



**SZENT ISTVÁN
EGYETEM**

ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR, BUDAPEST

BAKTERIOCIN TERMELŐ TEJSAVBAKTÉRIUMOK ÉS LISZTÉRIÁK INTERAKCIÓJA

Doktori értekezés tézisei

Engelhardt Tekla

Budapest, 2016

A doktori iskola

- megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola
- tudományága:** Élelmiszertudományok
- vezetője:** Dr. Vatai Gyula, DSc
egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Élelmiszeripari Műveletek és Gépek Tanszék
- témavezetők:** Dr. Mohácsiné Farkas Csilla, PhD
egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék
- Dr. Kiskó Gabriella, PhD
egyetemi docens
Szent István Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

A jelölt a Szent István Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

BEVEZETÉS

Napjainkban – becslések szerint – milliók szenvednek világszerte élelmiszereredetű megbetegedésekben, ezen belül a szennyezett víz és élelmiszer fogyasztása évente 2 millió ember halálát okozza. Ezen megbetegedéseket nagyrészt az alábbi mikroorganizmusok okozzák: *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, Shiga-toxin termelő *Escherichia coli*, norovírusok és a *Listeria monocytogenes*. Az Európai Unió 178/2002 EK rendelete lefekteti a 'termőföldtől az asztalig' szemléletet, miszerint az élelmiszeripari vállalkozók felelőssége a biztonságos élelmiszer garantálása az élelmiszerlánc minden pontján. A patogén mikrobák az élelmiszerláncban bárhol képesek szennyezést okozni: emberek, állatok, növények, talaj, szennyvízrendszer, levegő, fertőzött eszközök lehetnek a közvetítő közegek. Az elmúlt évtizedek során az élelmiszeriparban új trendek jelentek meg. A fogyasztók igénye megnövekedett a magas tápértékű, kevésbé feldolgozott, természetes, friss termékek iránt. Az élelmiszeripari szakembereknek új technológiákat kell kifejleszteni ahhoz, hogy a fogyasztók ezen igényét kielégítsék amellet, hogy a termékek továbbra is biztonságosak maradjanak. Az új technológiáknak megfelelő kontroll alatt kell tartaniuk a patogén mikrobákat. Az egyik legrégebbi tartósító eljárás a hőkezelés, melynek számos előnye és ugyanakkor hátránya is van. Így az élelmiszeripar új technológiák felé fordult úgy, mint a nagy hidrosztatikus nyomáskezelés, módosított atmoszférájú csomagolás, ionizáló sugárzás, pulzáló erőterű gélelektroforézis, antimikrobás anyagok (pl. nizin, bakteriocinek, karvakrol) használata. Ezen új technológiák alkalmazásával biztonságos élelmiszer előállítása garantálható, ha azokat körültekintően választjuk meg. Ennek érdekében számos kutatást végeznek, abból a célból, hogy az élelmiszeripar számára minden információ elérhető és megbízható legyen. Megbízható információt abban az esetben lehet biztosítani, ha a kezelésekre adott patogén mikrobák válaszát ismerjük, ellenkező esetben a mikrobák túlélhetik a kezelést, adaptálódhatnak az új környezeti tényezőkhöz, mely az élelmiszer biztonságosságát veszélyezteti.

Számos, számunkra hasznos mikroba – tejsavbaktériumok – is jelen van az élelmiszerekben, melyet előszeretettel alkalmaz az élelmiszeripar a termékek eltarthatósági idejének növelésére vagy az érzékszervi paraméterek kialakításának érdekében. A leggyakrabban használt tejsavbaktériumok a következő nemzetségekebe tartoznak: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. A tejsavbaktériumok képesek kontrollálni a közeli Gram-pozitív rokon fajokat úgy, mint a *L. monocytogenes*. A *L. monocytogenes* napjainkban kiemelkedő

jelentőségű patogén mikroba, mivel súlyos megbetegedést képes okozni magas halálozási rátával. A *L. monocytogenes* előfordulási aránya a fogyasztásra kész, fermentált, friss élelmiszerekben igen magas.

A mikroorganizmus viselkedését az élelmiszerek összetevői, valamint az élelmiszereken előforduló más mikrobák nagyban befolyásolják. Ennek a komplexitásnak a megértése szükséges a patogén mikrobák szaporodásának gátlásához. Ilyen rendszer például a tejsavbaktériumok és a *L. monocytogenes* kapcsolata. A tejsavbaktérium képes gátolni a *L. monocytogenes* növekedését az általa termelt különböző metabolitokkal, továbbá, mint az ismeretes a *L. monocytogenes* rendkívül rossz versengő, így más mikrobák könnyen túlnőhetnek.

CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során a tejsavbaktériumok és a patogén *L. monocytogenes* interakciójának jobb megértését tűztem ki célul. A *L. innocua* baktériumot gyakran használják a kutatások során a *L. monocytogenes* szurrogátumaként, így ezt a baktériumot is bevontam a kísérleteimbe. Továbbá vizsgáltam a *L. innocua* hatását a *L. monocytogenes*-re.

Az alábbi célok megvalósítását határoztam meg:

1. *Lactobacillus plantarum* és *Lb. sakei* antiliszteriális aktivitásának jellemzése
2. Különböző stressztényezők hatásának vizsgálata tejsavbaktériumok antiliszteriális bakteriocin termelésére
3. *Lb. plantarum* bakteriocin termelésének (NaCl és hőmérséklet hatására) leírása matematikai modell segítségével
4. *P. acidilactici* és *L. innocua* hatása *L. monocytogenes* biofilm képzésére különböző mátrixokban
5. *L. innocua* hatása *L. monocytogenes* hagyományos módszerrel való kimutatására.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Mikroorganizmusok: Kísérleteimbe 3 tejsavbaktériumot vontam be, melyeket a portói Katolikus Egyetem Biotechnológiai Intézete bocsátott rendelkezésemre. A *Lb. plantarum* ST202Ch és *Lb. sakei* ST153Ch fermentált húsipari izolátum, míg a *P. acidilactici* HA6111-2 törzset egy korábbi kutatás során fermentált 'alheira'-ból izolálták. A vizsgálataim során

felhasznált *L. monocytogenes* törzsből hármat a Listeria Research Center of ESB (LRCESB) biztosított: 1486/1, IIB szerocsoportú, sajtból izolált; 1604/2, IVb szerocsoportú, sajtból izolált; 971, IIB szerocsoportú, darált marhahúsból izolált. Három izolátumot a Mikrobiológiai és Biotechnológiai tanszék tart fent: *L. monocytogenes* L4 (sajtból izolált), *L. monocytogenes* L16 (sajtból izolált), *L. monocytogenes* T3 (élelmiszeripari izolátum). További felhasznált törzsek: *L. innocua* NCTC 11288, *L. monocytogenes* CCM 4699 (C1) és *L. innocua* CCM 4030 (C6).

Lb. plantarum és *Lb. sakei* által termelt bakteriocin jellemzése: A tejsavbaktériumok 24 órás tenyészetéből oltottam be az MRS táplevest, úgy hogy a baktérium végkoncentrációja 1 % (v/v) legyen, majd 24 órán keresztül 30 °C-on inkubáltam. A pH változást, az optikai denzitást (OD) (600 nm) óránként rögzítettem. A bakteriocin aktivitást (AU/ml) és sejtszámot három óránként vizsgáltam. Meghatároztam egyes enzimek, detergensnek valamint a hőmérséklet és pH hatását a bakteriocin aktivitására. A bakteriocin molekula méretét SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE) alkalmazásával határoztam meg.

Célmikrobáknak a *Listeria monocytogenes* 1486/1 és *L. innocua* NCTC 11288 törzseket választottam.

Stressztényezők vizsgálata a bakteriocin termelésre: A megfelelő stresszkörülmények kiválasztását screenelés előzte meg. Az eredmények alapján a megfelelő körülmények biztosítása mellett követtem nyomon a *P. acidilactici* és *Lb. plantarum* növekedését. A stressztényezők (pH, hőmérséklet, NaCl) vizsgálata során a mikrobák szaporító közegének az MRS levest választottam, a beoltási koncentráció 1% (v/v) volt. A pH változást óránként, a sejtszámot és bakteriocin aktivitását (AU/ml) három óránként vizsgáltam.

Célmikrobáknak a *Listeria monocytogenes* 1486/1, *L. monocytogenes* 1604/2, *L. monocytogenes* 971 és *L. innocua* NCTC 11288 törzseket választottam.

NaCl és hőmérséklet hatásának vizsgálata a bakteriocin aktivitásra redoxpotenciál mérésen alapuló technikával: Módosított MRS (0, 2, 4, 6% NaCl) levest oltottam be *Lb. plantarum* 24 órás tenyészetével, úgy, hogy annak végkoncentrációja 1% legyen; inkubálási hőmérsékletnek 20, 25 és 30 °C-ot választottam. A sejtszámot és bakteriocin aktivitást minden esetben 3 óránként határoztam meg 48 órán keresztül, ez alól kivétel a 4 és 6%-os NaCl tartalmú inkubáció, ahol 60 órán keresztül tartott a termosztálás. A szaporodási paramétereket minden esetben meghatároztam. A bakteriocin aktivitás méréséhez a tesztcella (inkubálási hőmérséklet 37 °C) összeállítása a következő volt: 9 ml ½ koncentrációjú TSB leves, 1 ml antiliszteriális bakteriocint tartalmazó MRS leves. A tesztcellákban a célmikroba a *L. monocytogenes* 1486/1 volt, melynek induló sejtszáma 10^5 TKE/ml volt.

Listeria fajok és tejsavbaktérium biofilm képzésének vizsgálata: *L. monocytogenes* 1486/1, 971, L4, *L. innocua* CCM 4030 (C6) és *P. acidilactici* törzseket vontam be a biofilm kísérleteimbe. A biofilm képzés vizsgálatára egy, az élelmiszeriparban gyakran használt anyagot, a rozsdamentes acél felületet választottam. Szaporító közegnek a BH és MRS levest, valamint darált húst választottam. Továbbá vizsgáltam a lisztériák biofilm képzését jégسالáta leveleken. A fent említett élelmiszermatrixok mindegyike támogatja a *Listeria* törzsek és a tejsavbaktérium szaporodását. A biofilm képzés vizsgálatához 24 órás friss tenyészeteket használtam fel, a közegeket 10^6 TKE/ml sejtszámra oltottam be és a sejtek kitapadási ideje 1 óra volt. A biofilm képzést – a közeg és felülettől függően – 48-168 óra hosszan követtem nyomon.

L. innocua hatása *L. monocytogenes* kimutatására az ISO 11290-1 módszer során: A vizsgálataimhoz a következő törzseket választottam ki: *L. monocytogenes* C1, L4, L16, T3 és *L. innocua* C6. Fél Fraser és Fraser dúsító levesbe különböző arányban oltottam be a *L. monocytogenes* törzseket és *L. innocua*t. A dúsítási levesekből a mintavétel után a sejtszámokat *Listeria*-szelektív - Ottaviani és Agosti szerint - (ALOA) agaron határoztam meg. *L. monocytogenes* T3 és *L. innocua* C6 együtt és külön történő tenyésztése során meghatároztam a szaporodás kinetikai paramétereit a Baranyi modellt használva, DMFit szoftver segítségével.

EREDMÉNYEK

Lb. plantarum és *Lb. sakei* által termelt bakteriocin jellemzése: A *Lb. plantarum* *L. monocytogenes* 1486/1 törzsszel szemben 15 óra után termelte a legtöbb (25600 AU/ml) bakteriocint, míg *L. innocua* NCTC 11288 ellen 18 óra után. *Lb. sakei* esetében *L. monocytogenes* 1486/1 törzsszel szemben a legnagyobb aktivitás 25600 AU/ml volt, *L. innocua* NCTC 11288 ellen 12800 AU/ml volt 15 óra inkubálás után. A bakteriocin aktivitás kissé csökkent különböző hőmérsékletek és pH hatására, de fontos megjegyezni, hogy a *L. innocua* NCTC 11288 minden esetben ellenállóbbnak bizonyult. A detergens hatása különböző volt mindkét tejsavbaktérium által termelt bakteriocinre, *L. monocytogenes* 1486/1 ellen az aktivitásban (*Lb. sakei* által termelt bakteriocin) nem volt megfigyelhető változás. Teljes ill. jelentős csökkenés volt megfigyelhető az antimikrobás aktivitásban proteáz K, tirozináz, peroxidáz, pepszin és tripszinnel való kezelés után. Katalázos kezelés után az antimikrobás hatás nem inaktiválódott, melyből arra következtethetünk, hogy a gátló hatásért nem szigorúan a H_2O_2 a felelős.

Lb. plantarum és *Lb. sakei* által termelt bakteriocin sztatikus hatást fejtett ki a *L. monocytogenes* 1486/1 és *L. innocua* NCTC 11288 törzsekre (a bakteriocin hozzáadása közép-log fázisú törzsekhez történt, ami 3 órás tenyészetet jelent).

Mindkét tejsavbaktérium által termelt bakteriocin kisméretű peptid (<14.5 kDa), valamint a sejtfelülethez kötöttek.

Stressztényezők vizsgálata a bakteriocin termelésre: A *P. acidilactici* kis pH értéken nem mutatott növekedést, sejtszáma és a közeg pH-ja nem változott 48 órán keresztül, azonban PA-1 bakteriocint képes volt termelni kisebb mennyiségben (6400 AU/ml). Az alkalikus (pH 8,5) környezethez való adaptáció megfigyelhető volt körülbelül 28 óra után. Az adaptáció során a pH 7-es értékig csökkent, majd ennél az értéknél elkezdődött az exponenciális fázis és ezzel párhuzamosan a pH ugrásszerűen csökkent ~ 4.3-as értékig. A legnagyobb bakteriocin aktivitás (25600 AU/ml) a stacioner fázisban volt megfigyelhető. Korábbi mérések alapján a tejsavbaktériumok gyorsan képesek adaptálódni ahhoz a hőmérsékletre, ami maximum 20 °C-kal alacsonyabb, mint az optimum szaporodási hőmérséklet. Ezzel ellentétes eredményeim azt mutatják, hogy a *P. acidilactici* 10 °C-on nem tudott regenerálódni, habár kisebb mennyiségű bakteriocint képes volt termelni. 50 °C hőmérsékleten a sejtek sérültek, 24 óra után nem volt kimutatható élősejt, jóllehet kis mennyiségű bakteriocin jelen volt 40 órán keresztül. A *P. acidilactici* stressz válasza az emelkedett hőmérsékletre hasonló volt, mint a kis hőmérsékletre adott válasz. A vizsgálataim során igazoltam, hogy a *P. acidilactici* nem képes regenerálódni és csak kis mennyiségben termel bakteriocint mind kis és nagy hőmérséklet esetében. A *P. acidilactici* élősejtszáma kisebb mértékű növekedést mutatott és a szaporító közeg pH értéke kissé csökkent, 7,5 % NaCl tartalom mellett 20-24 óra inkubálás után. A *P. acidilactici* törzs legmagasabb bakteriocin (6400 AU/ml) termelése 30-33 óra után volt megfigyelhető. A kismértékű adaptáció magyarázható azzal, hogy *P. acidilactici* képes akkumulálni, szintetizálni bizonyos oldott anyagokat és a transzportfolyamatokba beépíteni azokat a turgor nyomás visszaállításának érdekében.

A *Lb. plantarum* sejtszáma kis pH érték mellett a logN 6,9 értékről 7,6 értékre növekedett 48 óra alatt. A maximális bakteriocin aktivitás *L. monocytogenes* 971 (25600 AU/ml) ellen volt megfigyelhető. Korábbi kutatásokban figyelték meg, hogy a *Lb. plantarum* képes adaptálódni a savas környezethez aminosavak akkumulálásával, mellyel kiegyenlíti a savas környezetet. pH 8,5 érték esetén a *Lb. plantarum* egy meghosszabbított lag fázist mutatott, így a magasabb aktivitású bakteriocin később jelentkezett. A maximum aktivitást (25600 AU/ml)

a stacioner fázisban figyeltem meg, mely arra utal, hogy a *Lb. plantarum* által termelt bakteriocin egy másodlagos metabolit.

Hideg stresszhatásnál a *Lb. plantarum* sejtszáma kissé emelkedett 20 óra inkubálás után, de nem volt képes megfelelő mennyiségű bakteriocint termelni. A hideg hatására a sejtek különböző fiziológiai változáson mennek végbe, mint pl. az RNS és DNS másodlagos szerkezetének a stabilizálása, mely a transzláció hatékonyságát befolyásolja. Ez lehet egy magyarázat arra, hogy miért nem volt képes a *Lb. plantarum* riboszomálisan szintetizált bakteriocint termelni. Ezzel ellentétesen a hő sokkra kevésbé volt szenzitív a *Lb. plantarum*. A maximum anti-lisztériás hatás értéke 25600 AU/ml volt a *L. monocytogenes* 971 törzssel szemben.

A *Lb. plantarum* növekedését erősen korlátozta a 7,5 % -os NaCl tartalom, habár alacsony (800-3200 AU/ml) bakteriocin aktivitás kimutatható volt. Fontos kiemelni, hogy a mérés során a *Lb. plantarum* sejtek centrifugálása után a visszamaradt pellet fémes csillogást mutatott és nehéz volt visszaoldani. A sejtfal károsodhatott az ozmotikus stressz hatására.

NaCl és hőmérséklet hatásának vizsgálata a bakteriocin aktivitásra redoxpotenciál mérésen alapuló technikával: A bakteriocin aktivitás annak a legnagyobb hígítási tagnak a reciproka, ahol még agarcsepp módszert alkalmazva látható feltisztulás, tehát van gátlás. Ezzel a módszerrel, az AU/ml érték egy diszkrét változó lesz, mely információvesztéshez vezet. A bakteriocin aktivitás meghatározásához új paramétereket vezettem be: a ΔTTD -t, mely a gátolt és a kontroll *L. monocytogenes* minták detekciós idejének a különbsége; a t_e -t, mely egy adott aktivitás (*L. monocytogenes* logN 2,5 virtuális csökkenése) eléréséhez szükséges idő.

A *Lb. plantarum* növekedése során a legmagasabb antilisztériás aktivitás a késői lineáris és stacioner fázis között volt megfigyelhető. Figyelembe véve a 95%-os konfidencia intervallumokat a μ értékek a 2 %-os NaCl tartalomnál csökkentek szignifikánsan.

Továbbá, összehasonlítva a μ/μ_0 értékeket, a hőmérséklet és NaCl koncentráció között kölcsönhatás látszik. A kis hőmérséklet-értékeken a hozzáadott NaCl tovább csökkenti a gátló hatást, a szaporodási sebesség is nagyobb mértékben csökkent 30 °C-on, mint 20 °C-on. A méréseim alapján a *L. monocytogenes* ellen termelt antilisztériás bakteriocin jól detektálható az exponenciális szakasz közepétől egészen a stacioner szakaszig, ahol a bakteriocin mennyisége eléri a maximumot.

Mindkét környezeti faktor (hőmérséklet és NaCl) befolyásolja az antilisztériás aktivitást, vagyis a t_e -t, ennek összefüggését többváltozós regresszió modellel írtam le. Az eredményeim

alapján a bakteriocin termelést előre lehet jelezni. Fontos megjegyezni, hogy a fermentált élelmiszereket gyártóknak javasolt egyéb tartósítóipari technikát is alkalmazni *Lb. plantarum* mellett a *L. monocytogenes* kontrollálására.

Listeria fajok és tejsavbaktérium biofilm képzésének vizsgálata: A *L. monocytogenes* L4 törzset véletlenszerűen választottam ki a *L. innocua* C6 törzssel való egyidejű biofilm képzés vizsgálatra. 120 óra után a *L. monocytogenes* L4 nem volt detektálható, valamint a *L. innocua* C6 sejtszáma is csökkent a rozsdamentes acél felületeken. A jégсалáta levélen a *L. monocytogenes* L4 és *L. innocua* C6 biofilm képzése során először a *L. innocua* C6 sejtszáma emelkedett, míg a *L. monocytogenes* L4 sejtszáma csökkent. Két nap eltelte után mindkét *Listeria* törzs sejtszáma egy nagyságrenden belülre esett, a szórás értékeket is figyelembe véve.

Amikor a *L. monocytogenes* 1486/1 és 971 törzseket inokuláltam egyszerre a tejsavbaktériummal, a gátlás jól megfigyelhető volt. *P. acidilactici* képes volt gátolni a *L. monocytogenes* törzseket laboratóriumi modell közegben és darált húsban, rozsdamentes acél felületeken. Ezekben a rendszerekben a *P. acidilactici* nagy mennyiségű bakteriocint termelt, amely magyarázat lehet a *L. monocytogenes* törzsek gátlására. Méréseim során azt is megállapítottam, hogy a *P. acidilactici* nem képes bakteriocin termelésre tejben, amikor *L. monocytogenes* törzsek is jelen vannak. Továbbá, a *L. monocytogenes* 971 tejben képes volt túlnőni a *P. acidilactici*-t.

L. innocua hatása *L. monocytogenes* kimutatására az ISO 11290-1 módszer során: A *L. monocytogenes* L16 törzs nem képzett *L. monocytogenes*-re jellemző zónát 168 óra után sem ALOA táptalajon, így a további mérésekben ez a törzs nem szerepelt. Az ALOA táptalaj alkalmazásának vizsgálata során megállapítottam, hogy a *L. monocytogenes* zóna képzését 24, 34 és 48 óra inkubálás után érdemes leellenőrizni a táptalajon.

A dúsító lépések során, amikor a *L. innocua* C6 kezdeti sejtszáma nagyobb volt, mint a *L. monocytogenes* L4, C1, T3 törzseké, késői gátlás volt megfigyelhető. Ezzel szemben, ha a kezdeti sejtszám egyenlő arányú volt, akkor a sejtszám aránya nem változott a dúsító lépések során. A szaporodási paraméterek meghatározása során azt tapasztaltam, hogy a lag fázis meghosszabbodott a *L. monocytogenes* T3 (5.1 óra) esetében, amikor a *L. innocua* C6-al együtt növekedett (beoltási arány 1:1). A fél Fraser levesben egyedi tenyésztés során a *L. monocytogenes* T3 lag fázisa rövidebb volt (1,7 óra) a *L. innocua* lag fázisánál (3,0 óra). *L. monocytogenes* T3 és *L. innocua* C6 kezdeti 1:1 aránya a dúsító lépés során három

nagyságrendnyi különbséget mutatott a *L. innocua* C6 javára. Ez magyarázható azzal, hogy a *L. innocua* C6 belépett a stacioner fázisba és a *L. monocytogenes* T3 nem volt képes további növekedésre. Ez a jelenség a Jameson hatással magyarázható.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Két, *Lactobacillus sakei* ST153Ch és *Lactobacillus plantarum* ST202Ch által termelt lisztéria-ellenes bacteriocint jellemeztem, amely során bizonyítást nyert, hogy a bacteriocinek ellenállnak különböző környezeti tényezőknek (pH, hőmérséklet, NaCl, detergens). Továbbá megállapítottam, hogy a két bacteriocin mérete kisebb, mint 14,4 kDa.
2. Leírtam a *Pediococcus acidilactici* HA6111-2 és *Lactobacillus plantarum* ST202Ch törzsek *Listeria*-ellenes bacteriocin termelését enyhe stresszhatások alatt. Bacteriocin termelést pH 3,5; pH 8,5 és 7,5 % NaCl tartalom mellett figyeltem meg, valamint megállapítottam, hogy az aktivitás függ a célmikrobától.
3. Sikeresen adaptáltam egy redoxpotenciál mérésen alapuló módszert a bacteriocin aktivitás meghatározásához *Lb. plantarum* ST202Ch törzs esetében. A bacteriocin aktivitás meghatározásához két új paramétert vezettem be: a Δ TTD-t, amely a TTD-k különbséget mutatja meg a gátolt és kontroll (nem gátolt) *L. monocytogenes* szuszpenziók között; te-t, amely az az eltelt idő a fermentáció során ahol, a gátlóanyag a *L. monocytogenes* sejtszámában logN 2,5 virtuális értékű csökkenést eredményezett.
4. Új, többszörös regressziós modellt hoztam létre a kis hőmérséklet és a NaCl koncentráció közötti összefüggés megállapítására, mellyel a bacteriocin aktivitása előre jelezhető *Lb. plantarum* ST202Ch esetében *L. monocytogenes* 1486/1 törzs ellen.
5. Bebizonyítottam, hogy a biofilm képzés során a bacteriocin képzés mátrix-függő *P. acidilactici* HA6111-2 esetében.
6. Megállapítottam, hogy a biofilmet képző *L. monocytogenes* törzseket csak abban az esetben lehet teljesen gátolni, ha a *P. acidilactici* HA6111-2 törzs képes a bacteriocin termelésre. *P. acidilactici* törzs által termelt más antimikrobás anyagok nem bizonyultak ehhez elegendőnek.
7. A hagyományos tenyésztéses eljárás során megállapítottam, hogy a *L. monocytogenes* L4, T3 és C1 törzseket a *L. innocua* C6 képes gátolni a Fraser dúsítóban végzett lépések alatt. Amikor a *L. innocua* és *L. monocytogenes* kezdeti koncentrációjának aránya 100:1-hez, akkor a *L. innocua* képes túlnőni a *L. monocytogenes* törzseket.

JAVASLATOK

1. További molekuláris vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy pontosan meghatározzuk a *Lactobacillus sakei* ST153Ch és *Lb. plantarum* ST202Ch által termelt bakteriocinek jellegét.
2. Az eredményeim alapján javaslom a *L. innocua* szurrogátumként való használatának felülvizsgálatát. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy a pontos különbségeket felfedjük. Ajánlom a *L. monocytogenes* használatát *L. innocua* helyett a kísérletek során.
3. Viszonylag kis hőmérsékleten és magas NaCl koncentráció mellett a bakteriocin termelés nem maradéktalanul elegendő a *L. monocytogenes* gátlására, javaslom más technológiák együttes alkalmazását a tejsavbaktériumokkal. Továbbá, szükséges lenne az általam meghatározott modell validálása élelmiszer rendszerekben, amely így még megbízhatóbb predikciót eredményezne.
4. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy meghatározzuk a pontos okát a *L. monocytogenes* gátlásának *L. innocua* és a tejsavbaktérium által a biofilm képzés során.
5. *L. innocua* különböző anyagcsere termékeket termelhet, amelyek hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a *L. monocytogenes* gátolja a növekedésük során. Ezeknek a metabolitoknak az azonosítása szükséges, ahhoz, hogy megértsük a gátlás mibenlétét.

A dolgozathoz kapcsolódó publikációs tevékenység

Folyóirat cikkek

IF-es folyóirat cikkek

Engelhardt, T., Albano, H., Kiskó, G., Mohácsi-Farkas, Cs., Teixeira, P.: Antilisterial activity of bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici* HA6111-2 and *Lactobacillus plantarum* ESB 202 grown under pH and osmotic stress conditions. *Food Microbiology* 48: pp. 109-115. (2015). doi:10.1016/j.fm.2014.11.015. IF (2014): 3,331

Engelhardt, T., Ágoston R., Belák Á., Kiskó G., Mohácsi-Farkas, Cs.: The suitability of the ISO 11290-1 method for the detection of *Listeria monocytogenes*. *LWT-Food Science and Technology* 71: pp. 213-220. (2016). doi:10.1016/j.lwt.2016.03.038. IF (2014): 2,416

Nem IF-es folyóirat cikk (magyar)

Engelhardt, T., Ágoston R., Kiskó G., Mohácsi-Farkas, Cs. (2012): *Listeria monocytogenes* hagyományos módszerrel való kimutatásának problémái, *Konzervújság* 2012/3-4: pp.60-62.

Nemzetközi teljes konferenciakiadványok

Engelhardt, T., Albano, H., Kiskó, G., Mohácsi-Farkas, Cs., Teixeira, P. (7-8. Nov. 2013): Characterization of two bacteriocins active against *Listeria* species produced by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei*. In: Dalmadi I., Engelhardt T., Bogó-Tóth Zs., Baranyai L., Bús-Pap J., Mohácsi-Farkas Cs. (ed.) *Food Science Conference 2013 - With research for the success of Darányi Program: Book of proceedings*, Budapest, Hungary, ISBN 978-963-503-550-2

Engelhardt Tekla, Szakmár Katalin, Kiskó Gabriella, Mohácsi-Farkas Csilla, Reichart

Olivér (18-19. Nov. 2015.): Combined effect of NaCl and low temperature on antilisterial bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum*. In: Engelhardt Tekla, Dalmadi István, Baranyai László, Mohácsi-Farkas Csilla (ed.) Food Science Conference 2015 - Integration of science in food chain: Book of proceedings. Budapest, Hungary, pp. 74-77. ISBN:978-963-503-603-5

Nemzetközi konferencia-összefoglalók

Engelhardt, T., Ágoston R., Kiskó G., Mohácsi-Farkas, Cs. (21-23 May 2012.): Problems in Detection of *Listeria monocytogenes* with Traditional Method, IAFP European Symposium on Food Safety, Warsaw, Book of Abstracts.

Engelhardt, T., Orgován, J., Kiskó G., Mohácsi-Farkas, Cs. (15-17. May 2013.): Screening the inhibitory effect of *L. innocua* strains on several *L. monocytogenes* strains, IAFP European Symposium on Food Safety, Marseille, France, Book of Abstracts.

Engelhardt, T., Ágoston, R., Belák, Á., Kiskó G., Mohácsi-Farkas, Cs. (15-17. May 2013.): Growth of *Listeria monocytogenes* in Presence of *Listeria innocua* During Traditional Detection Method, IAFP European Symposium on Food Safety, Marseille, France, Book of Abstracts.

Engelhardt, T., Albano, H., Kiskó, G., Mohácsi-Farkas, Cs., Teixeira, P. (6-8. Dec. 2013.): Production of antilisterial bacteriocin by *Pediococcus acidilactici* HA6111-2 under different stress conditions, Microbiotec13, Aveiro, Portugal, Book of Abstracts pp. 91.

Engelhardt, T., Albano, H., Kiskó, G., Mohácsi-Farkas, Cs., Teixeira, P. (7-9. May 2014.): Characterization of two bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* produced by *Lactobacillus* spp. IAFP European Symposium on Food Safety, Budapest, Hungary, Book of Abstracts.

Engelhardt, T., Albano, H., Kiskó, G., Mohácsi-Farkas, Cs., Teixeira, P. (20-22. April

2015.): Production of antilisterial bacteriocin by *Lactobacillus plantarum* under different stress conditions. In: IAFP European Symposium on Food Safety. Cardiff, Wales, Book of Abstracts pp. 98.

Engelhardt, T., Hóbor, I., Deli, V., Kiskó, G., Mohácsi-Farkas, Cs. (8-10. July 2015.): Examination the biofilm formation of *Listeria* species and *Pediococcus acidilactici*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 62:(Supplement 1) p. 148. 1 p. (2015) 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, Hungary