

豆乳発酵性乳酸菌の分離とその機能性評価

伊藤 理至¹, 西尾 祥吾², 平林 真歩², 宮谷 精二^{3,4}, 芦田 久^{1,2}

要旨

豆乳発酵性の乳酸菌 2 株 (Sakura2 株と Sakura9 株) をヤエザクラの花より単離した。16S リボソーム RNA 遺伝子配列から、Sakura2 株は *Streptococcus salivarius*、Sakura9 株は *Enterococcus faecium* であると推定された。これらの 2 株は、検討した条件において、豆乳をそれぞれ 3.42 ± 0.17 、 4.33 ± 0.25 時間 (平均 \pm 標準偏差) で凝固させることができた。比較に用いた *Lactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Streptococcus* 属の菌株では、同条件で 2 倍ないしはそれ以上の発酵時間を要した。マウス脾臓細胞を用いたインターフェロン γ 産生促進試験においては、Sakura2 株と Sakura9 株の加熱死菌体は、市販ヨーグルトに使用されているプロバイオティクス乳酸菌株の死菌体に比較してより強い促進活性が見られた。Th1 サイトカインであるインターフェロン γ の産生を促進したことから、本菌を用いて調製された豆乳発酵食品を経口摂取することで細胞性免疫の活性化効果とアレルギーの抑制効果が期待できる。

キーワード：サイトカイン、インターフェロン γ 、乳酸発酵、プロバイオティクス、豆乳

1. 緒論

ヨーグルトは乳酸菌を用いて牛乳を乳酸発酵させた発酵食品である。ヨーグルトのスターター (種菌) として最も一般的な乳酸菌は、*Streptococcus thermophilus* と *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* の組合せであるが、この他にも *L. gasseri*、*L. casei*、*L. rhamnosus*、*L. brevis* などのさまざまな乳酸菌が市販ヨーグルトや発酵乳のスターターとして使われている。これらの乳酸菌は牛乳中のラクトースを資化して、乳酸発酵により乳酸を生成する。乳酸により pH が低下して乳中のカゼインの等電点である pH 4.6 付近になることで、乳が凝固する。

豆乳を原料にしてヨーグルト様の発酵乳を調製する場合、ヨーグルト用のスターターでは良好な乳酸発酵が得られない場合が多い。豆乳に含まれる糖質はラクトースではなく、スクロース、メリビオース、ラフィノースなどであるためである⁽¹⁾。豆乳の発酵に適した乳酸菌が探索されているが、長時間の発酵が必要な場合がほとんどである⁽²⁻⁹⁾。そこで、より優れた豆乳発酵性を示す乳酸菌を自然界から分離して、その機能性評価を行うことを目的とした。

受付日 2020 年 12 月 24 日、受理日 2021 年 2 月 22 日

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学生物理工学部 食品安全工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 株式会社 北岡本店 〒639-3111 奈良県吉野郡吉野町上市 61

4. 宮谷自然科学研究所 〒351-0101 埼玉県和光市白子 2-17-35-601

2. 材料と方法

2.1 使用菌株

Sakura2 株と Sakura9 株は、神奈川県小田原市のヤエザクラの花より分離した。Sakura2 株と Sakura9 株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構(千葉)にそれぞれ NITE P-02785、NITE P-02786 として寄託した。比較に使用した NBRC (NITE Biological Resource Center) 株の乳酸菌は独立行政法人製品評価技術基盤機構より入手した。その他の比較に用いた乳酸菌は市販発酵乳や野菜等より分離した。

2.2 培養方法

Sakura2 株と Sakura9 株は酒粕ろ過培地を用いて分離した。酒粕ろ過培地は、20%の酒粕 (w/v) を火にかけ粉碎しながらよく混合して沸騰させ、キッチンペーパーでろ過した後、水で Brix を 5.0%に調整し、121°Cで 15 分間オートクレーブした。ヤエザクラの花を酒粕ろ過液体培地に接触させ、30°Cで 24 時間の静置培養後に MRS 寒天培地 (Difco-BD、NJ、USA) を用いて分離した。*Streptococcus salivarius* NBRC 13956、*S. thermophilus* NBRC 13957、*S. thermophilus* NBRC 111149 はトリプシケースソイブロス (BD、NJ、USA) を用いて 30°Cで培養した。その他の比較に用いた乳酸菌は MRS 培地を用いて 30°Cで培養した。

2.3 豆乳発酵試験

市販の固形成分 10%豆乳 (スジャータめいらく、愛知) を 90°Cで 30 分間加熱滅菌し、15mL 滅菌チューブに 5mL ずつ分注し、そこにトリプシケースソイブロスまたは MRS 液体培地で培養した乳酸菌 5×10^7 個を添加し、37°Cで保温した。豆乳が凝固してチューブを転倒させても落下しなくなるまでの時間を測定し豆乳凝固時間とした。試験は 3 連で、独立に 5 回実施した。

2.4 糖資化試験

API50CHL 培地 (シスメックス・ビオメリュー、東京) を使用し、30°Cで 48 時間培養後に判定した。

2.5 人工胃液耐性、胆汁酸耐性試験

人工胃液は、0.04% (w/v) のペプシン (和光純薬、大阪) 水溶液に塩酸を加え pH2.5 に調整した。MRS 液体培地で培養した菌体を OD600 = 1.0 となるように人工胃液に懸濁し、37°Cで 1-3 時間インキュベートした。遠心分離した後 1mL の PBS で 1 回洗浄し、PBS で段階希釈して MRS 寒天培地に塗布しコロニー数を計測した。胆汁酸耐性は、0.1% (w/v) のコール酸ナトリウム (和光純薬) 水溶液に菌体が OD600 = 1.0 となるように懸濁し、37°Cで 2 時間インキュベートした後の生菌数を計測した。

2.6 免疫賦活試験

8-10 週齢オス C57BL/6J Kwl SPF マウス (紀和実験動物研究所、和歌山) は、AIN-93M 飼料 (オリエンタル酵母工業、東京) と水を自由摂取させ、温度 $20.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 30\%$ 、12 時間おきの明暗サイクルの条件下で飼育した。過剰麻酔で安楽死させたマウスから脾臓を摘出し、10% (v/v) の非動化ウシ胎児血清 (ニチレイバイオサイエンス、東京) を添加した RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich、MO、USA) 10 mL を加え細胞をほぐし、70 μm のセルストレーナー (VCS-70、

アズワン、大阪) を用いて凝集塊を除いた。遠心分離 (2500 rpm、4°C、10 分) により細胞を沈殿させ、0.85 % (w/v) 塩化アンモニウムを 5 mL 加えて懸濁し、室温で 5 分間静置することで赤血球を溶血させた。その後、上述の培地 5 mL を加えて遠心分離を行った。細胞を培地で洗浄した後、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 Hybri-Max (Sigma-Aldrich) を 0.1 % (v/v) 添加した培地で 2.0×10^6 mL に調製し、24 穴プレートに 1 mL ずつ分注した。

評価に用いる乳酸菌は、MRS 液体培地を用いて 30 °C で 3 日間静置培養し、PBS で洗浄した後、25、50、100 mg/mL (湿菌体重量濃度) に調製し 100 °C で 10 分間加熱した。マウス脾臓細胞を分注した各ウェルにこれらの乳酸菌死菌体を 10 μ L 加え、5% CO₂ 存在下 37 °C で 3 日間培養した。

培養上清中のインターフェロン γ (INF- γ) 濃度は、Mouse INF- γ OptEIA ELISA Set と OptEIA Reagent Set B (Cat. No. 555138、5505341、BD) を用いて測定した。

動物実験は、近畿大学生物理工学部 動物実験小委員会の承認を得て (承認番号 KABT-25-003)、近畿大学動物実験規定に従い実施した。

3. 結果

3.1 豆乳発酵性乳酸菌の分離

ヤエザクラの花から酒粕ろ過培地を用いて分離した乳酸菌の豆乳発酵性を調べたところ、Sakura2 株と Sakura9 株の 2 菌株に良好な発酵性が認められた。16S リボソーム RNA 遺伝子配列を解析したところ、Sakura2 株は BLAST に登録されている *Streptococcus salivarius* の主要な株と 99.3% (1303/1312 塩基)、Sakura9 株は *Enterococcus faecium* の主要な株と 96.7–96.8% (1258–1260/1301 塩基) の相同性を示した。Sakura9 株と *E. faecium* の 16S リボソーム RNA 遺伝子配列の相同性は約 97% とやや低いが、*E. faecium* と見なした。

方法に記載の条件で市販豆乳の発酵試験を行ったところ、Sakura2 株と Sakura9 株はそれぞれ 3.42 ± 0.17 、 4.33 ± 0.25 時間 (平均 \pm 標準偏差) で豆乳を凝固させることができた (表 1)。一方、比較に用いた *Lactobacillus* 属、*Leuconostoc* 属、*Streptococcus* 属の菌株では、同条件で 2 倍

表 1. 豆乳の凝固時間

<i>Streptococcus salivarius</i> Sakura2	3.42 ± 0.17
<i>Enterococcus faecium</i> Sakura9	4.33 ± 0.25
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 3074	7.75 ± 0.17
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 14712	7.25 ± 0.25
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 101977	8.04 ± 0.21
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 15891 ^T	6.75 ± 0.25
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 3070	6.88 ± 0.13
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 12006	8.08 ± 0.17
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 14713	7.13 ± 0.21
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 101973	6.38 ± 0.21
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 101975	7.13 ± 0.21
<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC 109604	7.25 ± 0.25
<i>Lactobacillus plantarum</i> HOKKAIDO	7.29 ± 0.13
<i>Lactobacillus plantarum</i> SN13T	8.08 ± 0.08
<i>Lactobacillus sakei</i> NBRC 3541	>12
<i>Lactobacillus sakei</i> NBRC 107130	6.88 ± 0.29
<i>Lactobacillus sakei</i> NBRC 15893 ^T	9.96 ± 0.38
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
subsp. <i>dextranicum</i> NBRC 100495 ^T	>24
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
subsp. <i>mesenteroides</i> NBRC 3832	10.17 ± 0.17
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
subsp. <i>mesenteroides</i> NBRC 12060	10.04 ± 0.13
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
subsp. <i>dextranicum</i> NBRC 3349	>12
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
subsp. <i>mesenteroides</i> NBRC 100496 ^T	>12
" <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
subsp. <i>sakei</i> " NBRC 102481	>12
<i>Leuconostoc</i> sp. NBRC 102475	6.33 ± 0.17
<i>Streptococcus salivarius</i> NBRC 13956	8.50 ± 0.17
<i>Streptococcus thermophilus</i> NBRC 13957	6.46 ± 0.29
<i>Streptococcus thermophilus</i> NBRC 111149	8.63 ± 0.21

各 3 連で独立に 5 回の試験を実施した。値は平均 \pm 標準偏差 (時間) を示す。

ないしはそれ以上の発酵時間を要した。豆乳発酵性が報告されている *L. plantarum* HOKKAIDO 株⁽³⁾と比較しても、約半分の時間で豆乳が凝固するという、良好な発酵性を示した。

3.2 糖資化性

Sakura2 株と Sakura9 株の糖資化性試験の結果を示す (表 2)。Sakura2 株は D-ラクトースと D-ガラクトースの資化性が無い点が *Streptococcus salivarius* の特徴と一致した。また、Sakura9 株は D-キシロースの資化性が有り、D-ソルビトールと配糖体アミグダリンの資化性が無い点が、*Enterococcus faecium* の特徴と一致した。Sakura2 株はダイズに比較的多く含まれる三糖であるラフィノース (Gal α 1-6Sucrose) の資化性が見られ、また Sakura9 株には D-キシロースや L-アラビノースといった植物に多く含まれるペントースを資化し、弱いながらも大豆に多い二糖であるメリビオース (Gal α 1-6Glc) の資化性も見られた。MRS 培地で培養した場合にガスの発生が見られなかったことから、両株ともにホモ乳酸発酵菌であると判断された。

表 2. 糖資化性試験

Sugars	Sakura2	Sakura9	Sugars	Sakura2	Sakura9
Monosaccharides			Sugar alcohols		
D-Glucose	+	+	Inositol	-	-
D-Galactose	-	+	D-Mannitol	-	w
D-Fructose	+	+	D-Sorbitol	+	-
D-Mannose	+	+	L-Arabitol	-	-
D-Xylose	-	+	Xylitol	-	-
L-Xylose	-	-	Erythritol	-	-
D-Arabinose	-	-	Glycerol	-	-
L-Arabinose	-	+	Glycosides		
D-Ribose	-	+	Amygdalin	+	-
L-Rhamnose	-	-	Arbutin	+	+
N-Acetylglucosamine	w	+	Aesculin	+	+
L-Fucose	-	-	Salicin	+	+
D-Fucose	-	-			
L-Sorbose	-	-			
Di- and tri-saccharides					
D-Cellobiose	+	+			
D-Maltose	+	+			
D-Lactose	-	+			
D-Melibiose	-	w			
D-Sucrose	+	+			
Trehalose	+	w			
D-Raffinose	+	-			
Gentiobiose	+	w			
D-Turanose	-	+			

API50CHL 培地を用いた。+, 良好な生育; w, 弱い生育; -, 生育なし。

3.3 人工胃液耐性と胆汁酸耐性

0.04%のペプシンを含む pH 2.5 の人工胃液に菌体を懸濁し、37°Cで 1-3 時間インキュベートした後の生菌数を計数し生存率を求めた (図 1)。Sakura9 株は高い生存率を示し、1-2 時間の処理

では90%以上、3時間の処理においても50%以上の生存率を示した。これは、当研究室でこれまでに野菜より単離した乳酸菌の中で高い耐性を示すことがわかっている *Pediococcus pentosaceus* KN01 や *L. plantarum* KN02 よりも高い生存率であった。Sakura2 株は人工胃液耐性が低く、1時間の処理で死滅した。他の *E. faecium* 株 (NBRC 3535、NBRC 100485、NBRC 100486、NBRC 100487、NBRC 100488、NBRC 100602、NBRC 113009) の耐酸性試験も実施したが、これらの株は3時間の処理で完全に死滅した (データ示さず)。

代表的な一次胆汁酸で殺菌活性が強いコール酸ナトリウム 0.1%水溶液に菌体を懸濁し、37°Cで2時間インキュベートした後の生存率を測定したところ、Sakura2 株は生菌数 0、Sakura9 は18%であった。*P. pentosaceus* KN01 と *L. plantarum* KN02 はいずれも1%以下であった。

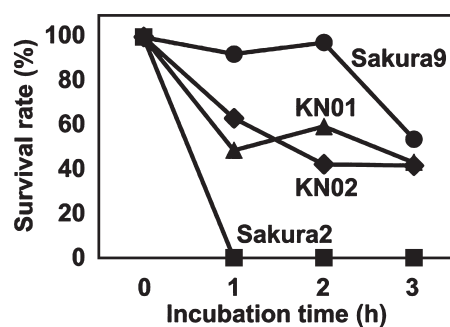


図1. 人工胃液耐性試験

人工胃液に菌体を懸濁し、37°Cでインキュベートした後の生存率を測定した。

KN01, *P. pentosaceus* KN01; KN02, *L. plantarum* KN02。

3.4 免疫賦活活性

Sakura2 株と Sakura9 株の免疫賦活活性を評価するために、マウス脾臓細胞にこれらの株の加熱死菌体を添加して培養し、培養上清に分泌されたインターフェロン γ (IFN- γ) 濃度を ELISA 法により測定した。比較のため、市販発酵乳から分離したプロバイオティクス乳酸菌 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (L.d.b.)、*L. gasseri* (L.g.)、*L. brevis* (L.b.)、および当研究室で野菜から分離した *L. sakei* 606 株と *L. helveticus* 616 株を評価に加えた。おそらく試験した乳酸菌の濃度 (0.25、0.50、1.00 mg/mL) が高かったため濃度依存性はあまり見られないが、最も濃度の低い 0.25 mg/mL で比較すると、Sakura2 株と Sakura9 株は市販のプロバイオティクス株よりも IFN- γ 産生促進活性が強く、野菜由来の一般的な乳酸菌である *L. sakei* 606 株や *L. helveticus* 616 株と比較すると極めて強い活性を示した。死菌体 0.25 mg/mL 添加区における IFN- γ 産生量は、Sakura2 株では 6.25 ng/mL、Sakura9 株では 5.49 ng/mL であった。

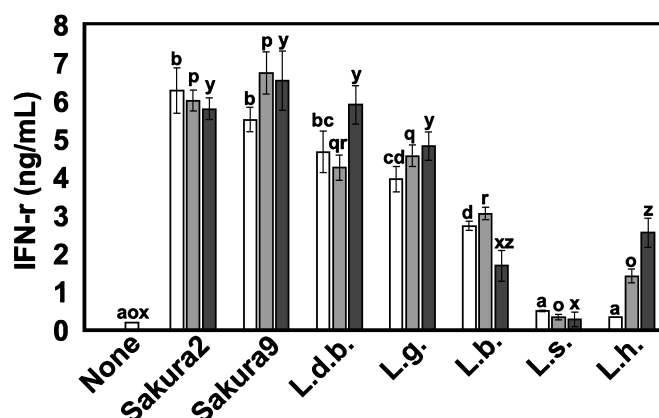


図2. マウス脾臓細胞に対する IFN- γ 産生促進試験

マウス脾臓細胞に、各乳酸菌の死菌体を 0.25 (白)、0.50 (グレー)、1.00 (黒) mg/mL になるよう添加し 3 日間培養し、培養上清中の IFN- γ 濃度を ELISA 法で測定した。誤差バーは ELISA 3 連測定の標準誤差を示す。同じ菌濃度間で異なる符号は、有意水準 5% の Tukey 検定の結果、有意な差があることを示す。L.d.b., *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、L.g., *L. gasserii*、L.b., *L. brevis*、L.s., *L. sakei* 606 株、L.h., *L. helveticus* 616 株。

4. 考察

ヤエザクラより分離した 2 株の乳酸菌 Sakura2 株と Sakura9 株は、16S rRNA 遺伝子の配列からそれぞれ *S. salivarius*、*E. faecium* であると推定された。後者の相同性は約 97% とやや低く、今後精査する必要がある。

豆乳の発酵試験においては、Sakura2 株と Sakura9 株は市販の発酵豆乳に使用されている株を含め比較した全ての株よりも短時間で発酵が進行した。豆乳中には糖質が約 3% 含まれ、これは牛乳における含量よりも少ない。構成糖はフルクトース、グルコースなどの単糖、マルトース、マルトトリオース、スクロース、メリビオース、ラフィノース、スタキオースなどのオリゴ糖である⁽¹⁾。大豆オリゴ糖を特徴付けるのは、非還元末端に α 結合のガラクトースが付加したメリビオース、ラフィノース、スタキオースである。Sakura2 株はラフィノース、Sakura9 株はメリビオースの資化性があるため、 α -ガラクトシダーゼを保有しているものと考えられる。今後、グリコシダーゼ活性の評価もおこなう計画である。

Sakura9 株は人工胃液と胆汁酸に対して高い耐性を示した。生菌を含む食品を摂取した場合に、生存したまま腸に到達するというプロバイオティクスとして有望な性質といえる。ただし、*E. faecium* の中には抗生物質耐性をもち日和見感染を引き起こす菌株が含まれるので⁽¹⁰⁾、生菌を含む食品に応用展開する場合には安全性についての検討が必要である。Sakura2 株は人工胃液と胆汁酸に対して耐性を示さなかった。*S. salivarius* は口腔内の善玉菌としてはたらき、サリバリシンと呼ばれるバクテリオシンを生産することでむし菌菌 *S. mutans* や歯周病菌の増殖を抑制する

ことが報告されている^(11,12)。口腔内で機能を発揮する場合には、胃液や胆汁酸への耐性は必要ない。

免疫調節機能を有する乳酸菌の報告は多く、豆乳発酵性の乳酸菌についてもいくつかの報告がある^(13,14)。Sakura2 株と Sakura9 株はともに、マウス脾臓細胞に作用して、IFN- γ の産生を強く促進した。脾臓には樹状細胞、マクロファージ、B細胞、T細胞が集積している。T細胞はさらにキラーT細胞とヘルパーT細胞に、後者はさらに Th1、T2、Th17、Treg などのサブセットに分類される。IFN- γ は主に Th1 から分泌され、マクロファージ、キラーT細胞、ナチュラルキラー細胞を刺激し細胞性免疫を活性化することで、細菌やウイルスに対する抵抗性を高める⁽¹⁵⁾。また、ナイーブヘルパーT細胞 (Th0) から Th1 への分化を促進するため、相対的に Th2 を抑制することでアレルギー傾向を緩和させる⁽¹⁶⁾。脾臓と同様の免疫細胞は小腸のパイエル板にも集積していることから、Sakura2 株と Sakura9 株の経口摂取により細胞性免疫の活性化効果とアレルギーの抑制効果が期待できる。これらの活性は死菌体で見られることから、熱に安定な成分の関与が示唆される。乳酸菌の免疫賦活成分としては、細胞表面に局在しているリポテイコ酸が報告されている⁽¹⁷⁾。今後は、活性化成分の特定や、活性化成分の認識に関わる免疫細胞側の受容体の特定をおこなう計画である。

5. 利益相反

著者の宮谷は株式会社北岡本店の技術顧問である。また、近畿大学においては株式会社北岡本店からの受託研究費で研究を実施した。

6. 参考文献

1. 垣田浩孝ら (1998) 順相 HPLC による単糖とオリゴ糖の同時分析法. 食品衛生学雑誌 39(5), 333–340.
2. Scalabrini, P. *et al.* (1998) Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 39, 213–219.
3. 中川良二ら (2005) *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO を用いた豆乳ヨーグルトの製造およびその機能性. 日本食品科学工学会誌 52(3), 140–143.
4. Chun, J. *et al.* (2008) Hydrolysis of isoflavone glucosides in soymilk fermented with single or mixed cultures of *Lactobacillus paraplantarum* KM, *Weissella* sp. 33, and *Enterococcus faecium* 35 isolated from humans. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 573–578.
5. Kaneko, D., Igarashi, T., Aoyama, K. (2014) Reduction of the off-flavor volatile generated by the yogurt starter culture including *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in soymilk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 1658–1663.
6. Havas, P. *et al.* (2015) Performances of new isolates of *Bifidobacterium* on fermentation of soymilk.

- Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 62, 463–475.
7. Livia Dias de Queirós, Juliana Alves Macedo, Gabriela Alves Macedo (2016) A new biotechnological process to enhance the soymilk bioactivity. Food Science and Biotechnology 25, 763–770.
 8. Biscola, V. *et al.* (2017) Soymilk fermentation by *Enterococcus faecalis* VB43 leads to reduction in the immunoreactivity of allergenic proteins β -conglycinin (7S) and glycinin (11S). Beneficial Microbes 8, 635–643.
 9. Zheng, Y. *et al.* (2020) A potential flavor culture: *Lactobacillus harbinensis* M1 improves the organoleptic quality of fermented soymilk by high production of 2,3-butanedione and acetoin. Food Microbiology 91, 103540.
 10. Gao, W., Howden, B.P., Stinear, T.P. (2018) Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. Current Opinion in Microbiology 41, 76–82.
 11. Lakshminarayanan, B. *et al.* (2013) Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the intestinal microbiota of elderly Irish subjects. Journal of Applied Microbiology 114, 886–898.
 12. Wescombe, P.A. *et al.* (2012) Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. Future Microbiology 7, 1355–1371.
 13. Nishimura, M. *et al.* (2015) Effects of yogurt containing *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO on immune function and stress markers. Journal of Traditional and Complementary Medicine 6, 275–280.
 14. Wachi, S. *et al.* (2014) *Lactobacillus delbrueckii* TUA4408L and its extracellular polysaccharides attenuate enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced inflammatory response in porcine intestinal epitheliocytes via Toll-like receptor-2 and 4. Molecular Nutrition & Food Research 58, 2080–2093.
 15. Shida, K. *et al.* (2006) Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokines and augment natural killer cell activity. Clinical and Vaccine Immunology 13, 997–1003.
 16. Shida, K. *et al.* (1998) *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. International Archives of Allergy and Immunology 115, 278–287.
 17. Okamoto, M. *et al.* (2001) Enhancement of anti-cancer immunity by a lipoteichoic-acid-related molecule isolated from a penicillin-killed group A *Streptococcus*. Cancer Immunology, Immunotherapy 50, 408–416.

Isolation and characterization of soymilk fermenting lactic acid bacteria

Takayuki Ito¹, Shogo Nishio², Maho Hirabayashi², Seiji Miyatani^{3,4}, Hisashi Ashida^{1,2}

Two soymilk fermentable lactic acid bacteria, strains Sakura2 and Sakura9, were isolated from cherry blossoms “Yaezakura”. From the 16S ribosomal RNA gene sequencing, it was estimated that the Sakura2 strain was *Streptococcus salivarius* and the Sakura9 strain was *Enterococcus faecium*. In both strains, soymilk could be coagulated in 3.42 ± 0.17 and 4.33 ± 0.25 hours (mean \pm SD), respectively, under the conditions examined. Several strains of the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Streptococcus* used for comparison required twice or more fermentation time under the same conditions. In the interferon- γ production promoting test using mouse spleen cells, the heat-killed cells of both strains showed stronger promoting activity than the heat-killed cells of the probiotic lactic acid bacterial strains used in commercial yogurt. Since these strains promoted the production of interferon- γ , which is a Th1 cytokine, it is expected that fermented soymilk foods prepared using these bacteria exert cell-mediated immunity activation and antiallergic activity when taken orally.

Key words: cytokine, interferon- γ , lactic acid fermentation, probiotics, soymilk,

Received 24 December 2020, Accepted 22 February 2021.

1. Major in Biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan
2. Department of Science and Technology on Food Safety, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama 649-6493, Japan
3. Kitaoka-Honten, Co., Ltd., 61 Kamiichi, Yoshino-cho, Nara 639-3111, Japan
4. Miyatani Natural Science Institute, 2-17-35-601, Shirako, Wako, Saitama 351-0101, Japan