

酵母共培養法を用いた乳酸菌の新規分離法の開発と ミャンマー産発酵食品からの分離

乙黒美彩^{1)*}, 前田康太郎¹⁾, 岸本宗和¹⁾, 山村英樹²⁾, 安藤勝彦³⁾, Nyunt Phay⁴⁾,
早川正幸²⁾, 柳田藤寿¹⁾

¹⁾山梨大学ワイン科学研究センター 〒400-0005 山梨県甲府市北新 1-13-1

²⁾山梨大学大学院生命環境学域 〒400-0035 山梨県甲府市武田 4-4-37

³⁾独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE), バイオテクノロジーセンター (NBRC)
〒292-0802 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8

⁴⁾Pathein University, Pathein, Myanmar

乳酸菌の分離に一般的に用いられているのは集積培養法や希釈平板法であるが、分離される乳酸菌の種類は優占性や増殖速度に依存している。本研究では酵母との共培養を利用したこれまでに報告例のない新規乳酸菌を効率的に分離することを目的に方法を構築した。さらに、開発した方法を用いてミャンマーの伝統的発酵食品から乳酸菌の希少種を分離し、本手法が多様性評価に有用であるか検証した。

予備試験として既知の乳酸菌 18 種 2 亜種と酵母 6 種を用いた共培養試験 (組み合わせ 114 通り) において、特定の乳酸菌と酵母の組み合わせは、ともに培養することにより乳酸菌の生育を促進あるいは抑制することが明らかとなった。この現象を応用し分離源試料を *Saccharomyces cerevisiae* 等の酵母とともに液体培地中で共培養し、次いで平板分離する酵母共培養法を構築した。本法の有効性を評価するため、ミャンマーの発酵食品 8 点 (魚やエビのなれ鮓、発酵ペースト) を用いて、酵母共培養法および希釈平板法により 52 株の乳酸菌を分離し、16S rDNA 解析による簡易同定を行った。ミャンマー産乳酸菌は 3 属、15 種に配属され、*Lactobacillus* 属が最も多く 85% (44 株) を占めた。16S rDNA 解析に基づく新規推定株は希釈平板法から 1 株、酵母共培養法から 2 株が分離された。*Lactobacillus* 属分離株のなかには近年台湾やタイの発酵食品から分離例のある *L. futsaii* や *L. plajomi* が含まれていたが、いずれも希釈平板法で分離された。一方、*Weissella* 属は *S. cerevisiae* との共培養分離法でのみ分離することが可能であった。これらから、開発した共培養法を発酵食品に適用することで、通常の希釈平板法では分離することができない乳酸菌種が得られることが示された。

キーワード : isolation of lactic acid bacteria, co-culture with yeast

自然環境中ではさまざまな生物や微生物が共生し多様な生態系を形成している。特に、微生物はさまざまな宿主と共生関係を構築することが可能で、その代謝機能は共生により過酷な環境中でも生育ができるように進化してきたものと推察できる。われわれに身近な微生物の共生環境としては発酵食品が挙げられる。伝統的な発酵食品は国や地域などにより多様な食文化が発達しており、特に乳酸菌と酵母の共存により製造される数多くの発酵食品が知られている。乳酸菌は栄養要求性が高いため、生育にはアミノ酸やビタミンなど多くの栄養素が必須である。乳酸菌が酵母と共生することの利点として、これらの栄養源の供給を酵母が担うとともに、酸化ストレスが軽減されることなどが考

えられる。酵母と乳酸菌の共存に関する研究は古く、乳酸菌と酵母の共培養において、乳酸菌や酵母の生育が有意に変化することが報告されている (Nakamura & Hartman, 1961)。近年では、酵母が共存すると酵母が有機酸を資化するために、乳酸などの過剰な酸の生成による乳酸菌の死滅を防ぐことが可能であることなどが明らかにされ (古川・片倉, 2012)、微生物間の相互作用がさまざまな角度から研究されている (Onaka *et al.*, 2011; Furukawa *et al.*, 2015; Sawada *et al.*, 2015)。

ミャンマー連邦は東南アジアのインドシナ半島の西部に位置し、北に中国、東にタイ、ラオス、西にはインド、バングラディッシュに国境を接している。広大な自然環境を擁し、哺乳類、爬虫類、鳥類、植物類を含めるとおよそ 7000 種以上の動植物が生息している。また、乾期と雨期が明確に区別される典型的な熱帯性気候を示す。他の東南アジアの国々同様に部族や民族

*Corresponding author

E-mail: motoguro@yamanashi.ac.jp

Accepted: August 22, 2017

ごとにさまざまな発酵食品文化が受け継がれている。ミャンマーにはエビやカニ、魚といった魚介類を原料にした発酵食品や、豆や野菜といった植物を利用した発酵食品が多く、ンガピ（エビの発酵ペースト）、パゾンチン（エビの馴れずし）、モヒンガ（発酵麺）などが知られている。一方で、これまでにミャンマー産発酵食品に由来する乳酸菌の網羅的な研究は行われておらず、ごく最近になり微生物探索が可能となったために、微生物遺伝子資源保有地域としての潜在的な価値は非常に高いと考えられる。

本研究ではさまざまな発酵食品から新規乳酸菌を効率的に分離するために乳酸菌の新しい分離方法として酵母共培養分離法を開発するとともに、ミャンマーの伝統的発酵食品から乳酸菌を分離することで酵母共培養分離法の有用性を検証し、さらにミャンマーの発酵食品における乳酸菌の系統学的多様性を調査することを目的とした。

各種酵母が乳酸菌の生育に及ぼす影響を調査するため、山梨大学ワイン科学研究センターに保存している酵母6属6種と乳酸菌7属18種2亜種（Table 1）を供試菌株とした。酵母はあらかじめMRS培地（Difco

社製）で生育し、シクロヘキシミドに感受性であることを確認した菌種を使用した。乳酸菌、酵母をそれぞれMRS液体培地（Difco社製）に接種し、30℃、2日間、好気条件下前培養し、MRS液体培地3mlをあらかじめ分注した12ウェルプレート（Thermo scientific社製）に乳酸菌と酵母の前培養液をそれぞれ50μlずつ接種した。比較対象として乳酸菌のみを接種したのもも調整した。本培養はアネロパック角形ジャー（三菱ガス化学社製）にアネロパック・ケンキ（三菱ガス化学社製）を入れ、30℃、2日間嫌気培養を行った。培養液を適宜希釈し、100μlをシクロヘキシミド（和光純薬、50mg/l）を添加したMRS寒天平板に塗布し、再度30℃、2日間嫌気培養し出現コロニー数を計測した。実験は同一条件で2回行い、*S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* および *Pichia fermentans* に関してはさらに追試を行い、計3回の実験から有意差検定を行った。なお、出現コロニー数は平均値で示した。

全部で114通りの組み合わせを試験したところ、*S. cerevisiae*, *K. marxianus* および *P. fermentans* は1回目と2回目の結果は促進や抑制の影響が同様な傾向

Table 1 List of strains used in this study

Strain	Other No.	Type strain
Yeast		
<i>Cryptococcus albidus</i> RIFY 2036	NBRC 1320	No
<i>Kluyveromyces marxianus</i> RIFY 4040	NBRC 0690	No
<i>Pichia fermentans</i> RIFY 4078	NBRC 1164	No
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIFY 1001	W-3	No
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> RIFY 4021		No
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> RIFY 2078	NRRL Y-2548	
Lactic acid bacteria		
<i>Enterococcus faecalis</i> RIFY 5051		No
<i>Lactobacillus alimentarius</i> JCM 1095		Yes
<i>Lactobacillus amylovorus</i> JCM 1126		Yes
<i>Lactobacillus collinoides</i> JCM 1123		Yes
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM 1002		Yes
<i>Lactobacillus farciminis</i> JCM 1097		Yes
<i>Lactobacillus fructivorans</i> JCM 1117		Yes
<i>Lactobacillus gasseri</i> JCM 1131		Yes
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1120		Yes
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RIFY 5050		No
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> NRIC 1541		Yes
<i>Pediococcus acidilactici</i> RIFY 5030		No
<i>Pediococcus pentosaceus</i> RIFY 5031		No
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> RIFY 5053		No
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> RIFY 5052		No
<i>Weissella confusa</i> JCM 1093		Yes
<i>Weissella halotolerans</i> JCM 1114		Yes
<i>Weissella paramesenteroides</i> NRIC 1542		Yes
<i>Weissella minor</i> JCM 1168		Yes

を示したが, *Cryptococcus albidus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Schizosaccharomyces pombe* の3菌種は1回目と2回目の結果に同一の傾向が見られなかった。そこで, *S. cerevisiae*, *K. marxianus* および *P. fermentans* の3菌種を選び3回目の試験を行った。これら3菌種においてコントロールと比較して有意に乳酸菌の生育に促進効果が認められた組み合わせが15通り, 反対に乳酸菌の生育に対して有意に抑制効果が示されたのは18通りであった (Table 2)。促進効果が大きかったのは *P. fermentans* と *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の組み合わせで約47倍であった。抑制効果が大きかったのは *L. farciminis* と *K. marxianus* または *P. fermentans* と共培養した場合で, それぞれ1/14, 1/18にまで生菌数が減少した。一方, *K. marxianus* と共培養すると, 試験した乳酸菌の7種2亜種の生育が抑制される結果となった。*P. fermentans* は10種2亜種に促進または抑制作用があり, *S. cerevisiae* は乳酸菌の生育に及ぼす影響が最も大きく, 11種2亜種で促進あるいは抑制の作用が認められた。

一方, 2回の試験結果で一貫した傾向が認められず有意差は求めていないが, *Z. rouxii* と *L. helveticus* の組み合わせで約24倍, *Schizo. pombe* と *Pediococcus acidilactici* の組み合わせで約22倍の促進作用があった。*C. albidus* は調査した菌株の生育に及ぼす影響は小さく, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* および *Streptococcus salivarius* subsp. *salivarius* に対して影響があったのみであった。しかしながら, これら *C. albidus*, *Z. rouxii*, *Schizo. pombe* の3菌種については, 結果のばらつきが大きく詳細な共培養条件を検討する必要があると考えられた。

以上の結果から試験した酵母6菌種は乳酸菌の生育に影響を与えることが明らかとなった。特に *S. cerevisiae* RIFY 1001, *K. marxianus* RIFY 4040, *P. fermentans* RIFY 4078 の3菌種は乳酸菌の生育に一貫した影響を与え有意差が認められたことから, これら3菌種を乳酸菌との共培養分離法に用いることとした。

ミャンマーのパテイン地区周辺のマーケットより発酵食品を取得し分離源とした。乳酸菌の分離培地にはMRS寒天培地 (Difco社製) を基本培地として, これに抗カビ剤としてシクロヘキシミド 50 mg/l と炭酸カルシウム 0.1 g/l を添加したものをを用いた。培養は30℃にてアネロバック・ケンキ (三菱ガス化学社製) を用いて嫌気培養を行った。各サンプル1gを0.75%生理食塩水に懸濁しサンプル希釈液とした。共培養法は, 酵母3属3種 (*S. cerevisiae* RIFY 1001, *K. marx-*

ianus RIFY 4040, *P. fermentans* RIFY 4078) を30℃で2日間培養したものを本培養とし, 各酵母培養液 50 μ l とサンプル希釈液 50 μ l を, MRS液体培地 3 ml を分注した12ウェルプレート (Thermo scientific社製) に接種し, 30℃で48時間嫌気培養を行った。培養後, 共培養液を適宜希釈し, 100 μ l を分離培地に塗布した。また, 比較対象としてサンプル希釈液を段階希釈後, 各溶液 100 μ l を分離培地に塗布する希釈平板法も行った。各分離法により生育したコロニーを色, 形状の違いから選択し, 単離, 純化した。

乳酸菌の同定はPrepMan[®] ultra reagent (Applied Biosystems, CA, USA) を用い分離株のゲノムDNAを抽出し, これを鋳型としてPCRにてほぼ全長の16S rDNAを増幅させ, ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。各菌株の塩基配列はATGC (ゼネティックス) でアッセンブルを行い, 1,200 bp以上の塩基配列についてEzTaxon (Kim *et al.*, 2012) にて相同性検索を行った。なお, *L. pentosus* と *L. plantarum* の同定には相同性検索において上位の結果を採用した。

はじめに, 酵母共培養法が新規乳酸菌の分離に有効であるかを確認する目的でパゾンチン (エビの馴れずし, No. 198) を用い乳酸菌の分離実験を行った。比較対象として, 希釈平板法による分離も行い, 各分離方法から1株または2株を選択し同定した。希釈平板法では *L. farciminis* および *L. pentosus* が認められ, 希釈平板法では分離されなかった *L. tuccei* が酵母共培養分離法により検出された。また, 新種推定株も分離することができた。以上より共培養分離法により通常の希釈平板法では検出されなかった種や新種推定株が分離され, 新規乳酸菌の分離に本法が有効であると考えられた (Table 3)。次に, 魚の馴れずし (ンガチン) やエビの馴れずし (パゾンチン) から同様に希釈平板法と共培養法を用いて乳酸菌の分離を試みた。*L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. pentosus* はいずれの分離法でも検出可能であったが, *L. formosensis*, *L. mudanjiangensis*, *L. songhuajiangnesis*, *L. tuccei*, *Weissella* 属は共培養分離法でのみ分離することができた。ミャンマーの発酵食品合計8点 (エビの馴れずし, No. 198を含む) から分離した乳酸菌は3属, 15種に配属され, *Lactobacillus* 属が最も多く85% (44株) を占めた (Table 4)。16S rDNA解析に基づく新種推定株は希釈平板法から1株, 酵母共培養法から2株が分離された。

原記載によれば *L. formosensis* は *Aspergillus* 属と

Table 2 Effect of co-culture with yeast strains for growth of lactic acid bacteria

Strain	Number of lactic acid bacteria (7 log CFU/ml)									
	Control	<i>Cryptococcus albidus</i> RIFY 2036 ^a	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> RIFY 2078 ^a	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> RIFY 4021 ^a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIFY 1001 ^b	<i>Kluyveromyces marxianus</i> RIFY 4040 ^b	<i>Pichia fermentans</i> RIFY 4078 ^b			
<i>Enterococcus faecalis</i> RIFY 5051	22	54	350	101	199*	108*	194*			
<i>Lactobacillus alimentarius</i> JCM 1095	21	24	10	192	7	7	6			
<i>Lactobacillus amylovorus</i> JCM 1126	28	10	73	53	77*	32	67*			
<i>Lactobacillus collinoides</i> JCM 1123	20	40	13	11	32	22	4 [†]			
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM 1002	4	10	8	10	11	29*	187*			
<i>Lactobacillus farciminis</i> JCM 1097	54	39	6	2	5 [†]	4 [†]	3 [†]			
<i>Lactobacillus fructivorans</i> JCM 1117	56	31	92	47	162*	51	42			
<i>Lactobacillus gasserii</i> JCM 1131	42	135	32	15	296*	14 [†]	251*			
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM 1120	7	12	169	14	69*	3 [†]	13			
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> RIFY 5050	229	46	114	212	22 [†]	46 [†]	44 [†]			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> NRIC 1541	23	15	14	307	6 [†]	11 [†]	100*			
<i>Pediococcus acidilactici</i> RIFY 5030	27	76	33	592	62*	13	29			
<i>Pediococcus pentosaceus</i> RIFY 5031	93	43	58	893	67	26 [†]	43			
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> RIFY 5053	277	406	93	85	99 [†]	140 [†]	76 [†]			
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> RIFY 5052	208	95	320	149	78 [†]	40 [†]	61 [†]			
<i>Weissella confusa</i> JCM 1093	20	22	23	10	23	11	130*			
<i>Weissella halotolerans</i> JCM 1114	47	66	70	67	122*	40	88			
<i>Weissella paramesenteroides</i> NRIC 1542	2	3	2	3	4	0	1			
<i>Weissella minor</i> JCM 1168	240	295	85	77	132	78	77			

a, value is the mean of duplicate test; b, value is the mean of triplicate test. *S. cerevisiae*, *K. marxianus* and *P. fermentans* performed a statistical analysis.

* significant differences compared to control (P<0.05; t-test), growth acceleration. † significant differences compared to control (P<0.05; t-test), growth suppression.

Table 3 Effect of co-culture method for the isolation of lactic acid bacteria from a food product of fermented shrimp and rice (Pazon Chin, sample No. 198) in Myanmar

Closest species based on 16S rRNA gene sequence similarity rate (%)	Number of strains			
	Ditition method (Control)	Co-culture with		
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIFY 1001	<i>Klyveromyces marxianus</i> RIFY 4040	<i>Pichia fermentans</i> RIFY 4078
<i>Lactobacillus farciminis</i>	1			
<i>Lactobacillus tuccei</i>		1		1
<i>Lactobacillus pentosus</i>	1			1
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>planatarum</i>			1	
<i>Lactobacillus</i> sp.			1*	

* A new species candidate with 16S rDNA similarity of 98.5% compared to the most homologous prototype species.

Table 4 Effect of co-culture method for the isolation of lactic acid bacteria from a food products of fermented shrimp and rice (Pazon Chin) and fermented fish and rice (Ngar Chinin) Myanmar (8 samples)

Closest species based on 16S rRNA gene sequence similarity rate (%)	Number of strains			
	Ditition method (Control)	Co-culture with		
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> RIFY 1001	<i>Klyveromyces marxianus</i> RIFY 4040	<i>Pichia fermentans</i> RIFY 4078
<i>Lactobacillus farciminis</i>	4	2	1	
<i>Lactobacillus fermentum</i>		1	2	
<i>Lactobacillus formosensis</i>				8
<i>Lactobacillus futsaii</i>	1			
<i>Lactobacillus mudanjiangensis</i>				2
<i>Lactobacillus namurensis</i>	1	1	2	
<i>Lactobacillus plajomi</i>	1			
<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	1	1	2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	1	5	1
<i>Lactobacillus songhuajiangensis</i>		1		
<i>Lactobacillus tuccei</i>		1		
<i>Lactobacillus</i> sp.	1*		1*	1*
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	1		1
<i>Weissella cibaria</i>		1		
<i>Weissella paramesenteroides</i>		2	2	

* New species candidate

Lactobacillus 属の菌株により発酵した大豆粕から分離されている (Chang *et al.*, 2015). *L. formosensis* 分離株 8 株はいずれも *P. fermentans* との共培養でのみ分離され、*S. cerevisiae* や *K. marxianus* との共培養では分離されなかったことは、エタノール耐性の違いが影響しているものと考えられた。Clemente-Jimenez *et al.* (2005) の報告では *P. fermentans* のアルコール生成量は最小培地およびブドウ果汁による発酵試験でそれぞれ 2.0 mg/l, 5.0 mg/l となり *S. cerevisiae* (4.0 mg/l および 10.6 mg/l) のおよそ半分であることが示されている。*L. songhuajiangensis* は 2013 年に中国のサワードウーから分離された菌株として初めて記載され

た種である (Gu *et al.*, 2013)。サワードウーは酵母と乳酸菌を共発酵させて作製する伝統的なパン種であり、共培養分離法はこれに着想を得ている。*L. songhuajiangensis* と同定した分離株のエタノール耐性は未調査であるが本研究において *S. cerevisiae* との共培養法でのみ分離することが可能であったことを考慮すると、*L. formosensis* 分離株とは異なり、*L. songhuajiangensis* 分離株は高いアルコール耐性を有しているものと推察できる。

本研究では魚やエビを原料とする馴れずし 8 点から乳酸菌を 52 株分離した。新種推定株も含めるとその内訳は 3 属 17 種に及んだ。16S rDNA 解析に基づく

新種推定株は希釈平板法から1株、酵母共培養法から2株が分離された。*Lactobacillus* 属分離株のなかには近年台湾やタイの発酵食品から分離例のある *L. futsaii* (Chao *et al.*, 2012) や *L. plajomi* (Miyashita *et al.*, 2015) が含まれていたが、いずれも希釈平板法で分離された。一方、*Weissella* 属は *S. cerevisiae* との共培養分離法でのみ分離することが可能であった。Moe *et al.* (2015) もミャンマーの馴れずし8点から43株の乳酸菌を分離し、その微生物フローラを解析している。Miyashita *et al.* (2012) はタイの発酵食品114点から945株を分離し、410株について16S rDNA塩基配列を行い、6属が認められたことを報告している。また、Nguyen *et al.* (2013) はベトナムの伝統的な発酵食品21サンプルから881株を分離し、その分布を明らかにしている。その結果 *L. fermentum* が56.6%、次いで *L. pentosus* (24.4%)、*L. plantarum* (17.1%) が数多く分離され、*Pediococcus* 属がごくわずかに分離されたと報告している。これらの研究結果と比較すると本研究では供試した試料数、分離株数は少ないながらも、酵母共培養法により効率的に多様な乳酸菌が分離できたと考えられた。

本研究においては酵母との共培養法を利用した乳酸菌の新規分離方法を開発し、さらに実際に発酵食品から多様な乳酸菌を分離することができた。本研究で考案した共培養分離法は発酵食品中の微生物が共生関係にあることに発想を得ている。したがって、共培養に利用した *S. cerevisiae* RIFY 1001, *K. marxianus* RIFY 4040, *P. fermentans* RIFY 4078 の3種の酵母は発酵力が高く、エタノールや炭酸ガス以外にも多くの一次、二次代謝産物を生産する (Clemente-Jimenez *et al.*, 2005; Gethins *et al.*, 2015; López-Malo *et al.*, 2013)。分類学的にも近縁な *S. cerevisiae* と *K. marxianus* では試験した乳酸菌の生育パターンはいずれも同様の傾向を示したが、*L. gasseri* や *L. helveticus* の生育には異なる影響を示した。一方、*P. fermentans* では *L. delbrueckii* および *W. confusa* の生育に促進作用が高く認められたことは、酵母の代謝産物が乳酸菌の生育に促進や抑制の作用を示したものと考えられる。本研究で選択した *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *P. fermentans* は生成量に差はあるが、発酵によりいずれもエタノールと炭酸ガスが生成する。今後、これらの物質が生育に与える影響を明らかにすることで分離方法の改良が期待できるが、共培養においては共生菌の存在や共生する細胞同士の接着が必要であるとの報告もあることから、これらのことを考慮し分離方法の改良

を行うべきである。

謝 辞

本研究はJSPS科研費JP26304006ならびに公益財団法人発酵研究所大型研究助成「熱帯地域に生息する超希少微生物の分離探索基盤の構築」を受けて行われたものです。

文 献

- Chang, C.H., Chen, Y.S., Lee, T.T., Chang, Y.C. & Yu, B. 2015. *Lactobacillus formosensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from fermented soybean meal. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: 101-106.
- Chao, S.H., Kudo, Y., Tsai, Y.C. & Watanabe, K. 2012. *Lactobacillus futsaii* sp. nov., isolated from fu-tsai and suan-tsai, traditional Taiwanese fermented mustard products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 489-494.
- Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J. & Rodríguez-Vico, F. 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **98**: 301-308.
- 古川壮一, 片倉啓雄 2012. 乳酸菌と酵母の共存と共生. *日本生物工学会誌* **90**: 188-191.
- Furukawa, S., Isomae, T., Tsuchiya, N., Hirayama, S., Yamagishi, A., Kobayashi, M., Suzuki, C., Ogihara, H. & Morinaga, Y. 2015. Screening of lactic acid bacteria that can form mixed-species biofilm with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**: 681-686.
- Gethins, L., Guner, O., Demirkol, A., Rea, M.C., Stanton, C., Ross, R.P., Yuceer, Y. & Morrissey, J.P. 2015. Influence of carbon and nitrogen source on production of volatile fragrance and flavour metabolites by the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* **32**: 67-76.
- Gu, C.T., Li, C.Y., Yang, L.J. & Huo, G.C. 2013. *Lactobacillus mudanjiangensis* sp. nov., *Lactobacillus songhuajiangensis* sp. nov. and *Lactobacillus nenjiangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional pickle and sourdough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 4698-4706.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S. &

- Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 716–721.
- López-Malo, M., Querol, A. & Guillamon, J.M. 2013. Metabolomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. *PLoS One* **8**: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060135>.
- Miyashita, M., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Malimas, T., Sugimoto, M., Yoshino, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Kirtikara, K., Tanticharoen, M. & Suzuki, K. 2012. 16S rRNA gene sequence analysis of lactic acid bacteria isolated from fermented foods in Thailand. *Microbiol. Cult. Coll.* **28**: 1–9.
- Miyashita, M., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Malimas, T., Sugimoto, M., Yoshino, M., Kamakura, Y., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanaka, N., Nakagawa, Y. & Suzuki, K. 2015. *Lactobacillus plajomi* sp. nov. and *Lactobacillus modestisalitolerans* sp. nov., isolated from traditional fermented foods. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: 2485–2490.
- Moe, N.K.T., Thwe, S.M., Shirai, T., Terahara, T., Imada, C. & Kobayashi, T. 2015. Characterization of lactic acid bacteria distributed in small fish fermented with boiled rice in Myanmar. *Fish Sci.* **81**: 373–381.
- Nakamura, L.K. & Hartman, P.A. 1961. *Lactobacillus*: yeast inter-relationship. *J. Bacteriol.* **81**: 519–523.
- Nguyen, D.T.L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Le Thanh, B. & Vandamme, P. 2013. A description of the lactic acid bacteria microbiota with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *Int. J. Food Microbiol.* **163**: 19–27.
- Onaka, H., Mori Y., Igarashi, Y. & Furumai, T. 2011. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 400–406.
- Sawada, K., Sato, T., Hamajima, H., Jayakody, L.N., Hirata, M., Yamashiro, M., Tajima, M., Mitsutake, S., Nagao, K., Tsuge, K., Abe, F., Hanada K. & Kitagaki, H. 2015. Glucosylceramide contained in koji mold-cultured cereal confers membrane and flavor modification and stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* during coculture fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 3688–3698.

Development of a new method for isolating lactic acid bacteria, and application of the method
to fermented foods in Myanmar

Misa Otoguro¹⁾, Kotaro Maeda¹⁾, Munekazu Kishimoto¹⁾, Hideki Yamamura²⁾, Katsuhiko Ando³⁾,
Nyunt Phay⁴⁾, Masayuki Hayakawa²⁾ and Fujitoshi Yanagida¹⁾

¹⁾The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi,

²⁾Faculty of Life and Environmental Sciences, Graduate School, University of Yamanashi,

³⁾NITE Biological Resource Center, ⁴⁾Patheon University

Enrichment or dilution methods are generally used for isolating lactic acid bacteria (LAB) from natural samples. However, these methods depend on the microbe's predominant characteristics or growth rate. Here, we developed a new method for isolating minor LAB by co-culture with yeast strains. We then used this method to isolate rare and indigenous species in the traditional fermented foods of Myanmar, thus enabling us to determine the taxonomic diversity of LAB there. To analyze the effects of co-culture we tested a combination of 18 species and 2 subspecies of LAB and 6 species of yeast. Interestingly, some specific combinations either accelerated or suppressed LAB growth. Eight fish or prawn products fermented with rice (*ngachin* and *pazun-chin*) were then obtained from the Ayeyawady market in Myanmar for testing. By using co-culture and dilution methods we isolated 52 LAB from these products. Co-culture with yeast resulted consistently in LAB isolation from all samples. The LAB were assigned to 3 genera and 15 species; the genus *Lactobacillus* accounted for 85% (44 strains) of the bacteria in these products. 16S rDNA analysis showed that one new species candidate was isolated by the dilution method, whereas 2 new species candidates were isolated by the co-culture method. *Lactobacillus futsaii* and *Lactobacillus plajomi*, isolated recently from Taiwanese fermented mustard products and from Thai fermented food, respectively, were also detected by the dilution method. However, the genus *Weissella* was isolated only by co-culture with *Saccharomyces cerevisiae*. Thus, co-culture enabled the isolation of rare LAB that are otherwise difficult to isolate by using the normal dilution method. Our results suggest that the development of new methodologies for isolating LAB is highly important for expanding our understanding of their ecology, taxonomy, and distribution.