

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02541

研究課題名(和文) フードメタボロミクスを基盤としたインドネシアの伝統的発酵食品『テンペ』の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Indonesian traditional fermented food "Tempe" based on food metabolomics

研究代表者

福崎 英一郎 (FUKUSAKI, Eiichiro)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40273594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：テンペは、インドネシア原産の発酵大豆で、高い栄養価を持つ優れたタンパク源である。テンペは、地域によって生産工程や発酵条件が異なるため、様々な品種が存在するが、生産工程や産地の違いに基づくテンペの特性に関する研究は非常に少ない。本研究では、メタボロミクスを、様々な地域や異なる製造工程で得られたテンペの研究に適用した結果、異なる場所で生産されたテンペは、都市とその生産区分によってクラスター化することがわかった。この結果に寄与する主要な化合物として、糖類とアミノ酸群が見出された。本研究は、産地や生産工程の異なるテンペの代謝の違いに言及した初めての報告である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テンペは大豆を発酵原料としたインドネシアの伝統的発酵食品である。栄養価が高い上に経済性に優れるため、インドネシアのみならず世界中のベジタリアンやビーガンから注目を集めるバランス栄養食である。テンペはインドネシアの風土に根付き、地域性が高い発酵食品である。しかしながら、これまで地域性や製法のちがいによる差異について研究されてこなかった。本研究はテンペにメタボロミクスという近代的解析技術を適応させ、定量的な網羅的代謝物解析を実施し、博物学的データの蓄積することは世界のテンペ研究にとって有意義だとおもわれる。

研究成果の概要(英文)：Tempeh is a fermented soybean native to Indonesia and an excellent source of protein with high nutritional value. Although there are many varieties of tempeh with different production processes and fermentation conditions in different regions, there are very few studies on the characteristics of tempeh based on differences in production processes and regions. In this study, metabolomics was applied to the study of tempeh obtained from different regions and different production processes, and it was found that tempeh produced in different locations clustered according to city and its production category. Sugars and amino acid groups were found as the main compounds contributing to this result. This study is the first report that refers to metabolic differences among tempeh produced in different cities and production processes.

研究分野：メタボロミクス

キーワード：metabolomics food metabolomics metabolome fermentation tempeh soy bean

## 1. 研究開始当初の背景

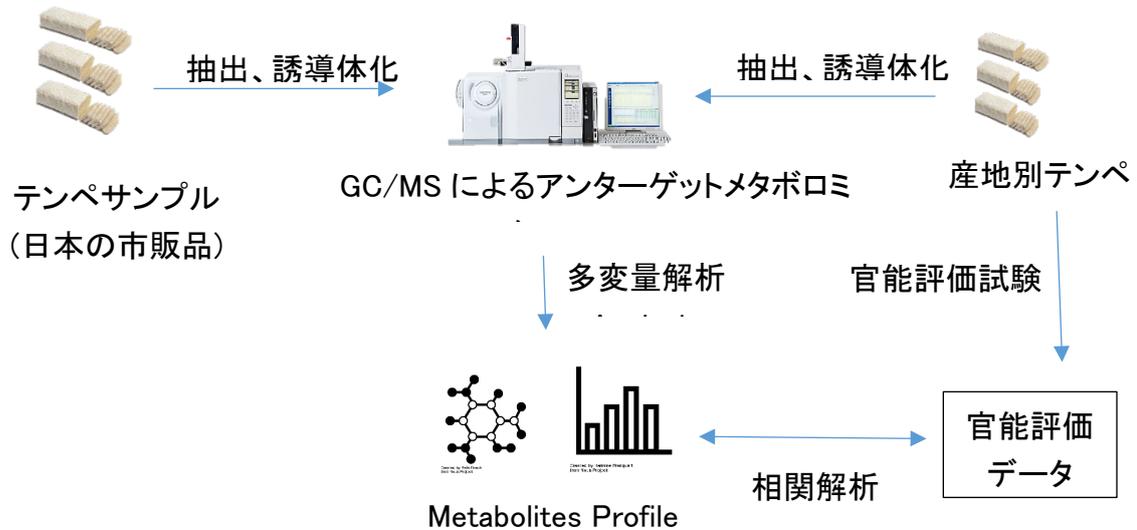
テンペは、脱皮したゆで大豆をリゾプス属菌で固体発酵させた、コンパクトで白いケーキ状の発酵食品である。インドネシアでは、テンペは高消化性タンパク質含有量で有名だが、炭水化物、飽和脂肪、繊維など他の栄養価も豊富である。テンペの生産は18世紀にジャワ島で始まり、今日に至るまで主食となるタンパク質源として利用されている。現在、インドネシアには家庭用産業から大規模産業まで、10万人以上のテンペ生産者がいる。このことから、テンペはインドネシアにとって、経済的価値だけでなく文化的価値も高い、非常に重要な地場産品であると言える。さらに、テンペはインドネシアのタンパク質消費量の少なくとも10%を供給しており、鶏卵(1.25%)や肉(3.15%)よりも高いことが知られている。テンペの製造工程では、調理した大豆に *Rhizopus spp.* を接種し、24時間から48時間、好みの食感が得られるまで培養する。リゾプス菌は、*Rhizopus oligosporus* (*Rhizopus microspores var. oligosporus* としても知られる)、*Rhizopus stolonifer*、および/または *Rhizopus oryzae* の種からなることができます。培養後、テンペは通常、揚げ物、炒め物、チップス、その他の主菜や副菜として調理された状態で消費される。テンペには様々な種類があり、地域ごとに異なる製造工程や発酵条件によって異なる。それぞれの地域は、何世代にもわたって受け継がれてきた土着の知識に基づいて、独自の個性を保っている。生産工程が異なるため、外観、味 (Bokulich et al, 2016)、化学成分などの特性が異なり、それらが互いに関連しあって複雑なデータマトリックスを形成している可能性がある。テンペの健康上の利点を報告する多くの研究があるが、異なる種類のテンペの特徴付けに焦点を当てた研究は非常に少ない。

## 2. 研究の目的

本研究は、テンペのフードメタボロミクス研究を確立することを目的とし、以下の目標を掲げた。まず、インドネシアの様々な地域で生産されたテンペの代謝物プロファイルと比較すること。そして、異なる方法で製造された様々なテンペの代謝物プロファイルと官能特性の関係を調査することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、いくつかの段階の実験を実施した。以下のフローチャートは、本研究の方法をしめす。



#### 4. 研究成果

##### 西ジャワ、中央ジャワ、東ジャワのテンペの糖分とアミノ酸の含有量は異なっていた。

インドネシア・ジャワ島の7つの都市から17のサンプル数を入手した。そして、これらのサンプルを原産都市に基づくグループと、包装方法に基づくグループに分類した。これらの分類に従って、ある類似性の範囲内でサンプル間の相関を明らかにするために、2つの別々のデータセットを設計した。最初のデータセットは、伝統的なテンペと分類されたサンプルの間で、原産地に基づく区別のパターンを示すように設計されている。仮に、生産区分の偏りを最小限に抑えた上で、産地に基づくサンプルの区別が行われると考えられる。GC/MS分析の結果、81種類の代謝物が検出された。主成分分析（PCA）により、西ジャワ産テンペと中央・東ジャワ産テンペが明確に区別されることが示された。明確な分離は、プロットの主成分（PC）1によって示され、変動の46.7%を説明した。同じプロットで、PC 1は西ジャワのテンペを、一緒に集まっている中央と東ジャワから分離した。興味深いことに、スコア散布図は、距離が比較的近い西ジャワの3都市（バンドン、ボゴール、ジャカルタ）のテンペが、中央・東ジャワサンプルのグループ化パターンに比べて、より近い位置にクラスター化していることを示していた。プルウォケルト、マラン、スラバヤ、ジョグジャカルタのテンペは、実際の地理位置とは異なり互いに近いが別々になっていた。スコアプロット1Aのローディングによると、PC1から特に7つの代謝物が西ジャワのサンプルの分離に寄与していることがわかった。これらの代謝物は、暫定的に糖類と命名された。このことは、西ジャワのテンペは、中部ジャワや東ジャワのサンプルとは異なる糖度を持つことを示唆している。また、11種類の糖類のうち7種類がWest Javaサンプルの分離に寄与し、他の4種類の糖類はCentral JavaとEast Javaテンペのグループ分けに寄与する代謝物として含まれなかったことから、これは支配的な識別因子であると考えられる。また、PC2は、西ジャワ、スラバヤ、ジョグジャカルタのすべてのテンペとマラン、プルウォケルトのテンペを分離している。この分離に寄与していることが示された代謝物は、糖4、ミオイノシトール、グルクロン酸、不明1、カダベリン、プトレスシン、サッカロピンである。中央ジャワと東ジャワのテンペがクラスター化し、PC1により西ジャワのテンペと分離していることを示し、負荷散布図を参照すると、PC1によ

る中央と東ジャワの分離には、すべての検出アミノ酸が含まれる多くの代謝物が寄与していることがわかる。これは、糖度の高い西ジャワのテンペに比べ、中央と東ジャワのテンペはより多くのアミノ酸を含んでいることを示唆している。テンペは、様々な都市を原産地とし、その属性に基づいてクラスター化されていることに加え、異なる製造工程がテンペに異なる代謝物プロファイルを与えていると仮定される。本研究では、包装の中で発酵が進むという事実から、包装方法に基づいて生産工程のカテゴリーを定義した。

### **産地と生産区分がテンペのメタボロームプロファイルに与える影響**

テンペはインドネシアの重要な食料品です。その消費と生産はインドネシアの文化の一部であるため、現在、地元の需要を満たすために多くの生産者が活動している。テンペの品質管理は、インドネシア国家標準化機構（BSN）によって SNI 3144:2015 として標準化されている。2013 年には、この標準化文書が CODEX 委員会によって検証され、CODEX STAN 313r-2013 として公表された。これらの文書では、物理的特性、化学的含有量、製造規格が標準化されている。さらに、規格に違反すると「不良品」とみなされることが明記されている。しかし、インドネシアにおけるテンペの生産は、土着的な知識を含み、原産地特有のものであることが判明しており、その結果、味だけでなく物理的特性も異なる可能性がある。最終製品の多様な特性は、内部の代謝物プロファイルの違いに起因する可能性がある。本研究は、代謝物プロファイルの比較によるインドネシア産テンペの特性評価を報告した最初の研究である。インドネシア・テンペ・フォーラムで得られたデータによると、テンペの製造手順の大きな違いは、調理法と浸漬法に観察された。最初の実験に基づき、PCA スコアとローディングプロットは、西ジャワのテンペが中央と東ジャワのテンペのクラスタリングと分離することを示した。このグループ分けは、発酵の環境条件（特に培養温度）が異なることに起因していると考えられます。これは、西ジャワの平均温度が 18-29°C であり、中央および東ジャワの平均温度（それぞれ 21-32°C および 21-34°C）と比較して、3°C 低いというデータから支持された。さらに、中央ジャワと東ジャワの最適な周囲温度は、テンペのカビ *Rhizopus* spp. の成長に適しており、37°C に近い温度で最適に成長することも示唆された（Nout and Kiers, 2005）。今回の実験では、発酵中に中部ジャワから西ジャワに移されたテンペのサンプルは、西ジャワにも中部・東ジャワにもクラスタリングしないことが判明した。このような最適生育温度の違いにより、複合タンパク質や炭水化物の分解速度が異なる可能性がある。Shrutleff and Aoyagi (1979) は、テンペから分離された *Rhizopus* 属は、*Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*（最高プロテアーゼ活性）、*Rhizopus oryzae*（最高アミラーゼ活性）、*Rhisopus stolonifer*（最低アミラーゼ活性）に見られるように、ポリマー分解の優先度が異なっていることを報告している。

また、生産区分によっても多様なメタボロームプロファイルが得られることが判明した。モダン、セミモダン、伝統的な発酵で処理されたサンプルの間に明確な分離を示した。現代のテンペは、伝統的なテンペよりもセミモダンに近いことが確認されました。興味深いことに、この PCA スコアプロットでは、原産地に基づくクラスタリング（PC1）は、製造カテゴリーに基づくクラスタリング（13.6%）よりも顕著に高い分散（50.7%）を与えることが示された。このデータは、テンペのユニークな特性が、インドネシア全土の他の場所で観察される可能性を示唆している。テンペの生産技術に関する文化的多様性を維持するためには、テンペの工業生産を標準化する努力と同時に、これらの地域の遺産を維持する努力が必

要かもしれない。

### テンペの製造工程が異なると、メタボロームプロファイルと官能特性が異なる可能性

本研究では、サンプルのメタボロームプロファイルが、テンペの生産地や生産方法と関連していることを発見した。さらに、様々な製造工程で得られる特定の属性に対する消費者の嗜好を比較することで、テンペの特徴を明らかにするため、官能分析を実施しました。市場の嗜好をさらに理解するために、75人のセミトレーナーパネラーによるヘドニックレーティングテストが選ばれた。総合得点に基づくと、スラバヤのテンペは、ジャワ島の3つの異なる都市からの他の3つのサンプルと比較して好まれた。バンドンのテンペは2番目に好まれ、ボゴールとプルワカルタのテンペは最も好まれない結果となった。また、パネリストはそれぞれ、モダンテンペ、セミモダンテンペ、トラディショナルテンペを好むという結果も出た。モダンなテンペは、他の2つのサンプルと比較して、すべての属性で好ましいことが示された。官能分析に使用したボゴール産テンペは、メタボロームプロファイリング実験に使用したものと同じ生産者のものである。しかし、メタボロームプロファイルが類似しているにもかかわらず、官能的な嗜好はバンドンテンペと類似していなかった。このことから、消費者の好みはサンプルの全体的な印象と一致し、メタボロームプロファイルとはあまり関係ないことがわかった。このことは、現代のテンペ（スラバヤテンペ）には、特定のメタボロームプロファイルが存在するかしないかで、それが最も好ましいものになる可能性があるという考えもある。さらに、ヘドニック評価テストは、セミモダンテンペとトラディショナルテンペのメタボロームプロファイルの違いが、メタボロームプロファイルが似ているにもかかわらず、物理的屬性が異なっていることが観察されたことを示唆した。

### 結論

本研究により、インドネシア7都市で生産されたテンペは、GC/MSシステムにより明確な代謝プロファイルを示し、生産工程に影響されることが示された。ヘドニック評価テストでは、セミモダンやトラディショナルテンペと比較して、モダンテンペの方が香り、色、食感、外観において好ましいことが示された。インドネシアでは、テンペの特徴が顕著に観察された。これは、テンペ発酵中の微生物群集に影響を与える地域ごとの周囲温度の違いに起因している可能性がある。さらに、真菌および細菌群集のタイムコースサンプリングにより、優勢な微生物のダイナミズムが観察されるかどうかを明らかにするために、微生物の分析を行うことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Dahlan Hadi Akbar, Nambu Yosuke, Putri Sastia Prama, Fukusaki Eiichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Effects of Soaking Tempe in Vinegar on Metabolome and Sensory Profiles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 30 ~ 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo12010030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rahmawati Della, Astawan Made, Putri Sastia Prama, Fukusaki Eiichiro	4. 巻 132
2. 論文標題 Gas chromatography-mass spectrometry-based metabolite profiling and sensory profile of Indonesian fermented food (tempe) from various legumes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 487 ~ 495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hadi Akbar Dahlan, Sastia Prama Putri, Eiichiro Fukusaki
2. 発表標題 Investigating the effect of adding Soy Hull to Tempe, an Indonesian fermented food
3. 学会等名 第73回 日本生物工学会大会（2021）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 環宏太郎, Sastia Prama Putri, 福崎英一郎
2. 発表標題 ノンターゲットメタボロミクスを用いた、テンペの保存状態の評価
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Della Rahmawati, Made Astawan, Sastia Prama Putri, Eiichiro Fukusaki
2. 発表標題 Metabolomics study of different mixing process of mixedtempe powder (Indonesian fermented food) from soybeanand red kidney bean
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	P U T R I S A S T I A  (Putri Sastia)  (50729796)	大阪大学・工学研究科・助教     (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------