

Anna Chlebowska – Śmigiel, Iwona Gientka, Kamila Mroczek

BADANIE AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ ŻYWNOŚCI TYPU TEMPEH

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Szkoły Głównej Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Kierownik: dr hab. S. Błazejak, prof. SGGW

Celem pracy było zbadanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej tempeh naturalnego i wędzonego dostępnego w ofercie internetowej. W badaniach wykorzystano 4 szczepy bakterii testowych: Escherichia coli ATCC 25922, Bacillus subtilis ATCC 6633, Salmonella Enteritidis ATCC 13076 i Staphylococcus aureus ATCC 25923. Oba badane produkty hamowały wzrost testowych szczepów bakterii. Najbardziej wrażliwe okazały się bakterie Staphylococcus aureus ATCC 25923 oraz Salmonella Enteritidis ATCC 13076. Najmniej wrażliwy był szczep Escherichia coli ATCC 25922.

Hasła kluczowe: tempeh, aktywność przeciwdrobnoustrojowa, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis*

Key words: tempeh, antimicrobial activity, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis*

Tempeh jest tradycyjnym indonezyjskim produktem otrzymywanym z soi w wyniku naturalnej fermentacji przy udziale bakterii mlekowych, drożdży i różnych szczepów z rodzaju *Rhizopus* (1). W przemysłowej produkcji nasiona poddane obróbce hydrotermicznej zaszczenia się inokulum czystych kultur starterowych *Rhizopus oligosporus*. Można również używać kultury starterowe wyizolowane z tempeh, skład których stanowią różne szczepy mikroorganizmów, głównie *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae* i czasami *Mucor spp.*, tak jak tradycyjne inokulaty indonezyjskie (2). Podczas II wojny światowej tempeh umożliwił przetrwanie niewoli japońskiej żołnierzom z armii USA, miejscowej ludności oraz obcokrajowcom, zauważono bowiem, że posiada on wysokie wartości odżywcze i zdolność do powstrzymywania biegunek. Obecnie tempeh jest znany jako żywność wegetariańska i produkowany dla konsumentów szukających wysokiej jakości zamienników mięsa (3,4).

Pierwsze doniesienia o antybakteryjnej aktywności izolatów z tempeh pochodzą z roku 1969, kiedy to Wang i wsp. (5) wykazali wrażliwość bakterii *Streptococcus cremoris* na substancje antybakteryjne zawarte w tempeh. W kolejnych latach pojawiło się wiele doniesień potwierdzających aktywność przeciwdrobnoustrojową tempeh (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

Po hodowli *Rhizopus oligosporus* na podłożu z hydrolizatu kazeiny wyizolowano czynnik antybakteryjny, którym był peptyd o masie cząsteczkowej 5500 Da (6). Jednakże do tej pory nie ma jednoznacznych doniesień na temat spektrum działania czynnika antybakteryjnego oraz zmian jego ilości w trakcie wzrostu pleśni (4). Przeprowadzone dotychczas badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej dotyczyły tempeh wytworzonego w sposób tradycyjny oraz izolatów pochodzących uzyskanych w badaniach modelowych. W związku z tym, że na rynku polskim pojawił się tempeh wytworzony metodą przemysłową, podjęto próbę zbadania jego ewentualnych właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wybrano tempeh naturalny oraz wędzony zakupione w sklepie internetowym oferującym produkty sojowe oraz 4 szczepy bakterii testowych: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Oba rodzaje tempeh posiadały Bio – certyfikat, nie zawierały sztucznych dodatków ani środków konserwujących. Badaniu poddano po 6 próbek tempeh naturalnego i wędzonego.

W celu sprawdzenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej tempeh wykorzystano metodę posiewu wgłębnego oraz dyfuzyjno - krążkową. W metodzie posiewu wgłębnego użyto podłoża, które stanowił homogenizat z tempeh, zarówno naturalnego, jak i wędzonego. Do 9 cm³ homogenizatu dodawano 1 cm³ zawiesiny bakterii testowych (próby właściwe). Równolegle przygotowywano próby kontrolne, które stanowiło 9 cm³ bulionu z dodatkiem 1 cm³ zawiesiny bakterii testowych. Każdy wariant wykonywano w trzech powtórzeniach. Zaszczepione próbki inkubowano przez 24h w temperaturze 37°C. Po tym czasie sprawdzano liczbę bakterii metodą płytkową oraz liczono stopień zahamowania wzrostu bakterii testowych jako różnicę między liczbą kolonii w próbie właściwej a liczbą kolonii w próbie kontrolnej. W metodzie dyfuzyjno – krążkowej wykorzystano podłoże wzrostowe dla bakterii testowych (*Mueller – Hinton*, bioMérieux) oraz krążki bibułowe nasączone wyciągami z obu rodzajów tempeh.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Badając wpływ przygotowanego homogenizatu z tempeh naturalnego na wzrost *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 początkowo wprowadzono $1,8 \times 10^8$ jtk/cm³ zarówno do podłoża kontrolnego, którym był bulion, jak i do homogenizatu. Po 24 godzinach hodowli w 37°C ogólna liczba drobnoustrojów w bulionie wynosiła $2,2 \times 10^8$ jtk/cm³, a w tempeh była niższa o 2 potęgi logarytmiczne i wynosiła $2,1 \times 10^6$ jtk/cm³ (tab.1).

W przypadku *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 liczba wprowadzonych bakterii w czasie „0” do tempeh naturalnego i bulionu wynosiła $6,8 \times 10^7$ jtk/cm³. Po inkubacji w bulionie uzyskano wynik $6,3 \times 10^8$ jtk/cm³, natomiast liczba komórek

bakterii w wyciągu z tempeh była zdecydowanie niższa i wynosiła $2,3 \times 10^7$ jtk/cm³ (tab.1).

Początkowa liczba bakterii *Bacillus subtilis* ATCC 6633 wprowadzona do wyciągu z tempeh naturalnego i bulionu odżywczego wynosiła $8,8 \times 10^6$ jtk/cm³. Po 24 godzinach hodowli ich liczba w bulionie wynosiła $4,5 \times 10^6$ jtk/cm³, a w homogenizacie $1,6 \times 10^6$ jtk/cm³ (tab.1). Wyciąg z tempeh spowodował zahamowanie wzrostu bakterii o 0,45 wartości logarytmicznej liczby komórek w stosunku do bulionu, co stanowiło ok.6,8%.

Wyniki uzyskane w przypadku wzrostu *Escherichia coli* ATCC 25922 świadczą o najmniejszej wrażliwości tych bakterii na substancje o charakterze przeciwdrobnoustrojowym obecne w żywności typu tempeh. Na początku wprowadzono $1,1 \times 10^7$ jtk/cm³ bakterii do wyciągu z tempeh naturalnego i bulionu. Po 24 godzinnej hodowli liczba komórek w tempeh była na poziomie $1,4 \times 10^8$ jtk/cm³, a w bulionie $1,9 \times 10^8$ jtk/cm³ (tab.1). Tempeh zahamował wzrost tylko o 0,13 wartości logarytmicznej liczby komórek (ok. 1,6%).

Tab e l a 1. Zmiany liczby komórek drobnoustrojów testowych w próbkach kontrolnych oraz wyciągach z tempeh naturalnego i wędzonego (wartości średnie z n = 6 próbek)

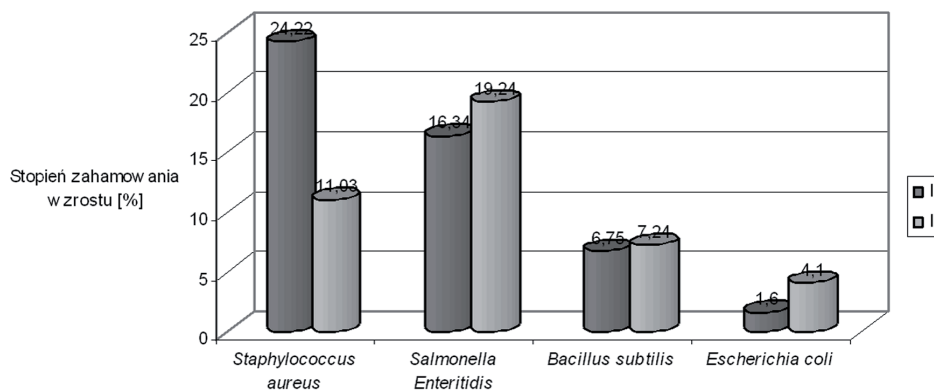
Table 1. Changes in cell number of test microorganisms in the control samples, the extracts of natural and smoked tempeh (mean values of n = 6 samples)

Testowy szczep bakterii	Liczba drobnoustrojów [jtk/cm ³]					
	Inokulum	Bulion	Tempeh naturalny	Inokulum	Bulion	Tempeh wędzony
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1,8 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$ B	$2,1 \times 10^6$ A	$3,2 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$ B	$2,1 \times 10^7$ A
<i>Salmonella Enteritidis</i>	$6,8 \times 10^7$	$6,3 \times 10^8$ B	$2,3 \times 10^7$ A	$3,5 \times 10^8$	$6,1 \times 10^8$ B	$1,2 \times 10^7$ A
<i>Bacillus subtilis</i>	$8,8 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$ B	$1,6 \times 10^6$ A	$2,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$ B	$3,4 \times 10^6$ A
<i>Escherichia coli</i>	$1,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$ A	$1,4 \times 10^8$ A	$3,8 \times 10^8$	$7,4 \times 10^8$ B	$3,2 \times 10^8$ A

A, B – te same litery oznaczają brak istotnej różnicy między wynikami.

W przypadku tempeh wędzonego uzyskano zbliżone wyniki. Wyraźnie hamował on wzrost *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, chociaż w mniejszym stopniu niż tempeh naturalny (rys.1). Podobne wyniki uzyskano dla bakterii *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, tu jednak bardziej skuteczny okazał się wyciąg z tempeh wędzonego. Stopień zahamowania wzrostu wyniósł 19,24% (Rys. 1) i był najwyższy ze wszystkich uzyskanych dla tego produktu. Również w przypadku *Escherichia coli* ATCC 25922 tempeh wędzony był bardziej skuteczny. Stopień zahamowania wynosił co prawda tylko 4,1%, ale był zdecydowanie większy niż

przy użyciu tempeh naturalnego (rys.1). W stosunku do *Bacillus subtilis* ATCC 6633 stopień zahamowania wzrostu przez tempeh wędzony był podobny jak dla tempeh naturalnego i wynosił około 7% (rys.1).



Ryc 1. Stopień zahamowania wzrostu drobnoustrojów testowych przez wyciąg z tempeh naturalnego (I) oraz wędzonego (II)

Figure 1. The inhibition of test microorganisms by extracts of tempeh natural (I) and smoked (II)

Badania przeprowadzone metodą posiewu wgłębnego (płytkową) potwierdzają występowanie w produktach typu tempeh czynnika ograniczającego wzrost bakterii Gram-dodatnich, opisanego przez *Kobayashi* i wsp. (6), jednak nie potwierdziło się, że szczepy *Bacillus subtilis* są najbardziej podatne na jego działanie. Również *Kuligowski* i *Nowak* (4) wykazali, że izolaty z tempeh powodowały zahamowanie wzrostu *Bacillus subtilis* maksymalnie o 0,72 wartości logarytmicznej liczby komórek w stosunku do próby odniesienia.

Otrzymane wyniki wykazały, że badane produkty najskuteczniej działały wobec *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076.

Niestety, brak jest doniesień literaturowych dotyczących wpływu tempeh zarówno na Gram-ujemne jelitowe pałeczki *Salmonella*, jak też gronkowce.

Metoda dyfuzyjno - krążkowa nie potwierdziła wyników uzyskanych w metodzie płytkowej, nie stwierdzono w badanych produktach żadnej aktywności przeciwbakteryjnej wobec 4 testowych szczepów. Podobne rezultaty w odniesieniu do metody krążkowej uzyskali *Kiers* i wsp. (9) oraz *Kuligowski* i *Nowak* (4). Być może stężenie składników aktywnych w roztworach naniesionych na krążki było zbyt niskie, aby uzyskać wyraźne strefy zahamowania wzrostu, albo metoda nie jest na tyle czuła, aby określić jakąkolwiek aktywność przeciwdrobnoustrojową. Zdaniem *Kobayashi* i wsp. (6) duża masa cząsteczkowa czynnika antybakteryjnego, która wynosi ok. 5500 Da może utrudnić jego wnikanie w głąb pożywki agarowej.

Otrzymane wyniki trudno porównać do danych literaturowych, gdyż nie ma doniesień dotyczących badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej żywności typu tempeh wyprodukowanej technologią przemysłową, a jedynie dotyczą tempeh tradycyjnego przygotowanego w różny sposób, po różnych czasach fermentacji i z innych surowców niż soja (6, 7, 9).

WNIOSKI

1. Badana żywność typu tempeh wykazywała istotną aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do wszystkich testowych szczepów bakterii.
2. Stopień zahamowania wzrostu był różny w zależności od produktu, jak też badanego szczepu bakterii i wynosił od 1,60% do 24,22%.
3. Największą wrażliwość na składniki aktywne obecne w obu badanych rodzajach tempeh wykazywały bakterie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076.

A. Chlebowska-Śmigiel, I. Gientka, K. Mroczek

THE RESEARCH OF TEMPEH ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Summary

In this study attempts to research the antimicrobial activity of natural and smoked tempeh produced from soybeans. Against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Diffusion-discs method and Plate Count Test was applied. Research has been shown, that the both of analyzed tempeh purchased in online store has antibacterial properties. The highest inhibitory activity was observed against gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and gram – negative bacteria *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076. The least sensitive strain was *Escherichia coli* ATCC 25922. There was no inhibition of growth of any of the tested strains.

PIŚMIENNICTWO

1. Libudzisz Z., Kowal K. : *Produkcja żywności orientalnej. W: Mikrobiologia techniczna, tom II, 2000; Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź: 64-65.* - 2. Kuligowski M., Nowak J. : *Możliwości modelowania cech funkcjonalnych żywności wytworzonej z nasion roślin strączkowych poprzez zastosowanie fermentacji typu tempeh. Biotechnologia, 2007; 4 (79): 114-124.* - 3. Nout M.J.R., Kiers J.L. 2005: *Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. J. Appl. Microbiol., 2005; 98: 789-805.* - 4. Kuligowski M., Nowak J. : *Aktywność antybakteryjna izolatów z podłoża hodowlanych pleśni *Rhizopus oligosporus*. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2006; 2 (47): 182-189.* - 5. Wang H.L., Ruttle D. I., Hesseltine C.W.: *Antibacterial compound from a soybean product fermented by *Rhizopus oligosporus*. Proc. Soci. Exp. Biol. Med., 1969; 131: 579-583.* - 6. Kobayashi S., Okazaki N., Koseki T. : *Purification and characterization of an antibiotic substance produced from *Rhizopus oligosporus* IFO 8631. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1992; 56 (1): 94-98.* - 7. 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.* - 8. Van den Broeck W., Cox E., Oudega B., Goddeeris B.M.: *The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. Vet. Microbiol., 2000; 71:*

223-244. - 9. Kiers J.L., Nout M.J.R., Rombouts F.M., Nabuuurs M.J.A., Meulen J. 2002: Inhibition of adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by soyabean tempe. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2002; 35: 311-315. - 10. Roubos-van den Hil P.J., Dalmas E., Nout M.J.R., Abee T.: Soya Bean tempe extracts show antibacterial activity against *Bacillus cereus* cells and spores. *J. Appl. Microbiol.*, 2009; 109: 137-145. 11. McCue P., Lin Y.T., Labbe R. G., Shetty K.: Sprouting and Solid State Bioprocessing by *Rhizopus oligosporus* increase the In vitro antibacterial activity of aqueous soybean extracts against *Helicobacter pylori*. *Food Biotechnol.*, 2004; 18: (2), 229-249. - 12. Dinesh Babu P., Bahyaraj R., Vidhyalakshmi R.: A low cost nutritious food "Tempeh"-A Review. *World J. Dairy & Food Sci.*, 2009; 4 (1): 22-27.

Adres: 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159C.