

MACIEJ KULIGOWSKI, JACEK NOWAK

## **AKTYWNOŚĆ ANTYBAKTERYJNA IZOLATÓW Z PODŁOŻY POHODOWLANYCH PLEŚNI *RHIZOPUS OLIGOSPORUS***

### Streszczenie

W pracy podjęto próbę oceny właściwości antybakteryjnych tempeh wytworzonego z poddanych fermentacji przy użyciu szczepu *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 nasion fasoli odmiany Igołomska i monitorowano kształtowanie się aktywności czynnika antybakteryjnego w czasie 48-godzinnej fermentacji. Jako mikroorganizmu wskaźnikowego użyto szczepu bakterii *Bacillus subtilis* DSM 347. Do oceny inhibicji wzrostu bakterii zastosowano metody: studzienkową, krążkową, nefelometryczną oraz pomiar zmian impedancji. Obecność czynnika antybakteryjnego w tempeh z fasoli stwierdzono za pomocą metod: nefelometrycznej i pomiaru zmian impedancji. Największą aktywnością hamującą wzrost testowanych bakterii charakteryzowały się izolaty z tempeh otrzymane po 40 h fermentacji. Sposób obróbki hydrotermicznej nasion fasoli miał wpływ na aktywność antybakteryjną izolatów z tempeh.

**Słowa kluczowe:** tempeh z fasoli, aktywność antybakteryjna, *Rhizopus oligosporus*, *Bacillus subtilis*

### Wprowadzenie

Grzyby strzępkowe, oprócz tego, że są potencjalnym źródłem pozyskiwania białek i enzymów [6], szczególnie zastosowanie znalazły na wyspach Indonezyjskich, gdzie od lat służą do wytwarzania fermentowanej żywności typu tempeh [13]. Obłuszczone, moczone i gotowane soja jest poddawana fermentacji grzybowej w zakresie temp. 25-37°C przez 24-72 h. Najczęściej do tego typu fermentacji stosowane są szczepy z rodzaju *Rhizopus* [9, 13]. W badaniach do wytwarzania tempeh stosowano również inne nasiona roślin strączkowych oraz zbóż, m.in. łubin [2], groch [10], fasolę [7], orzechy ziemne [1], ciecierzycę [12], owies [13], sorgo [8]. Tempeh zdobywa uznanie konsumentów ze względu na wysokie wartości smakowe i odżywcze [9]. Od wielu lat szczególne zainteresowanie budzą właściwości funkcjonalne tempeh, zwłaszcza zdolność do powstrzymywania biegunki u ludzi i zwierząt [3, 4]. Wykazano,

---

*Mgr inż. M. Kuligowski, prof. dr hab. J. Nowak, Zakład Fermentacji i Biosyntezy, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, ul. Wojska Polskiego 31,60 - 624 Poznań*

że *R. oligosporus* syntetyzuje czynnik antybakteryjny, aktywny wobec niektórych mikroorganizmów. W 2005 r. pojawiło się doniesienie [14] o możliwościach przeszczepienia genu z *R. oligosporus* odpowiedzialnego za syntezę polipeptydu o aktywności inhibującej wzrost *B. subtilis*. Jednak do tej pory nie ma jednoznacznych doniesień na temat spektrum działania czynnika antybakteryjnego oraz zmian jego ilości w trakcie wzrostu *R. oligosporus*. Oprócz oceny wpływu ekstraktów z tempeh, wytworzonego z grochu, na aktywność *Clostridium perfringens* [10], nie ma w literaturze doniesień dotyczących aktywności antybakteryjnej tempeh wytworzonego z innych niż soja nasion roślin strączkowych.

Celem przeprowadzonych badań było określenie potencjalnych zdolności antybakteryjnych izolatów z tempeh, wytworzonego z nasion fasoli, wobec *B. subtilis* oraz monitorowanie zmian ich aktywności w trakcie 48-godzinnej hodowli.

### **Materiał i metody badań**

Materiał do badań stanowił tempeh wytworzony z nasion fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*) odmiany Igołomska – otrzymanej z Przedsiębiorstwa Nasiennictwa Ogrodniczego i Szkółkarstwa „CNOS” Poznań. Do fermentacji tempeh stosowano szczep *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 otrzymany z National Regional Research Center, Peoria, Illinois, USA. Szczepem testowym do pomiaru aktywności antybakteryjnej był *Bacillus subtilis* DSM 347 pochodzący z Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Niemcy.

Do obróbki hydrotermicznej nasion fasoli zastosowano dwie metody, opracowane na podstawie metodyki stosowanej przez Egounletiego [1] (metoda A) oraz Kiersa (metoda B) [4] do nasion soi. Zmodyfikowano czas poszczególnych operacji odpowiednio do stosowanego surowca.

#### *Metoda A*

Nasiona fasoli gotowano przez 20 min, obłuszczano i ponownie gotowano przez 5 min.

#### *Metoda B*

Nasiona fasoli moczo przez 14 h, obłuszczano i gotowano przez 5 min. Do każdej operacji hydrotermicznej stosowano wodę wodociągową zakwaszoną do pH 5,0 kwasem mlekowym. Po zakończeniu obróbki hydrotermicznej nasiona pozostawiano do obsuszenia w temp. pokojowej ( $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ) przez 15 min. Tak przygotowane nasiona zaszczipiano inokulum zarodników *R. oligosporus*. Następnie nasiona fasoli umieszczano w płytkach Petriego i inkubowano przez 48 h w temp.  $37^\circ\text{C}$ , pobierając próbki do analiz co 4 h. Z przygotowanych próbek odważano 10 g, dodawano 20 ml destylowanej wody i poddawano homogenizacji w homogenizatorze H500 (Pol-Eko-

Aparatura, Polska) przy 15 tys. obrotów przez 4 min. Zawiesinę filtrowano, a przygotowane izolaty z temp. mrożono i przechowywano do dalszych analiz.

Oznaczanie aktywności antybakteryjnej prowadzono za pomocą metod: studzienkowej, krążkowej, nefelometrycznej oraz pomiaru zmian impedancji.

W każdej metodzie inokulum stanowiła zawiesina komórek *Bacillus subtilis* DSM 347 przygotowana poprzez 24 h hodowlę na wstrząsarce w temp. 30°C przy 120 obr./min. Podłoże do hodowli stanowił bulion odżywczy wg DSM o składzie: 3 g ekstraktu mięsnego, 5 g peptonu, 1000 ml wody; pH ustalano na poziomie 6,5.

#### *Metoda studzienkowa*

Bulion odżywczy wg DSM w ilości 90 ml z 2% dodatkiem agaru zaszczipiano 10 ml inokulum i rozlewano na płytki Petriego. Po zestaleniu agaru dokonywano korkoborem wycięcia studzienki o średnicy 10 mm, do której wkraplano 0,1 ml izolatu z temp. Próbę odniesienia stanowiły płytki Petriego, w których izolaty zastąpiono wodą destylowaną. Płytki inkubowano w temp. 30°C przez 24 h.

#### *Metoda krążkowa*

Na płytce przygotowane jak w przypadku zastosowania metody studzienkowej nakładano krążki bibułowe o średnicy 8 mm, nasączone izolatami z temp. Próbę odniesienia stanowiły krążki bibułowe nasączone wodą destylowaną. Płytki inkubowano w temp. 30°C przez 24 h.

#### *Metoda nefelometryczna*

Do 8,5 ml bulionu odżywczego wg DSM dodawano 1 ml inokulum komórek *B. subtilis* i 0,5 ml izolatu z temp. Hodowlę prowadzono w temp. 30°C na wstrząsarce przy 120 obr./min przez 3 h. Następnie dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali 650 nm. Próbę odniesienia stanowiła hodowla *B. subtilis*, w której izolaty z temp. zastąpiono wodą destylowaną.

#### *Pomiar impedancji*

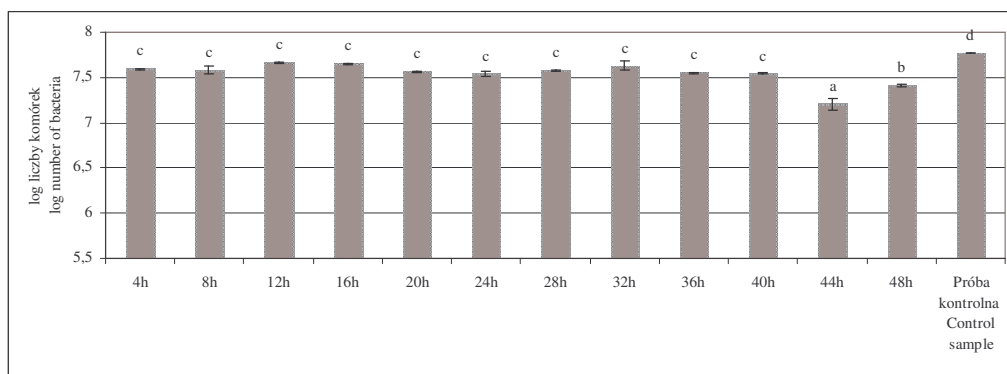
Pomiaru impedancji dokonywano w urządzeniu BacTrac 4100 (Sy-Lab, Austria) monitorującym zmiany impedancji podłoża w czasie. Warunki hodowli były identyczne, jak w przypadku stosowania metody nefelometrycznej, z pominięciem wstrząsania.

Oznaczenia przeprowadzono w 5 powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano analizę wariancji i ocenę najmniejszej istotnej różnicy (NIR) przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja

Przy zastosowaniu metody krążkowej i studzienkowej nie stwierdzono w izolatach z tempoh aktywności antybakteryjnej wobec testowanego szczepu bakterii. Otrzymane rezultaty w odniesieniu do metody krążkowej są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Kiersa i wsp. w odniesieniu do soi [4].

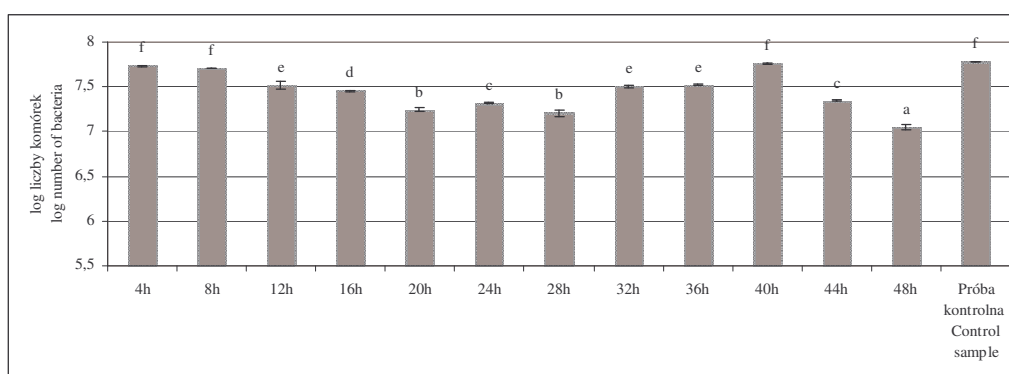
Wyniki uzyskane metodą oceny wzrostu z użyciem pomiaru absorbancji wskazują na występowanie niewielkiego hamowania wzrostu testowego szczepu bakterii przy zastosowaniu izolatów z tempoh fasolowego. Po dokonaniu pomiaru absorbancji obliczono liczbę komórek na podstawie sporządzonej krzywej wzorcowej. Wyniki podano jako logarytm liczby komórek bakterii, wykorzystując sporządzoną krzywą wzorcową. Aktywność antybakteryjna izolatów z tempoh była uzależniona od czasu fermentacji. Izolaty powodowały hamowanie wzrostu maksymalnie o 0,72 wartości logarytmicznej liczby komórek w stosunku do próby odniesienia. Za pomocą testu NIR uszeregowano wartości logarytmu z liczby komórek, co pozwoliło zróżnicować otrzymane wyniki. Wartości oznaczone na wykresie różnymi literami (rys. 1 i 2) różnią się statystycznie istotnie. W przypadku zastosowania metody A do obróbki hydrotermicznej nasion, najwyższą zdolnością inhibicji wzrostu charakteryzował się izolat otrzymany z 48. h fermentacji tempoh, natomiast brak zdolności do hamowania wzrostu wykazywały izolaty z tempoh z 4., 8., i 40. h fermentacji (rys. 1). Po zastosowaniu metody B do obróbki hydrotermicznej nasion, największą zdolnością inhibicji wzrostu szczepu charakteryzowały się izolaty z 44. i 48. h fermentacji tempoh (rys. 2).



Rys. 1. Wpływ dodatku izolatów z tempoh wytworzonego za pomocą metody A na liczbę komórek *B. subtilis* po 3 h hodowli w temp. 37°C.

Fig. 1. The effect of isolates from tempeh made by method A on the *B. subtilis* cells number after 3 h culture at 37°C.

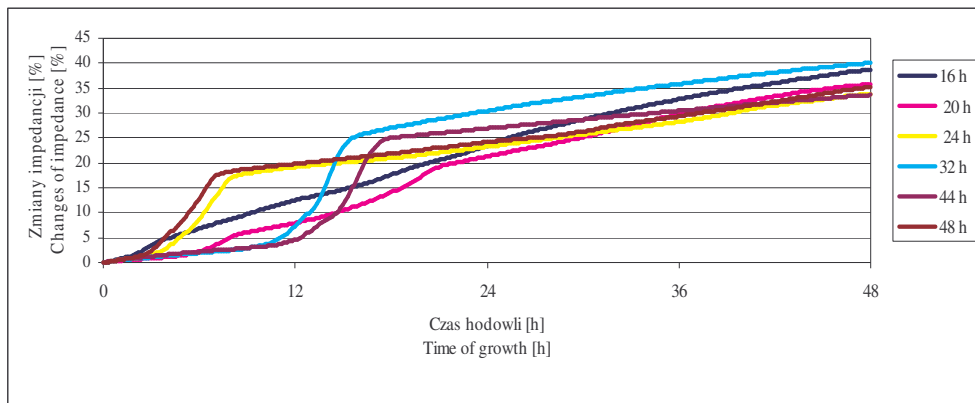
Uzyskane wyniki wskazują na wyższą aktywność czynnika antybakteryjnego po 40 h wzrostu *R. oligosporus* na podłożu fasolowym. Najwyższą aktywność czynnika antybakteryjnego stwierdzono w izolacie z 48. h fermentacji tempeh otrzymanego za pomocą obróbki hydrotermicznej metodą A. Do tej pory nie przeprowadzono badań nad dynamiką tworzenia czynnika antybakteryjnego w trakcie fermentacji. Nowak i wsp. [10] do oznaczania aktywności antybakteryjnej zastosowali izolaty z 24 h fermentacji, Kobayasi i wsp. stosowali ekstrakty z tempeh po 48 h fermentacji [5], natomiast Kiers i wsp. wykorzystali izolaty z 48. i 96. h fermentacji tempeh [4].



Rys. 2. Wpływ dodatku izolatów z tempeh wytworzonego za pomocą metody B na liczbę komórek *B. subtilis* po 3 h hodowli w temp. 37°C.

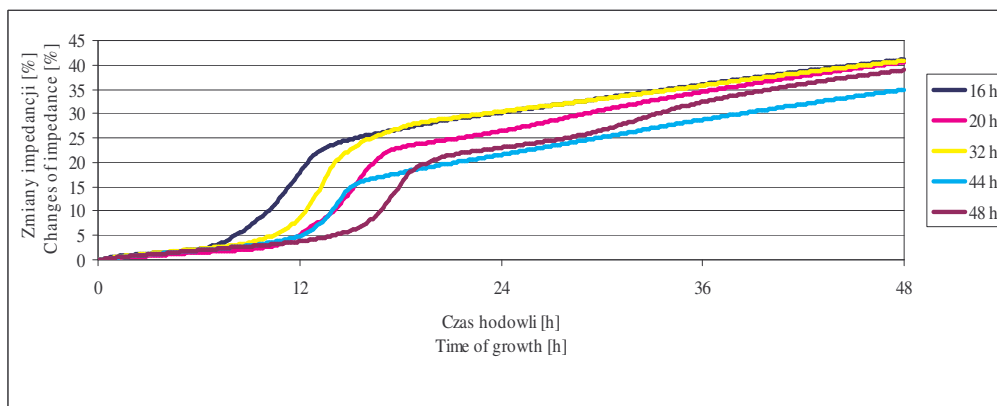
Fig. 2. The effect of isolates from tempeh made by method B on the *B. subtilis* cells number after 3 h culture at 37°C.

Poszukując metod pozwalających na bardziej precyzyjną ocenę aktywności antybakteryjnej fermentowanego produktu z fasoli, zastosowano metodę pomiaru zmian impedancji hodowli bakterii *B. subtilis*. W tym przypadku obserwowano zmiany w hodowli testowej przez 36 h wzrostu bakterii *B. subtilis*. Podobnie, jak w poprzednich metodach, do hodowli dodano izolaty tempeh z fasoli pochodzące z różnych etapów fermentacji. W przypadku izolatów z tempeh, do których wytworzenia zastosowano metodę obróbki hydrotermicznej A, dodano do hodowli izolaty z 16., 20., 24., 44. i 48. h fermentacji tempeh, które przy oznaczaniu nefelometrycznym należały do grup istotnie się różniących (z wyjątkiem izolatów z 22. i 44. h, które nie różniły się statystycznie istotnie). Zrezygnowano z dodatku do hodowli testowej izolatów, które przy oznaczaniu absorbancji nie wykazywały inhibicji wzrostu bakterii *B. subtilis*. Do oceny aktywności antybakteryjnej tempeh, do których wytworzenia zastosowano metodę B, zastosowano izolaty z identycznych etapów fermentacji jak w przypadku metody A. Krzywe wzrostu hodowli bakterii testowych z dodatkiem izolatów z tempeh wykreślono na podstawie zmian wartości impedancji w czasie hodowli (rys. 3 i 4).



Rys. 3. Wpływ dodatku izolatów z różnych etapów fermentacji tempeh wytworzonego za pomocą metody A na wzrost *B. subtilis*.

Fig. 3. The effect of isolates from tempeh made by method A on the growth of *B. subtilis*.



Rys. 4. Wpływ dodatku izolatów z różnych etapów fermentacji tempeh wytworzonego za pomocą metody B na wzrost *B. subtilis*.

Fig. 4. The effect of isolates from tempeh made by method B on the growth of *B. subtilis*.

Czas trwania lag fazy stanowił wskaźnik aktywności czynnika hamującego wzrost bakterii *B. subtilis*, obecnego w dodanych izolatach z tempeh. Najdłuższy czas lag fazy obserwowano w przypadku użycia izolatów z tempeh, do których wytworzenia zastosowano metodę obróbki A, najwyższą zdolność hamowania wzrostu hodowli testowej wykazywał izolat z tempeh po 44 h fermentacji. W przypadku stosowania do obróbki metody B, najwyższą aktywnością (wydłużenie czasu lag fazy) wykazywał izolat tempeh z 48 h fermentacji. Czas lag fazy hodowli *B. subtilis* wahał się od 4 do 14 h.

Przeprowadzone badania potwierdzają występowanie, w produkcie typu tempeh wytworzonego z fasoli, czynnika opóźniającego wzrost bakterii, opisanego przez Kiersa i wsp. [4], a wytwarzanego z soi tempeh. Izolaty z podłoży pochodzących *R. oligosporus* wykazywały aktywność antybakteryjną wobec *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* [5], a także *Clostridium perfringens* [10]. Kiers i wsp. wykazali aktywność antybakteryjną izolatów z tempeh wobec *Bacillus stearothersophilus*, nie potwierdzając jednocześnie wcześniejszych doniesień o zdolności do inhibicji wzrostu *B. subtilis* [4]. Oprócz nielicznych doniesień o hamowaniu aktywności jelitowych bakterii *C. perfringens* przez izolaty z tempeh wytworzonego z nasion grochu [10], brak jest w literaturze informacji o występowaniu czynnika antybakteryjnego w tempeh uzyskanym z innych niż soja surowców.

Najpowszechniej stosowaną metodą do oznaczania aktywności czynnika antybakteryjnego w tempeh była metoda krążkowa. Większość badaczy zastosowała również inne metody do oceny aktywności tego czynnika. Kobayasi i wsp. [5] zastosowali pomiar turbidymetryczny, Nowak i wsp. [10] pomiar objętości gazu wytwarzanego przez mikroorganizmy. Kiers i wsp. [4] stosując metodę krążkową nie uzyskali wyników tożsamyh z wynikami Kobayasiego i wsp., którzy jako najbardziej podatne na działanie czynnika antybakteryjnego zawartego w izolatach z tempeh określili szczepy *B. subtilis*. Niniejsze badania potwierdziły, że metody krążkowa i studzienkowa, polegające na dyfuzji czynników w głąb pożywki agarowej, nie są wystarczająco czułe do określania aktywności antybakteryjnej izolatów z tempeh. Co prawda Kiers i wsp. [4] wykazali, stosując metodę krążkową, aktywność antybakteryjną izolatów z tempeh wobec *B. stearothersophilus*, jednak niektóre mikroorganizmy wydają się szczególnie podatne na działanie czynnika antybakteryjnego z tempeh.

Wobec coraz większej popularności produktów fermentowanych typu tempeh i coraz powszechniejszego poszukiwania nowych surowców do jego wytwarzania, ocena nowych produktów, również pod względem występowania ewentualnej aktywności hamującej wzrost drobnoustrojów (zwłaszcza jelitowych), ma znaczenie dla bezpieczeństwa żywieniowego. Wydaje się, że badania nad czynnikiem antybakteryjnym produktów typu tempeh oraz spektrum jego oddziaływania może przyczynić się do lepszego poznania możliwości korzystnego wpływu tego typu produktów na równowagę mikroflory jelitowej konsumentów.

## Wnioski

1. Wykazano, że izolaty uzyskane z tempeh fasolowego miały zdolności inhibicji wzrostu bakterii *B. subtilis*.
2. Największą zdolnością do hamowania wzrostu bakterii *B. subtilis* charakteryzowały się izolaty uzyskane po 40 h fermentacji surowca fasolowego.



3. Sposób obróbki hydrotermicznej nasion fasoli miał wpływ na aktywność antybakteryjną izolatów z tempeh.

*Mgr inż. M. Kuligowski jest stypendystą w ramach Działania 2.6 Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego finansowanym z Europejskiego Funduszu Społecznego Unii Europejskiej i z budżetu państwa*

### Literatura

- [1] Egonlety M., Aworh O.C.: Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max Merr.*), cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp*) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa Harms*). J. Food Eng. 2003, **56**, 249–254.
- [2] Fudiyansyah N., Petterson D.S., Bell R.R., Fairbrother A.H.: Anutritional, chemical and sensory evaluation of lupin (*L. angustifolius*) tempe. Int. J. Food Sci. Tech., 1995, **30**, 297-305.
- [3] Kiers J.L., Meijer J. C., Nout M.J.R., Rombouts F.M., Nabuurs M.J.A., van der Meulen J.: Effect of fermented soya beans on diarrhea and feed efficiency in weaned piglets. J. Appl. Microbiol., 2003, **95**, 545-552.
- [4] Kiers J.L., Nout M.J.R., Rombouts F.M., Nabuurs M.J.A., van der Meulen J.: Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by soya bean tempe. Lett. Appl. Microbiol., 2002, **35**, 311-315.
- [5] Kobayasi S., Okazaki N., Koseki T.: Purification and characterization of an antibiotic substance produced from *Rhizopus oligosporus* IFO 8631. Biosci. Biotech. Biochem., 1992, **56** (1), 94-98.
- [6] Kumar S., Sharma N.S., Saharan M.R., Singh R.: Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. Proc. Biochem., 2005, **40**, 1701–1705.
- [7] Miszkiewicz H: Zmiany właściwości prozdrowotnych nasion roślin strączkowych w procesie fermentacji przy udziale *Rhizopus oligosporus*. W: Enzymatyczne modyfikacje składników żywności – pod red. E. Kołakowskiego, W. Bednarskiego, S. Bieleckiego. Wyd. AR w Szczecinie. Szczecin 2005, s. 479-492.
- [8] Mugula J.K. Lyimo M.: Evaluation of the nutritional quality and acceptability of sorghum based tempe as potential weaning foods in Tanzania. Int. J. Food Sci. Nutr., 2000, **51**, 269-277.
- [9] Nout M.J.R., Kiers J.L.: Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. J. Appl. Microbiol., 2005, **98**, 789-805.
- [10] Nowak J., Steinkraus K.H., Effect of tempeh fermentation of peas on their potential flatulence productivity as measured by gas production and growth of *Clostridium perfringens*. Nutr. Rep. Int., 1988, **38**, 1163.
- [11] Nowak J.: Oats Tempeh. *Acta Biotechnol.*, 1992, **12**, 345-348.
- [12] Reyes-Moreno C., Romero-Urias C.A., Milan-Carrillo J., Gomes-Garza R.M.: Chemical composition and nutritional quality of fresh and hardened chickpea (*Cicer arietinum L*) after the solid state fermentation (SSF). Food Sci. Technol. Inter. , 2000, **6**, 251-258.
- [13] Steinkraus K.H.: Handbook of indigenous fermented foods. Microbiology series. Marcel Dekker, New York 1995.
- [14] Yamada O., Sakamoto K., Tominaga M., Nakayama T., Koseki T., Fujita A., Akita O.: Cloning and heterologous expression of the antibiotic peptide (ABP) genes from *Rhizopus oligosporus* NBRC 8631. Biosci. Biotech. Biochem., 2005, **69** (3), 477-482.



**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ISOLATES FROM AFTER GROWTH MOULDS  
*RHIZOPUS OLIGOSPORUS***

S u m m a r y

The antibacterial activities of isolates obtain from tempeh made from beans Igołomska variety fermented by *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710 was assessed in this study. The antibacterial factor was estimated during 48 h fermentation. *Bacillus subtilis* DSM 347 was used as a test microorganism. The assessment of bacteria growth inhibition was performed by using several method: paper disk, agar slab well, nephelometric and measurement of impedance changes. Isolates obtain after 40h fermentation showed the highest inhibition of growth of test bacteria. The kind of hydrothermal treatment of bean seeds had an influence on the antibacterial activity.

**Key words:** tempeh from beans, antibacterial activity, *Rhizopus oligosporus*, *Bacillus subtilis* ☒