

梔子(*Gardenia jasminoides* 열매)培地를 이용한 喀痰 및 기타 病理檢體內 各種 酵母菌類의 分離 및 同定

서울市立西大門病院

鄭 淑

大韓結核協會 結核研究院

金 信 玉 · 金 尙 材

= Abstract =

Isolation and Identification of the Yeasts from Sputum or Other Clinical Specimens Using the Medium Containing Pigments Extract of *Gardenia jasminoides* Fruits

Suk Jeong

Seoul Seodaemoon City Hospital, Seoul, Korea

Sin-Ok Kim and Sang-Jae Kim

Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association, Seoul, Korea

Colonial morphology of the various yeasts often encountered in sputum or other clinical specimens was investigated on the corn meal-potato-yeast extract agar medium (GJCPY) containing orange-yellow pigments extracted from *Gardenia jasminoides* fruits in hopes of differential identification on primary cultures. The results obtained are as follows.

- 1) *Cryptococcus neoformans* which is a medically important yeast and whose colony showed brown to purple brown on GJCPY medium was distinguishable not only from buff colored *Cr. laurentii* after one week incubation but also from *Candida* spp.
- 2) Colony color of *Candida albicans*, a most common species in sputum specimens and of *Ca. parapsilosis*, a rare isolate, remained unchanged even after 15 days incubation.
- 3) *Ca. tropicalis*, second common isolate from sputums and *Ca. krusei*, a rare isolate, formed a characteristic rough and wrinkled colonies that permit to differentiate them from others.
- 4) Rare isolates, *Ca. guilliermondii* and *Ca. lusitaniae*, turned to prussian blue within three days of incubation.
- 5) *Torulopsis* sp. and *Saccharomyces cerevisiae* showed glossy grayish blue or light blue after one week incubation.

The findings clearly showed that *Ga. jasminoides* pigments medium was useful to the morphological differentiation of medically important yeasts that were often encountered in sputum or other clinical specimens.

緒 論

梔子(*Gardenia jasminoides* 열매)는 예로부터 黃色 물감으로 織物이나 음식물의 着色料로 이용해 왔다. 그

리고 軍糧米를 치자물에 담구었다가 찌서 저장했다는 보고도 있고, 漢方에서 不眠症과 黃疸의 치료에 쓰기도 하고 消炎, 止血 및 利尿의 藥効가 있다고 하는데 臨床對照試驗을 통해 증명된 사실은 아니라고 생각한다¹⁾. 橙黃色的 水溶性 梔子色素는 主成分이 crocin(MW

=977)으로 알려져 있으며 이와 같은 梔子色素가 菌에 의해 색깔이 변하는 사실을 李, 孫등²⁾이 오래전에 관찰한 바 있다. 그후 각종 細菌類의 梔子色素에 대한 다양한 반응이 관찰되었고 일부 細菌類의 同定에 유용하다는 사실을 보고한 바 있다³⁻⁷⁾. 그러나 梔子色素에 대한 眞菌類의 반응은 아직 관찰된 바 없어서 저자들은 각종 病理檢體로부터 分離되는 酵母菌類의 반응을 관찰하여 이들의 分離 同定에 도움이 되는지 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

일반적으로 酵母菌類는 絲狀菌과는 달리 體制가 단순하여 形態만을 중심으로 分類同定하기가 어려워 각종 炭水化物的 醱酵 또는 이용능력이나 여러가지 酵素反應을 관찰하여 分類同定한다⁸⁾. 그러나 그러한 방법들은 과정이 번거롭고 비용이 많이 들며 시간이 오래 걸리는 경우가 많아서 각종 檢體들로부터 다양하게 分離되는 酵母菌類를 간단하고 신속하게 同定할 수 있는 방법이 요구되고 있다. 신속 간편한 同定은 곧 신속 정확한 진단으로

이어져 患者를 효율적으로 管理할 수 있게해줄 뿐 아니라 비용도 크게 절감할 수 있다.

材料 및 方法

1. 試驗 菌株

美國 國立保健研究院(National Institutes of Health)과 American Type Culture Collections(ATCC)로부터 分讓 또는 구입한 酵母菌類와 結核研究院에서 한자로부터 分離培養해 보관하고 있는 각종 酵母菌類들을 시험균주로 이용하였다. 즉 *Candida albicans* 13주, *Ca. guilliermondii* 및 *Saccharomyces cerevisiae* 각각 3주, *Ca. krusei*, *Ca. parapsilosis* 및 *Ca. tropicalis* 등이 각각 2주, *Ca. lusitaniae*, *Ca. viswanathii*, *Rhodotorula* sp. 및 *Torulopsis glabrata* 등이 각각 1주 그리고 *Cryptococcus laurentii* 1주와 *Cr. neoformans* 12주 등이 이용되었다(Table 1).

Table 1. The Yeasts Used in This Study

Species	Serotypes	Mating types	Sources	No. of strains tested
<i>Cryptococcus laurentii</i>			ATCC18803	1
<i>Cr. neoformans</i>	A	α	ATCC6352, NIH381	2
<i>Cr. neoformans</i>	B	α	ATCC32269	1
<i>Cr. neoformans</i>	C	a	ATCC32608	1
<i>Cr. neoformans</i>	D	α	NIH3501	1
<i>Cr. neoformans</i>	D	a	NIH3502	1
<i>Cr. neoformans</i>	NT*	α	KIT0100-5	1
<i>Cr. neoformans</i>	NT	a	KIT0100-9	1
<i>Cr. neoformans</i>	NT	NM**	Clinical isolates	4
<i>Candida albicans</i>	A		NIH B311	1
<i>Ca. albicans</i>	B		NIH B4201	1
<i>Ca. albicans</i>	NT		NIH 53868, S31026 ATCC10231, 10259	4
<i>Ca. albicans</i>			Clinical isolates	7
<i>Ca. guilliermondii</i>			ATCC6260, 9390, 56822	3
<i>Ca. krusei</i>			ATCC2159, 14243	2
<i>Ca. lusitaniae</i>			ATCC42720	1
<i>Ca. parapsilosis</i>			ATCC10232, 22019	2
<i>Ca. tropicalis</i>			ATCC750, 14056	2
<i>Ca. viswanathii</i>			ATCC22981	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			ATCC2601, 4108, 9763	3
<i>Torulopsis glabrata</i>			ATCC2001	1

* = not tested,

** = not mated

2. 梔子色素 抽出 및 培地製造

市販 梔子(*Gardenia jasminoides*의 열매)를 구입하여 1개월 이상 충분히 건조시킨 다음 果皮를 제거하고 赤黃色 果肉을 씨앗과 함께 절구로 粉碎하여서 4°C로 냉각한 滅菌蒸溜水 1 l에 5g을 넣고 4~5시간 攪拌하면서 橙黃色素를 추출하였다. Watman No. 1, 2 濾過紙로 不溶性 粒子를 제거하고 pH를 7.0으로 조절하여 梔子色素 용액으로 사용하였다. 熱水抽出도 흔히 실시하지만 酵母菌集落의 색깔변화가 熱水抽出色素보다 冷水抽出色素가 함유된 배지에서 더 우수함을 예비실험에서 관찰하였고 色素 이외의 불필요한 화합물이 溶出되어 오는 것을 최소화하기 위해 傳來되어 오는 冷水 抽出法을 적용하였다.

使用培地는 酵母菌類의 형태관찰에 널리 이용되고 있는 yeast morphology agar (YMA, Difco社製)와 corn meal-potato-yeast extract (CPY)배지(蒸溜水 1 l에 corn meal agar 8.5g, potato dextrose agar 19.5g, yeast extract 1g, neopeptone 2g 등이 함유된 배지)에 梔子色素를 添加하거나 添加하지 않은 배지를 제조해서 酵母菌集落 색깔변화를 관찰하는데 이용하였다. 그리고 Korth 등⁹⁾이 *Cr. neoformans*의 分離同定에 이용한 caffeic acid 배지와 Shaw 등¹⁰⁾의 dopamine 배지도 제조하여 이군의 선택적 분리배양에 있어서 그들의 效率性을 비교관찰하였다. Caffeic acid 배지는 蒸溜水 1 l에 glucose 5g, $(NH_4)_2SO_4$ 5g, yeast extract 2g, K_2HPO_4 0.8g, $MgSO_4 \cdot 3H_2O$ 0.7g, caffeic acid 0.18g, ferric citrate 0.002g 및 agar 20g을 가하고 용해하여 高壓滅菌한 다음 分注했다.

Dopamine 배지는 먼저 蒸溜水 100 ml에 dopamine 0.02g, asparagine 0.5g, L-glutamine 0.5g 및 glycine 0.5g을 첨가하여 용해시킨 후 1M K_2HPO_4 로 pH를 5.5로 조절한 다음 pore-size 0.2 μm 의 濾過膜으로 여과해 汚染菌을 제거했다. 그 다음 증류수 400 ml에 KH_2PO_4 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.25g, thiamine-HCl 5mg, biotin 10 μg , glucose 0.25g 및 agar 12.5g을 첨가해 용해한 후 pH를 5.5로 조절하여 121°C에서 15분 高壓滅菌한 다음 온도가 55°C로 내려갔을 때 濾過滅菌한 dopamine 용액을 첨가해 잘 혼합하여 분주했다.

3. 菌接種 및 培養

Sabouraud's dextrose 寒天培地에 繼代培養한 試驗菌株의 菌集落을 0.067 M 滅菌 磷酸緩衝液(pH 7.0)에 浮遊시켜 菌集落이 分散되어 발육하도록 희석한 다음 각종 배지에 接種하여 28°C에서 배양하면서 菌集落의 색깔 변화를 3, 5, 7, 10, 15, 20 및 30일에 관찰하였다.

4. 喀痰 및 기타 檢體의 酵母菌類 分離培養

喀痰을 同量の 0.5% N-acetyl-L-cysteine과 섞어서 서서히 攪拌하여 液化시킨 다음 滅菌 증류수로 10배 희석하여 희석전 液化喀痰과 희석 喀痰을 0.2 ml씩 Chloramphenicol 50 $\mu g/ml$ 이 각각 첨가된 CPY 배지, 梔子色素를 함유한 GJCPY 배지 및 caffeic acid 배지에 접종하여 28°C 및 37°C에서 약 2주간 배양하면서 발육한 酵母菌集落을 관찰하고 동일한 형태의 菌集落數를 계산하여 분리된 각종 酵母菌類의 喀痰內 수를 推算하였다.

기타 病理 檢體 중 粘液性인 것은 喀痰과 동일하게 처리하였고, 腦脊髓液, 助膜液, 氣管枝 洗滌液등은 遠心 分離하여 沈澱物을 接種해 배양하였다.

5. 分離된 酵母菌類의 同定

분리배양된 酵母菌類는 發芽管시험, sucrose 同化시험 및 API 20C system(API Analytab 社)을 이용하여 각종 炭水化合物 同化시험을 실시하여 菌種을 同定하였다.

結 果

橙黃色 梔子色素는 水溶性이라 추출이 용이하였다. 일반적으로 熱水로 추출하면 많은 양의 색소를 얻을 수 있지만 색소 이외의 불필요한 각종 수용성 화합물도 많이 추출되기 때문에 傳來되어 오는 방법에 따라 熱水 대신 冷水(4°C)로 추출하였다. 그리고 두방법으로 추출한 색소를 함유시킨 배지에 酵母菌類를 接種하고 菌集落 색깔 변화를 비교관찰한 결과 冷水추출 색소가 함유된 배지에서의 菌集落 色相이 훨씬 더 선명해 冷水추출이 바람직했다. 색소를 95% methanol로 추출하여 吸光度를 관찰한 결과 434 nm와 464 nm에서 最大 吸光度를 나타내어 역시 주성분이 crocin이라고 생각되었다.

먼저 각종 病理檢體로부터 眞菌類 分離培養에 이용하

Table 2. Colonial Color Change of the Yeasts on the Medium Containing *Ga. jasminoides* Pigments (GJCPY)

Species	No. of strains tested	Incubation periods (day)															
		3			5			7			10			15			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
<i>Ca. albicans</i>	14	14			14			14			14			13	1		
<i>Ca. guilliermondii</i>	3		3			3			3			3				3	
<i>Ca. krusei</i>	2	2			2			2			2			2			
<i>Ca. lusitaniae</i>	1		1			1			1			1				1	
<i>Ca. parapsilosis</i>	2	2			2			2			2			2			
<i>Ca. tropicalis</i>	2	1	1		2			2			2					2	
<i>Ca. viswanathii</i>	1		1		1			1			1					1	
<i>Cr. laurentii</i>	1	1			1			1			1			1			
<i>Cr. neoformans</i>	12	8	4		2	9	1		3	9			2	4	6	2	10
<i>Sa. cerevisiae</i>	3	3			3			3			3			3			3
<i>To. glabrata</i>	1	1			1			1			1			1			1

The responses ; —=no color change, 1+=partial or light grayish green, 2+=grayish blue or bluish brown, 3+=deep blue or brown to purple brown

고 있는 CPY 배지에 梔子色素를 첨가하여 만든 배지 (GJCPY)에 각종 시험균주들을 배양하여 菌集落의 색깔변화를 관찰한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 *Ca. albicans* (Fig. 1)와 *Ca. parapsilosis* 등은 시험된 모든 균주가 10일 이상 지나도 菌集落 색깔이 전혀 변하지 않았는데 비해서 *Ca. guilliermondii* (Fig. 2)와 *Ca. lusitaniae* 등은 3일 이내에 靑色을 띠기 시작하여 5일 이내에 짙은 잉크색 내지 균청색 (prussian blue)을 띠었다. 그리고 *Ca. tropicalis*와 *Ca. viswanathii* 등은 시험된 모든 菌株가 3일이 지나서 서서히 옅은 청색을 띠다가 7일 정도 되면 *Ca. viswanathii*는 균청색을 띠고 *Ca. tropicalis*는 7~10일이 지나서야 회청색 내지 잉크색으로 변하고 菌集落 모양도 放射狀으로 주름지면서 털같은 기증균사가 나와 다른 균종들과 쉽게 구별할 수 있었다. *Ca. krusei*는 5일까지 색깔변화를 관찰할 수 없지만 7일 후에 옅은 灰色을 띠고 菌集落 표면은 거칠고 건조해 보이면서 불규칙하게 주름져 역시 다른 균종들과 쉽게 구별할 수 있었다. *Sa. cerevisiae*는 7일 후에 옅은 청색을 띠기 시작해 시간이 지나면서 밝은 靑色 菌集落을 형성하였고, *To. glabrata*는 10일이 지나서 옅은 청색을 띠기 시작하여 시간이 지나면서 색깔이 짙어지고 광택있는 菌集落을 형성하였다. 梔子배지에 배양한 이상의 균종들 중에서 菌集落 색깔이 변하는 酵母들은 모두

靑色을 띠지만 *Cr. laurentii*와 *Cr. neoformans*는 옅은 褐色을 띠거나 짙은 褐色 내지 紫褐色을 띠어 다른 균종들과 뚜렷하게 구별되었다. 대체로 *Cr. neoformans*는 시험균주 모두 배양 7일 이내에 갈색 또는 자갈색을 띠는데 균주에 따라 색깔 농도에 다소의 차이는 볼 수 있었다. 그러나 *Cr. laurentii*는 옅은 갈색을 띠고 있어서 *Cr. neoformans* 菌集落과는 다르고 특히 菌集落 표면이 거칠고 건조해 보여서 쉽게 구별할 수 있었다 (Fig. 2). 梔子色素가 함유되어 있지 않은 CPY 배지에서는 Fig. 1과 2에서 보는 바와 같이 *Cr. neoformans*만이 옅은 褐色을 띠었다.

喀痰과 같은 檢體에는 여러가지 酵母菌類가 混在하고 있는 경우가 많기 때문에 이들이 동시에 分離培養 될 때를 想定하여 여러 균종들을 섞어서 배양한 결과 Fig. 2에서 보는 바와같이 역시 *Cr. neoformans*는 짙은 갈색을 띠고 있어서 다른 균종들과 쉽게 구별할 수 있었다. *Cr. laurentii*도 갈색을 띠지만 옅은 색깔이고 표면이 거칠어 쉽게 구별된다. 그 외의 균종들은 색깔이 짙고 옅은 차이는 있지만 群靑色 菌集落으로 증식한다. 그러나 색깔이 빨리 그리고 짙게 변하는 *Ca. guilliermondii*와 *Ca. lusitaniae*는 역시 짙은 청색을 띠고 菌集落 주위의 배지 색깔도 청색으로 변하여 일반적으로 색깔이 변하지 않는 *Ca. albicans*의 菌集落도 배지로부터 청색소를 흡

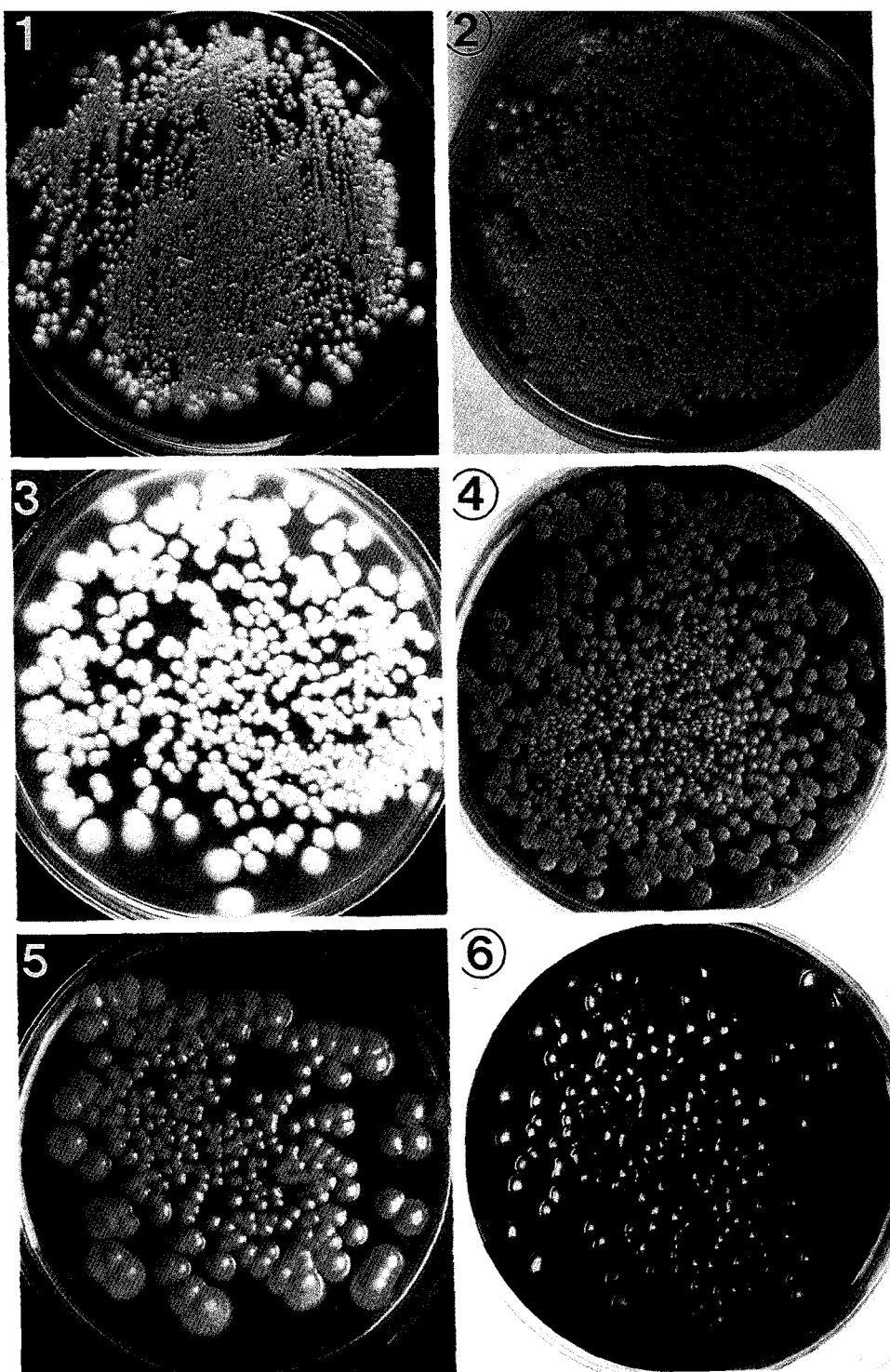


Fig. 1. Colony morphology of the yeasts grown on CPY and GJCPY media.

① ② *Ca. albicans* grown on CPY and GJCPY media, note no color change on GJCPY.

③ ④ *Ca. tropicalis* grown on CPY and GJCPY media, note prussian blue colonies on GJCPY.

⑤ ⑥ *Cr. neoformans* grown on CPY and GJCPY media, note dark brown colonies on GJCPY.

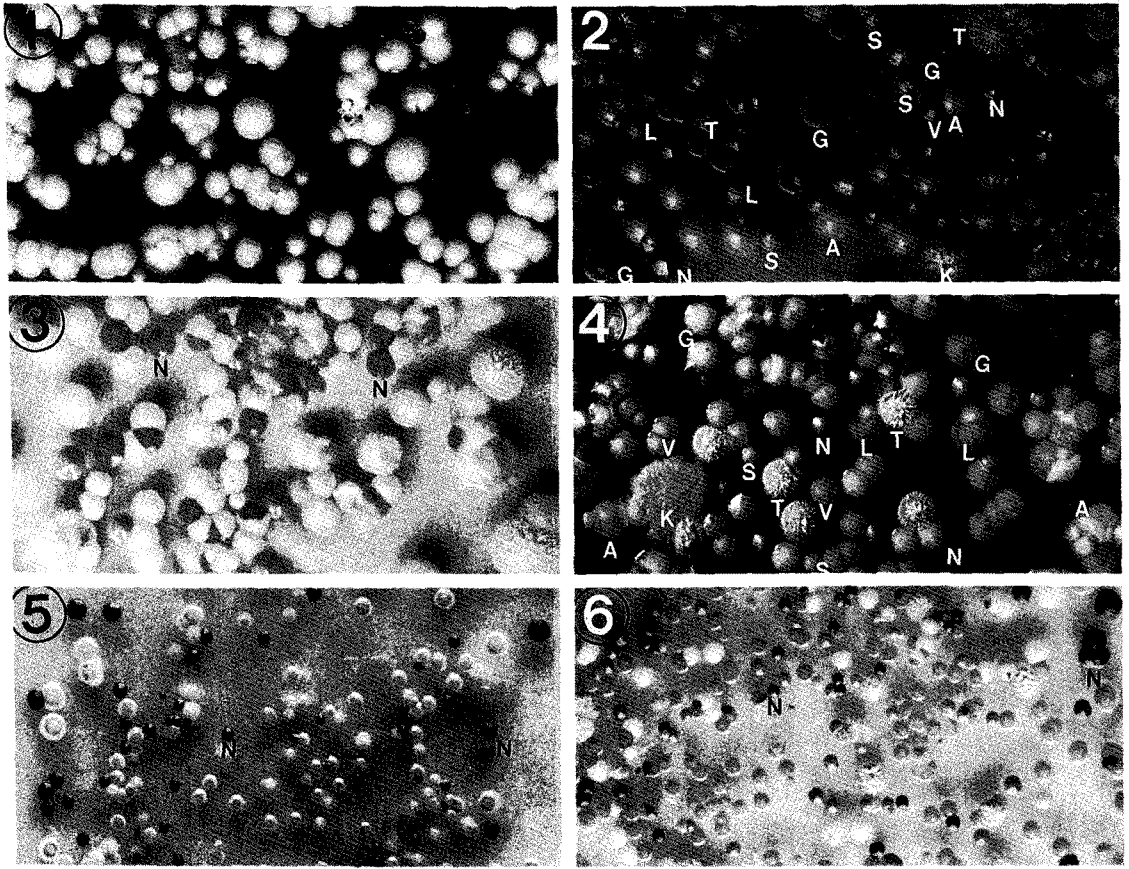


Fig. 2. Colonial colors of the various yeasts in a mixed culture on yeast morphology agar with (2) or without (1) *Ca. jasminoides* pigments, on CPY (3) and GJCPY (4), on dopamine agar (5), and on caffeic acid agar (6). A=*Ca. albicans*, G=*Ca. guilliermondii*, K=*Ca. krusei*, L=*Cr. laurentii*, N=*Cr. neoformans*, S=*Sa. cerevisiae*, T=*Ca. tropicalis*, V=*Ca. viswanathii*

착해 열린 청색을 띠고 있는 것을 볼 수 있었다. *Ca. tropicalis*와 *Ca. krusei*도 비록 그들이 다른 균종들과 혼재해 있어도 그들의 독특한菌集落 형태 때문에 섞이 구별할 수 있었다.

*Cr. neoformans*는 梔子色素가 들어있지 않은 CPY 배지에서도 다른 균종들과는 달리 열린 갈색을 띠어 구별되는데 YMA 배지에서는 색깔을 띠지 않아 다른 균종들과 구별되지 않았다(Fig. 2). 梔子色素가 함유되어 있는 YMA 배지(GJYMA)에 배양한 각종 酵母菌類의 菌集落 형태도 GJCPY에서 관찰된 결과와 크게 다르지 않았다. 다만 GJYMA배지에서는 색깔변화가 다소 지연되는 편이고 균청색으로 빨리 그리고 길게 변하는 균종들의 색상이 다른 균종들과 더욱 선명하게 구별되었다.

Caffeic acid 배지와 dopamine 배지에서는 *Cr. neoformans*만이 짙은 갈색을 띠어 역시 이균종의 분리배양에 유용하다는 사실을 확인할 수 있었다. 그러나 일부 酵母菌類는 dopamine 배지에서 발육이 다소 억제되는 현상을 볼 수 있어서 모든 시험균주가 다 잘 발육하는 caffeic acid 배지가 dopamine 배지보다 더 유용하였다.

梔子色素를 첨가한 CPY 배지(GJCPY)를 이용하여 여러가지 臨床病理檢體로부터 각종 酵母菌類를 분리배양한 결과 Table 3에서 보는 바와같이 가장 많이 검사한 喀痰으로부터 효모균류가 가장 많이 분리배양되었다. 喀痰 84건 중에서 65건(77.4%)으로부터 酵母菌類가 검출되었는데 2種이상 분리된 喀痰은 5건(6.0%)에 불과했고 60건으로부터는 1種만 분리되었다. 臨床病理

Table 3. Isolation of Yeasts from Sputum or Other Clinical Specimens

Specimen	No. of specimens examined	No. of yeasts yielded specimens			
		One or more species	One species	Two species	Three species
Sputums	84	65 (77.4)	60 (71.4)	4 (4.8)	1 (1.2)
Bronchial washings	4	1	1		
Cerebrospinal fluids	6	0			
Pleural fluids	2	1	1		
Biopsy, pus, etc.	8	0			
Total	104	67 (64.4)	62 (59.6)	4 (3.8)	1 (1.0)

() = %

Table 4. Yeasts Species Isolated from Sputum or Other Clinical Specimens and Their Isolation Frequency

Species	No. of cases	Colony forming cells per ml of specimen			
		< 100	101 - 200	201 - 1,000	> 1,000
<i>Candida albicans</i>	57	35 (61.4) ^[3]	10 (17.5) ^[2]	8 (14.0) ^[5]	4 (7.0) ^[3]
<i>Ca. ciferrii</i>	1	1			
<i>Ca. guilliermondii</i>	1				1
<i>Ca. lusitaniae</i>	1	1			
<i>Ca. tropicalis</i>	10	3 (30.0) ^[1]	1	1	5 (50.0)
<i>Rhodotorula minuta</i>	1		1		
<i>Rh. rubra</i>	1	1			
<i>Torulopsis candida</i>	1		1		

() = %

[] = number of cases whose serum showed positive precipitin reaction against *Ca. albicans* antigen on immunodiffusion tests.

檢體로부터 분리배양된 菌種은 모두 8種이었는데 가장 많이 분리된 菌種은 *Ca. albicans*로서 57건의 檢體로부터 검출되었고 그중 34건 (59.6%)으로부터 분리된 균은 檢體 1 ml로부터 100개 미만으로 분리되었다 (Table 4). 200개 이상 분리된 경우는 12건 (21.1%)이었고 이들 가운데서 患者血清으로 실시한 免疫擴散試驗에서 *Ca. albicans* 抗原에 대한 沈降抗體가 검출된 건수는 8건으로 균이 소수로 분리된 35건 중 陽性沈降抗體反應이 3건인 것에 비하면 훨씬 더 많다는 사실을 알 수 있었다. *Ca. albicans* 다음으로 흔히 분리되는 균종은 *Ca. tropicalis*로서 10건의 檢體로부터 검출되었고 균수가 1,000개 이상 많이 분리배양되는 경우가 5건이나 되었다. 그밖의 균종들은 각각 1건의 檢體에서만 분리되었고 *Ca. guilliermondii*를 제외하고는 모두 소수로 분리배양되었다 (Table 4). 소수로 분리되는 기타 菌種으로는

Ca. ciferrii, *Ca. lusitaniae*, *Rhodotorula minuta*, *Rh. rubra* 및 *Torulopsis candida* 등 이었다.

梔子色素가 함유된 一次分離培地에 증식한 菌集落의 색깔변화와 형태를 중심으로 구분하고 그들의 菌種을 同定한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 菌集落의 색깔변화가 1주 이후까지 전혀 없는 경우가 모두 *Ca. albicans*로 同定되었다. 일부 *Ca. albicans* (전체 34주 중 3주)는 열은 회색을 띠었으나 시간이 지나도 더 이상 색깔변화가 없었다. 그 다음으로 흔히 분리배양된 酵母로는 3~7일에 열은 灰青色을 띠고 菌集落이 거칠고 주름진 균주 10주가 모두 *Ca. tropicalis*로 밝혀졌고 *Ca. albicans*와는 一次分離培地에서 쉽게 鑑別할 수 있었다. 그리고 菌集落 색깔은 *Ca. tropicalis*와 비슷하면서 표면이 平滑한 菌株 1주는 *To. candida*로 동정되었다. 菌集落 색깔이 균청색으로 비교적 빨리 (3일후) 변하는

Table 5. Identification of Yeasts Grown on GJCPY Medium Inoculated with Sputum or Other Clinical Specimens

Colony color	Colony morphology	No. of isolates	Species identified by the various biochemical tests
No color even after 15 days	Smb	31	<i>Candida albicans</i>
Light blue after 7 days	S	3	<i>Candida albicans</i>
Grayish blue after 3-7 days	Rsw	10	<i>Ca. tropicalis</i>
	Sg	1	<i>Torulopsis candida</i>
Prussian blue after 3 days	Sf	1	<i>Ca. guilliermondii</i> ,
	S	1	<i>Ca. lusitaniae</i>
Yellow to light pink after 5 days	Tw	1	<i>Ca. ciferrii</i>
Grown as pink colony	S	2	<i>Rhodotorula minuta</i> , <i>Rh. rubra</i>

S=smooth, Smb=smooth and mycelial border, Rsw=rough, striped, and wrinkled, Sg=smooth and glossy, Sf=smooth and flat, Tw=tough and wrinkled

균 2주는 각각 *Ca. guilliermondii*와 *Ca. lusitaniae*로 동정되었고 이들이 다른 菌種들과는 섞이 구별되나 두 菌種을 형태로써 서로 구별할 수는 없었다. 소수로 분리된 *Ca. ciferrii* 1주는 열은 黃褐色의 표면이 거친 菌集落으로 증식했고, *Rhodotorula* spp.는 처음부터 粉紅色 菌集落으로 증식하므로 앞에서 언급한 균들과 쉽게 구별되었다.

考 察

全身的 또는 局所的 防禦機轉에 이상이 있는 개체에 발생하는 機會感染眞菌症은 老齡 인구의 증가와 human immunodeficiency virus 감염의 확산 등으로 인해 점점 증가하고 있는 추세이다. 이와같은 眞菌症에 가장 많이 관련된 菌種으로 *Ca. albicans*와 *Cr. neoformans*를 들 수 있으며 이들의 신속한 分離同定은 신속한 진단과 효율적 환자관리에 큰 도움을 줄 것이다.

臨床病理檢體로부터 *Candida* spp.를 선택적으로 분리배양하기 위해서 polysulfite¹¹⁾나 triphenyl tetrazolium chloride¹²⁾등을 첨가한 배지를 사용하기도 했고, Staib¹³⁾은 *Guizotia abyssinica* 씨앗 抽出物을 첨가한 배지에서 *Cr. neoformans*가 2~6일 후 褐色 菌集落으로 증식하는 것을 관찰하고 이균종의 선택적 分離同定에 유용함을 밝힌 바 있다. 그후 *Gu. abyssinica* 씨앗 抽出

物에 더해 creatinin과 사상균과 세균의 발육을 억제하기 위해 diphenyl과 chloramphenicol 등을 첨가해 비둘기집이나 공기로부터 *Cr. neoformans*를 선택적으로 분리배양하는데 성공하였다¹⁴⁾. 그러나 *Cr. neoformans*는 그외에도 감자, 당근, 잠두 등의 추출물이 함유된 배지에서도 褐色 菌集落을 형성한다는 사실을 관찰했고¹⁵⁾, L-3,4-dihydroxyphenylalanine, chlorogenic acid, protocatechuic acid, catechol, norepinephrine 및 dopamine 등이 포함된 배지에서도 褐色素를 생산한다는 사실을 밝혔다¹⁰⁾. 본실험에서도 梔子色素를 첨가하지 않은 CPY 배지에서 *Cr. neoformans*가 갈색을 띠는 것은 이 배지에 감자 추출물이 첨가되어 있기 때문인 것으로 생각한다. 그러나 梔子色素를 첨가한 배지에서는 훨씬 더 짙은 褐色 내지 紫褐色을 띠어 다른 어느 菌種과도 쉽게 구별되기 때문에 梔子배지가 *Cr. neoformans*의 선택적 분리동정에 매우 유용하다는 사실을 알 수 있었다. Caffeic acid 배지와 dopamine 배지도 *Cr. neoformans*의 선택적 분리동정에 유용하지만 dopamine 배지에서는 일부 酵母菌類의 발육이 억제되었고 그리고 이 두 배지는 *Cr. neoformans*의 분리동정에 유용하지만 梔子배지는 이균종뿐 아니라 *Ca. albicans*를 비롯한 일부 다른 균종의 분리동정에도 유용하기 때문에 咯痰과 같이 각종 酵母菌類가 混在하고 있는¹⁶⁾ 檢體로부터 의학적으로 중요한 酵母菌類의 분리동정에 보다 더

유용한 배지라고 생각한다.

앞서 언급한 각종 기질을 이용해 *Cr. neoformans*가 생산하는褐色素는 melanin으로 밝혀졌는데 梔子배지에서 생산되는褐色素도 비록 화학적으로 입증되지는 않았지만 melanin일 것으로 추정된다. Kwon-Chung 등^{17,18)}이 *Cr. neoformans*의 melanin色素 생산능력을 주요한 發病力因자의 하나로 들고 있다. 즉 이 菌種의 세가지 주요 發病因子로 1) 37°C에서 잘 발육할 수 있어야 하고, 2) 莢膜을 생산할 수 있어야 하며, 3) phenol oxidase를 생산해 적절한 기질로 melanin을 합성 할 수 있어야 한다고 했다. 細胞壁에 침적된 melanin은 宿主의 防禦機轉으로부터 균을 보호하는 것으로 추정되므로 이 균이 특히 腦로 轉移해 病變을 잘 형성하는 것은 뇌에 dopamine이 많아 melanin 합성이 용이하기 때문인 것으로 보고 있다. 만일 이것이 사실이라면 梔子배지에서褐色의 濃度가 다양하게 나타나는 菌株들의 發病力 평가에도 치자배지를 간접적으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

균에 의한 梔子色素의 변화는 1955년에 李, 孫등²⁾이 梔子色素를 첨가한 배지에 人型結核菌을 접종해 배양한 결과 菌集落과 그 주위가 暗靑色으로 변하는 것을 관찰해 보고한 것이 처음이라고 생각된다. 그 후 崔등⁷⁾이 迅速發育 mycobacteria를 梔子培地에 접종하여 배양한 결과 3일에 *Mycobacterium fortuitum-chelonae* complex 菌集落 주위가 暗紫色으로 변해 다른 迅速發育菌과 鑑別이 가능할 것이라고 보고했다. 그동안 梔子色素에 대한 각종 mycobacteria의 반응을 관찰한 바 있으나⁵⁾ 시험균주수가 너무 적고 색깔변화가 시간에 따라 다양하게 나타나는 경우가 많아 앞으로 더 연구검토 되어야 한다고 생각한다. 그리고 梔子色素에 대한 반응이 mycobacteria에 국한되지 않고 *Bacillus subtilis*¹⁹⁾를 비롯한 각종 細菌類에서도 관찰된 바 있다⁶⁾. 그러나 梔子の 黃色素가 균에 의해 靑色 또는 靑紫色으로 변하는데 관련된 酵素나 색소의 화학적 성상에 대한 연구가 많이 이루어져 있지 않다.

梔子色素에 대한 酵母菌類의 반응은 본보기 처음이며 여기서 관찰된 결과가 臨床病理檢體로부터 분리되는 그러한 균들의 분리동정에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 앞서 언급한 *Cr. neoformans*는 그 특징적 색깔로 쉽게 동정 될 뿐 아니라 역시 의학적으로 매우 중요하면서 병리검체로부터 가장 많이 분리되는 *Ca.*

*albicans*도 색깔변화가 없는 점으로 쉽게 감별된다. 비록 본실험에서는 喀痰으로부터 분리되지 않았지만 *Ca. parapsilosis*도 梔子배지에서 색깔을 띠지 않았다. 그러나 *Ca. albicans*는 CPY 배지에서 corn meal 성분 때문에 팡이실과 厚膜胞子(chlamydospore)를 생산하므로 주의해 관찰하면 쉬이 鑑別할 수 있을 것이다. 가장 확실하게 두 균종을 감별하는 방법은 發芽管 시험일 것이다. 본실험을 통해 밝혀진 바와 같이 喀痰처럼 여러 가지 菌種이 섞여 분리배양될 가능성이 높은 檢體라도 가장 흔히 분리되는 *Ca. albicans*가 대부분 단독으로 분리배양되고 2종이상 검출되는 경우는 67건 중 5건(7.5%)에 불과했기 때문에 梔子배지를 *Ca. albicans*의 선택적 分離同定 배지로 이용하는데 문제가 없다고 생각한다. 비록 두가지 이상 발육해도 Fig. 2에서 보는 바와 같이 菌種에 따라 색깔변화시기와 색깔농도에 다양한 차이를 보여주기 때문에 잠정적 同定에 큰 도움이 될 뿐 아니라 梔子色素가 없는 배지에서 구별이 어려운 균들의 同定을 위한 순수배양에도 큰 도움을 준다는 사실을 알 수 있었다. 梔子배지에서 색깔을 띠는 *Candida* spp.는 대부분 群靑色 내지는 灰靑色을 띠는데 *Ca. guilliermondii*와 *Ca. lusitaniae*는 빨리 그리고 짙게 착색되므로 쉬이 구별된다. *Ca. albicans*에 이어 喀痰으로부터 두번째로 흔히 검출되는 *Ca. tropicalis*와 간혹 분리되는 *Ca. krusei*는 색깔변화와 더불어 그들의 특징적 菌集落 형태로 쉽게 다른 균들과 구별할 수 있다.

따라서 梔子배지가 각종 臨床病理檢體로부터 의학적으로 중요한 酵母菌類의 선택적 分離同定에 매우 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

結 論

喀痰이나 기타 病理檢體로부터 의학적으로 중요한 酵母菌類의 分離同定에 橙黃色 梔子色素를 冷水로 추출하여 첨가한 corn meal-potato-yeast extract(GJCPY) 배지의 유용성을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 主要 病原性 酵母인 *Cr. neoformans*의 菌集落은褐色 내지 紫褐色을 띠어 다른 균종들과 쉽게 구별할 수 있었다.

2) 喀痰을 비롯한 각종 病理檢體로부터 가장 많이 분리되는 *Ca. albicans*는 색깔변화가 없어서 다른 균들과 구별되었다.

3) 略痰으로부터 두번째로 흔히 분리되는 *Ca. tropicalis*와 간혹 분리되는 *Ca. krusei*는 색깔변화와 더불어 표면이 거친 그들의 특징적 菌集落 형태로 다른 균들과 감별이 어렵지 않았다.

4) *Ca. guilliermondii*와 *Ca. lusitaniae*는 3일 이내에 靑色을 띠어 7일 이내에 짙은 群靑色을 띠므로 역시 다른 균들과 쉬이 구별되었다.

5) *Torulopsis* sp.는 1주후 광택있는 열은 灰靑色을 띠었고 *Sa. cerevisiae*는 열은 靑色을 띠었지만 다른 균들과 쉬이 구별되지 않는다.

이상의 결과로 보아 梔子배지가 의학적으로 중요한 酵母菌類의 分離同定에 매우 유용함을 알 수 있었다.

REFERENCES

- 1) 이창복 : 대한식물도감. p 694 서울, 향문사, 1989
- 2) 이택주, 손재영 : 식물계로부터 출발한 항균소물질에 관한 연구. 제 5보 : *Fructus Gardeniae*(梔子)를 가한 배지에서의 항산성균의 태도. 중앙가축위생 연구보고, 3:78, 1955
- 3) 봉만전, 정상인, 최철순, 양용태 : 치자(*Fructose gardeniae*)의 수용성 추출액(*crocin* 색소)이 괴팍성 세균의 증식에 미치는 영향. 중앙의대지 8:343, 1983
- 4) 석호봉, 김동성, 김상열, 이택주 : Crocin 첨가배지에서의 우유방염 유래 streptococci의 색소형성에 관한 연구. 한국수의학회지 16:191, 1976
- 5) 이원중 : Mycobacteria의 *Fructus gardenia*에 의한 착색성에 대한 연구. 석사 학위논문. 건국대학교 1975
- 6) 정상인, 최철순, 양용태 : 치자(*Fructose gardeniae*) 수용성 추출액 첨가배지에서의 각종 세균의 *crocin* 반응. 중앙의대지 7:301, 1982
- 7) 최철순, 김재학, 윤용덕, 이현수, 이택주 : Crocin 첨

가 결핵균 배지상의 색소형성에 의한 mycobacteria의 분류. 대한미생물학회지 9:33, 1974

- 8) Kreger-van Rij NJW: The yeasts-a taxonomic study. 3rd Ed, Elsevier Science Publishers B V, Amsterdam, 1984
- 9) Korth H, Pulverer G: Pigment formation for differentiating *Cryptococcus neoformans* from *Candida albicans*. Appl Microbiol 21:541, 1971
- 10) Shaw CE, Kapica L: Production of diagnostic pigment by phenoloxidase activity of *Cryptococcus neoformans*. Appl Microbiol 24:824, 1972
- 11) Nickerson WJ: Reduction of inorganic substance by yeasts. I. Extracellular reduction of sulfide by species of *Candida*. J Infect Dis 93:43, 1953
- 12) Pagano JJ, Levin JD, Trejo, W: Diagnostic medium for differentiation of species of *Candida*. Antibiot Annu 1957-1958, 137, 1958
- 13) Staib F: *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (syn *G. deifera* D C). Z Hyg 148:466, 1962
- 14) Shields AB, Ajello L: Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. Science 151:208, 1966
- 15) Kapica L, Shaw CE: Improvement in laboratory diagnosis of pulmonary cryptococcosis. Can Med Ass J 101:582, 1969
- 16) 김상재, 홍영표, 김신욱 : 폐결핵이나 기타 폐질환환자에서의 진균 합병증. 한국균학회지 16:26, 1988
- 17) Kwon-Chung KJ, Polachek I, Popkin, TJ: Melanin lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. J Bacteriol 150:1414, 1982
- 18) Kwon-Chung KJ, Rhodes JC: Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 51:218, 1986
- 19) 김종남 : 치자색소를 첨가한 배지에서 Lee's phenomenon을 일으키는 조건에 관한 연구. 석사학위논문, 건국대학교, 1978