は C₃₀ カロテノイドである glucopyranosyl-1-0-(4,4'-diapo-7', 8', 11', 12'-tetrahydrolycopen-4-oate)-6-0-(2-methyl butanoate) と推定される。本色素は

J.H. Marshal ら³⁾が *S. aureus* で同定している Staphyloxanthine と構成主骨格形は同様で、イソプレノイド鎖の末端カルボン酸に六単糖が結合している glycosyl 型ではあるが、糖の 6 位の hydroxymethyl に結合の alkylcarbonyl の alkyl 鎖が異なるものと考えられる (*S. epidermidis*: C₄H₉, *S. aureus*: C₁₄H₂₉)。しかも色調の遺伝子となるイソプレノイド鎖も異なる。すなわち、*S. aureus* 特有の橙黄色を呈する主色素の可視吸収スペクトルは 475 nm に極大をもち、*S. epidermidis* 特有のレモン色を呈する主色素は吸収極大 428 nm であり、47 nm 短波長にシフトしている。この波長のズレは発色団である C₃₀ イソプレノイド鎖中の共役二重結合数の差によるもので、*S. aureus* の共役二重結合数 9 個に対し、本菌は 7 個であることが推察される。糖部分については決定的な解析は出来なかったが、*S. aureus*, *St. faecium*¹⁵⁾ の主要色素と生合成系の pathway および GC-MS から六単糖と推定した。

fig. 2 については TLC 分離の不良と量不足の関係から、水添しての十分な GC-MS 解析が得られず、予想構造の域を出ない。しかし TLC、可視吸収スペクトル、赤外吸収スペクトルでの判断からイソプレノイド鎖中の共役二重結合数は 9 個で、六単糖とはエーテル結合 (-O-) しているものと考えられる。しかも、fig. 1 より極性が少し強いことから、糖の 6 位の酸素には alkyl 鎖は有しないものと思われる。参考のために *St. faecium* の色素を挙げたが、この様な構造に類似したものではなかろうか。



細菌や植物からの色素成分の分離、分析は、抽出→精製→機器分析の手順で行われる。生物成分は不安定なものが多く、これらの操作の過程で変性することもあり、また操作が複雑で、分析までに大量の試料を必要とすることが多い。これらの欠点を改良すべく研究者は種々工夫を行ってきた。近年、HPLC の急速な発達にともない、簡便な操作により分析が可能になってき

た。HPLC の特徴はカラム (充填担体)、移動相溶媒、送液速度を調節することで微少の極性差も分離出来る。したがって、本研究の様な菌体成分の 1 つである色素の分析には、極めて有用な方法である。例えば 25°C 培養菌の 2 種の主色素は可視吸収スペクトルでは、同一ピークを示したが、HPLC では Fr-4, Fr-5 と明らかに分離して得られる。この 2 つの色素は何れも fig. 2 の吸収パターンと酷似しているが、構造上どの部分の置換基により極性を異にするのかは同定出来なかった。しかし、少なくとも *S. epidermidis* の色素も極く少量の試料で分画出来、TLC やカラムクロマトグラフィーによる分画、分析より有用であることがわかった。

色素産生性に与える培養温度の影響についての HPLC による実験は、19°C, 25°C, 31°C, 37°C, 42°C の各温度について調べたが、典型は 25°C, 37°C, 42°C に見られたので、これを結果の項に示したわけである。結論的には培養温度 37°C では TLC で fig. 1 と名づけた吸収極大を 428 nm にもつ Fr-1 (30%) が主成分である。これに対し 31°C, 25°C, 19°C 培養では fig. 1 は消失し、新たに 447 nm に吸収極大をもつ Fr-4 (31°C, 51%; 25°C, 34%; 19°C, 22%), Fr-5 (31°C, 13%; 25°C, 23%; 19°C, 27%) が特徴的に出現し主色素となる。又 fig. 2 と名づけた色素 Fr-2 は 37°C (17%), 31°C (9%), 25°C (11%), 19°C (6%) 培養でいずれも産生されるが量は少ない。一方本菌の発育最高温度 42°C では通常細菌色素の合成系からは判断出来ない組成のものに変異した。この現象は高温と言う過酷な培養条件がしからしめたもので、すなわち 42°C では大きく異った色素合成経路が発現するものと考えられる。これらのことから産生色素の種類は培養温度に強く依存して変化することが明らかになった。

一般に細菌色素の産生量は培養定常期から静止期に増加すると言われている。細菌学の初期から、*Staphylococcus* の分類は色調を主体として行ってきたが、現在でも *Staphylococcus* 類の同定には色調を第一判定の指標として用いていることには間違いがない。色素産生の観察には、24 時間培養しコロニー形成後、室温に放置し、

色調が強まったとき判定する方法が用いられている。本研究においても37°Cで培養した菌を温度シフトすることで、その温度に適応して構造・組成が変換するか、de novo合成するかは興味あることである。しかし、37°Cで24時間培養した菌を、25°C、42°Cにシフトして24時間培養した温度のシフト実験から見て、一度その温度域で合成された色素は分子種の変化を起さないことがわかった。ただし低温側に移した25°C培養ではHPLCのピークは高くなり、全体的に色素の増量を示した。このことは、コロニー観察において室温放置することで色調を濃色化することに通じる。今後は菌の分裂が盛んで酵素活性も活発なlog phaseの菌で温度シフトによる色素の形成変化があり得るかを調べる必要がある。

Staphylococcusの色素は変異しやすいと言われ、その発現機構についても遺伝子操作法を導入して解析がおこなわれはじめている。しかし、合成経路が複雑であるため¹⁶⁾、取り上げられるような知見は得られていない。今後、HPLCを導入し、その産物を指標にして各色素の発現能や合成経路を追跡することが有益な研究方法になるであろうと思われる。

結 語

S. epidermidisの37°C培養(至適温度)における主要色素の物理化学的性質を解析し、その

構造を glucopyranosyl-1-0-(4,4'-diapo-7', 8', 11', 12'-tetrahydrolycopen-4-oate)-6-0-(2-methyl butanoate) と推定した。

HPLCを用いて色素産生に対する温度の影響を検討した結果では、25°C培養菌は37°C培養菌色素とは構造がわずかに異なるC₃₀カロテノイドを主要な色素とし、42°C培養菌はまったく異質の色素を有することが認められた。

37°Cで培養した後、25°Cあるいは42°Cに培養温度をシフトする実験では、温度シフトによる色素の変換や組成変化はみられなかったが、25°Cシフトの場合にのみ色素は増量することがわかった。

謝 辞

本研究の遂行にあたり御指導を賜りました金政泰弘教授に深く謝意を表します。さらに多くの討論、教示を頂きました友近健一講師、平井義一講師、速水正明博士ならびに香川医科大学微生物学講座林英生教授、岡部昭延助教授に心から御礼申し上げます。また実験を進めるにあたり種々の御協力を頂きました細菌学教室各位に心から感謝いたします。

なお本論文の主旨の一部は、第33回中四国細菌学会、第27回、第29回ブドウ球菌研究会において発表した。

文 献

1. Toply and Wilson's.: Staphylococcus and Micrococcus; the anaerobic gram-positive cocci. ed, (Parker. M.T.) Principles of bacteriology, virology and immunity. 2, 218—245, Edward. Arrol, London, 1983.
2. Willis, A.T. and Turner, G.C.: Staphylococcal lipolysis and pigmentation. *J. Pathol. Bacteriol* 84, 337—347, 1962.
3. Marchall, J.H. and Wilmoth, G.J.: Pigments of Staphylococcus aureus, a series of triterpenoid carotenoids. *J. Bacteriol.* 147, 900—913, 1981.
4. Hammond, R.K. and White, D.C.: Carotenoid formation by Staphylococcus aureus. *J. Bacteriol.* 103, 191—198, 1970.
5. Suzue, G.: Studies on carotenogenesis by Micrococcus pyogenes var aureus. *J. Biochem.* 46, 1497—1504, 1959.
6. Suzue, G., Tsukada, K. and Tanaka, S.: Occurrence of dehydrosqualene (C₃₀ phytoene) in

- Staphylococcus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta* 164, 88—93, 1968.
7. 篠井加津子：黄色ブドウ球菌のカロテノイド色素の分析化学的検討と生理的意義について。岡山医学会雑誌, 92, 73—83, 1980.
 8. Folch, J., Lee, M. and Sloane-Stanley, G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497—509, 1957.
 9. Talor, R.F. and Davies, B.H.: Triterpenoid carotenoids and related lipids. The triterpenoid carotenes of *Streptococcus faecium* UNH 564P. *Biochem. J.* 139, 751—760, 1974.
 10. 阿武喜美子, 瀬野信子：糖類の分離, 分析。赤堀四郎, 舟橋三郎編, 丸善, 東京, 実験化学講座, 23, 333—463, 1967.
 11. Sandvik, O. and Brown, R.W.: Spectrophotometric characterization of pigments produced by *Staphylococcus epidermidis* strains. Isolated from Bovine Udders. *J. Bacteriol.* 89, 1201—1208, 1965.
 12. Vetter, W., Englert, G., Rigassi, N. and Schwieter, U.: Spectroscopic Methods. In *Carotenoids*, ed. I. Otto, Birkhauser Verlag, Basel, pp. 189—266, 1971.
 13. 中西香爾：赤外線吸収スペクトル, 定性と演習, 南江堂, 東京, 1965.
 14. Brown, A.E.: The production of pigment by *Staphylococcus Pyogenes*. *J. Med. Lab. Technol.* 22, 121—129, 1965.
 15. Talor, R.F. and Davies, B.H.: Triterpenoid carotenoids and related lipids. Triterpenoid monohydroxy — and monoglucoxyloxy — carotenoids from *Streptococcus faecium* UNH 564P. *Biochem. J.* 139, 761—769, 1974.
 16. Marchall, J.H. and Wilmoth, G.J.: Proposed pathway of triterpenoid carotenoid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. Evidence from a study of mutants. *J. Bacteriol.* 147, 914—919, 1981.

Properties of pigments produced by *S.epidermidis*

Kazuteru OGO

Department of Microbiology Okayama University Medical School

(Director: Prof. Y. Kanemasa)

The major pigment isolated from *S.epidermidis* cells grown at 37°C was analyzed by various physicochemical methods. The chemical structure was presumed to be glucopyranosyl-1-0-(4,4'-diapo-7',8',11',12'-tetrahydrolycopen-4-oate)-6-0-(2-methylbutanoate).

The effect of growth temperature on the production of pigments was studied by HPLC. Cells grown at 25°C had a different C₃₀-carotenoid as the major pigment from cells grown at 37°C. Cells grown at 42°C had a pigment which was not a carotenoid.

By shifting the culture temperature from 37°C to 25°C or 42°C, the composition of the pigments did not change, but the amount of pigments increased in the case of a shift to 25°C.