



Title	Metabolomics-based Study for Investigating the Effect of Microbial Interventions in Tempe Soaking Step
Author(s)	Riyanto, Rifqi Ahmad
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/103200
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (RIFQI AHMAD RIYANTO)	
Title	Metabolomics-based Study for Investigating the Effect of Microbial Interventions in Tempe Soaking Step (微生物介入がテンペの浸漬段階に及ぼす影響を調査するためのメタボロミクス研究)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Tempe is a traditional Indonesian food produced through the solid-state fermentation of legumes, primarily soybeans, using <i>Rhizopus</i> spp. mold. It is a staple source of protein and is recognized for its functional health benefits. The production process of tempe involves several steps: soaking, dehulling, cooking, inoculating with a starter culture, packaging, and allowing for fungal fermentation. Variations in tempe production mainly arise during the soaking and cooking stages. Soaking is essential, as it hydrates the soybeans, removes anti-nutritional factors, enhances protein bioavailability, inhibits harmful microorganisms, and supports the growth of the tempe starter culture. However, due to variations in climate and processing methods, natural acid fermentation may not consistently occur, particularly in temperate climates. To address this issue, several chemical and microbial modifications have been implemented during the soaking step to ensure effective acidification. Despite this, comprehensive information regarding the metabolite profile of tempe produced with these modifications during soaking is still limited. Consequently, this study aims to investigate the impact of microbial intervention during the tempe soaking step on its metabolome. Prior to tempe fungal fermentation, soybeans were soaked with <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> NBRC 101978 and <i>Pichia burtonii</i> NBRC 0844. Tempe samples were subjected to comprehensive analysis using a widely targeted gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) metabolomics approach. A total of 100 metabolites of sugars, amino acids, fatty acids, and organic acids were annotated in all samples. Principal component analysis (PCA) showed that microbial interventions led to alterations in the metabolome of all samples, including the accumulation of amino acids in lactic acid bacteria (LAB) soaked-soybean tempe and biogenic amine, tyramine, in yeast soaked-soybean tempe. Unlike chemically added soaked-soybean tempe, microbial intervention significantly reduced the relative intensity levels of several sugars, including antinutrient raffinose, by more than two-fold. Furthermore, microbial interventions in the tempe soaking step significantly elevated the levels of several bioactive metabolites more than two-fold. Further study seeks to investigate the effect of different lactic acid bacteria species (<i>Limosilactobacillus fermentum</i> and <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>) and inoculum sizes (2.5, 5, 10% v/v) applied in tempe soaking on the metabolome of tempe. Tempe samples underwent thorough analysis using a widely targeted GC-MS metabolomics approach. A total of 86 metabolites, including sugars, amino acids, fatty acids, and organic acids, were annotated in all the samples. PCA showed that different LAB led to alterations in the metabolome of tempe with sugars being more abundant in <i>L. fermentum</i> treatment while <i>L. plantarum</i> treatment was dominated by amino acids and others. Additionally, PCA indicated that variations in inoculum size influenced the metabolite profile of tempe, with the metabolites contributing to the separation were from organic acid, amino acid, and sugar groups. The differentiation of lactic acid bacteria species significantly influences the metabolome of tempe, specifically affecting the antinutrient and bioactive compounds. In contrast, variations in inoculum size do not demonstrate a notable impact in terms of isoflavones and biogenic amine reduction. This research highlights the potential of microbial interventions during soybean soaking, benefiting other soy-based fermented foods.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (RIFQI AHMAD RIYANTO)		
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査 教授	福崎 英一郎
	副査 教授	本田 孝祐
	副査 教授	青木 航

論文審査の結果の要旨

本論文は、インドネシアを代表する伝統的発酵食品であるテンペの製造工程において、特に重要な「浸漬工程」に焦点を当て、この段階における微生物介入がテンペの代謝プロファイルに及ぼす影響を包括的に明らかにしたものである。テンペは大豆を主原料とし、カビ (*Rhizopus* 属) による固体発酵を経て製造される食品であり、高い栄養価と機能性を有することから、インドネシアのみならず世界的に注目されている。その製造工程のうち、浸漬は大豆の水和や抗栄養因子の除去、タンパク質の消化性向上、雑菌抑制、スター培養の生育促進など、多様な役割を担う重要なステップである。しかし、従来の自然酸発酵や化学的酸性化に依存する方法は、気候条件や加工環境によって酸生成が不安定となり、再現性や製品品質に課題があることが知られていた。

本研究では、この課題を解決するために、浸漬工程における微生物介入を試み、乳酸菌 (*Lactiplantibacillus plantarum* NBRC 101978, *Limosilactobacillus fermentum*) および酵母 (*Pichia burtonii* NBRC 0844) を用いた処理を行った。効果を調査するために、GC-MS による広範なメタボローム解析を実施した。まず、100種類に及ぶ糖類、アミノ酸、脂肪酸、有機酸などの代謝物を網羅的に同定し、主成分分析を通じて代謝プロファイルの変化を評価した。その結果、乳酸菌処理ではアミノ酸が蓄積する一方、酵母処理では生体アミンであるチラミンが特異的に増加するなど、微生物介入の種類に応じた特徴的な代謝変動が確認された。さらに、抗栄養因子ラフィノースは、化学的酸処理に比べても乳酸菌介入によって 2 倍以上効率的に低減されることが示され、従来法に対する明確な優位性が実証された。また、複数の生理活性代謝物が顕著に増加し、機能性食品としての付加価値向上にも資する可能性が見出された。

加えて、乳酸菌種の違いや接種濃度 (2.5, 5, 10% v/v) の影響についても詳細に検討が行われた。その結果、*L. fermentum* 処理では糖類が優位に残存し、*L. plantarum* 処理ではアミノ酸を主体とした代謝物が増加するなど、微生物種の違いが代謝プロファイルに顕著な影響を与えることが明らかになった。一方で、接種濃度の変化は有機酸やアミノ酸の相対量に一定の影響を及ぼすものの、イソフラボンや生体アミンの低減といった機能性関連成分に対する寄与は限定的であることが示された。これらの知見は、テンペの品質制御において微生物種の選択がより重要であり、接種濃度は補助的な役割を担うにとどまるこことを示唆している。

本研究の成果は、従来経験則に依存していたテンペ製造の浸漬工程に、科学的根拠に基づく改良指針を与えるものであるとともに、メタボロミクス手法を駆使することで、食品発酵研究に新たな知見をもたらしている点で学術的独創性が高い。また、得られた成果はテンペにとどまらず、納豆や味噌、醤油など他の大豆発酵食品の製造プロセスにも応用可能性を有し、発酵食品産業や機能性食品開発に対しても波及効果が期待される。研究目的は明確であり、実験計画は合理的かつ体系的に構築され、得られた結果の解析も十分かつ妥当である。

以上のように、本論文はテンペ製造における浸漬工程の科学的理を深化させ、発酵食品研究と産業応用の双方に資する新たな知見を提示したものである。その学術的独創性と実用的意義は十分に高い。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。