



**JELÖLÉSMENTES IMMUNSENZOROK FEJLESZTÉSE
PROBIOTIKUS BAKTÉRIUMOK ÉS AFLATOXIN M₁
KIMUTATÁSÁRA**

Szalontai Helga

Doktori Értekezés

Témavezető:
Adányiné Dr. Kisbocskói Nóra

Készült:
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar

2015

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Felföldi József**
Egyetemi tanár, PhD
Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Fizika-Automatika Tanszék

Témavezető: **Adányiné Dr. Kisbocskói Nóra**
Tudományos tanácsadó, DSc
Nemzeti Agrárkutató és Innovációs Központ,
Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet (NAIK-ÉKI)
Élelmiszer-analitikai Osztály

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Budapesti Corvinus 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 témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2015. év október 13-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi Bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke:

Mohácsiné Farkas Csilla, PhD, BCE

Tagjai:

Székács András, DSc, NAIK-AKK

Rezessyné Szabó Judit, PhD, BCE

Marschall Marianna, PhD, EKF

Koppányné Szabó Erika, PhD, NAIK-ÉKI

Opponensek:

Kiskó Gabriella, PhD, BCE

Batáné Vidács Ildikó, PhD, NAIK-ÉKI

Titkár:

Takács Krisztina, PhD, NAIK-ÉKI

Tartalom

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
1. BEVEZETÉS	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1 Bioszenzorok általános bemutatása	10
2.1.1 Bioszenzorok csoportosítása	11
2.1.2 A bioaffinitás érzékelők	12
2.1.3 Bioaffinitás szenzorokban alkalmazott antitest típusok	13
2.1.4 A jelölésmentes detektálás	15
2.1.4.1 Kvarckristály mikromérleg (QCM)	16
2.1.4.2 Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS)	22
2.2 Baktériumok kimutatása bioszenzorokkal	26
2.2.1 Élelmiszereket szennyező baktériumok	28
2.2.2 A probiotikus baktériumok jelentősége, azonosításuk modern módszerei	31
2.3 Mikotoxinok és kimutatásuk	35
2.3.1 A mikotoxinokról általában	35
2.3.2 Az aflatoxinok élelmiszerbiztonsági jelentősége	37
2.3.3 A mikotoxinok analízisének hagyományos és új módszerei	40
3. CÉLKITŰZÉS	45
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	46
4.1 Anyagok, vegyszerek	46
4.2 Mikroorganizmusok, antitestek	46
4.3 ELISA tesztek	47
4.4 Módszerek	47
4.4.1 <i>L. acidophilus</i> és <i>B. bifidum</i> antigének kinyerése	47
4.4.2 Immunizálás	47
4.4.3 Antigén-specifikus, tisztított IgG előállítás	48
4.4.4 QCM mérőrendszer	48
4.4.4.1 Szenzor előkészítés, felületmódosítás	49
4.4.4.2 Probiotikus baktériumok kimutatásának módszerei	51
4.4.5 OWLS mérőrendszer	52
4.4.5.1 Szenzor előkészítés, felületmódosítás	53
4.4.5.2 Probiotikus baktériumok és AFM ₁ kimutatásának módszerei	54
4.4.6 Mintaelőkészítés	55

4.4.6.1 Probiotikus baktériumok.....	55
4.4.6.2 Aflatoxin M ₁	56
4.4.7. Referencia módszerek.....	56
4.4.8 Statisztikai módszerek	56
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	57
5.1 QCM-alapú immunanalitikai modellkísérletek BSA – anti-BSA molekulapárral.....	57
5.1.1 Antitest immobilizálása MHDA és szulfo-LC-SPDP keresztkötő reagensekkel	57
5.1.2 Rögzített antitest koncentrációjának hatása	58
5.1.3 Injektált mintamennyiség és az áramlási sebesség hatása	58
5.1.4 Szenzorok többszöri használatának hatása	60
5.2 Immunszenzorok fejlesztése <i>L. acidophilus</i> és <i>B. bifidum</i> kimutatására.....	61
5.2.1 ELISA vizsgálat <i>L. acidophilus</i> és a <i>B. bifidum</i> antitestekre.....	61
5.2.2 QCM bioszenzorok fejlesztése <i>L. acidophilus</i> és <i>B. bifidum</i> kimutatására.....	63
5.2.2.1 Rögzítendő antitest koncentrációjának meghatározása	64
5.2.2.2 Baktérium szuszpenziók mérése áramló injektációs és megállított mintaáramú módszerekkel	65
5.2.2.3 <i>B. bifidum</i> és <i>L. acidophilus</i> szenzorok keresztreakcióinak vizsgálata	66
5.2.2.4 Élelmiszerminták vizsgálata	68
5.2.3 OWLS bioszenzorok fejlesztése <i>L. acidophilus</i> és <i>B. bifidum</i> kimutatására.....	71
5.2.3.1 Rögzítendő antitest koncentrációjának meghatározása	71
5.2.3.2 Mérési hőmérséklet és áramlási sebesség meghatározása	73
5.2.3.3 Baktérium szuszpenziók mérése áramló injektációs módszerrel.....	75
5.2.3.4 <i>B. bifidum</i> és <i>L. acidophilus</i> antitest szelektivitásának vizsgálata.....	76
5.2.3.5 Élelmiszerminták vizsgálata	77
5.3 Aflatoxin M ₁ bioszenzor	80
5.3.1 Az alkalmazott poliklonális aflatoxin M ₁ antitest koncentrációjának meghatározása..	80
5.3.2 Az optimális, rögzítendő AFM ₁ -HRP konjugátum koncentráció meghatározása	81
5.3.3 Mérési hőmérséklet hatása	82
5.3.4 Tejminták vizsgálata	84
5.3.5 Referencia mérések.....	87
6. KÖVETKEZTETÉSEK	88
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	90
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	92

9. SUMMARY	94
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	96
11. ÁBRAJEGYZÉK	120
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	123

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFM₁: aflatoxin M₁

AFM₁-BSA: aflatoxin M₁-bovine serum albumin konjugátum, aflatoxin M₁-marhaszérum albumin konjugátum

AFM₁-HRP: aflatoxin M₁- horseradish peroxidáz konjugátum, aflatoxin M₁-tormaperoxidáz konjugátum

APTS: γ -aminopropil-trietoxi-szilán

B. bifidum: *Bifidobacterium bifidum*

B. longum: *Bifidobacterium longum*

BSA: bovine serum albumin, marha szérum albumin

BSM: bifidus selective medium agar

CFU: colony forming unit, telepképző egység

DTT: ditioneitol

EDC: 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-karbodiimid

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, enzim-kapcsolt immunszorbens eljárás

FIA: flow injection analysis, áramló oldatos (injektálásos) elemzés

HPLC: high performance liquid chromatography, nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

HRP: horseradish peroxidáz, tormaperoxidáz

L. acidophilus: *Lactobacillus acidophilus*

L. lactis: *Lactococcus lactis*

LOD: limit of detection, kimutatási határ

MHDA: 16-merkaptó-hexadekán sav

MRS: de Man, Rogosa and Sharpe

NHS: N-hidroxi-szukcinimid

OPD: o-fenilén-diamin-dihidroklorid

OWLS: optical waveguide lightmode spectroscopy, optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia

PBS: foszfát pufferolt sóoldat

QCM: quartz crystal microbalance, kvarckristály mikromérleg

SPR: surface plasmon resonance, felületi plazmon rezonancia

Szulfó-LC-SPDS: szulfoszukcinimidil 6-[3-(2-piridilditio) propionamido] hexanoát

Tris: trisz(hidroximetil)-aminometán

TWEEN 20: polioxietilén-szorbitán-monolaurát

UHT: ultra-high temperature processing, ultra magas hőmérsékletű kezelés

1. BEVEZETÉS

Napjainkban az élelmiszerek - mind a szennyező, élelmiszerbiztonságot veszélyeztető vegyületek, mikrobák, mind az élelmiszerminőséget meghatározó összetevők – vizsgálatában a hagyományos és a modern analitikai, illetve a molekuláris biológiai módszerek mellett egyre nagyobb szerepet töltenek be a bioszenzoros alkalmazások.

A bioszenzorok előtérbe kerülése, dinamikus fejlődése az élelmiszer analitika területén számos tényezőnek köszönhető. A kimutatások érzékenysége gyakran felveszi a versenyt olyan nagyműszeres technikákkal, mint pl. a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), a gázkromatográfia (GC), sokszor egyszerűbb a mintaelőkészítési eljárás, e mellett kialakításuk, üzemeltetésük jellemzően kisebb költséggel megvalósítható. A bioszenzorok felépítését tekintve számos kombináció létezik a bio- vagy biomimetikus receptorok óriási változatosságából (antitest, antigén, oligonukleotid, szövet, teljes sejt, molekuláris lenyomatú polimerek stb.), a detektálási típusok (optikai, elektrokémiai, tömeg stb.) széles skálájából, a kialakított részegységek dimenziójából (pl. mikro-, nano nagyságrend) adódóan. A bioaffinitás szenzorok közül kiemelkedő az antitest-alapú, immunszenzoros alkalmazások szerepe. Hasonlóan más immunanalitikai módszerekhez, mint az enzim immunvizsgálat (EIA) vagy az enzimkapcsolt immunsorbens analízis (ELISA), a kimutatni kívánt anyagra, mikrobára stb. specifikus antitestek szelektivitását, és a nagyfokú érzékenységet, az antitest antigénnel szemben mutatott nagy affinitását használják ki a bioszenzorok fejlesztői is. Az immunszenzorok külön ágát képviselik az enzimes, vagy egyéb jelölést nem igénylő, ún. jelölésmentes (label-free) detektálásra alkalmas szenzortechnikákkal megvalósított kimutatások. Előnyként az alapvetően rövidebb analízis időt, a valós-idejű meghatározásokat, számos minta sorozatmérésének lehetőségét, a költséghatékony működtetést emelném ki.

Mindezen előnyöket szem előtt tartva az egri Eszterházy Károly Főiskolán 2006-ban alakult Egerfood Regionális Tudásközpont bioszenzor-fejlesztő laboratóriumában kezdtünk el egyéb szenzorok mellett kvarckristály mikromérleg (QCM) és optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS) alapú, jelölést nem igénylő szenzortechnikákkal dolgozni. Kiemelt jelentőséggel bírt a tejek, tejalapú fermentált készítmények egyes bioaktív komponenseinek és szennyezőinek bioszenzorokkal történő kimutatása és mennyiségi meghatározása, mégpedig elsősorban a monitorozó, de kellően érzékeny vizsgálatok kivitelezése (NTP-FUNKMILK OMFB-00386/2008 pályázat). A tejben, tejtermékekben előforduló szennyező, vagy patogén baktériumok élelmiszer-biztonsági jelentősége okán számos bioszenzoros vonatkozású tudományos publikáció látott napvilágot. Annak ellenére, hogy az előnyös élettani hatású, probiotikus baktériumok az elmúlt évtizedben a mikrobiológiai, molekuláris biológiai kutatások

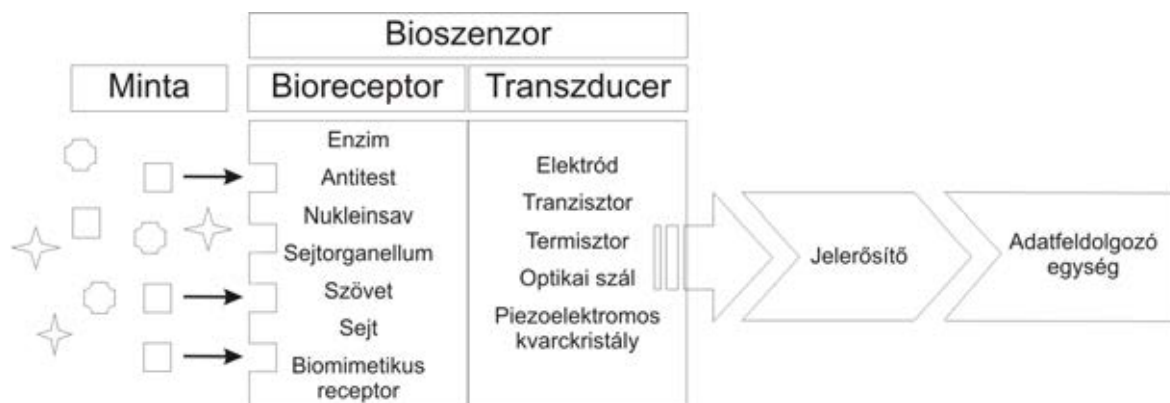
középpontjába kerültek - elsősorban az egyes törzsek azonosítása, rokonsági kapcsolataik és pontos, az emésztőrendszerben lezajló hatásmechanizmusuk feltárása miatt - bioszenzorral való tanulmányozásuk eddig nem volt jelentős terület. A fogyasztók védelme az élelmiszerek biztonságának szavatolásán túl azonban kiterjed a termékeken jelzett minőségi jellemzők, paraméterek ellenőrzésére is, ezért feladatomban leggyakrabban használt probiotikus baktériumok (*L. acidophilus*, *B. bifidum*) mennyiségi meghatározására alkalmas, antitest-alapú szenzorok (QCM és OWLS) fejlesztése volt.

A tejet szennyező vegyületek, mint pl. az állatgyógyászati szermaradványok, növényvédőszerrel szemben a biológiai eredetű, mikotoxinogén penészgombák által termelt aflatoxinok a legnagyobb egészségügyi kockázatot jelentő kontaminánsok közé tartoznak a tejben. Munkám céljából az aflatoxin B₁ metabolizmusával a szervezetben M₁ formává átalakuló, és a tejbe kiválasztódó aflatoxin M₁ bioszenzoros kimutatásának megvalósítását jelöltem ki OWLS-alapú bioszenzorral, az élelmiszerbiztonság témakörében született pályázatunkhoz (TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0008) kapcsolódva.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Bioszenzorok általános bemutatása

A kémiai érzékelők alcsoportjába tartozó bioszenzorok speciális, szelektív szenzorok, olyan analitikai eszközök, amelyek egy fizikai-kémia jelátalakítóval (pl. elektrokémiai, optikai, piezoelektromos stb.) szoros összeköttetésben, vagy abba integrálva biológiai eredetű (pl. enzim, szövet, mikroorganizmus, antitest stb.) vagy azt imitáló anyagot (pl. molekuláris lenyomatú polimerek, MIP) tartalmaznak (2.1 ábra) (SHARMA *et al.*, 2003, GYURCSÁNYI 2005). Az *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, Nemzetközi Elméleti és Alkalmazott Kémiai Szövetség) ajánlása szerint a bioszenzor olyan integrált eszköz, amely speciális biokémiai reakciókat használ fel egy kimutatni kívánt vegyület kvantitatív vagy félkvantitatív meghatározására oly módon, hogy a biológiai felismerő egység (enzimek, antigének, antitestek, szövetek, sejt organelumok, teljes sejtek) közvetlen kapcsolatban áll a jelátalakítóval (transzducer) (THÉVENOT *et al.* 1999).



2.1 ábra: A bioszenzorok elvi felépítése (VELASCO-GARCIA et MOTTRAM, 2003, módosítva)

A detektálás alapja a kimutatni kívánt vegyület specifikus kapcsolódása a komplementer biológiai felismerő elemhez (bioreceptor), amelyet egy megfelelő hordozó felületen rögzítenek (VELASCO-GARCIA et MOTTRAM, 2003). A molekuláris interakció egy vagy több fizikai, kémiai jellemző változását (pl. pH változás, elektron transzfer, tömegváltozás, hő fejlődés, gázok vagy ionok felvétele, ill. leadása) eredményezi, amely a jelátalakítóval mérhető. Gyakori cél a kimutatni kívánt anyag koncentrációjával arányos nagyságú vagy frekvenciájú elektromos jel detektálása (TURNER *et al.*, 1986; POWNER et YALCINKAYA, 1997).

Mivel a bioszenzor egy önálló, több részegység integrálásával összeállított eszköz, megkülönböztetik olyan egyéb analitikai rendszerektől, amelyek különböző elválasztási lépéseket

tartalmaznak (pl. HPLC) vagy speciális egységeket és/vagy mintaelőkészítési eljárásokat (pl. specifikus reagensek hozzáadását) igényelnek (THÉVENOT *et al.* 1999). Szintén megkülönböztetik a biológiai felismerő elemeket alkalmazó, de elektronikai jelátalakító, adatértékelő egységet nem tartalmazó egyszerű használatos gyorsesztektől, tesztsíkuktól (pl. laterális áramlás-tesztek).

A bioszenzoros technikák előretörése azzal magyarázható, hogy számos előnyt képviselnek a konvencionális analitikai technikákkal összehasonlítva. A biológiai eredetű felismerő elem nyújtotta szelektivitás megalapozza a specifikus eszközök fejlesztését, amelyekkel gyakran kis mennyiségű komplex minták valós idejű analízise valósítható meg egyszerű mintaelőkészítéssel. Az előnyök és elvárt jellemzők között szerepel a nagy érzékenység, a reprodukálható mérések, a gyors és egyszerűen kivitelezhető analízis és nem utolsósorban a költséghatékony működtetés (VELASCO-GARCIA *et MOTTRAM*, 2003). További tulajdonságuk, hogy túl a hagyományos kémiai analízis nyújtotta lehetőségeken, olyan speciális paraméterek mérésére is alkalmassá tehetőek, mint például a karcinogenitás, mutagenitás, citotoxicitás (KRÖGER *et al.*, 2002). Alkalmazásuk szerteágazó, kiterjed a környezetvédelem, a hadiipar, a klinikai diagnosztika és az élelmiszeranalitika területére is (TÓTH *et GYURCSÁNYI* 2002).

2.1.1 Bioszenzorok csoportosítása

A bioszenzorokat csoportosíthatjuk (1) strukturális alapon, a bennük alkalmazott biológiai eredetű/azt imitáló felismerő rendszerek alapján, az (2) alkalmazott receptorok funkciója szerint, vagy a (3) detektálás típusa szerint (2.1 Táblázat). Gyakran használatos a funkcionális szempontú osztályozás, amelyben a két alapvető csoport a bioaffinitás ill. a biokatalitikus receptorokkal működő szenzorok (WANG, 2006). Egyes szerzők további kategóriaként jelölik meg a hibrid, és a szintetikus receptoros alkalmazásokat (MELLO *et KUBOTA*, 2002; PICHON *et CHAPUIS-HUGON*, 2008).

2.1 Táblázat: Bioszenzorok csoportosítása (SHARMA *et al.*, 2003)

1. felismerő rendszer		2. fizikokémiai jelátalakítás	
funkció alapján	felismerő egység	detektálás alapján	transzducer
a) bioaffinitás	pl. antitest-antigén, oligonukleotidok, peptid nukleinsav	a) elektrokémiai	pl. amperometria, potenciometria, voltametria, impedimetria, konduktometria
b) biokatalitikus	enzimek	b) optikai	pl. optikai szálak, SPR, OWLS
c) mikroorganizmus alapú	teljes sejt	c) akusztikus	pl. piezoelektromos

Mind a biokatalitikus folyamatok, mind a bioaffinitáson alapuló reakciók detektálására számos megoldás létezik, melyek közül leggyakrabban az optikai (WANDERMUR *et al.*, 2014; AMIN *et al.*, 2012.; HERRANZ *et al.*, 2012., CHEN *et al.*, 2013) elven működő rendszereket, továbbá az elektrokémiai módszereken belül a potenciometriás (SAURINA *et al.*, 1999; PELLEGRINI *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2004) és a voltammetriás (EISSA *et al.*, 2012; ENSAFI *et al.*, 2013; PISOSCHI *et al.*, 2014) érzékelőket használják.

2.1.2 A bioaffinitás érzékelők

A bioaffinitáson alapuló kimutatási módszerek lényege, hogy a biomolekulák specifikus célmolekulákkal kapcsolódnak, azaz tágabb értelemben vett receptor-ligandum komplexek képződnek (WANG, 2006). Egyes biokémiai reakciók specifikitása és a receptor-ligandum molekulák egymáshoz való nagy affinitása lehetővé teszi szelektív és nagy érzékenyséű módszerek kidolgozását. Az immunszenzorokban a mérés alapját az antitest-antigén komplexek (immunkomplex) kialakulása jelenti. Ezen szenzorok specifikitása tulajdonképpen az antitestek (2.2 ábra) szelektív antigénköthető, antigén felismerő képességétől függ, amelyet az alkalmazott antitest típusa (poliklonális, monoklonális, rekombináns) határoz meg. Az antitestek analitikai célú előállítási módszereit a 2.1.3 pontban részletesebben bemutatjuk. A bioaffinitáson alapuló rendszerek létrehozásához gyakran a két komplementer szekvenciájú, egyszálú oligonukleotid (DNS vagy RNS) hibridizációját használják fel. A biomolekulák specifikus kötésére alkalmas fehérjemolekulák, a receptorok is szerepelhetnek biológiai felismerő elemként bioszenzorokban, bár előállításuk magas költsége, stabilitási problémák miatt alkalmazásuk még korlátozott (SUBRAHMANYAM *et al.*, 2002). Az aptamerek olyan *in vitro* előállított DNS vagy RNS oligonukleotidok, amelyek alkalmasak ionok (pl. K^+ , Hg^{2+} and Pb^{2+}) különböző makromolekulák és kis molekulatömegű vegyületek (pl. fehérjék, aminosavak, ATP, antibiotikumok, vitaminok, toxinok) szelektív megkötésére is (SZEITNER *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2008). A célvegyületre specifikus nukleotidok kinyerésének módját 1990-ben két, egymástól független kutatócsoport közölte a Nature és a Science folyóiratokban (ELLINGTON et SZOSTAK, 1990; TUERK et GOLD, 1990). Utóbbiban szerepel az eljárás napjainkban használatos elnevezése, a SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment), azaz a ligandumok exponenciális kinyerése *in vitro* evolúcióval. Szintetikus felismerő elemek közé tartoznak a molekuláris lenyomatú polimerek (molecularly imprinted polymer, MIP), és a peptid nukleinsavak (peptide nucleic acid, PNA). A MIP a természetes molekuláris felismerést imitálja, a célmolekulára alakban, méretben komplementer specifikus mélyedéseket és (a felismerést segítő) funkciós csoportokat tartalmaz. Előállításuk alacsony költsége és egyszerűsége, a MIP-eket jellemző nagyfokú stabilitás miatt széleskörű az analitikai célú, ezen belül a bioszenzoros

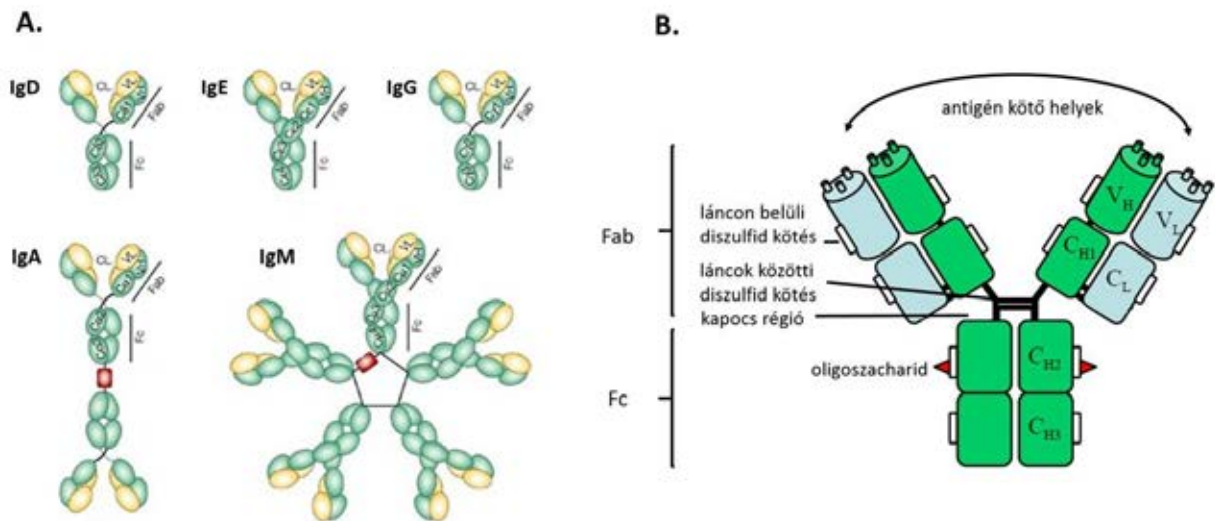
alkalmazás (PICHON et CHAPUIS-HUGON, 2008). A DNS analízisre használatos PNA molekulák annyiban térnek el a DNS molekuláktól, hogy a bázisok a dezoxiribóz foszfátészter lánc helyett N-(2-aminoetil)glicin vázon helyezkednek el (NIELSEN, *et al.* 1991). A szerkezetből adódóan ezek a mesterséges molekulák számos előnyös tulajdonsággal bírnak összehasonlítva a DNS-sel (pl. semleges töltés, nagyfokú stabilitás, ellenállóképesség a pH-, hőmérséklet-változással, szemben). Fejlesztettek már PNA bioszenzorokat gének azonosítására, DNS pontmutációinak vizsgálatára (AHOUR *et al.*, 2013; WITTUNG-STAFSHEDE *et al.*, 2000).

A detektálás szempontjából két nagy csoport különíthető el a bioaffinitáson alapuló technikákon belül, a (1) jelöléses és a (2) jelölésmentes (label-free) módszerek. A jelölést igénylő meghatározásoknál a reakcióban részt vevő egyik komponenshez (pl. antitesthez, antigénhez, oligonukleotidhoz) a reakció detektálását biztosító valamilyen jelölő anyagot (pl. radioaktív izotópot, enzimet, fluorszcens molekulát, nanorészecskét, kvantum pontot) kötnek. A jelölésmentes technikák ezzel szemben nem igénylik a jelöléssel járó zömében bonyolult és költséges lépéseket, sokszor leegyszerűsödik a mérési metodika és a molekuláris kölcsönhatások, adszorpciós, adhézión folyamatok valós idejű nyomonkövetése is megvalósítható (CUNNINGHAM, 2009).

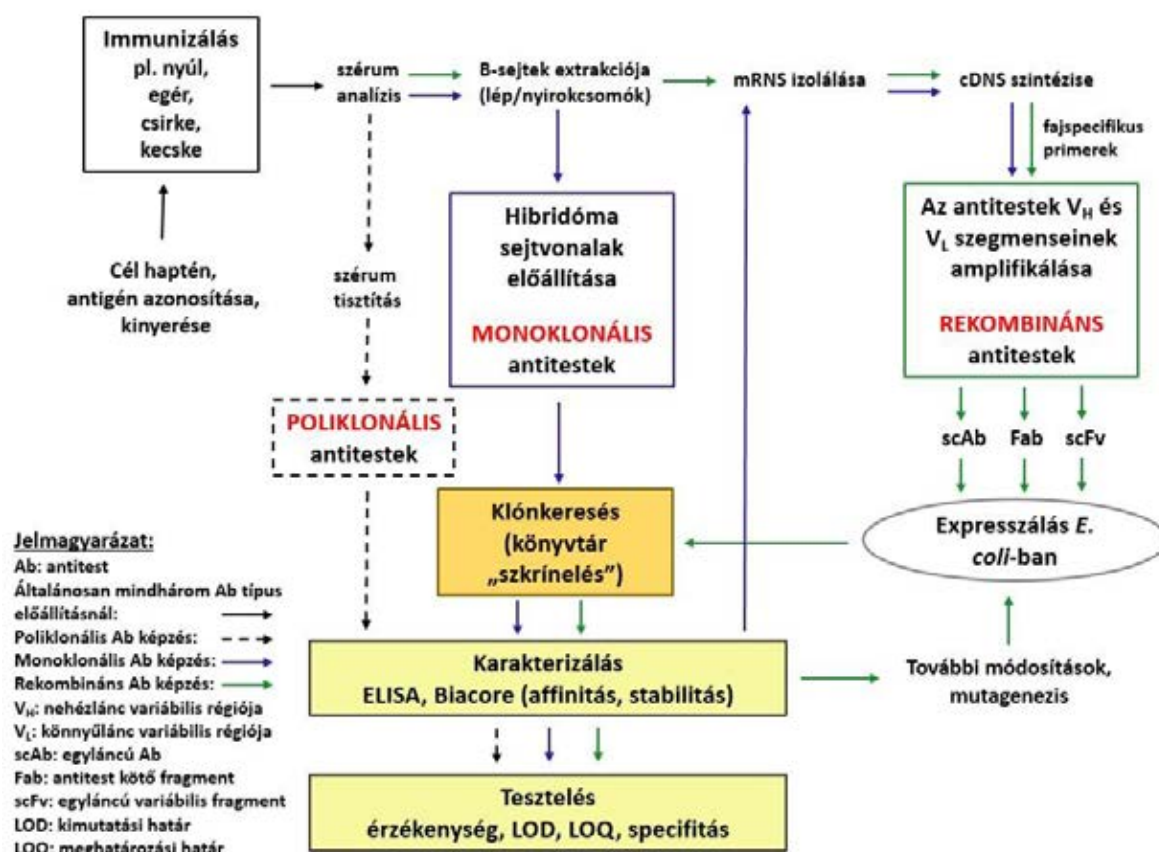
2.1.3 Bioaffinitás szenzorokban alkalmazott antitest típusok

Az ellenanyagok (2.2 ábra) előállításának 3 típusával poliklonális, monoklonális vagy rekombináns antitestek nyerhetők (2.3 ábra). A poliklonális ellenanyagokat valamilyen állat (pl. egér, nyúl, kecske) antigénnel történő immunizálásával állítják elő, gyakorlatilag több B-sejt klón által termelt, az általában polivalens antigén több epitópjára specifikus ellenanyag keverék (KENDALL, 2007). A poliklonális ellenanyagok kisebb szelektivitásban megnyilvánuló fő hátrányát küszöbölte ki a Köhler és Milstein által 1975-ben kifejlesztett hibridóma technika (KÖHLER et MILSTEIN, 1975). A módszer szintén immunizálással kezdődik, majd végső soron kiválasztják az *in vitro* előállított, tumorsejtek és ellenanyagtermelő B sejtek fúziójával kialakított, megfelelő antitestet termelő hibridóma sejt vonalat. A monoklonális ellenanyagok így egyetlen B-sejt klónból származó, az antigén egy epitópjára specifikus molekulák. A nagy szelektivitás mellett jellemző kisebb affinitás (viszonylag gyenge komplexképző hajlam) miatt alkalmazásukkal nagyobb kimutatási határ érhető el, mint a poliklonális ellenanyagokkal (SHEEHAN, 2007). A rekombináns technológiával az állatok immunizálása nélkül is megoldható az antitestek előállítása (1. és 2. típus): a megvalósításhoz szükséges antitesteket kódoló génkönyvtárakat (1) mesterséges úton (PCR) állítják elő („szintetikus könyvtár”), vagy a (2) DNS-t emberi naiv B sejtekből történő kivonása után amplifikálják PCR-rel (naiv könyvtár), vagy (3) a megfelelő antigénnel immunizált gazdaszervezet csontveléjéből/limfocitáiból vonják ki az RNS-t, amely templátként szolgál a

cDNS képzéséhez („immun könyvtár”) (BYRNE *et al.*, 2009). A módszer lényege, hogy a génkönyvtárakat mikroorganizmusokba (pl. baktérium, bakteriofág) juttatva expresszáltatják, majd kiválasztják a megfelelő antitestet termelő mikroorganizmusokat, amelyeket szaporítva kinyerhetőek a kívánt specifikus antitestek. A kiválasztott antitest antigénhez való affinitását mutációkkal lehet tovább növelni, továbbá antitest fragmentumokat, származékokat is elő lehet állítani. A rekombináns antitest nagy affinitással és szelektivitással rendelkezik, vagyis a két előző típus előnyeit egyszerre hordozza (SKERRA *et PLUCKTHUN*, 1988, WINTER *et al.*, 1994, HOOGENBOOM, 2005).



2.2 ábra: Immunglobulin (Ig) osztályok és az IgG ellenanyag-molekula általános szerkezete
(A) Immunglobulin osztályok (IgD: monomer, δ nehézlánc; IgE: monomer, ϵ nehézlánc; IgG: monomer, γ nehézlánc; IgA: monomer vagy dimer, α nehézlánc; IgM: pentamer, μ nehézlánc);
(B) IgG szerkezete (C_H: nehézlánc konstans régiói; V_H: nehézlánc (γ , δ , α , μ és ϵ típusok) variábilis régiója; C_L: könnyűlánc (λ és κ típusok) konstans régiója; V_L: könnyűlánc variábilis régiója; Fab: antigén kötő fragmentum; Fc: kristályosítható fragmentum) (forrás: (A) ROJAS *et APODACA*, 2002; (B) BYRNE *et al.*, 2009, módosítva).

2.3 ábra: Antitest előállítási típusok (forrás: CONROY *et al.*, 2009)

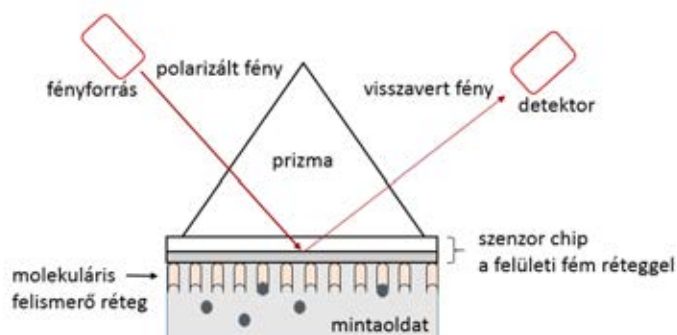
2.1.4 A jelölésmentes detektálás

A bioanalitika területén az új, jelölésmentes jelátvivők és detektálási elvek kifejlesztése jelentős előrelépést jelentett az affinitáson alapuló kölcsönhatások tanulmányozásában. A jelölésmentes bioszenzorok egyedülálló előnye, hogy valós-idejű kvantitatív információt szolgáltatnak a szenzorok határfelületén lezajló biokémiai reakciókról, kiküszöbölve a jelölésből adódó esetleges zavaró hatásokat (CIMINELLI *et al.*, 2013). Segítségükkel sokszor egyszerűbb mérés technikával (pl. kevesebb lépést igénylő analízis) érhető el a biomolekuláris kölcsönhatások kinetikájának, a biomolekulák adszorpciós, adhézios kölcsönhatásainak tanulmányozása. A jelölésmentes módszerek optikai (ellipszometria, felszíni plazmon rezonancia, optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia) és piezoelektromos detektálással valósíthatók meg.

Az ellipszometria a síkfelületre bocsátott, majd az onnan visszaverődő (reflektált) vagy az áteső (transzmissziós) fény optikai polarizációjának változását méri (TOMPKINS, 1993; AZZAM et BASHARA, 1977). Gyakrabban használatos a reflexiós elrendezés. A technika lényege, hogy az egymástól eltérő határfelületeken a különböző polarizációjú fény visszaverődése különböző. A fény beesési és visszaverődési szöge által meghatározott beesési síkkal párhuzamos, és arra merőleges rezgési síkú fény visszaverődését összehasonlítva (komplex reflexiós együttható)

információt nyerhetünk a vizsgált közeg törésmutatójáról, a felületen megkötött anyag rétegvastagságáról.

Az optikai, jelölésmentes bioszenzorok körén belül domináns helyet foglalnak el a felületi plazmon rezonancia (surface plasmon resonance, SPR) jelenségén alapuló meghatározások (DAVIS *et al.*, 2007). A gyakran alkalmazott Kretschmann-elrendezésű SPR készülék egy fényforrásból, egy nagy törésmutatójú prizmából, és azzal érintkező, tipikusan 50 nm rétegvastagságú fémrétegből, valamint egy detektorból áll (2.4 ábra). A felületi plazmonok egy fém (az esetek többségében arany)-dielektrikum határfelületen a vezetési elektronok mozgásához kapcsolódó elektronsűrűség-hullámok, melyeket úgy alakítanak ki, hogy a polarizált fényt egy prizma segítségével becsatolják a fémrétegbe. Egy adott beesési szögnél megtörténik a plazmongerjesztés, ekkor a fémfelületről visszavert fény intenzitása minimumot mutat. A detektálás alapja, hogy a rezonanciának megfelelő beesési szög (rezonanciaszög) törésmutató függő, így az, a fémréteg túloldalával érintkező közeg törésmutatójának változásával eltolódik (GYURCSÁNYI, 2005). Ezt a jelenséget kihasználva hozhatók létre jelölésmentes bioszenzorok, amelyekkel a fém vékonyréteghez érzékelő molekuláris réteget (pl. antitest, antigén, oligonukleotidok stb.) rögzítve vizsgálhatóak a mintaoldatok egyes komponensei (ŠÍPOVÁ *et HOMOLA*, 2013; LI *et al.*, 2012; RICCI *et al.*, 2007)



2.4 ábra: Az SPR rendszer sematikus ábrája

A továbbiakban a vizsgálataimhoz használt két, jelölésmentes meghatározásra alkalmas detektálási technikát, a kvarckristály mikromérleget (QCM) és az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópiát (OWLS) mutatom be részletesebben.

2.1.4.1 Kvarckristály mikromérleg (QCM)

A kvarckristály mikromérleg az akusztikus hullám (acoustic wave, AW) szenzorok családjába tartozó ultraszenzitív tömegmérő eszköz. Működése a piezoelektromosság elvén alapul, az érzékelő egy megfelelően hasított vékony kvarckristály lap, a felületére felvitt, jellemzően arany

vékonyréteggel (elektród). A továbbiakban a piezoelektromosság és elektrostrikió jelenségét, a kvarc fő hasítási típusait, a frekvenciaváltozáson alapuló tömegszámítási elvet és a kvarckristály mikromérleg arany elektródjának jellemző módosítási eljárásait tárgyaljuk.

A piezoelektromosság, a kvarc hasítási módjai

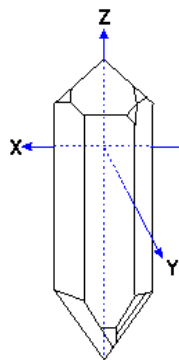
A piezoelektromosság és az elektrostrikió jelenségét a Curie testvérek, Pierre és Jacques Curie fedezték fel 1880-ban (CURIE et CURIE, 1880). Az egy vagy több poláris tengellyel rendelkező, vagy nem középpontosan szimmetrikus kristályok (pl. kvarc, turmalin) jellemzője, hogy meghatározott tengelyeik mentén alkalmazott mechanikai feszültség (nyomó vagy húzó) hatására elektromos töltések jelennek meg a kristály felületén, azaz elektromos feszültség generálható. A jelenség fordítottja az elektrostrikió, amikor is elektromos feszültséget adva a kristály két szemközti lapjára, mechanikai feszültség keletkezik, azaz a kristály bizonyos tengelyei mentén alakváltozást szenved, egyik irányba összehúzódik, másikba megnyúlik. A feszültség hatására ez a megnyúlás-összehúzódás egymást követően sokszor ismétlődik, a kristály mechanikai oszcillációt végez, de stabil rezgőmozgás kizárólag a kristály természetes rezonancia frekvenciájánál érhető el. A piezoelektromosság jelensége a fent említett kristályokon kívül több anyagra (pl. Seignette-só, lítium-tatraborát, cink-oxid) is jellemző. A Seignette-sót (Rochelle-só, nátrium-kálium-tartarát, $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) is előszeretettel használták, bár negatív jellemzői miatt, mint a könnyű vízdoldhatóság, vagy a 40-85% páratartalom melletti tárolás igénye, a gyakorlati alkalmazásban napjainkban háttérbe szorult (DONOVAN, 1979).

Ezekre a felfedezésekre alapozva leghamarabb a telekommunikációs eszközökben jelentek meg a különféle piezoelektromos részegységek, amelyek azóta is a számítógépek, radarok, mobiltelefonok stb. alapvető alkatrészei, majd az utóbbi bő 50 évben az akusztikus szenzorok egyre szélesebb körben kerültek alkalmazásra a kémiai analízisben is. Működésük alapja, hogy piezoelektromos, vagy egyéb érzékelő anyagokon keresztül mechanikai hullámot hoznak létre, amelyek működése közben az érzékelő felületén létrejövő bizonyos változás (pl. hőmérsékletváltozás, adszorpció) befolyásolja a hullám terjedését, amit pedig a módosult elektromos szenzorválasz jelez (BALLANTINE *et al.*, 1997). A felszíni változásokat nagy érzékenységgel lehet nyomon követni, ami megnyitott egy merőben új megközelítést a bioérezékelők fejlesztésében. Az akusztikus szenzorok alkalmassá tehetők a biomolekulák szenzorfelszínnel való interakciójának vizsgálatára, illetve a szenzorfelszín közvetítésével lezajló reakcióik tanulmányozására (CAVIC *et al.*, 1999).

A számos akusztikus érzékelő közül (surface acoustic wave resonator, SAW; flexural plate wave, FPW; shear horizontal acoustic plate mode, SH-APM) a kvarckristály mikromérleg (vagy 'thickness shear mode resonator', TSM) a legrégebben használt és legismertebb szenzor. A vékony

szilícium-dioxid kristálylapot meghatározott hasítási eljárással alakítják ki, majd parallel felületein a biomolekulák megkötésére, érzékelésére szolgáló aktív felületet többnyire porlasztással hozzák létre (pl. Au-, Ag-, Pt vékonyréteg).

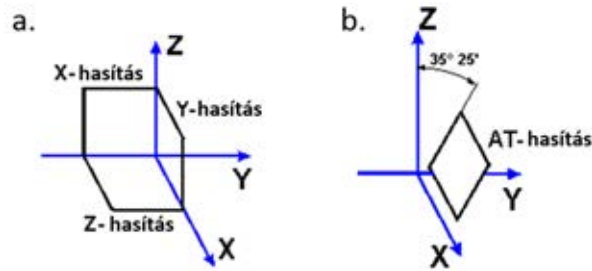
A kvarckristály mikromérleg fő egysége a kvarc - anizotróp anyag lévén - egyes fizikai sajátságai, mint pl. elaszticitás, elektromágneses sugárzás áteresztése függenek a kristályban való térbeli iránytól (párhuzamos irányokban azonos tulajdonságok). Ebből adódóan a kristály derékszögű tengelyeinek és hasítási síkjainak ismerete szükséges ahhoz, hogy az utóbbiak által meghatározott fő tulajdonságok (működési frekvencia és hőmérséklet, oszcilláció mód, elaszticitás, dielektromos jellemzők stb.) alapján válasszon a felhasználó az alkalmazás céljának megfelelően (ARAYA-KLEINSTEUBER et LOWE, 2007) (2.5 ábra).



2.5 ábra: A kvarckristály tengelyei

X (villamos tengely): piezoelektromosan aktív tengely, a töltések mindig az X tengelyre merőleges felületen jelennek meg; Y (mechanikai tengely): piezoelektromosan aktív tengely, az X tengelyre merőleges felületre felvitt töltések hatására a kristály méretváltozást szenved az Y tengely irányában; Z (optikai tengely): piezoelektromosan inaktív tengely

Az alap hasítási módok a tengelyek mentén (X, Y, Z) történnek, jelölésük pedig a szerint, hogy a hasítási sík mely tengelyre merőleges. Optikai alkalmazásoknál a Z, optikai tengelyre merőlegesen hasítják el a kristályt, a leggyakoribb, nem optikai célú metszési mód az AT (AT-cut), e mellett többek között a BT (BT-cut), CT (CT-cut) és SC (SC-cut) típusok is sokszor használatosak, főként elektronikai eszközökben. Az AT hasítás az Y tengelyre merőleges (X tengellyel párhuzamos), és a Z tengellyel $35^{\circ}15'$ szöget zár be (2.6 ábra). Az AT-hasított kristály fő előnye, hogy széles hőmérsékleti tartományban ($-20-75^{\circ}\text{C}$) használható a nélkül, hogy a hőmérséklet változása befolyásolná a frekvenciaváltozást, ezért a bioszenzorokban többnyire ezzel a kristálytípussal találkozunk (LEE *et al.*, 2001; LEE et LEE, 1996; JANSHOFF *et al.*, 2000).



2.6 ábra: A kvarc alap (a) és AT (b) hasítási módjai

A kvarckristály alap borításai (pl. platina, króm, ezüst, vas) közül leggyakoribb az arany vékonyréteg, mivel az arany kémiaileg inert és stabil, továbbá egyszerűen módosítható számos módszerrel (ARAYA-KLEINSTEUBER et LOWE, 2007), de a felhasználás céljától függően elterjedtek egyéb felületek is, mint az oxidok (szilikon-dioxid, alumínium-oxid), karbidok (pl. vas-karbid, szilikon-oxikarbid), szulfidok (réz-szulfid, vas-szulfid).

Frekvenciaváltozás alapú tömegszámítás

A kvarckristály mikromérleg a kvarc piezoelektromos tulajdonsága alapján méri a felszínén végbemenő tömegváltozást, azaz a szenzortechnika a frekvenciaváltozás érzékeny detektálásával teszi lehetővé a tömegmérést. A meghatározott alap rezgési frekvenciával jellemezhető kvarckristály váltóárammal rezgésbe hozható, és rendkívül stabilan tartja oszcillációs frekvenciáját. Ez az alapfrekvencia megváltozik, ha a kristály felületén adszorbeció/deszorpció megy végbe. A frekvencia eltolódása arányos a felületen lerakódott tömeggel, mely összefüggést elsőként Sauerbrey (1959) írta le az alábbiak szerint:

$$\Delta f = f_0^2 \frac{-\Delta m}{A \sqrt{\mu_q \cdot \rho_q}}$$

ahol:

Δf - frekvenciaváltozás, f_0 - kvarckristály alap rezgési frekvenciája, Δm - a kvarckristályra rakódott anyag tömege, A - kvarckristály aktív felülete (elektrodok között), μ_q – kvarc nyírási/csúsztatási modulusa, ρ_q – kvarc denzitása.

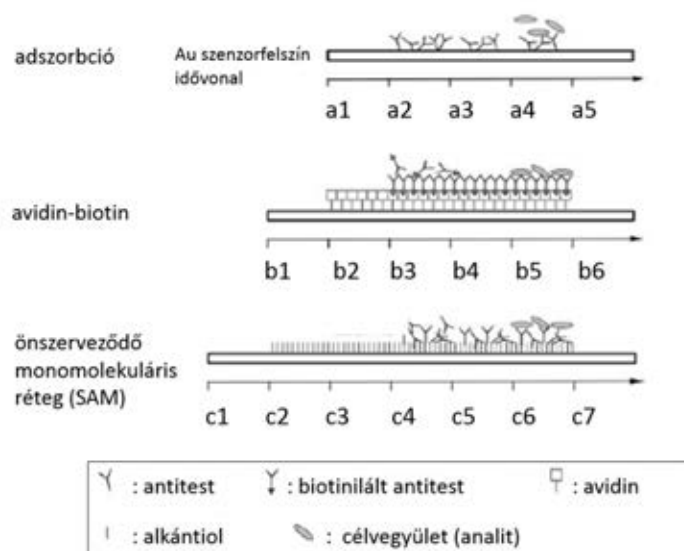
Feltételezve, hogy a kristály tulajdonságai állandóak, az alábbi formulára egyszerűsíthető az egyenlet:

$$\Delta f = -2,3 \cdot 10^6 f_0^2 \frac{\Delta m}{A}$$

A frekvencia- és a tömegváltozás között lineáris az összefüggés, tehát a kristály felületén lerakódott anyag hatására az alapfrekvencia csökken, és ez arányos az adszorbeálódott tömeggel. Az érzékenységet szemléltetendő, egy 10 MHz alapfrekvenciájú kristályon 10 ng/cm² adszorbeálódott anyagmennyiség 2,3 Hz-es frekvenciaváltozást okoz (GRÜNDLER, 2007). A Sauerbrey egyenlet azonban csak abban az esetben pontos, amennyiben a lerakódott filmréteg mintegy „kis térbeli kiterjesztése” a kristálynak, tehát ha a megkötött anyag kis rétegvastagságú (~µm) és hasonlóan a kvarchoz rigid, valamint ha legfeljebb 0,05%-os a kvarckristály $\Delta m/m$ tömegterhelése (LU et CZANDERNA, 1984). A modell pontatlanul becsüli a polimerek, biofilmrétegek, sejtek tömegét, alulbecsüli a lágy, többrétegű filmek tömegét (ARAYA-KLEINSTEUBER et LOWE, 2007; ZHOU *et al.*, 2000; MARX, 2003), és eredendően pontatlan folyadék fázisban történő méréskor, amikor a kristályhoz képest a felszín viszkozitása, denzitása, rugalmassága is nagyban különbözik a kvarcétól. A folyadék fázisra vonatkoztatott elméletek sora látott napvilágot, melyek mindegyike a viszkozitást és a denzitást tekinti kulcs paraméternek a frekvenciaváltozás folyadékfázisban történő pontos meghatározásakor (KANAZAWA et GORDON 1985; NOMURA et OKUHARA 1982; VOINOVA *et al.*, 2002; BRUCKENSTEIN et SHAY, 1985). Napjainkban egyre szélesebb körben alkalmazzák a disszipáció (D) mérésével kombinált rezonancia frekvencia mérést (QCM-D), amellyel a tömeg meghatározás mellett az adszorbeált filmréteg viszkoelasztikus jellemzőiről is információt kapunk, ez által pedig a szenzorfelzínen kötött molekuláris rétegekben jelentkező strukturális változásokat is tanulmányozhatjuk (RODAHL et KASEMO, 1996).

Biomolekulák rögzítése a kvarckristály arany vékonyrétegén

A kvarckristály mikromérleggel megvalósuló bioszenzor fejlesztések során leggyakrabban specifikus antitesteket ill. oligonukleotidokat használnak a célvegyület, mikroorganizmus stb. felismerő elemeként, amelyeket alapesetben a kvarckristály arany vékonyrétegén rögzítik. A három fő típus az adszorpció, az avidin-biotin komplexen keresztüli rögzítés és a kovalensen, önszerveződő monomolekuláris réteg (self-assembled monolayer, SAM) létrehozásával megvalósuló immobilizálás (2.7 ábra).



2.7 ábra: Fő immobilizálási eljárások a kvarckristályon (LAZCKA *et al.*, 2007)

(a1: felszín tisztítás; a2: antitest oldatba merítés; a3: mosás; a4: minta felszínre juttatása; a5: detektálás; b1: felszín tisztítás; b2: avidin borítás kialakítása; b3: biotinilált antitestek felszínre juttatása; b4: mosás; b5: minta felszínre juttatása; b6: detektálás; c1: felszín tisztítás; c2: SAM kialakítás; c3: aktiválás EDC/NHS észterrel; c4: antitest immobilizálás; c5: mosás; c6: minta felszínre juttatása; c7: detektálás)

Az adszorpció kétségtelenül a legegyszerűbb, leggyorsabb, de egyben a legkevésbé megbízható módszer is. Az antitestek random módon kapcsolódnak a felszínhez, az antigénkötő helyek megfelelő orientációja jellemzően nem kontrollálható, ezért az adszorpcióra építő bioszenzoros kimutatások teljesítménye elmarad az avidin-biotin rendszeren keresztüli vagy a kovalens rögzítési módszerek mögött (TOMBELLI *et MASCINI*, 2000). Karyakin és társai (2000) antitest fragmenteket rögzítettek adszorpcióval azok natív thiol csoportjain keresztül úgy, hogy az antigénkötő helyek nem sérültek és a szenzor elfogadható érzékenységet mutatott.

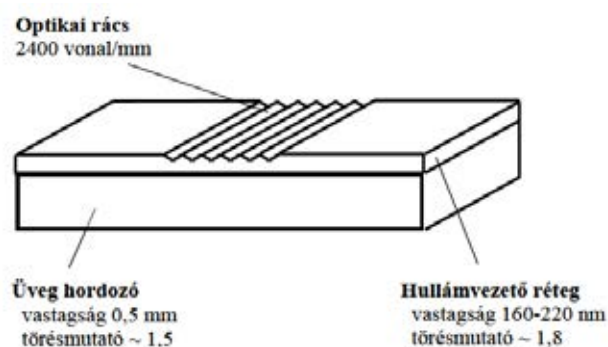
Az avidin-biotin komplexképzéssel megvalósított biomolekula rögzítés egyszerűen kivitelezhető, és igen hatékony módszer: alapesetben avidin módosított szenzorfelszínhez vagy nanorészecskékhez kapcsolnak biotinilált molekulákat (pl. antitest, DNS) (OUERGI *et al.*, 2002). Előnye, hogy habár nem kovalensen kapcsolódnak, az avidin-biotin kötés az egyik legnagyobb ismert stabilitási állandóval ($\sim 10^{15}$ mol/l) jellemezhető. Ez a rögzítési eljárás gyakran kerül alkalmazásra bioszenzorokban a mellett, hogy a szükséges vegyületek költségesek (STORRI *et al.*, 1998).

A szenzorfelszínen kialakított önszerveződő monomolekuláris rétegekben (SAM) a szerves molekulák spontán rendeződve „feji” végükkel a hordozóhoz kapcsolódnak. A „fej” rész tipikusan molekuláris láncban (pl. alkil lánc, $(C-C)^n$) folytatódik, amelynek terminális vége

módosított/módosítható. Jellemző funkciós csoportok a hidroxil-, amino-, karboxil- és a tiol csoportok, ezeken keresztül történik a biomolekulák orientált kapcsolása. A piezoelektromos szenzorok arany elektródján a SAM réteget elsősorban diszulfidok vagy tiol vegyületek etanolos oldatába merítve alakítják ki pl. alkántiol vegyületek alkalmazásával (SU et LI, 2004). A SAM alapú szenzorok széleskörű felhasználása azzal magyarázható, hogy általuk a biomolekulák orientált kapcsolása mellett robusztus szenzorok alakíthatóak ki (VAUGHAN *et al.*, 2001).

2.1.4.2 Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS)

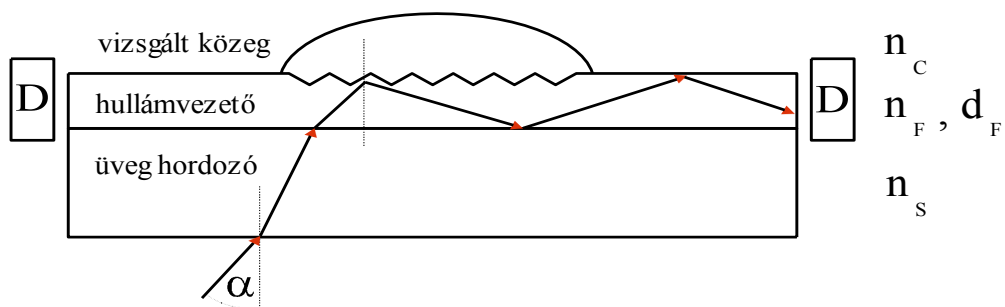
Az Optikai Hullámvezető Fénymódus Spektroszkópia (OWLS) hasonlóan a többi jelölést nem igénylő detektálási módszerhez, lehetővé teszi a határfelületen, molekuláris szinten végbemenő folyamatok valós-idejű vizsgálatát. Ez, a technika alapját képező, két fő részből álló integrált optikai hullámvezető szenzor (chip) alkalmazásával valósítható meg. A chip kialakítása során az alsó, kisebb törésmutatójú (1,5) üveghordozóra egy 160-220 nm vastagságú, nagy törésmutatójú (1,8) szilícium-oxid – titánoxid (STO) hullámvezető réteget visznek fel, amelyen egy 2 mm szélességű, 2400 osztás/mm sűrűségű aktív becsatoló optikai rácsot alakítanak ki (2.8 ábra).



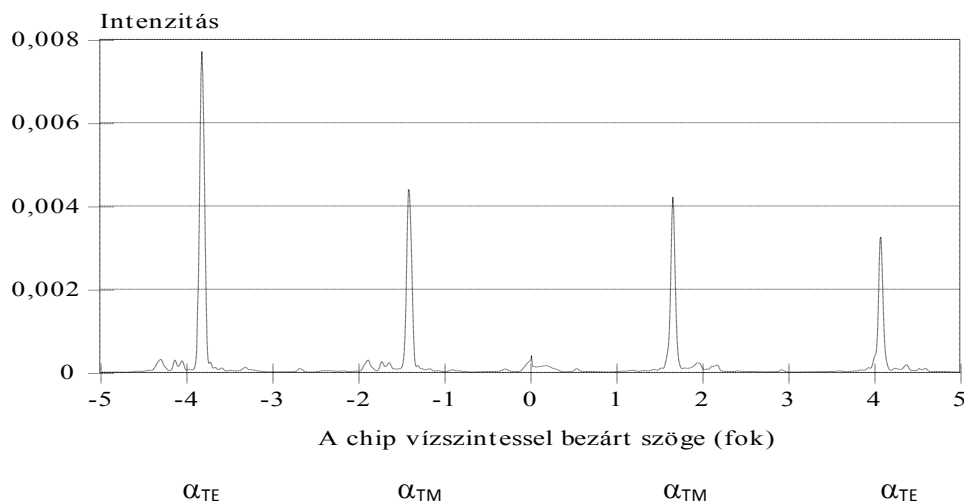
2.8 ábra: Integrált optikai hullámvezető szenzor fő részei (ADÁNYI, 2013)

A mérésnél a rácsot alulról s és p síkban polarizált, transzverz elektromos (TE) és mágneses (TM) hullámkomponensekből álló He-Ne lézer fénnel ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) világítjuk meg. A léptetőmotor segítségével a chipet tengelye mentén kis szögtartományban ($\pm 10^\circ$) forgatva a lézernyaláb felett, a fény a rácson megtörik, illetve szóródik és meghatározott szögnél (becsatolási szög) belép a hullámvezetőbe, ahol teljes visszaverődések sorozatával, hullámvezetéssel terjed. A bevezetett fénymennyiség detektálása a chip két végén elhelyezett fotodiódákkal történik (2.9 ábra). A műszer a becsatolási szögek változását méri mindkét módusra (TE és TM) a becsatolt fény intenzitásának függvényében (2.10 ábra). Ez a két beesési szög megváltozik, ha a felületen vagy annak közelében bármilyen törésmutató változás történik, és mivel a fény nemcsak a vékony

hullámvezető rétegben terjed, hanem bizonyos mélységben behatol a hullámvezető felett elhelyezkedő közegbe is, így a becsatolási szög megváltozásával érzékenyen reagál a határfelületen bekövetkező változásokra. A mért becsatolási szögekből a becsatolási egyenlet alapján mindkét fénymódusra számítható az effektív törésmutató értéke, amelyből a hullámvezető felületén megkötődött anyag törésmutató értéke és rétegvastagsága is számolható. A beesési szögek folyamatos nyomon követésével tehát kvantitatív információt nyerhetünk a felületen lezajló adszorpciós folyamatokról (PIEHLER *et al.*, 1997; RAMSDEN *et al.*, 1997; TIEFENTHALER, 1992).



2.9 ábra: OWLS szenzor felépítése, a hullámvezetőbe csatolt fény detektálása
 n_s - üveg hordozó törésmutatója, n_F - hullámvezető film törésmutatója, n_C - vizsgált közeg törésmutatója, d_F - hullámvezető vastagsága, α - becsatolási szög, D – detektor
 (ADÁNYI, 2013)



2.10 ábra: Becsatolt fény mennyisége a lézer beesési szögének függvényében (adott chipre jellemző intenzitás spektrum; α_{TE} - transzverz elektromos fénymódus becsatolási szöge, α_{TM} - transzverz mágneses fénymódus becsatolási szöge)

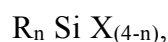
A ráccsal csatolt optikai hullámvezető technika érzékenyebb, mint más jelölésmentes detektálásra alkalmas műszerek, meghaladja az SPR szenzorét, az ellipszometriát (LUKOSZ, 1991). Az OWLS előnye, hogy a külön TM és TE módusokhoz tartozó becsatolási szögek meghatározásával a szenzor felületén megkötődött réteg két független paramétere határozható meg, összehasonlítva az SPR technikával, amellyel egy, a TM módus mérésére van lehetőség (LUKOSZ, 1995; RAMSDEN *et al.*, 1997).

Hullámvezető tisztítása, felületmódosítási eljárások

A SiO₂-TiO₂ összetételű szenzorfelület tárolás során hidrofóbbá válik, mert adszorbeálja a levegő szerves szennyezőit, ezért használat előtt szükséges a felületet tisztítása és hidratálása. A tisztítási eljárás megválasztásánál figyelembe kell venni a tisztítandó anyag fizikai, kémiai tulajdonságait, valamint a tisztítást követő alkalmazást, amely lehet közvetlen adszorpció, vagy első lépésként egy felületmódosító eljárás. Tisztítás, hidratálás céljából különféle fizikai, kémiai eljárásokat, illetve ezek kombinációit alkalmazzák. A fizikai módszerek közül legeredményesebb az oxigénplazma kezelés (XIAO *et al.* 1998), de ennek költségessége miatt még gyakoribb a hővel vagy ultrahanggal történő tisztítás. Kémiai tisztításra leggyakrabban savakat (kénsav, krómkénsav, salétromsav, sósav), ritkábban lúgokat, ill. detergenset használnak (MATVEEV, 1994; BIER *et al.* SCHMID, 1994; MAUPAS *et al.*, 1996; WILLIAMS *et al.* BLANCH, 1994; SURI *et al.*, 1994; CLERC *et al.* LUKOSZ, 1997), de számos példát találunk a tisztítási módok összetett alkalmazására is (XIAO *et al.*, 1997; RUSIN *et al.*, 1992; AHLUWALIA *et al.*, 1992).

A tisztított, hidratált hullámvezető felületén a molekulák rögzíthetők közvetlenül adszorpcióval, vagy kovalens kötéssel. A rögzítendő molekulák kovalens kötéséhez a tisztított, hidrofíllé tett felületet többnyire különböző felületmódosító eljárásoknak vetik alá, melyek közül a fémoxidok módosítására gyakran használják a szilanizálást. Az eljárás eredményeképpen a kialakuló felületi funkciós csoportok révén közvetlenül, vagy további módosítás közbeiktatásával kovalensen rögzíthetők a biomolekulák.

A szilánok általános képlete:



ahol:

$$n=1,2,3$$

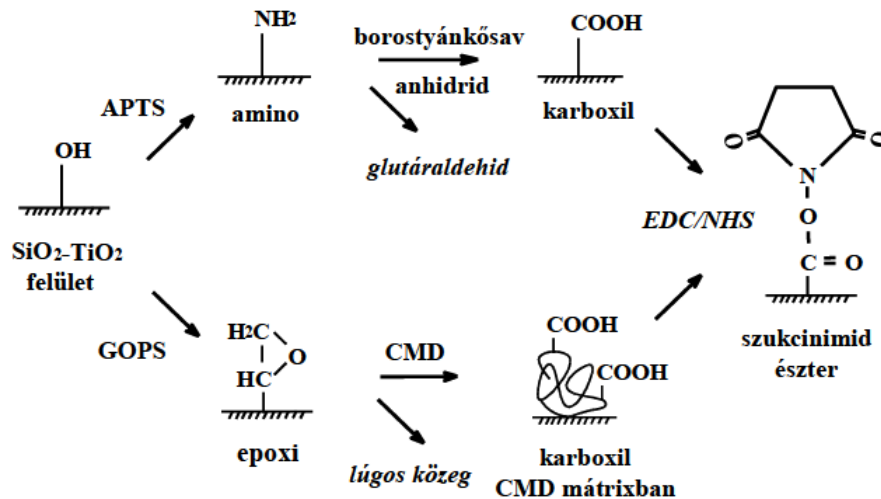
R: nem hidrolizálható funkciós csoport (pl. amino-, epoxi-, ciano- vagy fenil csoport), a rögzítendő molekulát közvetlenül, vagy keresztkötő vegyületen keresztül kapcsolja a szilánon át a hordozó felülethez; X: hidrolizálható csoport (pl. alkoxi-, amino- vagy klórcsoport), a szilán és a hordozó közötti sziloxánkötés kialakításában vesz részt.

A megfelelő szilán kiválasztása általában tapasztalati úton történik, figyelembe kell venni mind a szilanizálendő anyag, mind az alkalmazni kívánt szilán vegyület tulajdonságait és a további alkalmazási területeket. A szilánréteg vastagságát és stabilitását számos tényező befolyásolja, alapvetően függ az alkalmazott szilánvegyülettől (szénlánc hossza, hidrolizálható csoportok száma), pl. erősen hidrofób, kis hidrolitikus stabilitású felület képezhető a hosszú alkiláncú, egy hidrolizálható csoportot tartalmazó monoszilánokkal, illetve erősen keresztkötött, nagy stabilitású felszín alakítható ki rövid szénláncú, három hidrolizálható csoportot tartalmazó szilán vegyületekkel. A rétegvastagságot az oldószer típusa, az oldat koncentrációja és víztartalma is befolyásolja, de az oldat pH-ja, a kezelés hőmérséklete és időtartama, valamint a szilanizálást követő hőkezelés körülményei is fontos tényezők. A szilanizálás történhet vizes vagy szerves fázisban. A felületmódosítás időtartama az alkalmazott hőmérséklettől függően néhány órától akár 1-2 nap is lehet (WEETALL, 1993; ROY et KUNDU, 1979), ezt követően záró lépésként minden esetben hőkezelik a hordozót, így polimerizálva a felszínre felvitt szilánréteget.

Mind a vizes, mind a szerves fázisú szilanizálásnál a leggyakrabban használt vegyület a γ -aminopropil-trietoxi-szilán (APTS), amellyel aminocsoportok vihetők fel a hordozó felületére (BIER et SCHMID, 1994; SURI *et al.*, 1994; WILLIAMSON *et al.*, 1989).

Biomolekulák rögzítésének módjai a szilanizált szenzorokon

A hordozó felülethez a szilanizálással kialakított funkciós csoportokon keresztül közvetlenül, vagy azok további módosítását követően kapcsolhatunk biomolekulákat. A 2.11 ábrán a γ -aminopropil-trietoxi-szilán (APTS) és a γ -glicidoxi-propil-trimetoxi-szilán (GOPS) vegyületekkel történő felületmódosítási eljárásokat foglaltuk össze a kezelések eredményeképpen képződő felületi funkciós csoportok feltüntetésével.



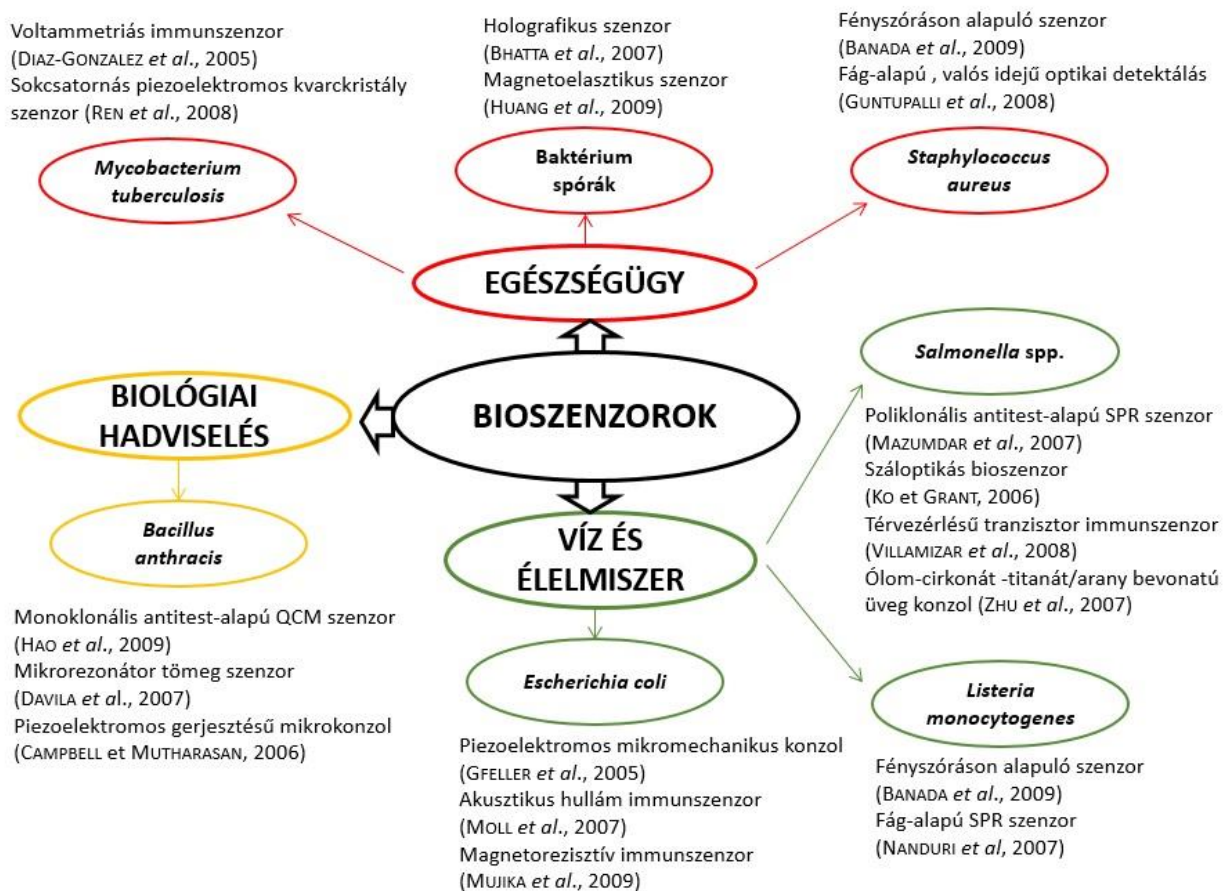
2.11 ábra: Szilanizált SiO₂-TiO₂ hordozó felületmódosítási eljárásai (APTS – γ -amino-propil-trietoxi-szilán, GOPS – γ -glicidoxi-propil-trimetoxiszilán, EDC – 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)karbodiimid-hidroklorid, NHS – N-hidroxi-szukcinimid, CMD – karboximetil-dextrán) (ADÁNYI, 2013)

Az APTS-sel történő szilanizálást követően további, egy vagy több felületaktiválási lépés szükséges, majd az így kialakított reaktív csoportokhoz a fehérjék már közvetlenül kapcsolhatók. Az aminocsoportok aktiválására gyakran használják a glutáraldehidet, amely az APTS-sel hordozófelületen kialakított, és a rögzítendő biomolekula aminocsoportjai között létesít kapcsolatot a láncvégi aldehid csoportjain keresztül (WILLIAMSON, 1989, BIER ET SCHMID, 1994), vagy a borostyánkősav anhidrides módosítást követően az EDC/NHS észter képzésen keresztüli aktiválást (WATTS *et al.*, 1994). A GOPS kezeléssel képzett felületi epoxi csoportokhoz a biomolekulák közvetlenül, vagy szintén EDC/NHS eljárás közbeiktatásával köthetők (JOHNSON *et al.*, 1991).

2.2 Baktériumok kimutatása bioszenzorokkal

A konvencionális mikrobiológiai tenyésztési eljárások (LEONI et LEGNANI, 2001, FRATAMICO 2003) mellett a polimeráz láncreakció (pl. real-time PCR: RODRÍGUEZ-LÁZARO *et al.*, 2005; multiplex PCR: JOFRÉ *et al.*, 2005; reverz transzkriptáz PCR: DEISINGH et THOMPSON, 2004), a különböző immunológiai próbák (CROWTHER, 1995; PARK *et al.*, 1996; KUHN *et al.*, 2012) és biokémiai tesztek a baktériumok azonosítására és mennyiségi meghatározására legáltalánosabban használt módszerek, ami a technikák megbízhatóságával magyarázható. Gyakran felmerülő hátrányuk azonban a lassú kivitelezés (pl. telepszámlálás, PCR), a számos

lépésből álló mintaelőkészítés, valamint a költséges műszer- és vegyszerigény (PCR, ELISA). A hagyományos technikák alternatívájaként a baktériumok kimutatását célzó bioszenzoros módszerek az utóbbi évtizedekben a kutatások fókuszába kerültek, mely munkák összegzésével, összehasonlításával kapcsolatban számos tudományos cikk jelent meg (SHARMA *et al.*, 2003; NAYAK *et al.*, 2009; PEDRERO *et al.*, 2009; ARORA *et al.*, 2011; PALCHETTI et MASCINI, 2008; SADIK *et al.*, 2009). Elsősorban a komoly egészségügyi kockázatot jelentő kórokozó mikroorganizmusok és toxinjaik gyors és megbízható kimutatásának és meghatározásának kiemelkedő a jelentősége. A fő kutatási területek ebben a témában az egészségügy/klinikai diagnózis, az élelmiszerek és vizek (környezet) minőség-ellenőrzése, valamint a biológiai hadviselés (2.12 ábra) (LAZCKA *et al.*, 2007; GOODING 2006; NAYAK *et al.*, 2009).



2.12 ábra: Bioszenzorok újabb alkalmazásai mikroorganizmusok kimutatására a mezőgazdaság, az egészségügy, a bioterrorizmus elleni védekezés és az élelmiszer minőség-ellenőrzés ágazatokban (NAYAK *et al.*, 2009, módosítva)

A jótékony hatású, probiotikus baktériumok azonosítására, mennyiségi meghatározására irányuló bioszenzoros fejlesztések híján a továbbiakban az élelmiszereket szennyező, egészségügyi kockázatot jelentő képviselőik bioszenzoros kimutatási módszereit, ezen belül is a kutatási témához szorosan kapcsolódva a jelölésmentes, bioaffinitáson alapuló szenzorokat

mutatom be bővebben. Ezt követően a probiotikus baktériumok jelentőségét, azonosításuk modern módszereit összegzem, beleértve a probiotikus baktériumokkal kapcsolatban született, bizonyos anyagcseretermékeik azonosítását célzó bioszenzoros vizsgálatokat is.

2.2.1 Élelmiszereket szennyező baktériumok

Az élelmiszerek, vizek mikrobiológiai vizsgálatára nagy figyelem irányul, hiszen az élelmiszerláncon keresztül közvetítői lehetnek patogén, ill. romlást okozó baktériumoknak, amelyek a gyomor-bélrendszerben megtelepedve egyaránt okozhatnak élelmiszer fertőzéses és anyagcsere termékeik (exotoxinok, endotoxinok) révén élelmiszer mérgezéses megbetegedéseket, így a kórokozók nyersanyagokból és késztermékekből időben történő kimutatása rendkívül fontos egészségügyi, élelmiszer-biztonsági szempont. A leggyakoribb, sokszor súlyos lefolyású megbetegedéseket okozó élelmiszereket, vizeket szennyező baktériumok a *Salmonella* (pl. *Salmonella* Typhimurium), az *Escherichia* (pl. *E. coli* O157:H7), a *Staphylococcus* (pl. *S. aureus* néhány törzse), a *Shigella* (pl. *Shigella dysenteriae*), a *Bacillus* (pl. *B. anthracis*), a *Campylobacter* (pl. *C. jejuni*), a *Clostridium* (pl. *Clostridium botulinum*) nemzetségek képviselői, ill. a *Listeria monocytogenes*, a *Coxiella burnetii* és a *Yersinia enterocolitica* fajok (FENG, 2001, ADAMS et MOSS, 2008ab).

A baktériumok kimutatására fejlesztett bioszenzorokban felismerő elemként leggyakrabban enzimeket, antitesteket és oligonukleotidokat alkalmaznak, bár az enzimeket túlnyomórészt az utóbbiak jelölő molekuláiként elektrokémiai szenzorokban, és nem a baktériumok közvetlen érzékelőiként (LAZCKA *et al.*, 2007). Számos amperometriás (LIN *et al.*, 2008, GAU *et al.*, 2001), potenciometriás (UITHOVEN *et al.*, 2000), voltametriás (LASCHI *et al.*, 2006, FARABULLINI *et al.*, 2007), konduktometriás (MUHAMMAD-TAHIR et ALOCILJA, 2004) és impedimetriás (RADKE et ALOCILJA, 2005, WANG *et al.*, 2008) szenzort fejlesztettek már élelmiszereket szennyező baktériumok mennyiségi meghatározására.

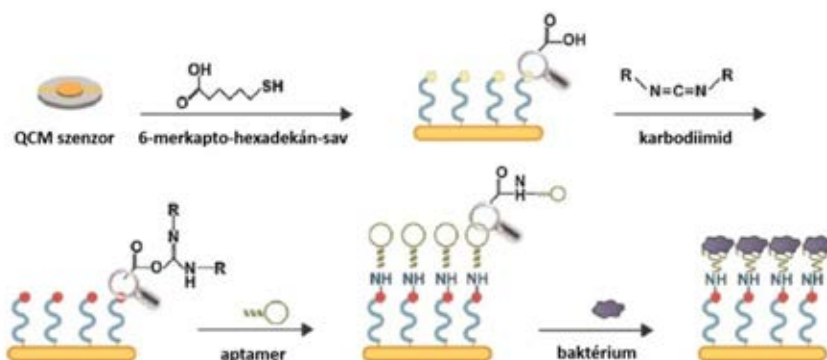
Az egyszerűbb kivitelezésből adódóan előtérbe kerülnek a jelölést nem igénylő (label-free) módszerek, amelyeket olyan szenzortechnikákkal valósítanak meg, mint a felszíni plazmon rezonancia (SPR), a kvarckristály mikromérleg (QCM), vagy az optikai hullámvezetés elvét felhasználó OWLS (GUAN *et al.*, 2004). Számos különböző kombináció létezik az alkalmazott detektorokat, a felismerő molekulákat tekintve, amely alapvetően a kimutatandó baktériumtól, az elérendő érzékenységtől, az élelmiszer mátrixtól függ (WILLNER *et al.*, 1997).

2.2.2 Jelölésmentes bioaffinitás szenzorok az élelmiszereket szennyező baktériumok kimutatására

A bioaffinitás bioszenzorokba antitestet/antigént, oligonukleotidokat (DNS, RNS), peptid nukleinsavat ill. biomimetikus bioreceptorokat (pl. molekuláris lenyomatú polimerek, aptamerek)

integrálnak felismerő elemként. A jelölésmentes detektálásra alkalmas eszközök közül a QCM, az SPR és az OWLS a leggyakrabban, elsősorban antitest-alapú kimutatásra használt szenzortechnikák (ABERL *et al.*, 1994; KÖBLINGER *et al.*; 1995, LARICCHIA-ROBBIO *et al.*, 2004), melyek gyakran kerülnek alkalmazásra az élelmiszereket, vizeket szennyező baktériumok mennyiségi meghatározására is (2.2 Táblázat).

Guilbault kutatócsoportjai *Listeria monocytogenes* baktériumra fejlesztettek QCM-alapú immunszenzorokat, amelyeknél protein A vagy G (MINUNNI *et al.*, 1996) rétegen, valamint EDC-NHS észteron keresztül (VAUGHAN *et al.*, 2001) rögzítették a specifikus antitesteket az arany elektród felszínéhez. Wong és munkatársai (2002) *Salmonella* baktériumokra és azok egyes törzseinek megkülönböztetésére is alkalmas, ezüst elektróddal ellátott QCM szenzort írtak le, az antitesteket glutáraldehiddel aktivált polietilénimin módosított hordozón rögzítve. A szintén antitest-alapú, *E. coli* baktériumra specifikus szenzorok mellett (PLOMER *et al.*, 1992; ADÁNYI *et al.*, 2006b) a coliform baktériumok azonosításra PCR amplifikált DNS oligonukleotidokat használó alkalmazások (MO *et al.*, 2002; MAO *et al.*, 2006) is ismertek, amelyek akár 10^{-12} M DNS-t ($2,67 \times 10^2$ sejt/ml) is kimutatnak. Ozalp és mtsai (2015) aptamer-alapú áramló oldatos QCM bioszenzorral *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*-ot mutatott ki tejből (LOD: 100 sejt/ml). Az aptamereket kovalensen rögzítették a szenzorfelületen kialakított imin csoportok és az aptamerek amino csoportjainak reakciójával (2.13 ábra). Az élelmiszerminták vizsgálatakor mutatott nagy érzékenységhez hozzájárult a 10 percet igénylő elő-szeparálási lépés is, amely az aptamereknek mágneses gyöngyökön való immobilizálásával történt.



2.13 ábra: Aptamer-alapú QCM szenzor felületének kialakítása (OZALP *et al.*, 2015)

Antitest-alapú SPR alkalmazásokat találunk számos patogén (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella paratyphi*) baktériumra. Zömében tiszta tenyészetek pufferes szuszpenzióit mérték 10^2 - 10^5 sejt/ml kimutatási határral, valós élelmiszermintákat nem vizsgáltak (SUBRAMANIAN *et al.*, 2006ab; HAINES et PATEL, 1995; KOUBOVÁ *et al.*, 2001; OH *et al.*, 2004). Egy gyakorlati alkalmazási példa a Wei és mtsai (2007)

által leírt immunszenzor, amelyben avidinnel módosított szenzorfelülethez kapcsolt biotinilált poliklonális antitestekkel mutattak ki *Campylobacter jejuni* baktériumokat csirkehús mintából (LOD 10^3 sejt/ml). Taylor és társai (2006) egy olyan több csatornás immunreakción alapuló SPR rendszert hoztak létre, amivel a leggyakrabban előforduló patogén baktériumok detektálhatóak, mint az *E. coli* O157:H7, *Salmonella* sp., a *Listeria monocytogenes*, és a *Campylobacter jejuni*. A mérések során $3,4 \times 10^3$ - $1,2 \times 10^5$ sejt/ml kimutatási határt értek el. Nelson és társai (2001) elsőként azonosítottak 18 bázishosszúságú egyszálú DNS oligonukleotiddal *E. coli*-ból izolált nagy, 1500 bázisból álló riboszomális 16S rRNS-t (LOD 2 nM). Új, jelölésmentes, szelektív, a detektálandó teljes sejt mikrokontakt lenyomatán alapuló SPR szenzort fejlesztettek már *E. coli* mennyiségi meghatározására, amelyben molekuláris szintű felismerő elemként N-metakriloil-L-hisztidin-metilésztert, a hisztidin polimerizálható formáját használták. A szenzor érzékenysége $1,5 \times 10^6$ sejt/ml (YILMAZ *et al.*, 2015).

Optikai, rezgő tükrő-alapú bioszenzort írtak le Watts és társai (1994) *S. aureus* felszínén protein A-t expresszáló törzsének mennyiségi meghatározására. A szendvics módszerben felismerő ligandként alkalmazott immunglobulin G-t szilanizálással módosított szenzorfelületen rögzítették, a legjobb érzékenységet IgG-arany kolloid konjugátum használatával érték el (detektálási tartomány: 4×10^3 – $1,6 \times 10^6$ sejt/ml). További példa az optikai detektálásra egy OWLS alapú *E. coli* mennyiségi meghatározására létrehozott immunszenzor. A szerzők a specifikus antitestet glutáraldehiddel kapcsolták az előzetesen γ -amino-propil-trietoxi-szilánnal kezelt hullámvezető chiphez. Méréseiket áramló injektációs (FIA) módszerrel végezték, 200 μ l mintát vizsgálva (LOD 3×10^4 sejt/ml)(ADÁNYI *et al.*, 2006b).

2.2 Táblázat: Jelölésmentes bioszenzorok az élelmiszereket szennyező baktériumok mennyiségi meghatározására

Transzducer	felismerő egység	baktérium	élelmiszer	LOD	ref.
piezo- elektromos QCM	antitest-antigén	<i>S. paratyphi</i> A, <i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i>	nincs (puffer)	1×10^4 sejt/ml	WONG <i>et al.</i> , 2002
	antitest-antigén	<i>Listeria monocytogenes</i>	nincs (puffer)	$1,2 \times 10^5$ sejt/ml	MINUNNI <i>et al.</i> , 1996
	antitest-antigén	<i>L. monocytogenes</i>	nincs (puffer)	1×10^7 sejt/ml	VAUGHAN <i>et al.</i> , 2001
	antitest-antigén	<i>E. coli</i>	nincs (puffer)	1×10^6 sejt/ml	PLOMER <i>et al.</i> , 1992
	antitest-antigén	<i>E. coli</i>	nincs (puffer)	$1,7 \times 10^5$ sejt/ml	ADÁNYI <i>et al.</i> , 2006b

	antitest-antigén	<i>Salmonella spp.</i>	nincs (puffer)	1×10 ⁶ sejt/ml	KOENIG et GRATZEL, 1993
	DNS oligonukleotid	<i>E. coli</i>	víz	10 fg	Mo et al., 2002
	DNS oligonukleotid	<i>E. coli O157:H7</i>	nincs (puffer)	10 ⁻¹² M DNS, 2,67×10 ² sejt/ml	MAO et al., 2006
	DNS oligonukleotid	<i>Staphylococcus aureus</i>	nincs (puffer)	0,015 μM	TOMBELLI et al., 2006
	aptamer	<i>S. typhimurium</i>	tej	1×10 ² sejt/ml	Ozalp et al., 2015
	molekuláris lenyomat (MIP)	<i>E. coli</i>	nincs (puffer)	0,1 mg/ml	FINDEISEN et al., 2012
	teljes sejt lenyomat	<i>E. coli</i>	nincs (puffer)	3,72×10 ⁵ sejt/ml	YILMAZ et al., 2015
optikai					
	SPR				
	antitest-antigén	<i>Staphylococcus aureus</i>	nincs (puffer)	1×10 ⁵ sejt/ml	SUBRAMANIAN et al., 2006b
	antitest-antigén	<i>Salmonella spp.</i>	nincs (puffer)	1×10 ⁴ sejt/ml	HAINES et PATEL, 1995
	antitest-antigén	<i>L. monocytogenes, S. Enteritidis</i>	nincs (puffer)	1×10 ⁶ sejt/ml	KOUBOVÁ et al., 2001
	antitest-antigén	<i>E. coli O157:H7</i>	nincs (puffer)	1×10 ³ sejt/ml	SUBRAMANIAN et al., 2006a
	antitest-antigén	<i>S. paratyphi</i>	nincs (puffer)	1×10 ² sejt/ml	OH et al., 2004
	antitest-antigén	<i>Campylobacter jejuni</i>	csirkehús	1×10 ³ sejt/ml	WEI et al., 2007
	antitest-antigén	<i>E. coli O157:H7</i>	alma üdítőital, tej, marhahús	1×10 ² -1×10 ³ sejt/ml	WASWA et al., 2007
	DNS oligonukleotid	<i>E. coli</i>	nincs (puffer)	2 nM 16S rRNS	NELSON et al., 2001
	DNS oligonukleotid	<i>Brucella abortus, E. coli, Staphylococcus aureus</i>	nincs (puffer)	100 pM DNS	PILIARIK et al., 2009
	teljes sejt lenyomat	<i>E. coli</i>	nincs (puffer)	1,54×10 ⁶ sejt/ml	YILMAZ et al., 2015
	optikai hullám-vezető				
	antitest-antigén	<i>S. aureus</i>	tej	4×10 ³ -1,6×10 ⁶ sejt/ml	WATTS et al., 1994
	antitest-antigén	<i>E. coli</i>	nincs (puffer)	3×10 ⁴ sejt/ml	ADÁNYI et al., 2006b

2.2.2 A probiotikus baktériumok jelentősége, azonosításuk modern módszerei

Sok, élelmiszerekben is előforduló, ún. probiotikus baktérium található meg az ember emésztőrendszerében, amelyek jótékony hatással vannak az általános egészségi állapotra. Ezt a felvetést tükrözi ezen baktérium csoport elnevezése is, probioitikum: „az életért”. A probiotikus

koncepciót elsőként az orosz származású Nobel-díjas Ilja Iljics Mecsnyikov (1845-1916) népszerűsítette, és megkezdte a híresen hosszú életű bolgár parasztok által fogyasztott fermentált tejtermékekben található *Lactobacillus* kultúra izolálását. Elmélete szerint ezeknek a tejsavbaktériumoknak a bélrendszer vad baktérium populációiba való transzformálásával az idős kori kóros tünetek visszaszoríthatók, és valószínűleg jelentősen növelhető az élettartam (KLAENHAMMER, 2007; BIBEL, 1988). A fermentált tejtermékek fogyasztása egyre népszerűbbé vált Európában azzal, hogy a Pasteur Intézet támogatta a bolgár *Lactobacillus*-szal készült *Le Ferment* gyártását, majd a Pasteur Intézet sikerein felbuzdulva Isaac Carasso 1919-ben Barcelonában megalapította Danone nevű cégét. Később (1930) Minoru Shirota a humán féceszből izolált *Lactobacillus* kultúrát (*L. casei* Shirota), amely túlélte a gyomor-bélrendszeren történő áthaladást (SHORTT, 1998). A fermentált Yakult tej gyártásához a mai napig a Shirota törzs tiszta tenyészetét használják, ez a termék a koreai és japán társadalmakban az étrend állandó része, és már Európában is hozzáférhető. Ezek mellett számtalan probiotikus kultúrát tartalmazó fermentált tejtermék is megtalálható a piacon, a hagyományosan fogyasztott tejtermékeken (pl. joghurt, kefir) túl pl. az édes, csak *L. acidophilus*-t tartalmazó acidophilus tej, vagy a kizárólag *B. bifidum* törzsekkel készülő bifidus tej.

A probiotikum kifejezés definíciója sokat változott, elsőként olyan, mikroorganizmusok által termelt anyagcseretermékekre vonatkoztatták, amelyek elősegítik egyéb mikrobák növekedését (LILLY *et al.*, 1965). Ez az értelmezés a napjainkban használt prebiotikum kifejezéssel mutatja a legnagyobb hasonlóságot. Fuller (1999) szerint a probiotikumok olyan élő mikrobás takarmány adalékok, amelyek jótékony hatással bírnak a gazdaszervezetre az által, hogy elősegítik a bélrendszer egyensúlyát. Napjainkban olyan humánbarát bélbaktériumokat értünk alatta, amelyeket bizonyos számban alkalmazva/elfogyasztva jótékonyan hatnak az egészségre és hozzájárulnak a jó közérzethez (GOMES *et MALCATA*, 1999; GUARNER *et SCHAAFSMA*, 1998; MARTEAU *et al.*, 1997; SALMINEN *et al.*, 1999) (2.3 Táblázat). A probiotikus baktérium megnevezés nem rendszertani kategória. Több, olyan egymással nem közelrokon baktériumcsoport is ide tartozik, amelyek azonban közös anyagcsere és élettani sajátosságokkal rendelkeznek. Az ebbe a csoportba tartozó baktériumokat a Valódi baktériumok (Eubacteria) országán belül a Firmicutes törzsbe sorolják, Gram-pozitív, spórát nem képző, kataláz- és oxidáz negatív, pálcá vagy kokkus alakú baktériumok. A tejsavbaktériumok az energianyerés érdekében homo-, és heterofermentatív módon bonthatják le a szénhidrátokat. Homofermentatív lebontás esetén a képződött anyagoknak legalább 85%-a tejsav, míg heterofermentatív lebontás esetén a tejsav mellett egyéb anyagok is keletkeznek, mint szén-dioxid, ecetsav, etanol, hangyasav, glicerin, stb. Humán táplálkozási, és élelmiszer mikrobiológiai szempontból a *Lactobacillus* és a *Bifidobacterium* nemzetségek a legjelentősebbek.

2.3 Táblázat: Humán egészség helyreállítására és megőrzésére alkalmazott probiotikus baktériumok (GOEL *et al.*, 2006, módosítva)

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	Egyéb spp.
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. lactis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>L. citreum</i>	<i>E. avium</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. pseudolongum</i>	<i>L. paramesenteroides</i>		<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. breve</i>	<i>L. pseudomesenteroides</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. thermophilum</i>			<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. eriksonii</i>			<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>B. animalis</i>			
<i>L. cremoris</i>	<i>B. adolescentis</i>			
<i>L. leichmanni</i>				
<i>L. paracesai</i>				
<i>L. gasseri</i>				
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. rhamnosus</i>				
<i>L. salivarius</i>				
<i>L. amylovorus</i>				
<i>L. johnsonii</i>				

A probiotikus mikroorganizmusok jelenlétét, azonosítását, mennyiségi meghatározását hagyományosan mikrobiológiai tenyésztési módszerrel, többnyire szelektív táptalajon végzik, amely több napig is eltartó időigényes folyamat. A lemezöntési, szélesztési technikák megbízhatóak, de előfordulnak fals pozitív és fals negatív eredmények, valamint nem minden mikroba tenyészthető a hagyományos eljárással (SPANGGAARD *et al.*, 2000). Ezért a tradicionális meghatározás mellett az olyan molekuláris biológiai módszerek használatosak, mint a polimeráz láncreakció (PCR) és annak különböző variációi (pl. *in situ*, real-time PCR), a ribotipizálás, a genomi DNS-sel végzett restrikciós fragmenthossz polimorfizmus vizsgálat (RFLP), a random amplifikált polimorf DNS vizsgálat (RAPD), a 16S rRNS szekvenálása és a fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH) (O’SULLIVAN, 1999). A legelterjedtebb PCR technikát felhasználva azonosítják többek között a különböző nemzetek jellegzetes fermentált élelmiszereinek kialakulásáért felelős mikroorganizmusokat. Randazzo és társai (2004) 16S rDNS RFLP módszerrel meghatározták a *Lactobacillus casei* azon törzseit, amelyek a szicíliai házilag készített olajbogyó jellegzetes aromáját adják, valamint Van Hoorde és társai (2010) a Gouda típusú sajtok jellegzetes ízét adó *Lactobacillus paracasei* fajokat PCR-denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) segítségével azonosították. Az élelmiszerekben található probiotikumok meghatározása mellett különböző PCR technikákat fejlesztettek probiotikus baktérium terápia bélflórára gyakorolt hatásának vizsgálatára is (BRIGIDI *et al.*, 2003; FILTEAU *et al.*, 2013).

Az enzimkapcsolt immunszorbens módszer is gyakran használatos a probiotikumok számának, leginkább féceszből történő meghatározására. Durant és mtsai (1997) monoklonális antitest alapú ELISA tesztet fejlesztettek baromfi probiotikus baktériumainak kevert tenyészetéből történő kimutatására 1×10^4 sejt/ml detektálási limittel. *Lactobacillus casei* Shirota baktérium gyomor-bélrendszeren történő átjutását vizsgálták Yuki és munkatársai (1999), a humán féceszből történő mennyiségi meghatározást monoklonális antitestekre épülő ELISA tesztel valósították meg. Szintén ELISA-val végezték el a *Bifidobacterium thermacidophilum* baktériumnak az enterohemoragiás *E. coli* O157:H7 fertőzés lefolyására gyakorolt hatásának vizsgálatát: a probiotikummal való kezelés egerekben csökkentette a fekáli *E. coli* számot és a fertőzés lefolyása enyhébbnek bizonyult (GAGNON *et al.*, 2006).

Az alternatív, gyors módszereket számba véve, eltérően az élelmiszereket szennyező baktériumok mennyiségi meghatározására fejlesztett bioszenzorok nagy számától (2.2.1 fejezet), a probiotikus baktériumok mennyiségi meghatározására bioszenzoros publikációk nem születtek. Találunk viszont példákat a probiotikumok anyagcseretermékeinek kimutatására irányuló fejlesztésekre, pl. a tejsavbaktériumok által termelt, gyakran romlásindikátorként detektált tejsav élelmiszerekből (tejtermékek, bor, sör, üdítők) történő meghatározására számos L- és D-laktát dehidrogenáz-, illetve L-laktát oxidáz enzim alapú amperometriás szenzort (PARRA *et al.* 2006; NIKOLAUS et STREHLITZ, 2008; BORI *et al.*, 2012; MONOSÍK *et al.*, 2012; MAZZEI *et al.*, 2007; PALMISANO *et al.*, 2001). Az antimikrobás hatásokról ismert bakteriocinek csoportjába tartozó, kizárólag a *Lactococcus lactis* bizonyos törzsei által termelt nizin élelmiszerből történő kimutatására Immonen és Karp (2007) fejlesztettek módosított luciferáz operonnal ellátott *Lactococcus lactis*-alapú bioszenzort. A génmódosított élő sejtekkel működő szenzorral biolumineszcenciát detektáltak, a kimutatási határ 0,1 pg/ml standard oldatokat mérve, tej esetében 3 pg/ml. A probiotikus *Lactobacillus* csoport bélrendszert kolonizáló képességét vizsgálták Uchida és mtsai (2006): a baktériumok vastagbél mucosához való kapcsolódását tanulmányozták jelölésmentes SPR-alapú szenzorral. Kilencvenhárom, székletből izolált tejsavbaktérium törzs közül kiválasztottak 4, az intesztinális nyálkahártyában expresszázó A-típusú vér antigénhez nagy affinitást mutató törzset. Ezen törzsek felszíni proteinjeinek A-antigénhez való kapcsolódása alapján feltételezik, hogy felületi fehérjéik elősegítik a humán bélrendszerben való megtelepedést. Szintén optikai detektálású szenzorral, elektrokémiai OWLS-sel vizsgálták Adányi és mtsai (2006a) különböző stressz faktorok (tejsav, ecetsav, hidrogén-peroxid) tejsavbaktériumokra gyakorolt hatását, a baktériumokat natív formában a vezető indium-*ön* szenzor felszínéhez kötve.

2.3 Mikotoxinok és kimutatásuk

2.3.1 A mikotoxinokról általában

A mikotoxinok penészgombák által termelt, kis molekulatömegű másodlagos anyagcsere termékek (PRIETO-SIMÓN *et al.*, 2007). Közös jellemzőjük, hogy erős biológiai hatásúak, a szervezetbe kerülve akut vagy krónikus mérgezést válthatnak ki. A „penészgomba” megnevezés nem rendszertani kategória, olyan mikroszkopikus gombákat értünk alatta, amelyek különböző szubsztrátokon hifaszövedékből álló finom fonalas bevonatot képeznek. Fő, élelmiszeripari szempontból is jelentős képviselőik a gombák (Fungi) országának Zygomycetes (járomspórás gombák), Ascomycetes (aszkuszos gombák) és Hyphomycetes osztályaiba tartoznak. A jól ismert *Mucor* (pl. fejespenész, *Mucor mucedo*) és *Rhizopus* (pl. *Rhizopus stolonifer*) fajok a Zygomycetes osztályba, az ismert ivaros szaporodású *Aspergillus* és a *Penicillium* fajok az Ascomycetes osztályba, míg az ismeretlen ivaros folyamatú (anamorf/imperfekt) fajukat a Hyphomycetes csoportba sorolják.

A penészek széles körű elterjedése a természetben annak köszönhető, hogy képviselőik sokféle szubsztráton és eltérő körülmények között (pl., nedvességtartalom, oxigénszint, hőmérséklet) is képesek megtelepedni. Napjainkban a penészek a legnagyobb problémát a mezőgazdasági termények szennyezésével okozzák. Gabonákon való megtelepedésük megtörténhet már a számtóföldön, problémát jelent a szakszerűtlenül végzett betakarítás, szárítás, és gyakran a helytelen tárolás során szaporodnak el a terményeken. Túl azon, hogy hatalmas gazdasági károkat okoznak a termelésben, toxikus metabolitjaik révén komoly közegészségügyi veszélyt jelentenek, elsősorban az *Aspergillus*, *Fusarium* és *Penicillium* nemzetségekbe tartozó fajok. Becslések szerint a világon megtermelt gabonafélék mintegy 25% -a bizonyos mértékig mikotoxinokkal szennyezett (FINK-GREMMELS, 1999; MANNON *et* JOHNSON, 1985). A mikotoxinok szervezetbe való kerülése nem csak az élelmiszerekkel, de bőrön keresztül, vagy belélegezve is megtörténhet. Bármilyen legyen is a kontamináció útja, komoly veszélyt jelentenek az emberi és az állati egészségre. A szennyezőanyag-kockázatértékelés szakértői szerint a mikotoxinok a legfontosabb krónikus megbetegedéseket okozó táplálkozási kockázati tényezők közé tartoznak, a szintetikus szennyezők, növényi toxinok, élelmiszer-adalékanyagok és a növényvédőszer-maradékok mellett (KUIPER-GOODMAN, 1998). A mikotoxinok ismert képviselőinek száma egyre nő, és a kémiai szerkezetük, hatásuk nagy változatosságából adódóan osztályozásuk nem egyértelmű, az újabb tudományos eredményekkel párhuzamosan folyamatosan változik, bővül. A 2.4 Táblázatban a mikotoxinok fő csoportjait és az érintett mezőgazdasági terményeket, élelmiszereket foglaltuk össze.

2.4 Táblázat: A mikotoxinok fő csoportjai és az érintett termékek (PRIETO-SIMÓN *et al.*, 2007, módosítva)

Mikotoxin	Forrás	Érintett termékek
Aflatoxinok (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ , M ₂)	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Gabonafélék (kukorica, rizs, árpa, búza), olajos magvak (mogyoró, dió, pisztácia) tésztafélék, dohány, fűszerek, gyapotmag, tej
Szterigmatocisztin (aflatoxin B ₁ prekurzora)	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. versicolor</i>	Gabonafélék (kukorica, búza, árpa), olajos magvak (dió, mogyoró), szójabab, zöld kávé, fűszerek, sonka, sajt
Ochratoxinok (A, B, C)	<i>Aspergillus alliaceus</i> , <i>A. auricomus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. viridicatum</i>	Gabonafélék (kukorica, rizs, rozs, búza, hajdina, árpa, köles, zab), szőlő, kávé, kakaó, fűszerek, szárított élelmiszerek, bor, sör, sajt
Fumonizinek (B ₁ , B ₂ , B ₃)	<i>Aspergillus alternata</i> , <i>Fusarium anthophilum</i> , <i>F. dlamini</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. napiforme</i> , <i>F. nygama</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. verticillioides</i>	Gabonafélék (kukorica, rizs, árpa, búza), olajos magvak, spárga, sör
Patulin	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Byssosclamyces</i> sp., <i>Penicillium expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i>	Penészes gyümölcsök (alma, körte, szőlő, cseresznye, meggy stb.)
Zearalenon	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Gabonafélék (kukorica, búza, árpa, zab, rizs), tésztafélék, dió, tej, állati takarmányok
A-típusú trichotecének (pl. HT-2 toxin, neozolaniol, T-2 toxin)	<i>Cephalosporium gramineum</i> , <i>Fusarium acuminatum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. myrothecium</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>Myrothecium</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Stachybotrys atra</i> , <i>Trichoderma</i> sp., <i>Trichothecium</i> sp., <i>Verticimonosporium</i> sp.	Gabonafélék (kukorica, rizs, rozs, búza, árpa, zab), manióka, földimogyoró, szójabab, napraforgómag, mustármag, burgonya, banán, mangó, sör
B-típusú trichotecének (pl. deoxinivalenol/vomitoxin, fusarenon X, nivalenol)	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Gabonafélék (kukorica, rizs, rozs, búza, hajdina, árpa, zab), tésztafélék, bébi és csecsemő élelmiszerek, maláta, sör
Ciklopiazonsav	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>P. aurantiogriseum</i> (korábban <i>P. cyclopium</i>), <i>P. camembertii</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. crustosum</i>	Kukorica, köles, széna, takarmánykeverékek, mogyoró, hüvelyesek, sajt, sonka, kolbász, virsli, paradicsom, tej
Citrinin	<i>Aspergillus carneus</i> , <i>A. niveus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>P. citrinin</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. verrucosum</i>	Gabonafélék (kukorica, rizs, rozs, búza, árpa, zab) földimogyoró, gyümölcsök, kolbász
Citreoviridin	<i>Penicillium citreonigrum</i> , <i>P. ochrosalmoneum</i>	Kukorica, rizs
Moniliformin	<i>Fusarium avenaceum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i>	Gabonafélék (kukorica, rizs, rozs, búza, zab)
Alternaria toxinok tenuazonic sav	<i>Alternaria alternata</i>	Gabonafélék (búza, rizs, rozs, cirok), dohány, napraforgó, repce, pekándió, olajbogyó, paradicsom, olajbogyó, mandarin, paprika, alma

Ergot alkaloidok	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>Neotyphodium coenophialum</i> (korábban <i>Acremonium coenophialum</i>)	Gabonafélék (kukorica, búza, rozs, árpa, köles, zab), széna, pázsitfűfélék
Lolitrem	<i>Neotyphodium lolii</i> (korábban <i>Acremonium lolii</i>)	Perjefélék
Phomopsin	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>	Csillagfürt
Penitrem A	<i>Penicillium crustosum</i>	Kukorica, dió, sajt, gyümölcsök
Roquefortinok (A, B, C)	<i>Penicillium camamberti</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. roqueforti</i>	Kukorica, pázsitfűfélék
Sporidezminek	<i>Pithomyces chartarum</i>	Pázsitfűfélék

2.3.2 Az aflatoxinok élelmiszerbiztonsági jelentősége

Az aflatoxinok felfedezése 1961-re nyúlik vissza, az 1960-ban Angliában jelentkező, több mint 100 000 pulyka elhullását okozó pulykavészt („turkey X disease”) követő évre. A betegséget az állatok takarmányában levő valamely szennyezőanyagnak tulajdonították. Vékonyréteg kromatográfias vizsgálat során derült ki, hogy bizonyos fluoreszcens, a később aflatoxinoknak elnevezett vegyületek voltak a tömeges elhullás okozói. Beigazolódott az is, hogy a mérgezés forrása az *Aspergillus flavus* penészgombával szennyezett, toxin tartalmú földimogyoróból készült táp volt. Az „Aflatoxin” elnevezés egy mozaikszó, az „A” az *Aspergillus* nemzetséget, a „fla” a *flavus* fajt jelöli. A „B” és „G” megjelölések a vékonyréteg kromatográfias vizsgálatok során UV fényben jelentkező színük angol megnevezésére (blue-kék; green-zöld), az „M” jelölés pedig az illető toxinok tejből (milk) történő első kimutatására utal (RUSTOM, 1997; TURNER *et al.*, 2009).

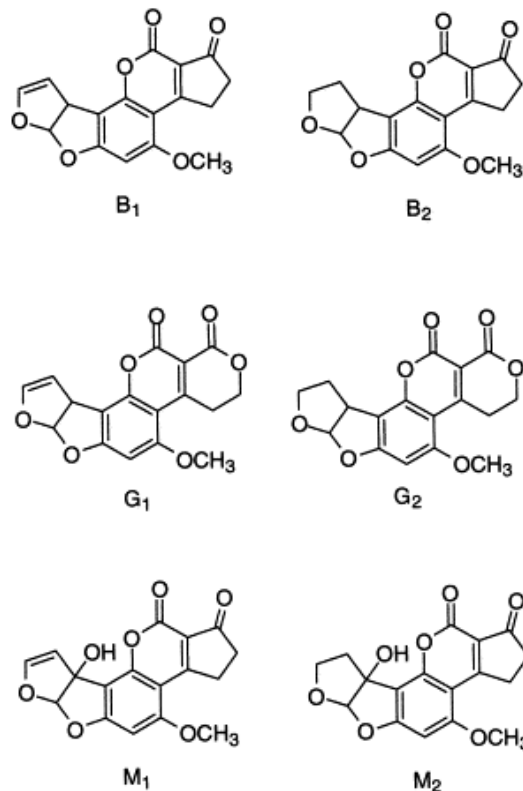
A furanokumarinok csoportjába tartozó vegyületek legjelentősebb termelői az *Aspergillus* nemzetség elsősorban forró, párás klímájú területeken elterjedt, talajlakó, növényeket károsító két faja: az aflatoxin B típusokat termelő *A. flavus* széles elterjedésű (ubiquitous) faj, előnyben részesíti a föld feletti növényi részeket (levelek, virágok), míg a korlátozottabb elterjedésű, aflatoxin B és G típusokat egyaránt termelő *A. parasiticus* jobban alkalmazkodott a talajban való életmódhoz (The EFSA Journal, 2007). Az *A. bombysis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius*, és *A. pseudotamari* szintén potenciális aflatoxin termelő fajok, de élelmiszerbiztonsági szempontból kisebb a jelentőségük (FILAZI et SIRELI, 2013). A termelt mikotoxinok minőségét és mennyiségét illetően szignifikáns különbségek vannak ugyanazon faj egyes törzsei között. Az *A. flavus* törzsek pl. csak mintegy fele termel 10^6 µg/kg fölötti koncentrációban aflatoxinokat (TURNER *et al.*, 2009).

A 18 azonosított aflatoxin főbb képviselői az aflatoxin B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), M₁ (AFM₁) és az M₂ (AFM₂) (2.14 ábra). Az *A. flavus* tipikus toxinjai az AFB₁, AFB₂, az *A. parasiticus* AFG₁, AFG₂, AFB₁ és AFB₂ toxinokat termel. Az előzőekhez képest kisebb mennyiségben termelődő B₂A és G₂A formákat izolálták már *A. flavus* és *A. parasiticus*, számos

közelrokon vegyületet, mint pl. az aflatoxin GM₂-t, a parasiticolt és az aflatoxicolt, *A. flavus* tenyészetekből.

Az akut és krónikus toxicitásuk rangsorolva: AFB₁ > AFG₁ > AFB₂ > AFG₂. A B típusok esetében a nagyobb toxicitás a ciklopentanon gyűrűhöz köthető, összehasonlítva a G típusokkal, amelyekben 6 tagú laktongyűrű szerepel. A B₁ és G₁ típusoknál az erősebb mérgező hatás a 8,9-es kettős kötés epoxidációjával magyarázható.

Az AFM₁ és AFM₂ az AFB₁ és AFB₂ hidroxilált anyagcsere termékei, amelyek emberben és állatokban is képződnek a szervezet metabolizmusa során, és kiválasztódnak az anyatejbe. Az aflatoxin B₁ vagy B₂ szennyezett élelmiszer, ill. takarmány elfogyasztásával kerül az emberi, állati szervezetbe, majd ott átalakul a kiindulási vegyületekkel összehasonlítva ugyan kevésbé mérgező, de még így is a legtoxikusabbnak ítélt mikotoxinok közé sorolt M₁ és M₂ formákká. Az AFM₁ előfordulhat tojásban, kukoricában és földimogyoróban is (ZAGHINI *et al.*, 2005; SHOTWELL *et al.*, 1976; REN *et al.*, 2007).

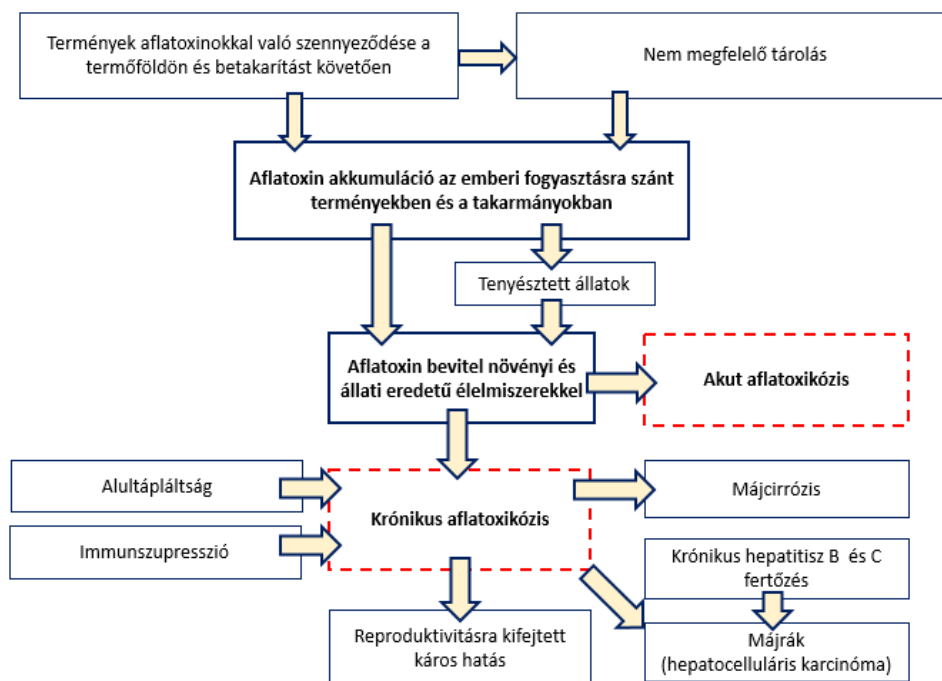


2.14 ábra: Főbb aflatoxinok kémiai szerkezete

Az emberi egészségre gyakorolt hatásokat számba véve az aflatoxinok a természetes úton képződő legrákkeltőbb, teratogénebb és mutagénebb vegyületek közé tartoznak, és a táplálékláncon keresztül az emberi szervezetbe kerülve fejtik ki káros hatásukat (2.15 ábra).

A Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (International Agency for Research on Cancer, IARC) megállapította, hogy az emberben genotoxikus karcinogének (group 1), a májrák kiváltói lehetnek. E tekintetben azok a legveszélyeztetettebbek, akik hordozzák a hepatitisz B vírus felszíni antigénjét (WHO Technical Report Series, 1998). Cullen és mtsai (1987) Fischer patkányokon végzett kísérlete alapján az AFM₁-et tized annyira rákkeltő hatású vegyületnek ítélik, mint az AFB₁-et. Az aflatoxinokkal szennyezett élelmiszerekkel való táplálkozás hosszútávon jelentkező krónikus hatásai többek között az immunrendszer működését gátló (immunszuppresszív) és genotoxikus hatás, továbbá a hepatocelluláris karcinóma kialakulása.

Az aflatoxinok számos élelmiszert szennyeznek világszerte, fellelhetők gabonafélékben, fűszerekben, olajos magvakban, zöldségekben és gyümölcsökben, tejben, tejtermékekben és más állati eredetű élelmiszerekben (pl. tojás, hús) stb. (2.4 Táblázat) (DORS *et al.*, 2011). Becslések szerint mintegy 4,5 milliárd ember, zömmel a fejlődő országok lakossága folyamatosan fogyaszt aflatoxinokkal erősen szennyezett terményeket, amely krónikus megbetegedések és akut mérgezések kialakulásához vezethet (SHUAIB *et al.*, 2010). A komoly egészségügyi kockázatot jelentő aflatoxinok és a hasonló mérgező mikotoxinok élelmiszerekben levő mennyiségét szigorúan és folyamatosan ellenőrizni és a határértékeket szabályozni szükséges annak érdekében, hogy elkerülhető legyenek a tömeges megbetegedések és az akut, esetenként halálos végkimenetelű mérgezések.



2.15 ábra: Aflatoxinok útja a táplálékláncban és az emberben okozott megbetegedések (BBOSA *et al.*, 2013)

A jövőben a különböző termékek mikotoxinogén penészgombák - ezen belül az aflatoxinokat termelő penészek is - által előidézett mikotoxin szennyeződése nagy valószínűséggel megnőhet a globális felmelegedés (átlaghőmérséklet néhány °C-kal való emelkedése), valamint az ezzel feltehetően összefüggésben levő extrém időjárási jelenségek (pl. aszályok, szokatlan méreteket öltő csapadékképződés, hőhullámok) gyakoriságának és/vagy időtartamának meghosszabbodása miatt (FARKAS et BECZNER, 2009). Számunkra különösen figyelemre méltó, hogy régióinkban a klímazónák topográfiai értelemben északabbra és nagyobb tengerszint feletti magasságokba tolnak, és hazánk klímája néhány évtized múlva Észak-Bulgária és Dél-Románia mostani éghajlatához lesz hasonló – derül ki a Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Karának Matematikai és Informatikai Tanszékén dolgozó kutatók modelljeiből és előrejelzéseiből (FARKAS *et al.*, 2013). Az európai helyzetre vonatkozóan az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) Emerging Risk részlegének felkérésére készült 2012-es jelentés szerint kukoricaszemtermésre vonatkozóan +2 °C-os hőmérséklet növekedéssel számolva Dél-Európa egyes részein (pl. Közép- és Dél-Spanyolország, Dél-Olaszország) az aflatoxinkockázat jelentősen nőhet, Magyarországon mérsékelt kockázat növekedéssel kell számolni. A +5 °C-os hőmérséklet emelkedési scenárióra számítva az érintett területek növekedése várható. Régióinkban a betakarítást követő, ún. „post-harvest” toxinképzőként is számon tartott penészgomba fajokat tartják különösen fontosnak a klímaváltozás következményei szempontjából, pl. az aflatoxinokat (*A. flavus*, *A. parasiticus*), az ochratoxin A-t (*A. ochraceus*, *P. verrucosum*) és a fumonizineket (*F. verticilloides*) termelő fajokat (FARKAS et BECZNER, 2009). Hazánk területének „mediterránizálódása” miatt elterjedőben vannak termesztett növényeinken a melegkedvelő *Aspergillus* fajok, mint pl. az *A. flavus* kukorica szemtermésén (DOBOLYI *et al.*, 2011), vagy a melegkedvelő fekete *Aspergillus* fajok szőlőn és hagymán (VARGA *et al.*, 2012).

A hazai mezőgazdasági termelésben a mikotoxin-probléma szempontjából nagy figyelmet igényel a gabonafélék (kukorica, búza) termesztése, illetve a fűszerpaprika-, az alma- és a szőlőtermesztés (KOVÁCS, 1998, FAZEKAS *et al.*, 2005).

2.3.3 A mikotoxinok analízisének hagyományos és új módszerei

A mikotoxinok vizsgálatának fő analitikai módszerei a vékonyréteg kromatográfia (TLC), nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) vagy a gázkromatográfia (GC), leggyakrabban UV-Vis vagy fluorescens spektroszkópiás, tömegspektrometriás (MS), tandem MS (MS/MS), vagy elektrokémiai detektorokkal kapcsolva (PITTET, 2005). A felsorolt módszerek alkalmazása költséges, időigényes lépéseket követel, pl. szerves oldószerekkel történő szilárd fázisú extrakció, a minta zavaró komponenseinek eltávolítása, előkoncentráció, származékképzés stb. (DALY *et al.*,

2000). Az immunaffinitás oszlopok (IACs) alkalmazásával előrelépés történt a minta extrakció és tisztítás területén, azonban a mérési eljárás még időigényes.

Az analitikai módszerek mellett a nagy specifitású és érzékenységű ELISA-t is széles körben alkalmazzák a mikotoxinok mennyiségi meghatározására, melynek előnye, hogy lehetőséget ad nagyszámú minta párhuzamos vizsgálatára, így hathatós eszköze a gyors vizsgálatoknak. Habár a legtöbb ELISA teszt nem igényel bonyolult mintaelőkészítést, azonban számos mosási lépés szükséges, és az esetek többségében használt, enzimekkel konjugált jelölő molekulák, vagy fluoreszcens festékek detektálásához speciális lemezolvasó (plate reader) berendezést igényelnek (SKOTTRUP *et al.*, 2008).

Az utóbbi évtizedben megnőtt az igény az új, nagy érzékenységű detektálási technikák kifejlesztésére, amelyet jól tükröz a témában megjelent publikációk számának növekedése. Az alternatív kimutatási módszerekhez a bioszenzorok, a multi-platformok, az egyszer használatos gyorsesztek, a molekuláris lenyomatú polimereken alapuló eljárások tartoznak (PRIETO-SIMÓN *et al.*, 2007).

Néhány mikotoxin azon tulajdonságára alapozva, hogy bizonyos enzimek szubsztrátjaként szerepelhetnek, kutatások folytak enzim-alapú, elektrokémiai detektálással megvalósított bioszenzor fejlesztésre. Moressi és munkatársai (1999) szénpaszta elektróddal végezte el alternariol és alternariol-monometil-éter amperometriás kimutatását tirozináz enzimmel, a detektálási limit alternariolra $1,9 \times 10^{-5}$ mol/l, alternariol-monometil-éterre $2,4 \times 10^{-5}$ mol/l volt. Ennek, és a hasonló szenzoroknak (MOLINA *et al.*, 1997) a fő problémája, hogy az elektród gyorsan passzivalódik a ráakódó oxidációs termékektől. Habár ezt a hibát ki tudták küszöbölni pl. arany elektródon történő dodekántiolos önszerveződő monolayer kialakításával, és az érzékenységet tovább növelték (alternariol-monometil éter LOD $9,1 \times 10^{-8}$ mol/l) (MORESSI *et al.*, 2004), továbbra is jellemző a szelektivitás hiánya, amely általában jellemző a toxinok enzimes kimutatására. A nanotechnológiai újítások, mint például a szén nanocsövek, a toxinok enzimes analízisében is megjelentek. Alkalmazásuk több szempontból is előnyös, pl. nagy mennyiségű enzim köthető a felülethez és segíti (megkönnyíti) az elektrontranszportot, ezáltal a detektálási tartomány és a kimutatási határ tekintetében jobb eredmények érhetők el, mint TLC-vel vagy HPLC-vel (YAO *et al.* 2006).

DNS-alapú bioszenzoros alkalmazások területén kevesebb publikáció született, pl. Siontorou és mtsai (1998) elektrokémiai szenzort fejlesztett, a kimutatás az aflatoxin M₁ DNS hibridizációjának gátlásán alapul. Szintén elektrokémiai (differenciál pulzus voltammetria), DNS-aptamer alapú bioszenzort fejlesztettek már ochratoxin A kimutatására is (BARTHELMEBS *et al.* 2011). A mágneses nanorészecskék felhasználásával összeállított szenzorokban a detektálás szitanyomott elektródokkal történt. Soklépéses, direkt, és indirekt kompetitív kimutatási

módszereket hasonlítottak össze. Az érzékenyebb direkt módszerrel az Európai Unióban érvényes szabályozásnak megfelelő határérték alatti koncentrációban mutatták ki a toxint borból (LOD 0,11 ng/ml).

Az immunoassay vizsgálatok az ellenanyagok és antigének specifikus és nagy affinitású reakciójából adódóan eredendően nagy szelektivitással és érzékenységgel jellemezhetők, és lehetővé teszik több minta párhuzamos elemzését is. Az előnyöket figyelembe véve érthető, hogy a legtöbb újítás is ezen a területen születik.

Egy előremutató lépés a hordozható, gyors, költséghatékony eszközök kialakítása felé az immuntesztcsíkok (immunkémiai tesztcsíkok) fejlesztése, melyekkel érzékeny *in situ* vizsgálatok végezhetők. A leggyakoribb alkalmazás a több zónából álló immunfiltrációs, laterális áramlás elvét felhasználó teszt, amelyben az antigén/antitest kimutatását a meghatározott zónákban membránhoz kötött színes reagensekkel jelölt és jelöletlen immunglobulinokkal/antigénekkal valósítják meg. A minta átáramlik a tesztcsíkon és az ún. tesztzónákban jelentkező színváltozás jelzi az eredményt. Igen/nem választ adó kvalitatív, és félkvantitatív meghatározást tesznek lehetővé. Kompetitív laterális áramlás tesztet fejlesztettek Delmulle és társai (2005) aflatoxin B₁ sertés tápból történő kimutatására. A tesztcsík egyes zónáiban a membránhoz aflatoxin B₁-BSA konjugátumokat, illetve arany kolloid részecskékké kapcsolts specifikus monoklonális antitesteket kötöttek. A mintában levő aflatoxin B₁ verseng a tesztcsíkban immobilizált toxinnal a detektálási zónában korlátozott mennyiségben levő antitestek kötő helyeiért. A minta tesztcsíkra való felvitele előtt előkészítést igényel, a legjobb eredményt (LOD 5 µg/l) metanolos vizes (80:20 V/V) extrakcióval érték el. Egy rendhagyó, szintén aflatoxin B₁ kimutatására fejlesztett, érzékeny (LOD 20 ng/l) tesztben a mintában levő szabad toxin molekulák versengenek az aflatoxin B₁-gyel kapcsolt, festék molekulákat tartalmazó liposzómákkal az ellenanyag szabad kötő helyeiért. Túl azon, hogy egyszerűen, vizuálisan értékelhető a teszt, lehetőség van az optikai denzitás mérése (pásztázó denzitométer) alapján a kvantitatív elemzésre is (HO et WAUCHOPE, 2002).

Az immunoszenzorok alkalmazásának számos előnye van, összevetve az eddig ismertett ELISA kitekkel (pl. gyorsabb analízis, folyamatos monitoring, lehetőség van a biológiai érzékelő regenerálására) és immuntesztcsíkokkal (pl. folyamatos monitoring, kvantitatív meghatározás, érzékelő regenerálásának lehetősége). A megfelelő detektálási módszerrel kombinálva pedig hordozható szenzorok is kialakíthatók. Mindezek mellett az általánosan alkalmazott jelöléssel megvalósított mérés technika korlátozó tényező lehet, ezért a fejlesztési törekvések egyik ága az alternatív, jelölésmentes módszerek kidolgozására irányul. A mikotoxinok mennyiségi meghatározására fejlesztett elektrokémiai immunszenzorokra hozott példákat követően ezen, jelölést nem igénylő módszereket mutatom be részletesebben.

Alarcón és mtsai (2006) szitanyomott szén elektródokkal valósította meg ochratoxin A direkt és indirekt kompetitív meghatározását monoklonális antitestek felhasználásával. Az ochratoxint alkalikus foszfáttal jelölték, és az 1-naftil-foszfáttal lezajló reakcióban képződő 1-naftolt mérték differenciál pulzus voltammetriával. A direkt módszer érzékenyebb volt, bár mindkét esetben a törvényi szabályozásban meghatározott 375 ng/l határérték alatti detektálási limitet ($LOD_{\text{direkt}}=60\text{ng/l}$; $LOD_{\text{indirekt}}=100\text{ ng/l}$) érték el. A lisztmintákat direkt úton, egy lépéses acetonitriles extrakciót (acetonitril:víz 6:4 V/V) követően mérték ($LOD=0,4\ \mu\text{g/kg}$). Enzimgátláson alapuló konduktometriás mérési módszert dolgoztak ki aflatoxin B₁ kimutatására Liu és mtsai (2006). A vezetőképesség változás a tormaperoxidáz (HRP) bio-elektrokatalitikus reakcióján alapul: a bioérzékelő réteget a mikroelektrodon rögzített arany nanorészecskékhez kötött HRP-aflatoxin antitest képezi. A mérés elve, hogy a mintában levő toxin molekulák az elektród felületen az antitesttel immunkomplexet képeznek, amely gátat képez a HRP-elektrod felszín elektromos jelátvitelében. A mérést foszfát pufferben, H₂O₂, KI és NaCl jelenlétében végezték, a toxin kimutatási határa 0,1 ng/ml.

A jelölést nem igénylő szenzortechnikák eredményesen alkalmazhatók az antigének direkt mérési módszerrel történő kimutatására, amennyiben a mérendő anyag kellően nagy molakulatömegű ahhoz, hogy a szenzorfelületen rögzített antitesthez való kapcsolódását a detektorral érzékenyen tudjuk mérni. A mikotoxinok kis molekulatömegéből adódóan mennyiségi meghatározásukra túlnyomórészt indirekt meghatározásokat végeznek mind a piezoelektromos mind az optikai szenzortechnikákkal, mivel az antitestek kDa-os tömegükkel jól mérhetőek. QCM alkalmazásra példa Jin és mtsai (2009) indirekt kompetitív aflatoxin B₁ szenzora, amelyben arany nanorészecskéket használtak, mint a másodlagos antitestek "tömeg jelölőit", ezzel jelerősítést indukálva. 0,01 ng/ml kimutatási határt érték el toxin standardokkal szennyezett tejben, a dinamikus méréstartomány 0,1-100 ng/ml volt. A szenzorral több minta egymást követő mérését végezték el a kétlépéses (glicin-NaOH, pH 12,5; glicin-HCl, pH 2,7) regenerálást követően.

SPR szenzortechnikát számos mikotoxin immunreakció-alapú analízisére fejlesztettek (2.5 Táblázat). Indirekt módszerrel határoztak meg aflatoxin B₁, deoxinivalenol, fumonizin B₁ és zearalenon toxinokat van der Gaag és társai (2003). Az ismert koncentrációjú specifikus antitesteket tartalmazó oldatot inkubálták az ismeretlen koncentrációjú toxinokat tartalmazó mintával, majd a keveréket a szenzorfelületre injektálták. Így, a szenzorral a komplexet nem képező szabad antitesteket mérték vissza az egyes mérőcella részegységekben rögzített toxin molekulákkal. A szenzorral a mikotoxinokat a regenerálási lépéssel együtt 25 percen belül lehet mérni. Egy másik, szintén indirekt módszert felhasználó alkalmazásban az aflatoxin B₁-et BSA-val konjugálva kapcsolták a szenzorhoz dextrán gélen keresztül. A szerzők által előállított poliklonális antitest-, és a szenzorfelületen rögzített toxin-molekulák között kialakuló másodlagos

kötéseket 20 V/V% acetonitrilt tartalmazó 1 mol/l etanolamin oldattal bontva regenerálták a szenzort. Mullett és mtsai (1998) a direkt módszer érzékenységét a minta recirkulációjával fokozó módszerrel mutattak ki fumonizin B₁ toxint SPR szenzorról. Az 50 ng/ml-es kimutatási határ gyakorlatilag megegyezik egy másik, indirekt meghatározással (VAN DER GAAG *et al.*, 2003) elért kimutatási határral. A szenzor jól használható monitorozó, gyors mérésekre (10 perc/minta). Deoxinivalenol indirekt meghatározására több, mint 500 alkalommal az érzékenység jelentős csökkenése nélkül használható immunszenzort fejlesztettek Tüdös és mtsai (2003), a regenerálást 6 mol/l guanidin-kloriddal végezték (méréstartomány: 2,5-30 ng/ml).

2.5 Táblázat: Mikotoxinok kimutatása SPR immunszenzorokkal (HODNIK et ANDERLUH, 2009)

Mikotoxin	M_w (Da)	detektálás típusa	kimutatási határ	Referencia
Deoxinivalenol	296,3	indirekt	0,5 ng/g	VAN DER GAAG <i>et al.</i> , 2003
Deoxinivalenol	296,3	indirekt	2,5 ng/ml	TÜDÖS <i>et al.</i> , 2003
Aflatoxin B ₁	312,3	indirekt	0,2 ng/g	VAN DER GAAG <i>et al.</i> , 2003
Aflatoxin B ₁	312,3	indirekt	3 ng/ml	DALY <i>et al.</i> , 2000
Zearalenon	318,4	indirekt	0,01 ng/g	VAN DER GAAG <i>et al.</i> , 2003
Ochratoxin A	403,8	indirekt	0,1 ng/g	VAN DER GAAG <i>et al.</i> , 2003
Ochratoxin A	403,8	direkt	0,1 µg/ml	YU et LAI., 2004
Fumonizin B ₁	721,8	indirekt	50 ng/g	VAN DER GAAG <i>et al.</i> , 2003
Fumonizin B ₁	721,8	direkt	50 ng/ml	MULLETT <i>et al.</i> , 1998

Optikai detektáláson alapuló OWLS technikát alkalmazva mutattak ki ocratoxin A-t és aflatoxin B₁-et direkt és kompetitív módszerrel Adányi és mtsai (2007). Mivel a direkt meghatározás nem bizonyult elég érzékenynek, a kompetitív eljárást optimalizálták, mellyel a detektálási tartomány 0,5-10 ng/ml volt mindkét toxinra. Árpa és búza mintákat vizsgálva a szenzoros eredmények jól korreláltak a kontroll méréshez használt ELISA teszt eredményeivel.

3. CÉLKITŰZÉS

QCM és OWLS-alapú immunszenzorok fejlesztését tűztem ki célul probiotikus baktériumok (*L. acidophilus* és *B. bifidum*), valamint OWLS-alapú immunszenzor kialakítását aflatoxin M₁ mennyiségi meghatározására az alábbiak szerint:

1. A QCM immunszenzor fejlesztésének megalapozására modell méréseket (BSA - anti-BSA molekulapár) terveztem, melynek célja a piezoelektromos szenzor áramló oldatos, direkt immunanalitikai módszerrel történő alkalmazhatóságának tanulmányozása volt, ezen belül antitest immobilizálási és mérési eljárások összehasonlítását, a működési paraméterek immunszenzor érzékenységére gyakorolt hatásának vizsgálatát terveztem.

2. A QCM és OWLS-alapú immunszenzorok fejlesztése során céлом volt a mérési paraméterek optimalizálását követően a szenzorok kalibrálása pufferes baktérium szuszpenziókkal és a baktériumokkal mesterségesen szennyezett tejmintákkal, majd a fejlesztett bioszenzorokkal ismeretlen sejtszámú fermentált tejminták *L. acidophilus* és *B. bifidum* sejtszámának meghatározása, továbbá szelektivitási vizsgálatok kivitelezése.

3. Az OWLS-alapú aflatoxin M₁ bioszenzor fejlesztése során célul tűztem ki működési paraméterek – mérési hőmérséklet, aflatoxin M₁ antitest, és a szenzorfelületen rögzítendő AFM₁-HRP konjugátum optimális koncentrációja – meghatározását, különböző mintaelőkészítési módszerek szenzor érzékenységére és a visszanyerési hatékonyságra kifejtett hatásának vizsgálatát. Végül céлом volt a fejlesztett indirekt immunszenzorral az AFM₁ mennyiségét tejmintákban meghatározni.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Anyagok, vegyszerek

A *L. acidophilus* és a *B. bifidum* baktériumok tenyésztésére szolgáló táptalajokat (de Man, Rogosa and Sharpe agar, MRS; Bifidus Selective Medium agar, BSM), a marha szérum albumint (BSA), az aflatoxin M₁-et (AFM₁), a γ -aminopropil-trietoxi-szilánt (APTS), a trisz(hidroximetil)-aminometánt (Tris), a 16-merkaptó-hexadecán savat (MHDA), az 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimidet (EDC), a dithiothreitol (DTT), az o-fenilén-diamin-dihidrokloridot (OPD), a polioxietilén-szorbitán-monolaurátot (TWEEN 20) a Sigma-Aldrich Co. Ltd-től, (MO, USA) szereztük be. A szulfoszukcinimidil 6-[3-(2-piridilditio) propionamido] hexanoát (szulfo-LC-SPDP) keresztkötőt, és az N-hidroxi-szukcinimidet (NHS) a Thermo Scientific Inc.-től (IL, USA) a 25%-os glutáraldehid oldatot a Merck KGaA-tól (Németország) rendeltük. A 3 KDa centrifugaszűrőt (3 KDa Macrosep) a Pall Co.-től (USA) szereztük be. A bioszenzoros mérések valós mintáihoz 1,5%-os zsírtartalmú, helyi élelmiszerboltból beszerzett UHT tejet használtam.

4.2 Mikroorganizmusok, antitestek

A modell immunanalitikai vizsgálatokhoz szükséges anti-BSA IgG (2,6 mg/ml) a Sigma-Aldrich Co. Ltd. (MO, USA) terméke volt.

A Budapesti Corvinus Egyetem (Mikrobiológia és Biotechnológia tanszék) biztosította a kísérletekhez szükséges baktérium törzseket (*Lactobacillus acidophilus* NCAIMB O1132 (*L. acidophilus*), *Bifidobacterium bifidum* NCAIMB O1356 (*B. bifidum*), *Bifidobacterium longum* NCAIMB O1819 (*B. longum*) és *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NCAIMB O2123 (*L. lactis*)). A *L. acidophilus* (4,48 mg/ml) és a *B. bifidum* (27,28 mg/ml) antiszérumokat a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs központ Élelmiszer-tudományi Kutatóintézetének (NAIK-ÉKI) (korábban Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet) Biológiai Osztályán állítottuk elő újjélandi fehér nyulak immunizálásával (lásd: 4.4.1, 4.4.2 és 4.4.3 pontok).

Az aflatoxin M₁-BSA (AFM₁-BSA) immunogénre előállított poliklonális nyúl aflatoxin M₁ szérumot (85 mg/ml) az Agriserától (Svédország), az aflatoxin M₁-tormaperoxidáz (AFM₁-HRP) konjugátumot (22 mg/ml) az R-Biopharmtól (Németország) szereztük be.

4.3 ELISA tesztek

A probiotikus baktérium antitestek szelektivitás-vizsgálatára összeállított ELISA teszthez a 96 lyukú mikrotiter lemez (200 μ L) a VWR International-tól (Germany), a tormaperoxidázzal (HRP) jelölt kecske anti-nyúl IgG a Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.-től (PA, USA) származott. A bioszenzoros aflatoxin M₁ mérések során a tejminták aflatoxin M₁ mentességének igazolását, illetve a standard minták bioszenzoros méréseihez a referencia vizsgálatot kompetitív ELISA teszttel (Ridascreen Aflatoxin M₁ teszt kit, RBiopharm, Germany) végeztem el.

4.4 Módszerek

4.4.1 *L. acidophilus* és *B. bifidum* antigének kinyerése

Az immunizáláshoz szükséges sejtfal antigének kinyerését és a bioszenzoros vizsgálatokhoz szükséges antiszérumok előállítását az Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet (ÉKI, korábban KÉKI) Biológia Osztályán végeztük.

Az antigének kinyerése céljából feltártuk a baktérium sejteket. A táplevesben szaporított *B. bifidum* és *L. acidophilus* sejteket lecentrifugáltuk (5500 g, 15 perc), a táplevest leöntöttük és a sejteket desztillált vízben újraszuszpendáltuk. A sejtek roncsolása French Press Cell Disrupter (FA-003 20K mini) készülékkel 800 PSI nyomáson háromszori ismétlésben történt. A nagyobb sejt darabok centrifugálással való eltávolítása (5 500 g, 15 perc) után a kinyert felülúszót a sejtfal antigén kinyerése céljából újra lecentrifugáltuk (12 000 g, 15 perc). Ezt követően háromszor desztillált vizes mosást alkalmaztunk, majd a kapott szuszpenziót liofilizáltuk.

4.4.2 Immunizálás

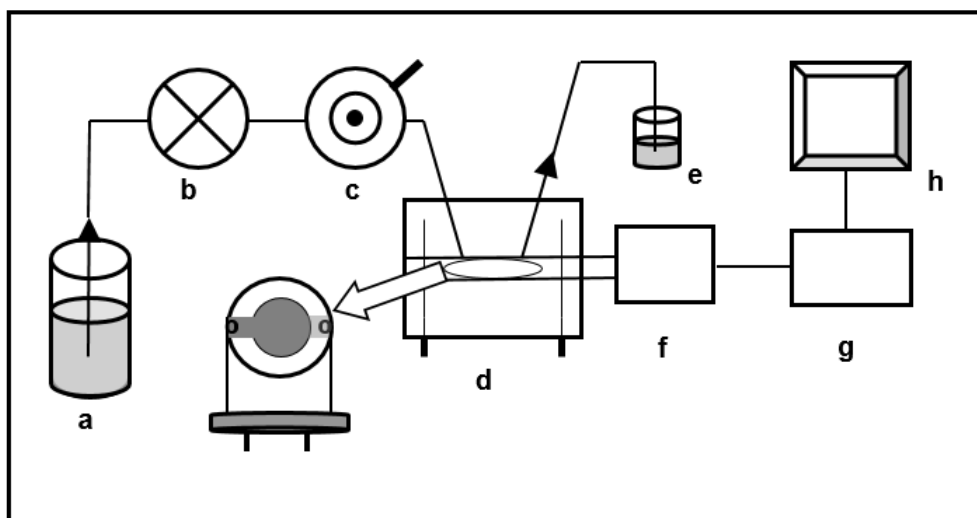
Az immunizáláshoz fiatal, felnőtt, nő ivarú nyúl alanyokat (kb. 2-2,5 kg induló súlyú új-zélandi fehér nyulak) választottunk. Ezt indokolja, hogy pubertás korban, ill. idősebb egyedeknél csökken az immunválasz, illetve a női ivarú egyedekben nagyobb mennyiségben termelődnek az antitestek. Az adott antigénre specifikus nyúlszérum előállítása a nyúl alanyok szubkután immunizálásával, Harboe és Ingild (1973) módszerét adaptálva történt. Az alapimmunizáláshoz Freund-komplett adjuvánst, a további, emlékeztető immunizálásokhoz Freund-inkomplett adjuvánst használtunk: az első oltás a sejtfal antigén és komplett Freund adjuváns 1:1 elegye (100 μ l) volt, mely az antigént 25 μ g/nyúl testtömeg kg koncentrációban tartalmazta. Az első immunizálást követő 14., 28., és a 42. napon inkomplett Freund adjuváns használatával megismételtük az immunizálást. Az oltásokat minden esetben lapocka közé, többszöri injektálással adtuk. Az immunizálás előtt levettük a kontrollszérumot, az immunszérumokat pedig a marginális vénából, 8-10 nappal az emlékeztető oltások után vettük.

4.4.3 Antigén-specifikus, tisztított IgG előállítása

A szérumsztítást IgG frakcióra, kisózásos módszerrel végeztük (HARBOE et INGILD, 1973). Tíz ml nyers immunszérumot lassú kevertetés mellett 1:1 arányban szobahőmérsékleten 70%-os ammónium-szulfáttal elegyítettünk, a kémhatását ammóniával pH 7,0-re állítottuk be. Az elegyet további két óráig kevertettük, majd lecentrifugáltuk (20 perc, 2500 fordulat/min). A kiülepedett csapadékot újraoldottuk 5 ml foszfát pufferben (0,01 mol/l, pH 7,4) és 70%-os ammónium szulfáttal 10 ml-re egészítettük ki, majd az előbbieket szerint ismét kevertettük és centrifugáltuk a szuszpenziót. Végül az 5 ml foszfát pufferben (0,01 mol/l, pH 7,4) újraoldott IgG-frakcióból álló csapadékot 10×21 mm dializáló zsákba (Serva, Visking) töltöttük és 20-szoros térfogatnyi pufferrel szemben, 2×12 óráig dializáltuk 4 °C-on. A tisztított szérumot felhasználásig mélyhűtőben tároltuk.

4.4.4 QCM mérőrendszer

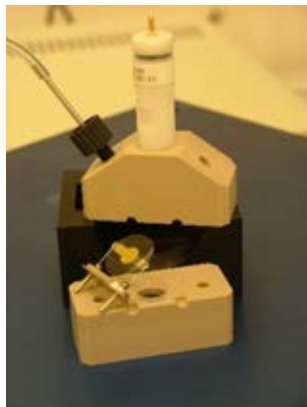
A QCM mérőrendszert (430A modell, CH Instruments, TX, USA) áramló oldatos vizsgálatokhoz állítottam össze, fő részei az átfolyó cella a kvarckristály munkaelektroddal, az oszcillátor és az analizátor (CH Instruments, TX, USA) (4.1 ábra).



4.1 ábra: QCM mérőrendszer sematikus rajza áramló oldatos mérésekhez összeállítva (a: puffer; b: perisztaltikus pumpa; c: injektor; d: átfolyó cella a kvarckristállyal; e: hulladék; f: oszcillátor; g: analizátor; h: számítógép)

Az immunszenzorok kialakításakor az antitestek rögzítése az arany vékonyréteggel ($2 \times 0,196 \text{ cm}^2$) ellátott 7,995 MHz-es AT hasítású kvarckristály (Ch Instruments, TX, USA) felső oldali arany elektrodján történt önszerveződő monomolekuláris keresztkötő réteg képzésével (lásd: 4.4.4.1 pont). Az előkészített, antitest borítású (felületmódosított) kristályt a 70 μl belső térfogatú átfolyó cellába (4.2 ábra) helyezve rögzítettem, és az oszcillátorhoz csatlakoztattam,

amelyet a jelfeldolgozó egységhez kapcsoltam. A folyamatos folyadékáramlást perisztaltikus pumpával (Minipuls 3, Gilson, Franciaország) biztosítottam. A minták szenzorfelületre juttatását injektorral (Rheodyne 7725, CA, USA) végeztem, amelyet 200 vagy 500 µl-es mintahurokkal láttam el.



4.2 ábra: A QCM átfolyó cellája a kvarckristállyal

4.4.4.1 Szenzor előkészítés, felületmódosítás

Az önszerveződő monomolekuláris réteg létrehozása előtt a kvarckristály arany elektródja tisztítást igényel: 20 µl 1,2 mol/l NaOH oldattal 20 percig kezeltem, majd vizes mosás és szárítás után azonos mennyiségű 1,2 mol/l HCl oldattal 5 percig, végül koncentrált HCl oldattal kezeltem 2 percig (ADÁNYI, 2006b). Záró lépésként desztillált vízzel mostam, majd nitrogén gőzben szárítottam a kvarckristályt.

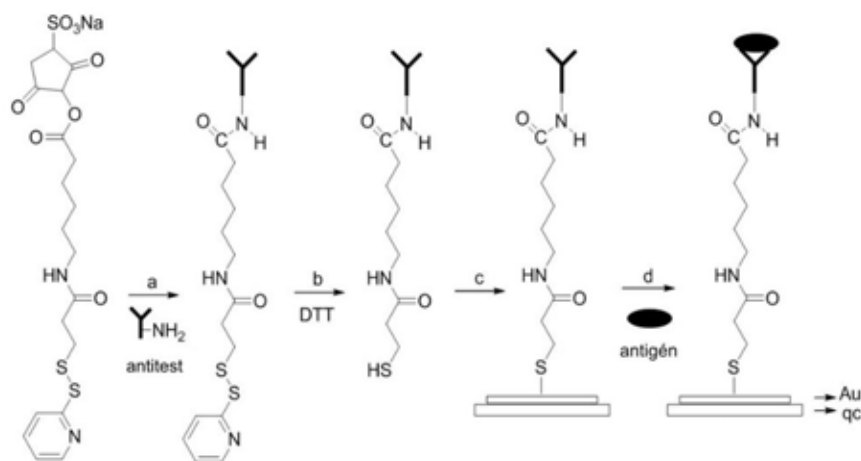
A BSA – anti-BSA modellmérések során két antitest immobilizálási módszert hasonlítottam össze. A szulfo-LC-SPDP és MHDA keresztkötő reagensekkel végzett felületmódosítás (PARK et KIM, 1998; SU et LI, 2004) elvét a 4.3 és a 4.4 ábrákon összegeztem. A modellméréseket követően a probiotikus baktériumok kimutatására fejlesztett immunszenzorokban szulfo-LC-SPDP-vel módosítottam a szenzorfelületet.

Antitest rögzítés lépései szulfo-LC-SPDP keresztkötővel:

- 9 µl antitest oldat (75 mmol/l foszfát puffer, pH 7,4) + 9 µl 20 mmol/l szulfo-LC-SPDP oldat → 1 h inkubáció szobahőmérsékleten,
- Az inkubációt követően az oldathoz adtam 6 µl 25 mmol/l DTT oldatot (100 mmol/l acetát puffer, 100 mmol/l NaCl, pH 4,5) és további harminc percig inkubáltam,
- A tisztított elektród felületére felvittem 10 µl oldatot, amit szobahőmérsékleten kb. 1 óra alatt beszárítottam.

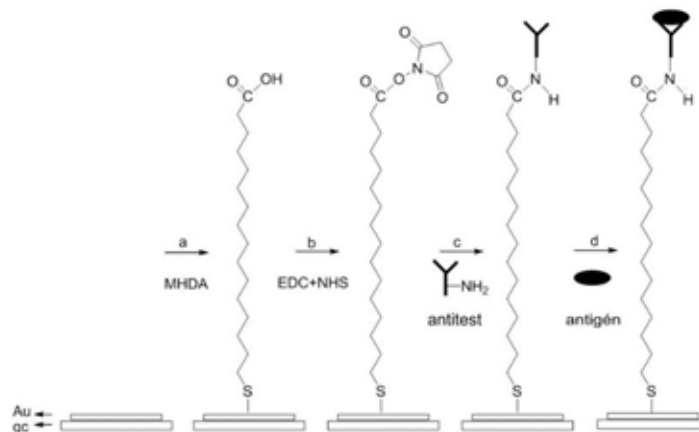
Antitest rögzítés lépései MHDA keresztkötővel:

- 5 mmol/l etanolos MHDA oldatba merítettem a kvarckristályt 24 h-ra,
- A szenzorfelszín etanolos és vizes mosását, szárítását követően 10 μ l 75 mmol/l EDC és 15 mmol/l NHS észterrel (1:1 arányú elegy) végeztem a szenzorfelszín módosítását,
- Vizes mosás és szárítás után 10 μ l megfelelő koncentrációjú antitest oldatot vittem fel a szenzorra és szárítottam.



4.3 ábra: Antitest immobilizálás mechanizmusa szulfo-LC-SPDP keresztkötővel (SZALONTAI *et al.*, 2012)

(Au: arany vékonyréteg; qc: kvarckristály; a: szulfo-LC-SPDP reakciója az antitest aminos csoportjával; b: láncvégi tiol csoport képzés DTT-vel; c: antitest Au réteghez való kötése a keresztkötő tiol csoportján keresztül; d: antigén antitesthez való kapcsolódása)



4.4 ábra: Antitest immobilizálás mechanizmusa MHDA keresztkötővel (SZALONTAI *et al.*, 2012) (Au: arany vékonyréteg; qc: kvarckristály; a: orientált monomolekuláris MHDA keresztkötő réteg létrehozása a szenzorfelületen; b: keresztkötő aktiválása NHS észter képzéssel; c: antitest immobilizálása amid csoporton keresztül; d: antigén antitesthez való kapcsolódása)

4.4.4.2 Probiotikus baktériumok kimutatásának módszerei

A. B. bifidum és a *L. acidophilus* baktériumok QCM bioszenzoros meghatározását direkt mérési módszerrel végeztem, azaz a megfelelő eljárással a kvarckristály felületére rögzített antitestekkel közvetlenül mértem a vizsgált mintából a baktérium sejteket. Az immunszenzorok fejlesztésekor a következő két folyadékáramlásos rendszert alkalmaztam és hasonlítottam össze, mindkét esetben injektációs módszerrel juttattam a mintákat a szenzorok felületére.

1. Áramló injektációs analízis (FIA):

Az alapvonalat a reakció puffer (75 mmol/l pH 7,4 foszfát) áramoltatásakor kapott stabil jelválasznál vettem fel, amelyhez a felületmódosított chip átfolyó cellába helyezését és a pufferáram elindítását követően hozzávetőlegesen fél óra szükséges. A szenzorfelületen bekövetkező változásokat – immunkomplex képződés, regenerálás – jelző frekvenciaváltozást (Hz) az idő függvényében vizsgáltam. Miután stabil alapvonalat vettem fel a pufferre, injektáltam a mintát (200 vagy 500 μ l), és az antitest-antigén molekulakomplex képződését kísérő frekvencia eltolódást (csökkenést) detektáltam. Az áramlási sebességtől függően kb. 20 perc szükséges az injektálást követően az alapvonal újbóli stabilizálására. A frekvenciaváltozást a minta injektálása előtti és az azt követő frekvencia különbségéből számoltam.

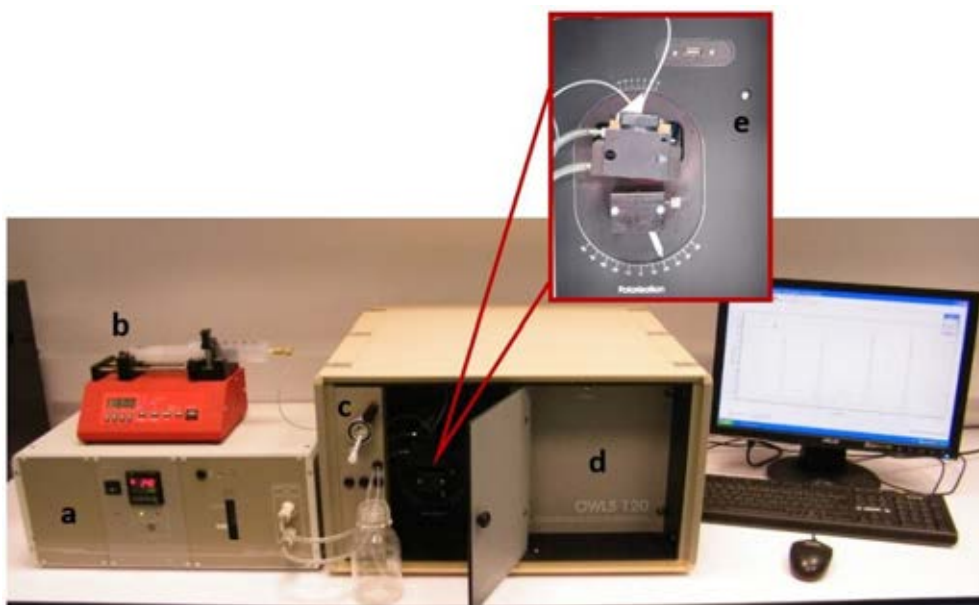
2. Megállított mintaáramlás (inkubációs) módszere:

Megegyezően az áramló oldatos méréshez, az alapvonalat foszfát pufferre vettem fel. A minta injektálását követően miután a vizsgált oldat elérte a mérőcellát (áramlási sebességtől és a csőrendszer hosszától függően, esetünkben kb. 2 perc), leállítottam a pumpát ezzel időt hagyva az antigén-antitest immunkomplexek kialakulásának. Tíz perces inkubációt követően újraindítottam a folyadékáramlást. A stabil jelválasz elérése után számoltam az injektálás előtti és utáni alapvonalak különbségéből a frekvenciaváltozást.

A szenzorfelszín regenerálását, azaz az immunkomplexben kötött, chip felületére kovalensen rögzített antitestektől az antigének eltávolítását 1,2 mol/l NaOH oldattal végeztem mindkét mérési módszer esetében. A regenerálást követően újabb mérési ciklus - minta, regenerálás - kezdhető a bioszenzorral.

4.4.5 OWLS mérőrendszer

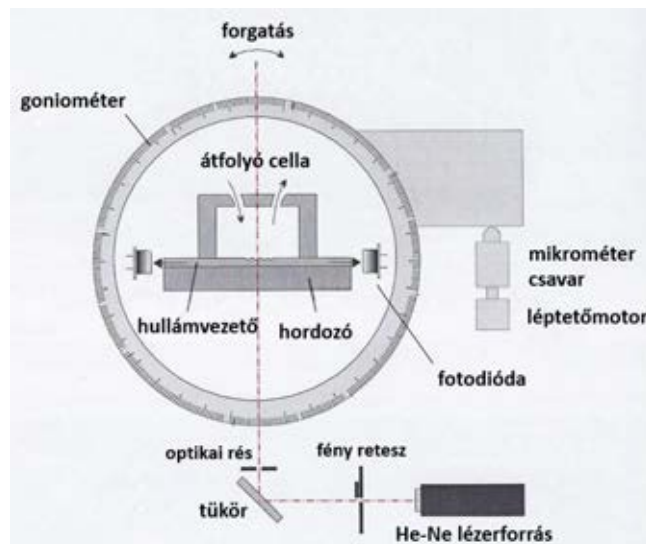
Vizsgálataimat a Magyarországon gyártott (Mikrovákuum Kft., Budapest) OWLS 120 készülékkel végeztem (4.5 ábra), amelyet a QCM mérőrendszerhez hasonlóan áramló injektációs mérésekhez állítottam össze. A műszer beépített injektorral (Rheodyne 7725, CA, USA) kerül forgalomba, amelyet 200 µl-es mintahurokkal láttam el. Az oldat áramlását fecskendő pumpával (Syringe Ne-1000, NY, USA) biztosítottam. Méréseimhez hűtő/fűtő termosztátot (OWLS™ TC Temperature Control Unit, Mikrovákuum Kft.) használtam, amellyel a szenzortartó egység hőmérsékletét szabályoztam ($20-80 \pm 0,1$ °C).



4.5 ábra: OWLS mérőrendszer FIA méréshez összeállítva

(a: termosztát, b: fecskendő pumpa; c: beépített injektor; d: OWLS 120; e: átfolyó küvetta)

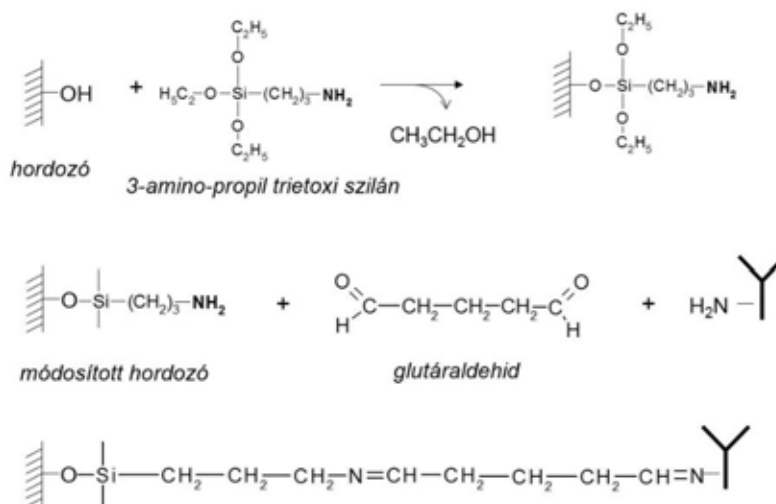
A szenzor chipet (OW2400) előzetesen a szenzortartóba helyezve rögzítettem az átfolyó cellában. A mérések során a hullámvezetőbe belépő, teljes visszaverődések sorozatával terjedő polarizált He-Ne lézer (632,8 nm) fény detektálása a chip két végén elhelyezett fotodiódák segítségével történik, a pillanatnyi becsatolási szög értékek meghatározására mechanikus goniométer szolgál (4.6 ábra). Az eredmények kiértékeléséhez a BioSense 2.6.8 szoftvert használtam. Az eredményeket összegző ábrákon a tömeg mértékegység (ng/cm^2) helyett az „egység” (arbitrary unit, a.u.) megjelölést alkalmaztam. Ennek oka, hogy a szoftver tömegszámítás modellje három- és négyrétegű modellekre vonatkozóan vezeti le az adszorbeálódott tömeget, munkám során azonban általában az ötödik-hatodik réteget határoztam meg, a kimutatási módtól függően. A mérési eredmények pontosságát azonban ez nem befolyásolja, tekintve, hogy minden esetben standard oldatokkal kalibráltam a szenzorokat.



4.6 ábra: OWLS 120 optikai rendszerének sematikus ábrája

4.4.5.1 Szenzor előkészítés, felületmódosítás

Az OW2400 chip felületét tisztítottam, majd szilanizálással módosítottam, mivel a szenzor $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ felületén kevés a hidroxil csoport a biomolekulák közvetlen kovalens rögzítéséhez. A módosítást Trummer és mtsai (2001) munkája alapján végeztem el, amellyel az antitestek, ill. az $\text{AFM}_1\text{-HRP}$ konjugátum immobilizálására alkalmas felületi amino csoportokat képezve, és egy további felület aktiválási lépés beiktatásával már egy lépésben rögzíthetők a felismerő elemként alkalmazott fehérje típusú biomolekulák (4.7 ábra).



4.7 ábra: OW2400 chip felületének módosítása szilanizálással és aktiválása glutáraldehiddel

A szenzorok krómkénsavas tisztítása (15 min, szobahőmérséklet) és hidratálása (90 °C-os desztillált víz, 1 h) után vizes fázisú szilanizálást végeztem, 10%-os APTS oldatba (pH 3,0) merítve a chipet, majd egy éjszakán át tartó hőkezelést (95 °C) alkalmaztam a stabil szilánréteg kialakítására. A módosított szenzorokat 4 °C-on tároltam felhasználásig.

Az antitestek (*L. acidophilus* vagy *B. bifidum*) és az AFM₁-HRP konjugátum rögzítését közvetlenül a mérések előtt, FIA módban végeztem el, desztillált víz áramoltatása mellett. A szilanizálással módosított hordozó és az antitest, valamint a HRP amino csoportjait glutáraldehid keresztkötő aldehid csoportjain keresztül kapcsoltam össze, amely a gyakorlatban 200 µl 2,5%-os glutáraldehid injektálásával történt. Az alapvonal stabilizálódását követően 200 µl meghatározott koncentrációjú antitest, illetve AFM₁-HRP oldatot injektáltam a szenzortípustól függően. Átlagosan 10 perc elteltével 10 mmol/l HCl oldattal mostam a felszín, végül a desztillált vizet a reakció pufferre (42 mmol/l Tris, pH 7,4) cseréltem, majd az alapvonal újbóli felvétele után mértem a vizsgálandó mintákat. A szenzorfelület regenerálását, azaz az immunkomplexek disszociálását 200 µl 10 mmol/l HCl oldattal végeztem. Egy ciklus (minta, regenerálás) mérése átlagosan 20 percet vesz igénybe (áramlási sebesség 0,16 ml/min, 20 °C).

4.4.5.2 Probiotikus baktériumok és AFM₁ kimutatásának módszerei

A *B. bifidum* és a *L. acidophilus* baktériumok bioszenzoros meghatározását direkt mérési módszerrel végeztem, hasonlóan a QCM mérőrendszerrel ismertetett áramló injektációs módszerhez (4.4.4.2 fejezet), azaz a megfelelő eljárással az OWLS szenzor chip felületére rögzített antitestekkel közvetlenül mértem a vizsgált mintából a baktérium sejteket.

A mérendő oldatokat úgy állítottam össze, hogy bennük az antigénre specifikus antitest állandó mennyiségben legyen, és csak a kimutatni kívánt antigén koncentrációját változtattam. Az

antitest oldatot és az AFM₁ standardokat, ill. az antitest oldatot és az ismeretlen AFM₁ koncentrációjú mintákat 1:1 arányban összekevertem, és meghatározott inkubációs idő elteltével a szenzorra injektáltam. Így az immunkomplexet nem képező, feleslegben levő antitestet mértem vissza a szenzorfelzínén rögzített antigénnel, azaz a mért jel fordított arányban áll a minta antigén (toxin) tartalmával.

4.4.6 Mintaelőkészítés

4.4.6.1 Probiotikus baktériumok

A bioszenzoros mérésekhez 3 féle, baktérium sejteket tartalmazó mintát készítettem:

1. Baktérium sejtek (*L. acidophilus* vagy *B. bifidum*) pufferben szuszpendálva a bioszenzorok működési paramétereinek meghatározásához.
2. Tejminták: baktérium sejtek (*L. acidophilus* vagy *B. bifidum*) tejben szuszpendálva, 10× vagy 100× hígítva.
3. Fermentált tejminták: *B. bifidum* baktériummal készített bifidus, ill. *L. acidophilus* baktériumokat tartalmazó acidophilus tejminták 10× vagy 100× hígításban.

A minták elkészítéséhez első lépésben a baktériumokat táplemezen szaporítottuk. *L. acidophilus* esetében MRS (de Man, Rogosa and Sharpe), *B. bifidum* esetében BSM (Bifidus Selective Medium) táptalajt használtunk. A 48 órás, 37 °C-on történő tenyésztést követően a telepeket néhány ml Tris (42 mM pH 7,4) pufferben szuszpendáltuk, majd szélesztéssel meghatároztuk a sejtszámot. 1.0E+9 CFU/ml törzs szuszpenziókat készítettünk, amelyeket a bioszenzoros vizsgálatokhoz tovább hígítottam a kívánt koncentrációra.

A valós minták elkészítéséhez a tömény pufferes baktérium szuszpenziót lecentrifugáltam, a puffert tejjre cseréltem, és a kívánt koncentrációban hígítást végeztem. A redős szűrőn (5-13 µm részecskeátmérő) történő szűrést követően Tris pufferrel hígítottam a mintát (10× ill. 100×).

A bioszenzoros mérésekhez készített két féle fermentált tejminta a bifidus és az acidophilus tej volt. A tejet előzetesen sterilizáltuk, majd a csíramentesítést követően a bifidus tejminta esetében a *B. bifidum* (200 µl, 10³ sejt/ml), acidophilus tej készítéséhez *L. acidophilus* sejteket oltottunk (200 µl, 10³ sejt/ml) 50 ml tejbe. Ezt követően a tejet 37 °C-on inkubáltuk. A 48 órás tenyésztés alatt óránként mintát vettünk, amelyeknek a csíraszámát szélesztéses módszerrel meghatároztuk, ezzel párhuzamosan az így vett mintákból néhány ml-t 4 °C-ra helyezve leállítottuk a sejtek további szaporodását. Így különböző sejt-koncentrációjú fermentált tejmintákat kaptunk, amelyeket redős szűrőn szűrtem és a kívánt mértékben (10× vagy 100×) hígítottam 42 mmol/l pH 7,4 Tris pufferrel.

4.4.6.2 Aflatoxin M₁

Az AFM₁ szenzor működési paramétereinek meghatározása során standard addícióval készítettem a pufferes oldatokat, és 3 féle mintaelőkészítési módszert hasonlítottam össze: elsőként a tejhez különböző koncentrációban hozzáadtam az AFM₁ standardokat, majd a mintákat redős szűrőn szűrtem (részecskeátmérő: 5-13 µm), vagy centrifugáltam (3500 g, 10 min, 10 °C) vagy méretkizárásos centrifugálást (3K Pall macrosep szűrő, 4500 g, 30 min, 10 °C) alkalmaztam. Végül a kívánt mértékben hígítottam a mintákat Tris pufferrel (42 mmol/l, pH 7,4). A meghatározott koncentrációjú AFM₁ antiszérum oldatot csak közvetlenül a szenzorra injektálás előtt elegyítettem az AFM₁ standard oldatokkal, ill. a tejmintákkal 1:1 arányban, és a 3 perces inkubáció (24 °C) leteltével bioszenzorra vittem a mintákat.

4.4.7. Referencia módszerek

A *L. acidophilus* és *B. bifidum* baktériumok kimutatására fejlesztett bioszenzorok kialakításakor referencia mérésként mikrobiológiai tenyésztéses módszert alkalmaztunk. A fermentált tejminták (acidophilus és bifidus tej) *L. acidophilus* és *B. bifidum* tartalmát szélesztéses módszerrel, MRS és BSM táptalajokon határoztuk meg.

Az aflatoxin M₁ szenzor fejlesztésekor a tejminták előkészítése előtt a bioszenzoros vizsgálatokhoz használt tejek aflatoxin M₁ szintjét kereskedelmi forgalomban levő kompetitív ELISA teszttel (4.3 fejezet) ellenőriztem. Csak azokat a tejetet használtam a mérésekhez, amelyek nem tartalmaztak az ELISA teszttel kimutatható aflatoxin M₁-et (LOD tejben 0,005 µg/l). Ugyanezt a kompetitív tesztet használtuk a valós minták bioszenzoros méréseinek ellenőrzésére is.

4.4.8 Statisztikai módszerek

A statisztikai értékeléshez és az adatok, eredmények ábrázolásához az Excel (Microsoft Office Professional Edition, 2003) és az Origin Scientific Graphing and Analysis szoftvert (Version 7) használtam. Az eredmények összehasonlításához a Student-féle kétmintás t-próbát alkalmaztam p<0,05 szignifikancia szintet véve.

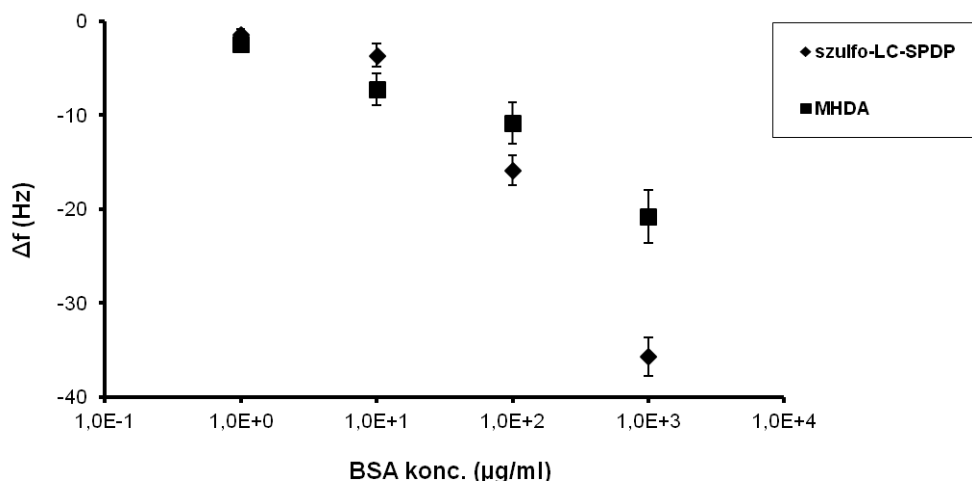
5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 QCM-alapú immunanalitikai modellkísérletek BSA – anti-BSA molekulapárral

A probiotikus baktériumok kimutatására irányuló bioszenzoros vizsgálatokat megelőzően előkísérleteket végeztem BSA – anti-BSA molekulapárral. A modellkísérletekkel a QCM szenzor áramló oldatos, direkt antitest-alapú meghatározásokban való alkalmazhatóságát vizsgáltam. Célom volt, hogy összehasonlítsak immobilizálási eljárásokat, ezeknek az antitest-rögzítésben való alkalmasságát. Összehasonlítottam továbbá két mérési módszert (áramló injektálásos és a megállított mintaáramlású módszerek), és tanulmányoztam az injektált mintamennyiség hatását, valamint a kristályok többszöri használatának lehetőségét is.

5.1.1 Antitest immobilizálása MHDA és szulfo-LC-SPDP keresztkötő reagensekkel

A szenzorok tisztítását, felületmódosításukat a 4.4.4.1 pontban leírtak szerint végeztem el. Az antitestek szenzorfelületen való rögzítése MHDA keresztkötővel 26 órát, szulfo-LC-SPDP-vel 2,5 órát vesz igénybe. Az összehasonlító vizsgálat során 25 $\mu\text{g/ml}$ a-BSA-t immobilizáltam és 1, 10, 100 valamint 1000 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú BSA standardokat mértem áramló injektálásos rendszerben (5.1 ábra).



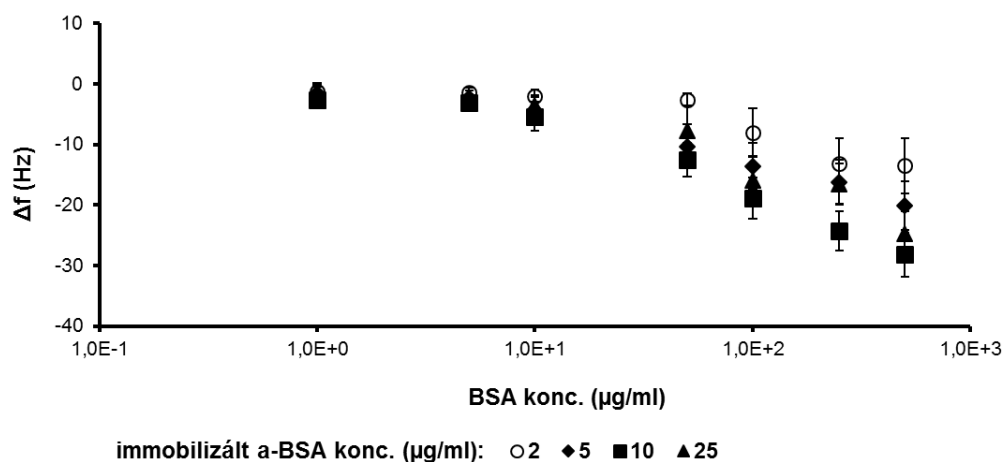
5.1 ábra: Frekvenciaváltozás a BSA koncentrációjának függvényében szulfo-LC-SPDP és MHDA keresztkötő reagensek alkalmazásával
(25 $\mu\text{g/ml}$ a-BSA, 500 μl minta, 0,15 ml/min, 20 °C)

A legkisebb, 1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú BSA oldatokat mérve nem tapasztaltam jelentős különbséget a két immobilizálási eljárás között a detektált jel nagyságát ($-1,4 \pm 0,6$ és $-2,4 \pm 0,8$ Hz) tekintve. Tíz $\mu\text{g/ml}$ BSA koncentrációnál az MHDA alkalmazásával nagyobb

frekvenciaváltozást mértem ($-7,2 \pm 1,7$ Hz) mint szulfo-LC-SPDP-vel ($-3,6 \pm 1,2$ Hz), de a 100-1000 $\mu\text{g/ml}$ BSA koncentráció tartományban a szulfo-LC-SPDP ($-15,9 \pm 1,6$ és $-35,7 \pm 2,1$ Hz) bizonyult eredményesebbnek összehasonlítva az MHDA-val kapott eredményekkel ($-10,8 \pm 2,2$ és $-20,8 \pm 2,8$ Hz). Figyelembe véve a detektált frekvenciaváltozás értékeit és a szenzorok elkészítésének időigényét, a továbbiakban a szulfo-LC-SPDP keresztkötőt alkalmaztam az antitest rögzítéséhez.

5.1.2 Rögzített antitest koncentrációjának hatása

Az immobilizált antitest koncentrációjának hatását vizsgálva 2, 5, 10 és 25 $\mu\text{g/ml}$ anti-BSA-t rögzítettem a kvarckristályon, és 1-500 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció tartományban áramló injektálásos módszerrel mértem BSA standard oldatokat (5.2 ábra). A kisebb koncentrációjú (1, 5 és 10 $\mu\text{g/ml}$) BSA oldatokat vizsgálva nem tapasztaltam jelentős különbséget az antitest koncentrációjának változtatásával, míg az 50-500 $\mu\text{g/ml}$ tartományban az antitest mennyiségétől függően értékelhető különbségeket mértünk. A 10 $\mu\text{g/ml}$ rögzített antitest oldattal szignifikánsan növekvő frekvenciaváltozást detektáltam, és ez a szenzor bizonyult a legstabilabbnak is, összehasonlítva a 2, 5 és 25 $\mu\text{g/ml}$ a-BSA-val módosított szenzorokkal, ezért a további modellméréshez ezt a koncentrációt alkalmaztam.

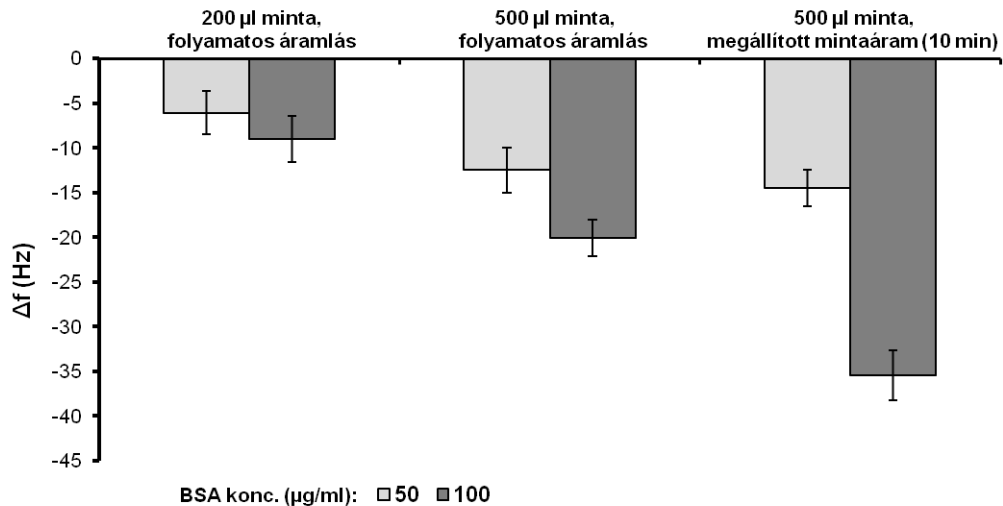


5.2 ábra: A szenzorfelületen rögzített anti-BSA koncentrációjának hatása a mért jelre (500 μl minta, 0,15 ml/min, 20 °C)

5.1.3 Injektált mintamennyiség és az áramlási sebesség hatása

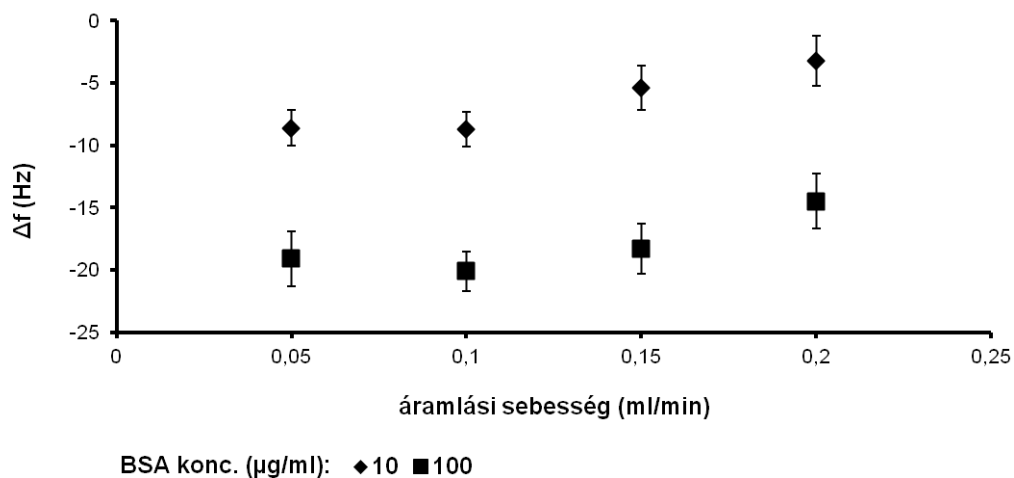
A mintamennyiség és a mérési módszer hatásának vizsgálatára 200 és 500 μl BSA standard oldatokat mértem injektálásos módszerrel (5.3 ábra), valamint megállított mintaáramot alkalmazva (4.4.4.2 fejezet). Ekkor az 500 μl BSA minta injektálását követően mintegy 10 perces inkubációs időt hagytam a BSA - anti-BSA immunkomplexek kialakulásához. Az 50 és 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA

oldatokra jelentős jelnövekedést tapasztaltam a mintahurok térfogatának emelésével. A megállított mintaárammal a kisebb, 50 µg/ml BSA standardra csak 5,07%-os jelnövekedést detektáltam a folyamatos mintaáramlással mért értékhez képest. A 10 percre megállított mintaáram jóval eredményesebbnek bizonyult a nagyobb koncentrációjú, 100 µg/ml BSA oldat mérésekor: az 500 µl mintahurokkal mért $-20,1 \pm 2,1$ Hz frekvenciaváltozás érték $-35,5 \pm 2,8$ Hz-re emelkedett az inkubációs időnek köszönhetően.



5.3 ábra: Injektált mintamennyiség, az áramló injektációs módszer és a megállított mintaáram hatása a mért jelre (10 µg/ml a-BSA, 0,15 ml/min, 20 °C)

A FIA rendszerekben a mérési paraméterek optimalizálásának meghatározó része az áramlási sebesség hatásának vizsgálata, mivel az áramlási sebességtől függ a minta tartózkodási ideje a reakciócellában. Az immunkomplexek kialakulására gyakorolt hatás tanulmányozására 0,05 – 0,2 ml/min áramlási sebesség tartományban mértem 10 és 100 µg/ml, 500 µl BSA oldatot injektálva, 10 µg/ml rögzített antitest mellett (5.4 ábra).



5.4 ábra: Áramlási sebesség hatása a mért jelre (10 µg/ml a-BSA, 500 µl minta, 20 °C)

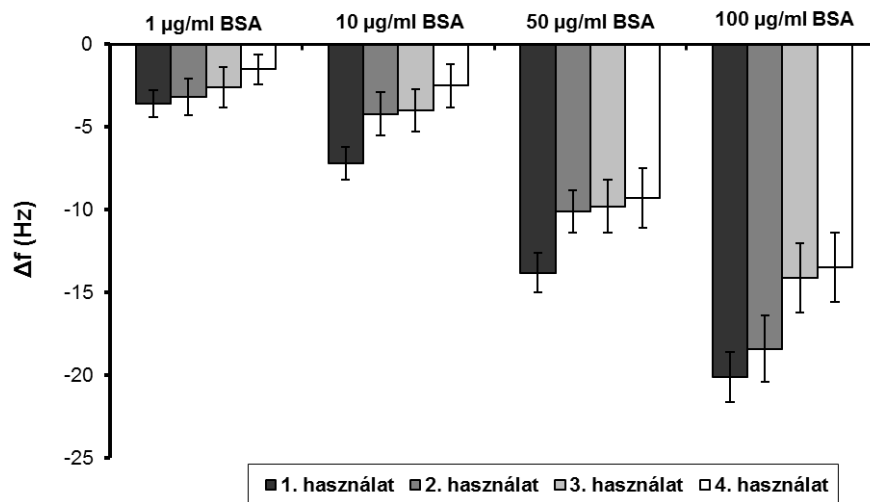
A legkisebb, 0,05 ml/min áramlási sebességnél ugyan hosszabb a minta tartózkodási ideje a mérőcellában, hasonló frekvenciaváltozás értékeket kaptam a 10 és a 100 µg/ml BSA oldatokra, $(-8,6 \pm 1,4; -19,1 \pm 2,2)$ mint a 0,1 ml/min áramlási sebesség mellett $(-8,7 \pm 1,4$ és $-20,1 \pm 1,6$ Hz). Ennek oka, hogy a szenzor felszínéhez közel lamináris áramlás alakulhat ki, csökkentve ezzel a biomolekulák kapcsolódási lehetőségét. A nagyobb, 0,15 és 0,2 ml/min sebességgel már jelentősen csökkentek a mért frekvenciaváltozás értékek, a minta reakciócellában való tartózkodási idejének csökkenésével. Figyelembe véve az egyes BSA oldatokra kapott jelek nagyságát és stabilitását, a vizsgált tartományban a 0,1 ml/min áramlási sebesség bizonyult optimálisnak.

5.1.4 Szenzorok többszöri használatának hatása

Az antitest-alapú bioszenzoros mérések alapja, hogy el tudjuk távolítani az immunkomplexben kötött, szenzorfelületen rögzített „felismerő” molekulától (antitest, antigén) a molekulapár másik tagját (antigén, antitest). Park és mtsai (2000) szalmonella fajok kimutatására fejlesztett QCM-alapú immunszenzorával 8 mol/l karbamid, 1,2 mol/l NaOH és 0,2 mol/l glicin-HCl oldatok regeneráló hatását hasonlította össze és a legjobb eredményt a szenzor 2,5 ml, 1,2 mol/l NaOH-dal való regenerálásával érték el. Hasonlóan eredményesen alkalmazták az 1,2 mol/l NaOH oldatot Adányi és munkatársai (2006b) *E. coli* sejtek antitestektől való disszociálására. Az irodalmi előzmények és előkísérleteim alapján használtam regeneráló oldatként az 1,2 mol/l NaOH oldatot méréseim során. Minden minta vizsgálatát követően 500 µl 1,2 mol/l NaOH oldatot injektálva regeneráltam a szenzorfelületet. Ezzel a mérési eljárással szenzoronként 15-20 mérési ciklus végezhető el, összesen átlagosan 35%-os jelcsökkenéssel. A minták vizsgálata közben standardok injektálásával nyomonkövethető az érzékenység változása, korrigálható a mérési eredmény.

Arra vonatkozóan azonban, hogy milyen hatással van a szenzorok egyes méréseket követően történő teljes tisztítása és előkészítése, azaz az ismételt használat az újonnan felépített érzékelő réteg érzékenységére, irodalmi adatot nem találtam. A 4.4.4.1 fejezetben leírt módszer szerint végeztem el 1,2 mol/l NaOH, 1,2 mol/l HCl és koncentrált HCl oldatokkal a kvarckristály arany vékonyrétegének tisztítását, majd ezt követően az anti-BSA-t a szenzorfelületen rögzítettem (10 µg/ml). 1-100 µg/ml BSA oldatokat vizsgáltam 0,1 ml/min áramlási sebesség mellett. A mérés befejezését követően a szenzorfelületet újra tisztítottam és az antiteströgzítést újra elvégezve a szenzort előkészítettem a következő mérésre. Ezt a folyamatot többször elvégezve vizsgáltam az érzékenységben bekövetkezett változásokat azt tapasztalva, hogy a vizsgált BSA koncentráció tartományban az ismételt alkalmazások során a szenzor rendre veszített az érzékenységéből (5.5 ábra). A szenzor negyedik használatakor az 1 µg/ml koncentrációjú BSA oldatot mérve mindössze

-1,5 ± 1,2 Hz frekvenciaváltozást detektáltam, amely közel van a szenzor ~1 Hz-es hibahatárához. Eredményeim alapján az általunk alkalmazott tisztítási eljárással az egyes szenzorok maximálisan 4 alkalommal használhatóak újra.



5.5 ábra: Kvarckristályok ismételt használatának hatása a mért frekvenciaváltozásra (10 µg/ml a-BSA, 0,1 ml/min, 500 µl minta, 20 °C)

Összefoglalva, a BSA - anti-BSA molekulapárral végzett QCM modellkísérletek alapján megállapítható, hogy a szulfo-LC-SPDP keresztkötő reagens eredményesebben alkalmazható a biomolekulák rögzítésére, mint az MHDA, és hatékonyabb az antigének kimutatásában, figyelembe véve mind a detektált jeleket, mind az immobilizálás időszükségletét. A további immobilizálási kísérleteim azt mutatták, hogy a 10 µg/ml rögzített a-BSA koncentráció az optimális 1-500 µg/ml BSA minták vizsgálatára. Az áramló injektációs mérési módszerrel 0,1 ml/min áramlási sebesség a leghatékonyabb. Az 500 µl minta injektálásával, megállított mintaárammal értem el a legnagyobb frekvenciaváltozásokat összehasonlítva az áramló injektációs mérési módszerrel. Megállapítottam továbbá, hogy az alkalmazott kristálytisztítási eljárással maximálisan négy alkalommal használható ugyanazon chip.

5.2 Immunszenzorok fejlesztése *L. acidophilus* és *B. bifidum* kimutatására

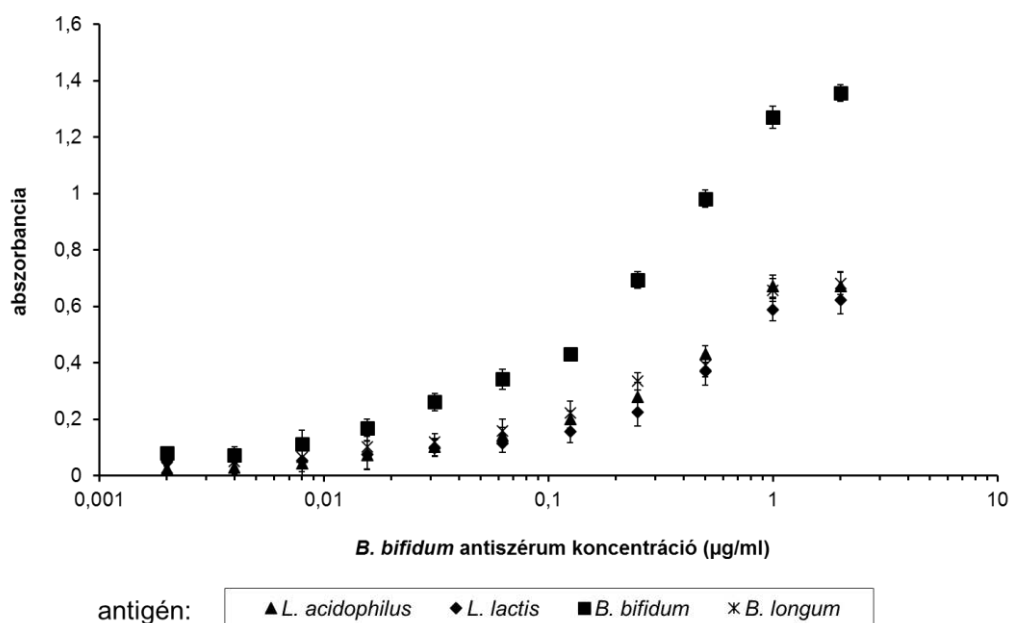
A QCM- és OWLS-alapú immunszenzor fejlesztés előtt az immunizálással nyúlban termeltetett, tisztított anti-*L. acidophilus* és anti-*B. bifidum* IgG frakciók bioszenzoros alkalmazhatóságát ELISA teszttel tanulmányoztam.

5.2.1 ELISA vizsgálat *L. acidophilus* és a *B. bifidum* antitestekre

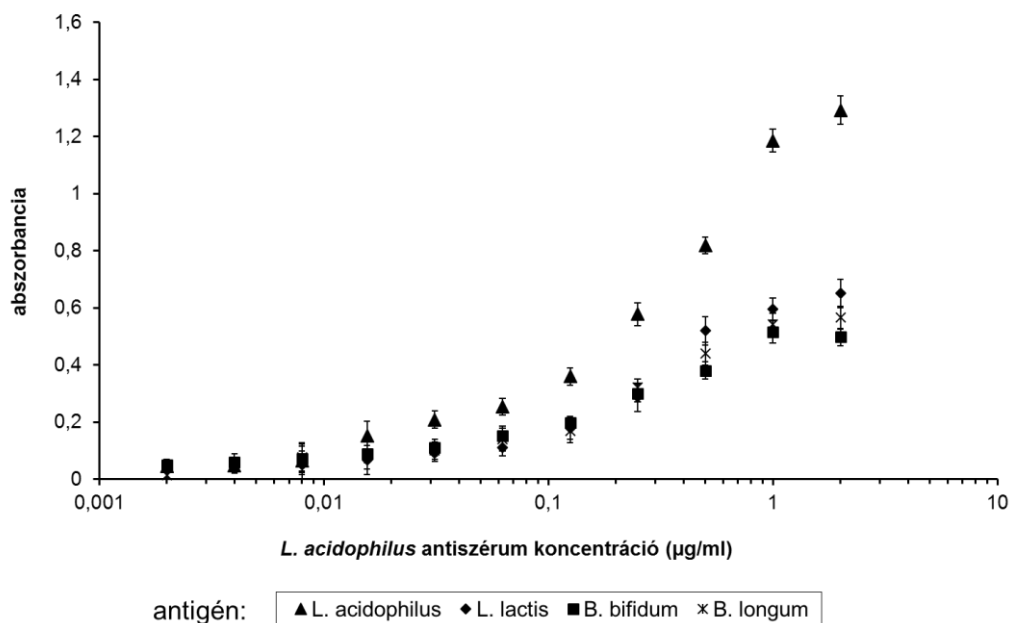
Indirekt ELISA teszttel vizsgáltam a *B. bifidum* és *L. acidophilus* baktériumokra előállított poliklonális antitestek szelektivitását. A keresztreakciók tanulmányozására két további probiotikus

baktériumból (*L. lactis* és *B. longum*) származó sejtfal antigént is megvizsgáltam. A 96 lyukú ELISA mikrotiter lemezeket 100 µl/lyuk, 5 mg/ml sejtfal antigén (*L. acidophilus*, *B. bifidum*, *L. lactis*, *B. longum*) tartalmú 0,1 mol/l nátrium karbonát-bikarbonát (pH 9,6) pufferrel 4 °C-on egy éjszakán át történő inkubálással érzékenyítettem. Ezt követően a lemezeket háromszor mostam 250 µl/lyuk 0,1% Tween 20 tartalmú 0,01 mol/l foszfát (pH 7,4) pufferrel. A szabad kötőhelyeket 200 µl/lyuk 5% zselatin tartalmú foszfát pufferrel blokkoltam (37 °C, 1 h). Az ismételt mosást követően 100 µl/lyuk mennyiségben a sejtfal antigén ellen nyúlban termeltetett, tisztított ellenanyagot (*L. acidophilus*, *B. bifidum*) adtam (0,002-2 µg/ml) az antigénnel érzékenyített mikrotiter mélyedésekbe. Ismételt mosást követően a kialakult immunkomplexek detektálására a lemezeket 1:30 000-es hígítású torma-peroxidázzal jelölt anti-nyúl kecske IgG konjugátummal inkubáltam (100 µl/lyuk, 37 °C, 1 h). A színkialakítást 100 µl/lyuk szubsztrát és kromogén tartalmú (OPD/H₂O₂, Sigma Fast, Sigma) oldattal történő inkubálással (20 perc, °C) végeztem. A reakciót 50 µl/lyuk 3 mol/l H₂SO₄ oldattal gátoltam. Az optikai denzitás abszorbancia értékeit 490 nm-en, 630 nm referencia hullámhosszal szemben automata ELISA fotométerrel (Dynatech) mértem.

A *B. bifidum* antitiszérum *B. bifidum* sejtfal antigénhez és további, nem specifikus antigénekhez (*L. acidophilus*, *B. longum*, *L. lactis*), valamint *L. acidophilus* antitiszérum *L. acidophilus* és további (*B. bifidum*, *B. longum*, *L. lactis*) antigénekhez való affinitását teszteltem és az eredményeket szemilogaritmikus skálán ábrázoltam (5.6 és 5.7 ábra).



5.6 ábra: *B. bifidum* poliklonális antitest jellemzése indirekt ELISA teszttel (5 mg/ml antigén rögzítve, HRP-jelölt anti-nyúl kecske IgG, OPD/H₂O₂, 490 nm)



5.7 ábra: *L. acidophilus* poliklonális antitest jellemzése indirekt ELISA teszttel (5 mg/ml antigén rögzítve, HRP-jelölt anti-nyúl kecske konjugátum, OPD/H₂O₂, 490 nm)

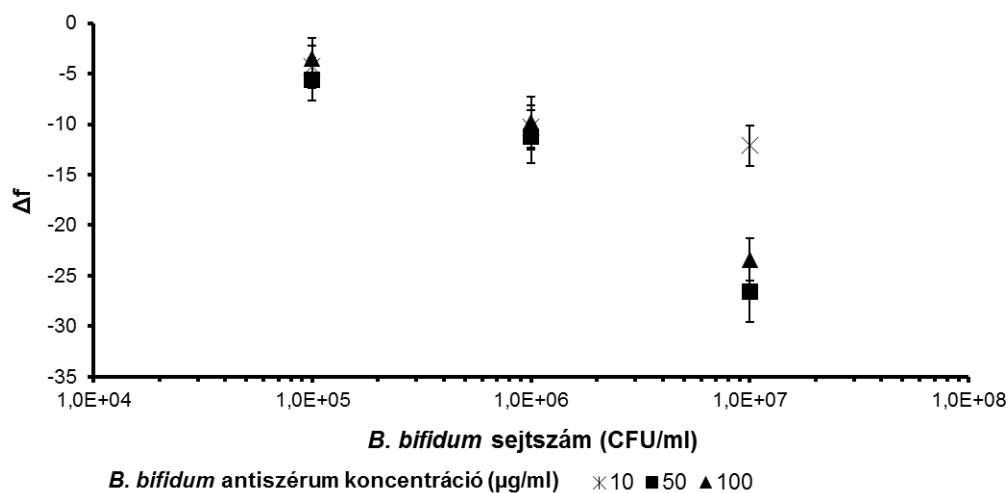
A poliklonális *B. bifidum* antiszérum 0,03-2,0 µg/ml koncentráció tartományban jó szelektivitást mutatott a *B. bifidum* antigénekre, amit a nem specifikus antigénekre kapott 54-69%-kal kisebb abszorbancia értékek mutattak. A vizsgált antigének közül a legkisebb keresztreaktivitást a 0,12-2,0 µg/ml koncentráció tartományban a *L. lactis* antigénnel szemben mutatta a *B. bifidum* antiszérum. Hasonló eredményeket kaptam *L. acidophilus* antitestre is, az *L. lactis*, *B. bifidum* és *B. longum* antigénektől jól elvált az antitest 0,03-2,0 µg/ml koncentráció tartományban (53-58%-kal kisebb abszorbancia értékek). Az *L. acidophilus* antitest a legkevésbé a *B. bifidum* baktériummal volt kereszt-reaktív a 0,12-2 µg/ml tartományban. Az ELISA teszt eredményei alapján megállapítottam, hogy az *L. acidophilus* és *B. bifidum* poliklonális antitestek alkalmazhatóak a bioszenzor fejlesztésekhez.

5.2.2 QCM bioszenzorok fejlesztése *L. acidophilus* és *B. bifidum* kimutatására

A QCM-alapú immunszenzor fejlesztés során tanulmányoztam az immobilizált antitest mennyiségének, és a mérési módszernek (áramló injektációs és megállított mintaáramú) a hatását, továbbá vizsgáltam az egyes szenzorok szelektivitását. A bioszenzorokat a baktériumok pufferes szuszpenzióival kalibráltam. Végül élelmiszermintákat vizsgáltam, fermentált tejekben határoztam meg a *L. acidophilus* és *B. bifidum* baktériumok sejtszámát és az eredményeket mikrobiológiai tenyésztési módszerrel kapott sejtszámokkal hasonlítottam össze. A továbbiakban ezeket az eredményeket ismertetem részletesen.

5.2.2.1 Rögzítendő antitest koncentrációjának meghatározása

A direkt immunszenzor fejlesztése során alapvető lépés a rögzítendő antitest koncentrációjának meghatározása. A *B. bifidum* és *L. acidophilus* antitestek szenzorfelületen immobilizálható koncentrációját úgy határoztam meg, hogy mindkét antiszérumot különböző koncentrációkban (10, 50 és 100 µg/ml) rögzítettem a kvarckristály arany vékonyrétegen, majd 10^5 - 10^7 CFU/ml pufferes (75 mmol/l, pH 7,4 foszfát) baktérium szuszpenziókat mértem a modellmérésekkel megállapított legkedvezőbb paraméterek mellett (500 µl mintamennyiség, 0,1 ml/min áramlási sebesség, áramló injektációs analízis).



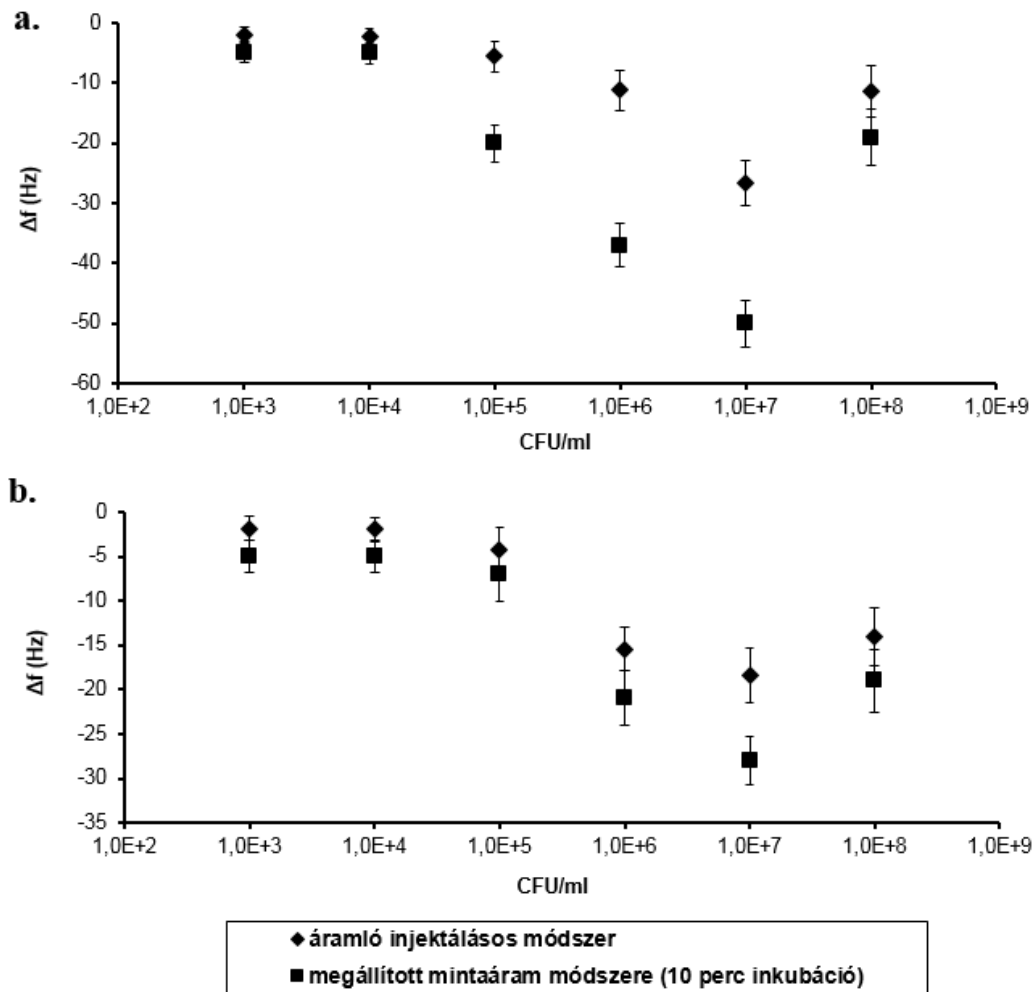
5.8 ábra: Immobilizált *B. bifidum* antitest koncentrációjának hatása a frekvenciaváltozásra (500 µl minta, 0,1 ml/min, 20 °C)

A 10, 50 és 100 µg/ml rögzített *B. bifidum* antiszérummal a 10^5 és a 10^6 CFU/ml pufferes szuszpenziókra hasonló volt a mért jel (pl. 10^5 CFU/ml-re $-4,32 \pm 0,52$ Hz, $-5,57 \pm 0,32$ Hz és $-3,5 \pm 0,8$ Hz) és a koncentráció emelkedésével növekvő jeleket detektáltam. A 10 µg/ml antitesttel a 10^7 sejtszámra ($-12,11 \pm 1,14$ Hz) nem volt szignifikáns frekvenciaváltozás növekedés összehasonlítva a 10^6 sejtszámra kapott értékkel ($-10,33 \pm 0,98$) (5.8 ábra). Hasonlóak voltak a mérési eredmények a 10 µg/ml koncentrációjú *L. acidophilus* antitesttel módosított szenzorral is a *L. acidophilus* pufferes mintáira. Az 50 µg/ml *B. bifidum* antitest borítású szenzorral a vizsgált tartományban a koncentráció növekedésével rendre nagyobb frekvenciaváltozásokat kaptam ($-5,57 \pm 0,32$ Hz; $-11,21 \pm 0,85$ Hz és $-26,55 \pm 1,82$), hasonlóan a *L. acidophilus* szenzorhoz ($-4,21 \pm 0,31$ Hz; $-15,42 \pm 1,12$ Hz és $-18,32 \pm 1,42$ Hz). A 100 µg/ml antiszérumot használva az érzékenység és a detektált jelek stabilitása csökkent, ami az érzékelő antitest réteg túltelítődésére utal. A továbbiakban mindkét antiszérum 50 µg/ml koncentrációban került alkalmazásra.

5.2.2.2 Baktérium szuszpenziók mérése áramló injektálós és megállított mintaáramú módszerekkel

A *B. bifidum* és a *L. acidophilus* pufferes mintáinak mérésére 50 µg/ml, az adott baktériumra specifikus antiszérumot rögzítettem a szenzorokon. 10^4 - 10^8 CFU/ml mintákat vizsgálva hasonlítottam össze az áramló injektálós és a megállított mintaáramú mérési módszereket 0,1 ml/min áramlási sebesség mellett, szobahőmérsékleten. A szenzorfelszín regenerálását a minták lefutását követően 500 µl 1,2 mol/l NaOH oldat injektálásával végeztem el. A *B. bifidum* baktérium dinamikus méréstartományja 10^4 - 10^7 CFU/ml (5.9/a ábra), hasonlóan a *L. acidophilus* szenzorhoz (5.9/b ábra). Megegyezően a BSA – anti-BSA modellmérések eredményeihez, a minta 10 perces tartózkodási ideje a mérőcellában jelnövekedést okozott.

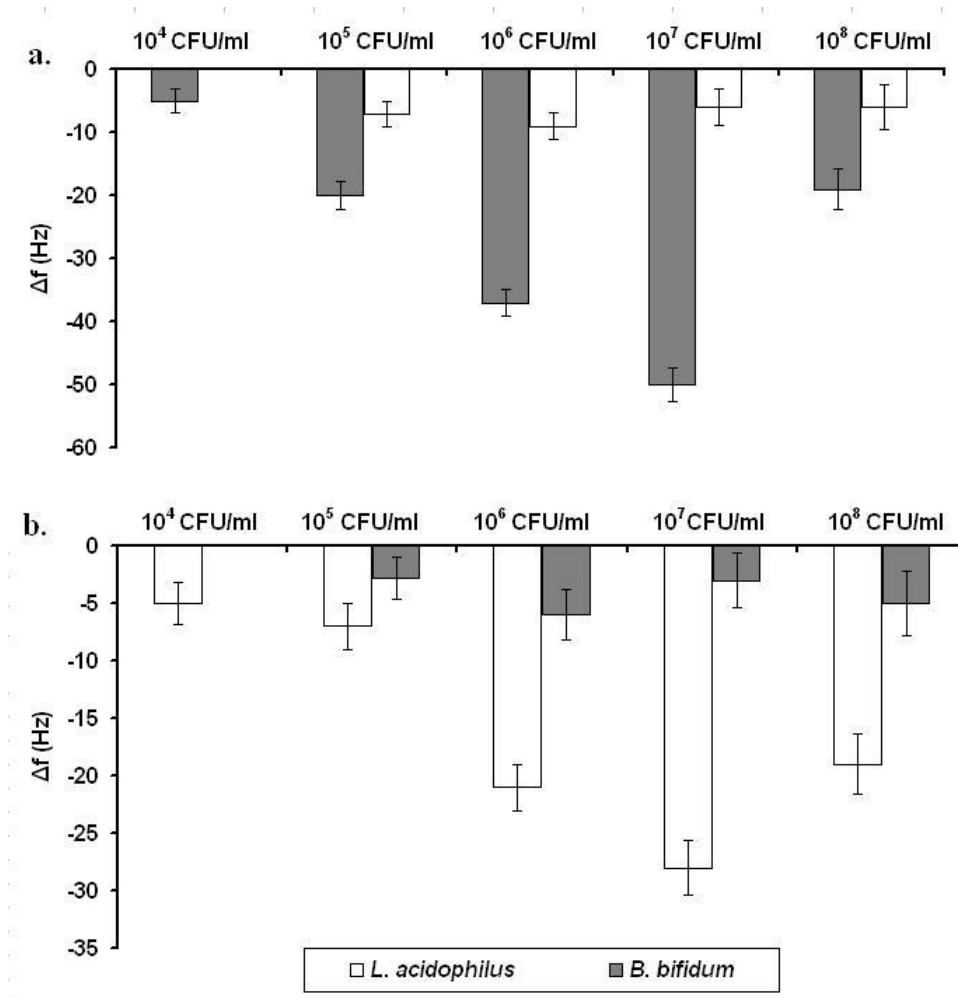
A legtöbb, baktériumok kimutatására fejlesztett jelölésmentes piezoelektromos immunszenzor kimutatási határa 10^5 - 10^7 CFU/ml (MINUNNI *et al.*, 1996; PLOMER *et al.*, 1992; ADÁNYI *et al.*, 2006b; VAUGHAN *et al.*, 2001), 10^4 sejt/ml kimutatási határt Wong és mtsai (2002) értek el (2.1 Táblázat), míg a szendvics típusú immunszenzorokkal néhány nagyságrenddel alacsonyabb, 10^2 - 10^3 CFU/ml a kimutatási határ (SU et LI 2004). Ezekben a munkákban többnyire az alap, áramló oldatos analízist alkalmazzák, amelynél a mintát az antitesttel módosított szenzorfelszínen hosszú ideig (maximálisan 1 h) áramoltatják. A másik fő mérés technika a bemelegítési módszer, ekkor az előkészített kristályt legalább 0,5 h-ra a mintaoldatba merítik. Ugyan az általam alkalmazott mindkét mérési módszerrel rövidebb a minta tartózkodási ideje a mérőcellában, ami kisebb frekvenciaváltozás értékeket eredményez, hasonló kimutatási és mérési tartomány érhető el, mint a hosszadalmasabb eljárásokkal.



5.9 ábra: *B. bifidum* (a) és *L. acidophilus* (b) mintákra kapott frekvenciaváltozás értékek áramló injektációs és megállított mintaáramú mérési módszerekkel (50 µg/ml antitest, 0,1 ml/min, 500 µl loop, 20 °C)

5.2.2.3 *B. bifidum* és *L. acidophilus* szenzorok keresztreakcióinak vizsgálata

Az antitestek pufferes közegben való keresztreakcióinak tanulmányozására két vizsgálatot végeztem. Egy *B. bifidum* szenzorral mértem külön *B. bifidum*, és *L. acidophilus* baktériumokat tartalmazó szuszpenziókat, majd ugyanilyen elven a mérést megismételtem *L. acidophilus* antitesttel ellátott szenzorral is. A vizsgálatokat megállított mintaárammal, szobahőmérsékleten hajtottam végre. A *B. bifidum* antitest (5.10/a ábra) nem mutatott keresztreakciót a 10^4 CFU/ml *L. acidophilus* mintára, míg a 10^5 - 10^7 CFU/ml tartományban a *B. bifidum*ra kapott jelválaszokhoz képest 12-35%-os frekvenciaváltozás értékeket mértem. Az *L. acidophilus* antitesttel az előzőekhez hasonlóan a nem specifikus *B. bifidum* baktérium 10^4 sejtszámban nem volt detektálható. A 10^5 - 10^7 tartományban 10-40%-os frekvenciaváltozásokat detektáltam a *B. bifidum* különböző koncentrációjú mintáira összehasonlítva az *L. acidophilus*ra kapott értékekkel (5.10/b ábra).



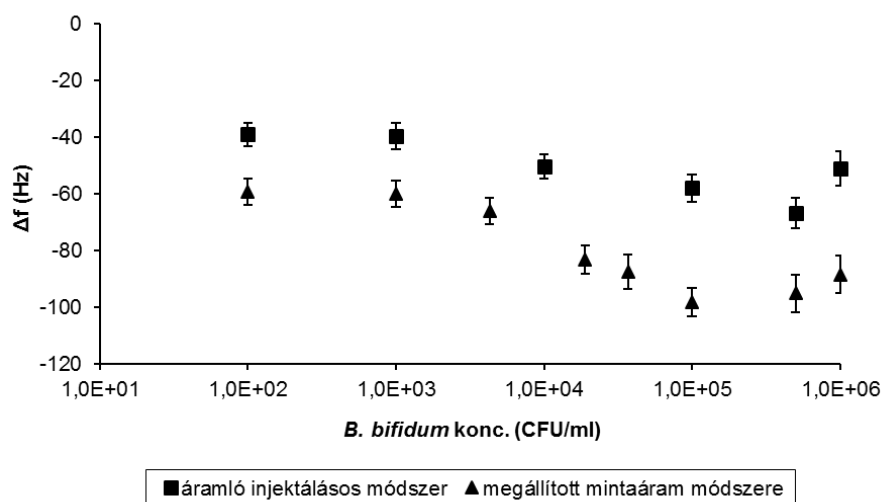
5.10 ábra: *B. bifidum* (a) és *L. acidophilus* (b) antitestek szelektivitásának vizsgálata (50 μ g/ml antitest, 0,1 ml/min, 500 μ l loop, 20 °C)

A baktériumok kimutatására fejlesztett immunszenzorok szelektivitására vonatkozóan igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésre, még a gyakran vizsgált patogén, élelmiszereket szennyező baktériumok élelmiszermintából történő bioszenzoros kimutatása is ritka. Vaughan és mtsai (2001) *Listeria monocytogenes* baktériumra fejlesztett QCM immunszenzort poliklonális antitestekkel, és vizsgálta annak keresztreakcióját *Bacillus cereus* baktériummal. A *L. monocytogenes* 1×10^8 sejt/ml, míg a *B. cereus* baktériumot 1×10^7 sejt/ml koncentrációban vizsgálva nem tapasztaltak keresztreaktivitást. Plomer és mtsai (1992) szintén QCM szenzorral az enterobaktériumok egy közös antigénjére előállított monoklonális antitesttel mutatott ki *E. coli* K12, *Citrobacter* sp., *Proteus* sp. és *E. coli* vad törzset különböző érzékenységgel. Wei és mtsai (2007) SPR-alapú immunszenzort fejlesztettek *Campylobacter jejuni* baktériumra. Az alkalmazott poliklonális antitesttel keresztreakciót mutattak ki *Salmonella typhimurium*mal, és *Arcobacter skirrowii* baktériummal szemben.

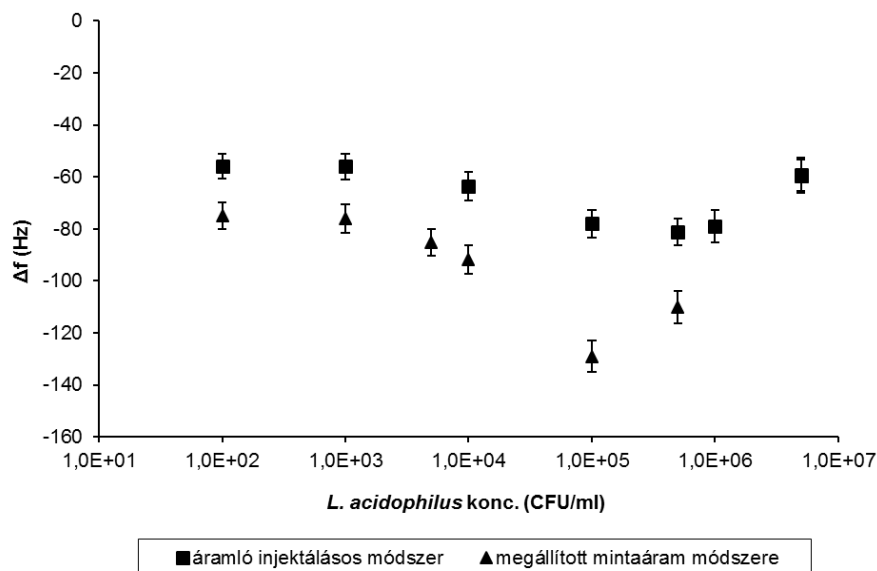
5.2.2.4 Élelmiszerminták vizsgálata

A bioszenzoros módszer valós mintákon történő tesztelésére fermentált tejtermékeket, bifidus és acidophilus tejet készítettünk (4.4.6.1 fejezet). A fermentált tejminták bioszenzoros mérése előtt a szenzort standard addícióval (10^3 - 10^6 CFU/ml *B. bifidum* és *L. acidophilus* hozzáadásával) készített, hígított tejmintákkal kalibráltam. $10\times$ és $100\times$ hígítású tejmintákat mértem, a detektált frekvenciaváltozás értékek a két hígításnál kevés eltérést mutattak, de a $10\times$ hígításnál lényegesen nagyobb standard hiba volt megfigyelhető, amit valószínűleg a nagyobb fehérje tartalom okozott. A detektált jelek nagysága és statisztikai értékelése alapján a továbbiakban a tejek $100\times$ hígítását alkalmaztam, és a baktériumok hozzáadásával készített, különböző koncentrációjú mintákat áramló injektációs és megállított mintaáramú módszerrel egyaránt vizsgáltam (5.11 és 5.12 ábra).

Mindkét baktérium esetében 10^3 CFU/ml volt a kimutatási határ. Ugyanazon koncentrációk mérésekor megállított mintaárammal 8-70%-kal nagyobb frekvenciaváltozás értékeket kaptam összehasonlítva a folyamatos mintaárammal kapott értékekkel. Ugyanakkor a folyamatos mintaáram módszerrel mindkét baktérium esetében szélesebb volt a dinamikus méréstartomány. A legnagyobb mérhető *B. bifidum* és *L. acidophilus* sejtszám 5×10^5 CFU/ml volt folyamatos mintaárammal ($-66,62 \pm 3,2$ Hz és $-81,30 \pm 3,8$ Hz) míg megállított mintaárammal 10^5 CFU/ml ($-98,01 \pm 4,3$ Hz és $-129,04 \pm 6,2$ Hz). Az eredmények alapján megállapítható, hogy bár a megállított mintaáram érzékenyebb módszer, ami a minta mérőcellában való 10 perces inkubációs idejével magyarázható, a folyamatos mintaárammal szélesebb méréstartomány érhető el rövidebb mérésidővel. Mindezeket figyelembe véve előnyösebbnek tartom az áramló injektációs mérési módszert a minták vizsgálatára.

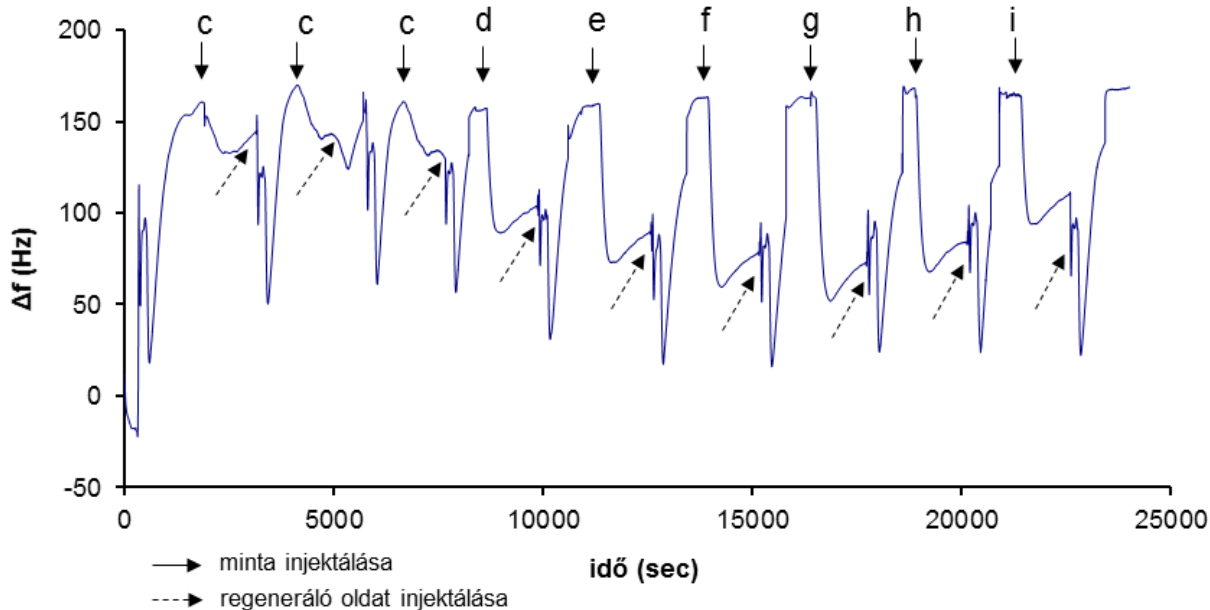


5.11 ábra: *B. bifidum* mérése $100\times$ hígítású tejben (50 μ g/ml antitest, 500 μ l mintahurok, 0,1 ml/perc, 20 $^{\circ}$ C)



5.12 ábra: *L. acidophilus* mérése 100× hígítású tejben
(50 µg/ml antitest, 500 µl mintahurok, 0,1 ml/perc, 20 °C)

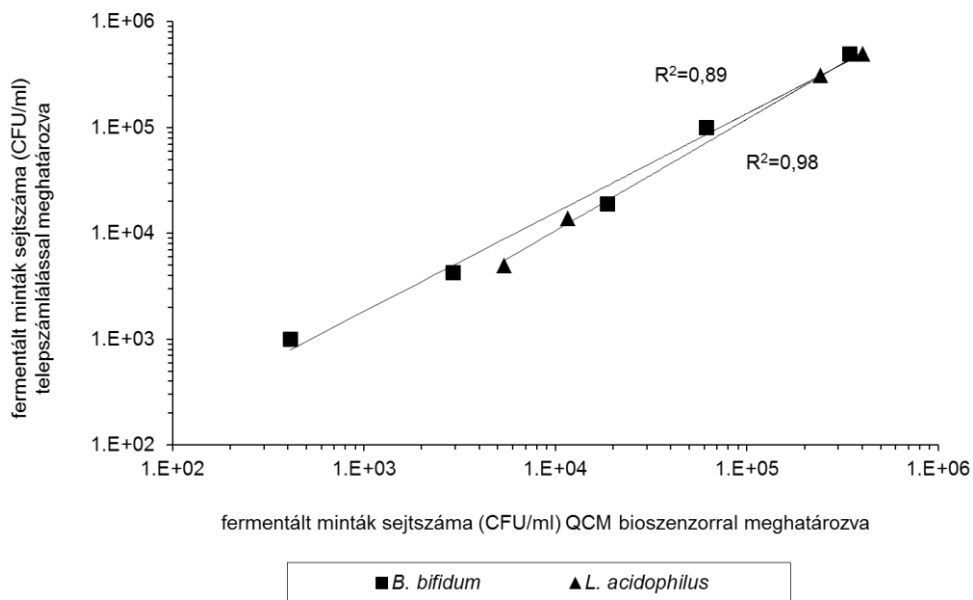
A kalibrációt követően ismeretlen sejtszámú acidophilus és bifidus tejmintákat vizsgáltam bioszenzorról, és meghatároztam azok *L. acidophilus* ill. *B. bifidum* sejtszámát. Az 5.13 ábrán egy QCM mérési görbéje látható az *L. acidophilus* kalibráló sor és az acidophilus tejminta mérésével. A bioszenzoros eredményeket összehasonlítva a mikrobiológiai tenyésztéses módszerrel kapott csíraszámokkal (4.4.6.1 és 4.4.7 fejezetek), a fermentált, ismeretlen sejtszámú mintákra kapott frekvenciaváltozás értékekből a kalibráció alapján számolt sejtszámok jól korreláltak a tenyésztéses módszerrel kapott csíraszám értékekkel (5.14 ábra, 5.1 Táblázat). Kisebb sejtszámoknál (10^3) a QCM immunszenzorról kapott sejtszámok elmaradnak a tenyésztéses módszerrel kapott sejtszámtól, a 10^3 fölötti tartományban azonban megbízhatóan határozható meg a tejmintákban a *B. bifidum* és *L. acidophilus* sejtszám a bioszenzorról.



5.13 ábra: Tejminták *L. acidophilus* sejtszámának meghatározása

(c) 100× hígítású tejminták injektálása; (d-h) 100× hígítású, (d) 1,0E+3 (e) 1,0E+4 (f) 1,0E+5 (g) 5,0E+5 (h) 1,0E+6 CFU/ml tejminták injektálása, (i) 5,4E+3 CFU/ml acidophilus tejminta injektálása

(50 µg/ml antitest, 500 µl mintahurok, 0,1 ml/perc, 20 °C)



5.14 ábra: *B. bifidum* és *L. acidophilus* sejtszámok QCM bioszenzorral és telepszámlálással meghatározva

5.1 Táblázat: *B. bifidum* és *L. acidophilus* sejtszámok QCM bioszenzorral és telepszámlálással meghatározva

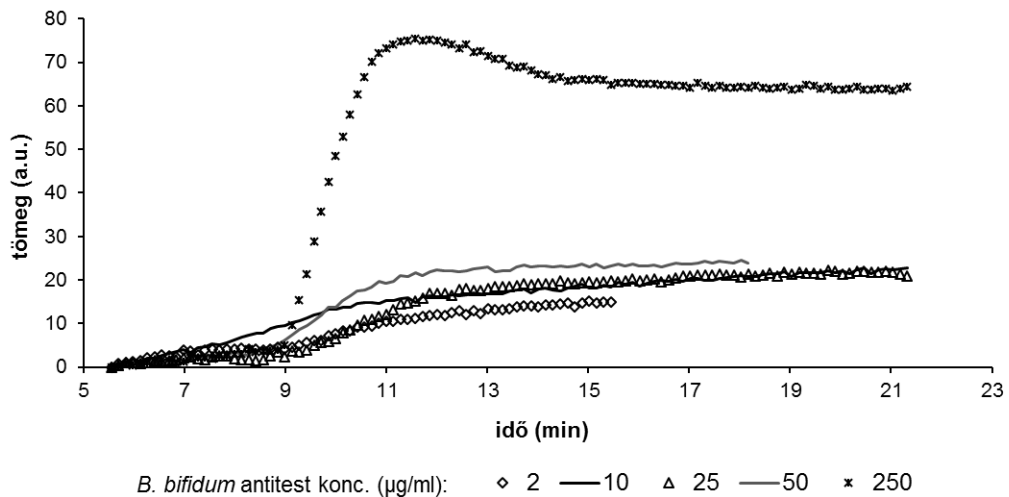
<i>B. bifidum</i> sejtszám (CFU/ml) tenyésztési eljárással meghatározva	sejtszám (CFU/ml) a detektált frekvenciaváltozás (Δf) alapján	<i>L. acidophilus</i> sejtszám (CFU/ml) tenyésztési eljárással meghatározva	sejtszám (CFU/ml) a detektált frekvenciaváltozás (Δf) alapján
1000	410	5000	5400
4300	2900	14000	11600
19000	18700	310000	243000
100000	61300	500000	401000
500000	344000		

5.2.3 OWLS bioszenzorok fejlesztése *L. acidophilus* és *B. bifidum* kimutatására

Az OWLS szenzorfejlesztés során meghatároztam a szenzorfelületen rögzítendő antitest koncentrációját, vizsgáltam a mérési hőmérséklet és az áramlási sebesség hatását és tanulmányoztam az antitestek szelektivitását. A pufferes baktérium szuszpenziók mérését követően valós élelmiszermintákban határoztam meg a *L. acidophilus* és *B. bifidum* sejtszámokat.

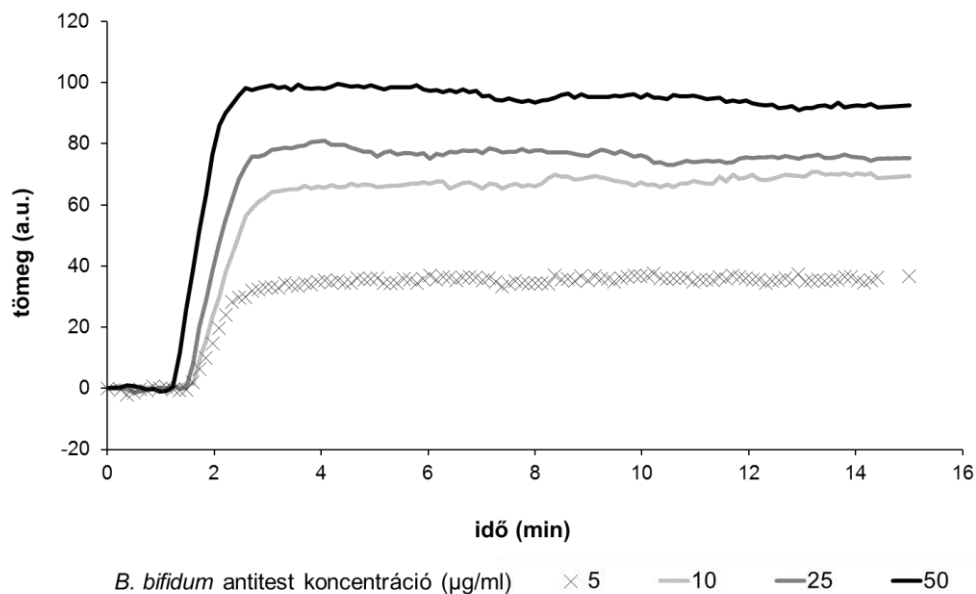
5.2.3.1 Rögzítendő antitest koncentrációjának meghatározása

Az OWLS szenzorfejlesztés első lépéseként megvizsgáltam, mely antiszérums koncentráció a leghatékonyabb a baktériumok kimutatására. Ennek eldöntésére először az egyes, antitest előállításához kinyert *L. acidophilus* és *B. bifidum* sejtfal antigén szuszpenziókat 1:500 arányban hígítottam 42 mmol/l Tris, pH 7,4 pufferrel, majd a 4.4.5.1 pontban leírtak szerint rögzítettem a szenzorfelületre. Az így előkészített szenzorokkal különböző hígítású (2, 10, 25, 50 és 250 $\mu\text{g/ml}$) *L. acidophilus* és *B. bifidum* antiszérumsok jelét mértem (5.15 ábra). A 250 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú *B. bifidum* antitest túltelítette a szenzorfelületet, a 2 $\mu\text{g/ml}$ antitesttel pedig instabil jeleket kaptam. Vizsgálataim alapján az *L. acidophilus* esetében szintén kizárható volt a legtöményebb és a leghígabb antiszérums alkalmazhatósága.

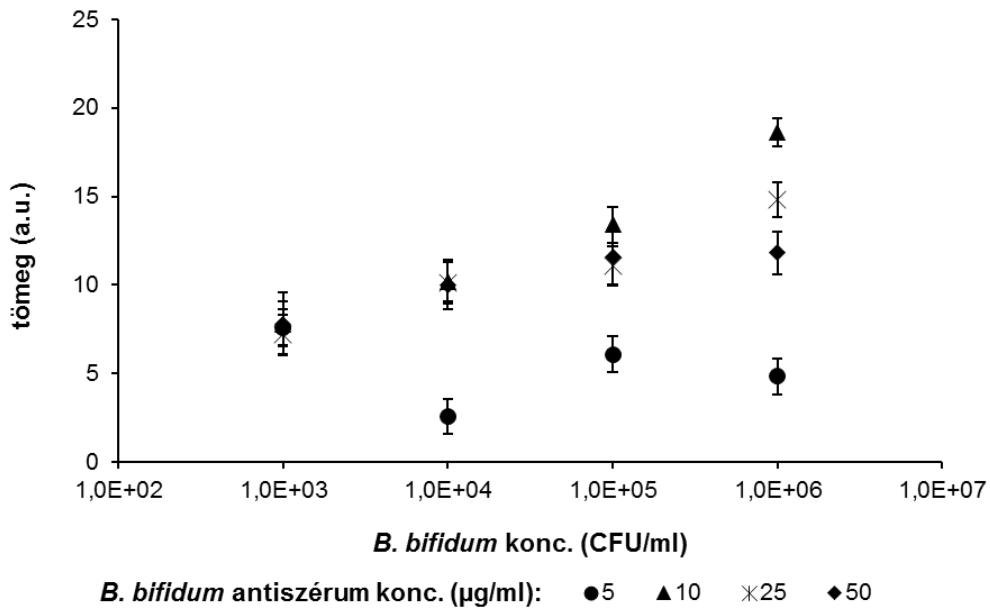


5.15 ábra: *B. bifidum* antitest mérése a szenzoron rögzített antigénnel (500× hígítású antigén rögzítve, 200µl minta, 0,16 ml/min, 24 °C)

Ezen vizsgálatokat követően további méréseket végeztem, melyek során mind a *L. acidophilus*, mind a *B. bifidum* antiszérumokat 5, 10, 25, ill. 50 µg/ml koncentrációban vittem fel a szenzorfelületre és 10^3 - 10^7 CFU/ml tartalmú *L. acidophilus* és *B. bifidum* pufferes szuszpenziókat mértem az egyes chippekkel. Az 5.16 ábrán a különböző hígítású *B. bifidum* antitestek rögzítésekor detektált tömeget ábrázoltam az idő függvényében.



5.16 ábra: OWLS szenzorvázslatok a különböző koncentrációjú *B. bifidum* antiszérum immobilizálásakor (200 µl antitest rögzítve, 0,16 ml/min, 24 °C) (SZALONTAI *et al.*, 2014a)

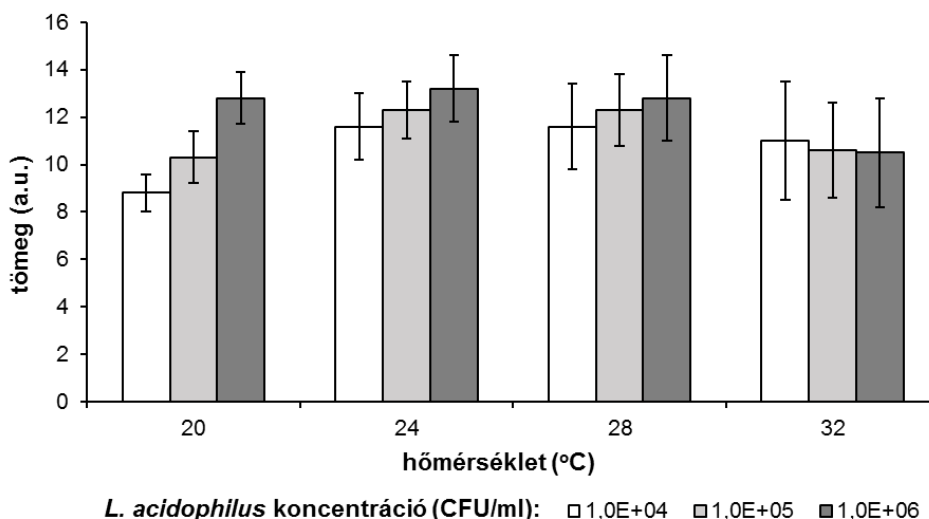


5.17 ábra: *B. bifidum* 10^3 - 10^6 CFU/ml koncentrációjú szuszpenzióinak mérése különböző koncentrációjú *B. bifidum* antiszérum rögzítésével (200 µl minta, 0,16 ml/min, 24 °C)

Az 5.17 ábrán foglaltam össze az eltérő koncentrációjú *B. bifidum* antitest immobilizálásakor kapott további eredményeket. Az 5 µg/ml koncentrációval instabilak voltak a jelek, és a szenzorfelszíni antitestekkel a baktérium sejtszám növekedésével nem volt detektálható arányosan növekvő tömeg. Az antigén kötő helyek túltelítődését tapasztaltam a 10^5 és 10^6 CFU/ml szuszpenziók mérésekor, amikor a 25, ill. az 50 µg/ml antitest bojtású szenzort alkalmaztam. A vizsgált *B. bifidum* sejtsuszpenziók esetében a 10 µg/ml antitest koncentráció bizonyult optimálisnak. Meggyező eredményeket tapasztaltam az *L. acidophilus* antitest esetében is. A detektált jelek nagyságát és az egyes antitest hígításokkal kapott dinamikus méréstartományokat összehasonlítva a 10 µg/ml koncentrációt választottam a szenzor érzékenyítéséhez a további mérések kivitelezésekor mindkét antiszérum esetében.

5.2.3.2 Mérési hőmérséklet és áramlási sebesség meghatározása

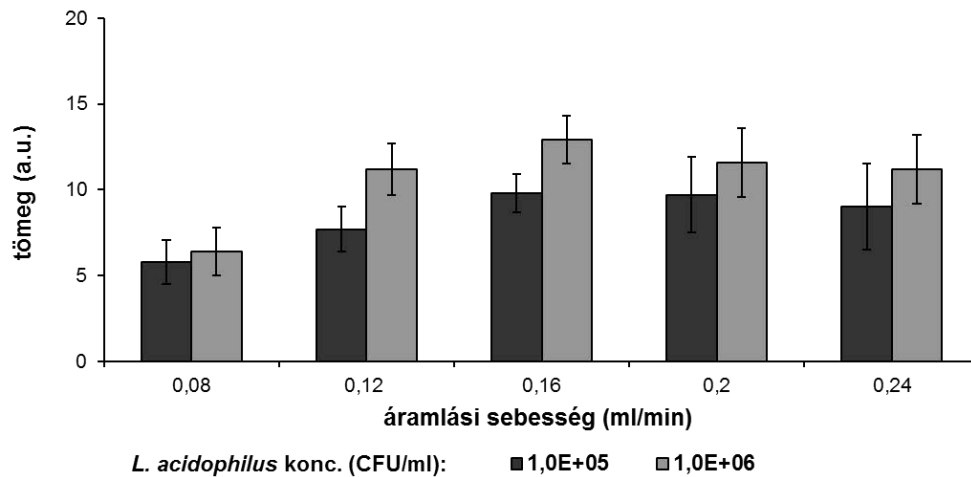
Az immunszenzor fejlesztés következő lépése az optimális mérési hőmérséklet és áramlási sebesség meghatározása volt. Mind az *L. acidophilus*, mind a *B. bifidum* szenzor hatékonyságát megvizsgáltam 20-32 °C-os hőmérsékleti tartományban. Az alábbi ábrán (5.18 ábra) a 10^4 - 10^6 CFU/ml *L. acidophilus* szuszpenziók vizsgálatával kapott eredményeket foglaltam össze.



5.18 ábra: A mérési hőmérséklet hatása az *L. acidophilus* immunszenzorra (10 µg/ml anti-*L. acidophilus*, 200 µl minta, 0,16 ml/min)

Az 5.18 ábrán látható, hogy a 20 és a 24 °C-os hőmérséklet bizonyult a megfelelőnek, ekkor mutatott kellő stabilitást a szenzor, amit a 28 és 32 °C-on tapasztalhoz képest kapott kisebb szórás értékek is jeleznek. Habár 24 °C-on nagyobb tömegegységeket kaptam az egyes baktérium szuszpenziókra, mint 20 °C-os hőmérsékleten, a szenzor kevésbé volt érzékeny. A hőmérsékletet tovább emelve instabilitás, és további érzékenység csökkenés lépett fel, továbbá a fokozott buborék-képződési hajlam zavarta a méréseket. Mindezeket figyelembe véve a 20 °C-os hőmérsékletet alkalmaztam a továbbiakban.

Az áramlási sebesség hatását 0,08-0,24 ml/min tartományban vizsgáltam (5.19 ábra). A legkisebb, 0,08 ml/min áramlási sebesség esetében tapasztalt kis jelválaszok a mérőcellában kialakuló kedvezőtlen áramlási viszonyokkal (lamináris áramlás) magyarázhatóak. A 0,12 és 0,16 ml/min áramlás alkalmazásával egyre érzékenyebben lehetett mérni a 10^5 és 10^6 CFU/ml baktérium szuszpenziókat. Ezekre a koncentrációkra a 0,16 ml/min áramlás mellett kaptam a legnagyobb jeleket, $9,86 \pm 1,1$ és $12,92 \pm 1,4$ értékeket tömegegységben (a.u.) kifejezve. Az áramlási sebesség fokozása során instabilitást, és a minta reakciócellában való rövidebb tartózkodási ideje miatt csökkenő jelintenzitást tapasztaltam.

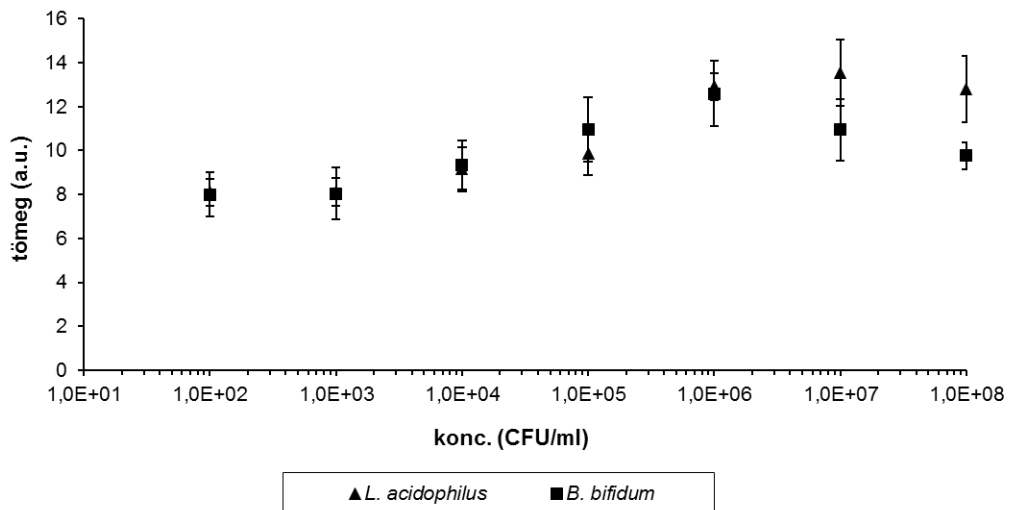


5.19 ábra: A mintaáramlás sebességének hatása a detektált jelre
(10 µg/ml anti-*L. acidophilus*, 200 µl minta, 20 °C)

A kidolgozott mérési eljárással minden mintát követően 200 µl 10 mmol/l HCl oldattal regenerálva szenzorfelszínt, egy szenzorral átlagosan 25-30 minta mérése végezhető el, mely során az érzékenység átlagosan 25%-kal csökken. Az érzékenység csökkenése standard oldatok injektálásával követhető nyomon és a jelcsökkenés alapján korrigálhatóak az eredmények. Egy szilanizálással előkészített szenzor átlagosan 8-12 alkalommal használható a hullámvezető réteg sérülése nélkül.

5.2.3.3 Baktérium szuszpenziók mérése áramló injektációs módszerrel

Az előzőekben megállapított optimális mérési paraméterek (10 µg/ml rögzített antiszérum, 0,16 ml/min áramlási sebesség, 20 °C) alkalmazásával vettem fel a pufferes baktérium szuszpenziók kalibrációs görbéit. *L. acidophilus* dinamikus méréstartománya 10^3 - 10^7 CFU/ml, *B. bifidum* esetében 10^3 - 10^6 CFU/ml (5.20 ábra). A nagyobb - *L. acidophilus* baktériumnál 10^8 CFU/ml, *B. bifidum* baktériumnál 10^7 CFU/ml - koncentrációk mérésekor a szenzorfelszín antitest rétegének túltelítődése – az antitesthez képest nagy feleslegben levő antigének térben kiszorítják egymást, gátolják a kötőhelyekhez való kapcsolódást – miatt jelcsökkenés volt tapasztalható.



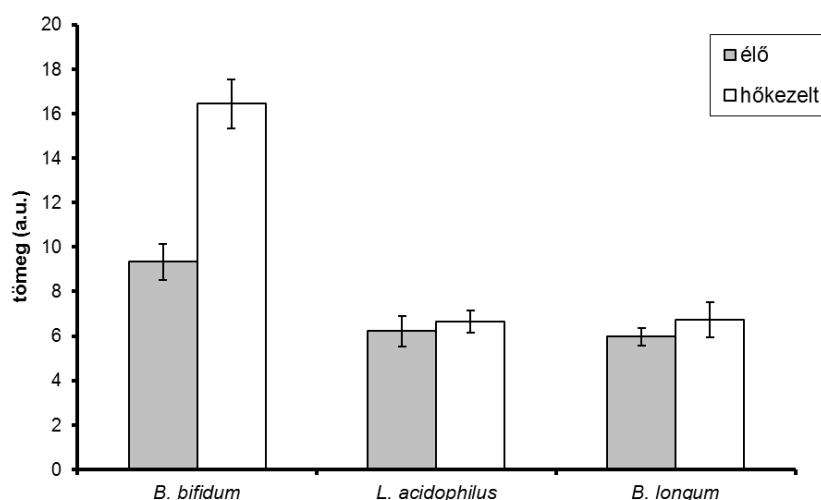
5.20 ábra: *B. bifidum* és *L. acidophilus* pufferes szuszpenzióinak OWLS szenzorral mért kalibrációs görbéi (10 µg/ml antitest, 200 µl minta, 0,16 ml/min, 20 °C)

5.2.3.4 *B. bifidum* és *L. acidophilus* antitest szelektivitásának vizsgálata

A *B. bifidum* és *L. acidophilus* antitestek más, probiotikus baktériumokhoz való affinitásának tesztelésére 10 µg/ml *B. bifidum* ill. *L. acidophilus* antiszérumot immobilizáltam az OWLS chip felületén. Ezekkel a szenzorokkal mértem 10^4 sejt/ml pufferes baktérium szuszpenziókat: élő és hőkezelt *B. bifidum*, *L. acidophilus* és *B. longum* sejteket tartalmazó mintákat. A *B. bifidum* élő sejtekre kapott tömeg egység értékekhez képest átlagosan 76%-kal nagyobb tömeg értékeket mértem a holt sejtekre (5.21 ábra), azaz a szenzor a legnagyobb érzékenységet a specifikus antitestek holt sejtekkel való reakciójakor mutatja. Hasonlóan az ELISA teszt eredményeihez (5.2.1 pont), a *B. bifidum* szenzor keresztreakciót mutatott *L. acidophilus* és *B. longum* baktériumokkal. A bioszenzoros mérések nem mutattak szignifikáns különbséget a *B. bifidum* antitesteknek az *L. acidophilus* és a *B. longum* élő, ill. holt sejtjeinek reakciója között. Hasonló eredményeket kaptam a *L. acidophilus* antitest szelektivitására vonatkozóan is (5.2 Táblázat).

5.2 Táblázat: *B. bifidum* és *L. acidophilus* antitestek szelektivitása

Immobilizált antitest	anti- <i>B. bifidum</i> anti- <i>L. acidophilus</i>	
	Detektált tömeg (a.u.)	
<i>B. bifidum</i> élő	9,33 ± 0,8	4,58 ± 0,3
<i>B. bifidum</i> hőkezelt	16,45 ± 1,1	5,14 ± 0,2
<i>L. acidophilus</i> élő	6,21 ± 0,6	9,16 ± 0,8
<i>L. acidophilus</i> hőkezelt	6,65 ± 0,3	12,32 ± 1,0
<i>B. longum</i> élő	5,97 ± 0,4	3,67 ± 0,2
<i>B. longum</i> hőkezelt	6,72 ± 0,8	4,12 ± 0,2

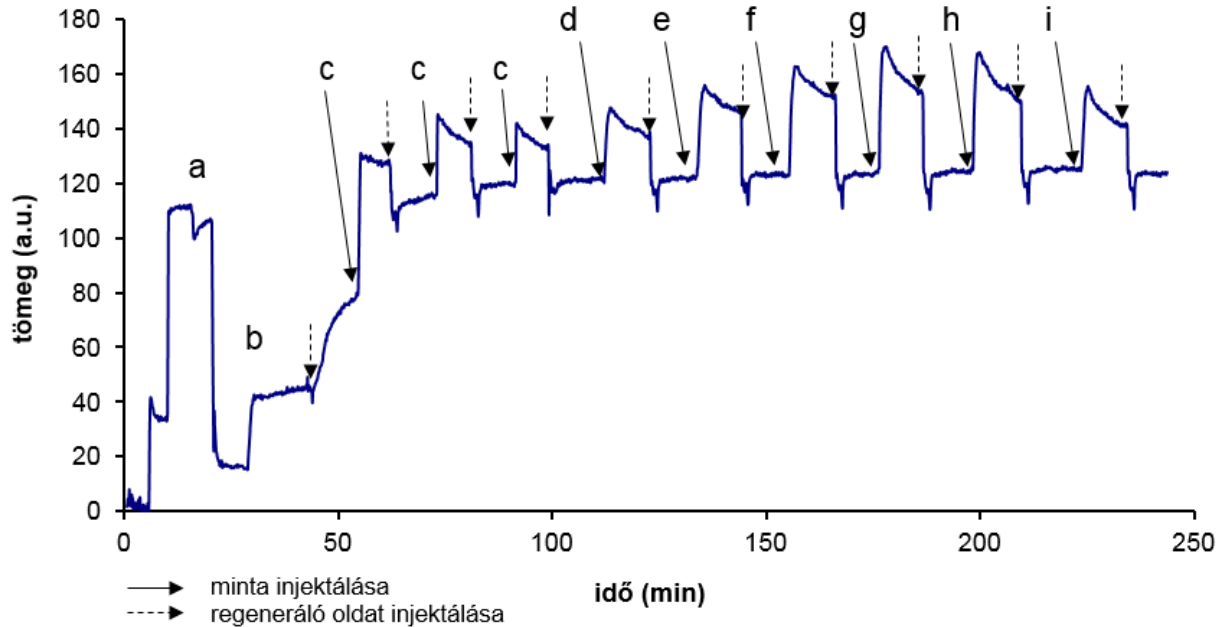


5.21 ábra: *B. bifidum* szenzor szelektivitása
(10 µg/ml antitest, 200 µl minta, 0,16 ml/min, 20 °C)

5.2.3.5 Élelmiszerminták vizsgálata

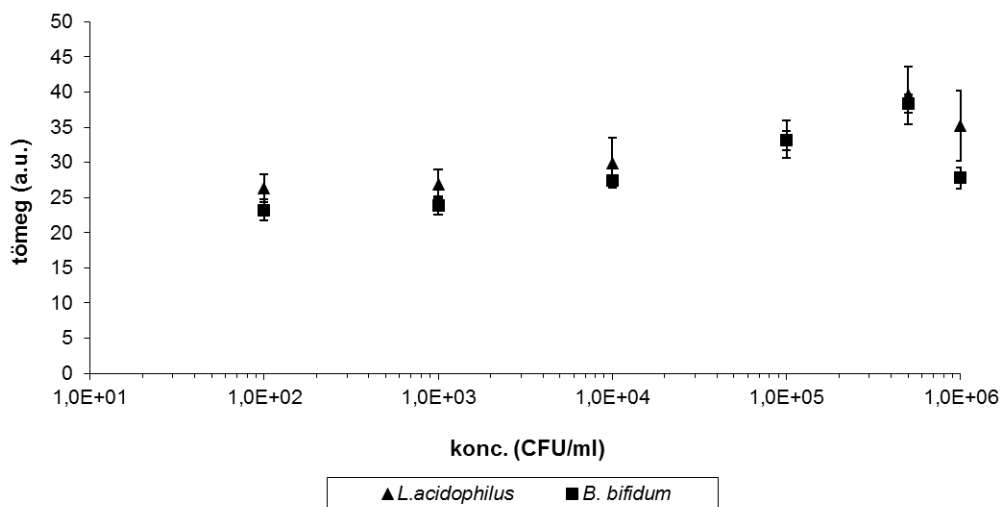
A QCM mérési eredményekre alapozva a tejmintákat 100× hígításban vizsgáltam az OWLS szenzorral is. A szenzor kalibrálásához a mintákat úgy készítettem elő, hogy a 100× hígítású tejminták a *B. bifidum*, ill. *L. acidophilus* sejteket 10^3 - 10^6 koncentrációban tartalmazták (mintaelőkészítés 4.4.6.1 fejezet). Az antiszérum rögzítését, és 10 mmol/l HCl oldattal történő mosást követően az első 3 minta nem tartalmazott hozzáadott sejteket, ezek injektálását azért végeztem, hogy az esetleges nem specifikus adszorpciót kiküszöböljem (5.22 ábra, c jelű injektálások), ezt követően kalibráltam a szenzort. A dinamikus méréstartomány 100× hígított

tejben mindkét baktériumra 10^3 - 5×10^5 sejt/ml (5.23 ábra). A tejminták mérésekor felvett kalibrációt a baktériumok pufferes kalibrációival összevetve azt tapasztaltam, hogy a méréstartomány 10^3 - 10^7 sejt/ml-ről (*L. acidophilus*), illetve 10^3 - 10^6 sejt/ml-ről (*B. bifidum*) 10^3 - 5×10^5 sejt/ml-re csökkent a tejminta okozta mátrixhatás miatt.



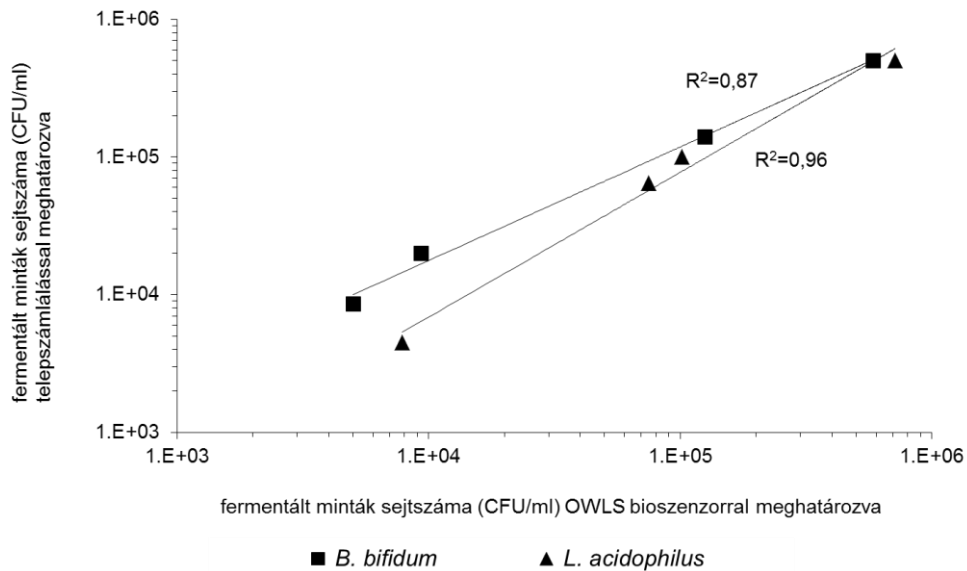
5.22 ábra: Tejminták *B. bifidum* sejszámának meghatározása $100\times$ hígítású tejben OWLS szenzorral

(a-b): antiszérum immobilizálása glutáraldehiddel; (c): $100\times$ hígítású tejminták injektálása; (d-h): $100\times$ hígítású, (d) $1,0E+3$ (e) $1,0E+4$ (f) $1,0E+5$ (g) $5,0E+5$ (h) $1,0E+6$ CFU/ml tejminták injektálása, (i): $4,5E+3$ CFU/ml bifidus fermentált tejminta injektálása



5.23 ábra: *B. bifidum* és *L. acidophilus* baktériumok mérése $100\times$ hígított tejben (10 μ g/ml antiszérum; 200 μ l minta, 0,16 ml/min áramlási sebesség; 20 °C)

Az OWLS szenzorok $100\times$ hígítású tejmintákra való kalibrálását követően ismeretlen sejtszámú fermentált tejet, csak *L. acidophilus* tartalmazó acidophilus, ill. csak *B. bifidum* baktériumokat tartalmazó bifidus tejmintákat (mintaelőkészítés: 4.4.6.1 pont) vizsgáltam. Az ismeretlen sejtszámú mintákra a bioszenzorról detektált jelek alapján számolt sejtszámokat (sejt/ml) összevettem a minták telepszámlálással kapott csíraszám értékeivel, amelyek jó egyezést mutattak (5.24 ábra).



5.24 ábra: Fermentált tejminták *B. bifidum* és *L. acidophilus* sejtszámai OWLS bioszenzorról és telepszámlálással meghatározva

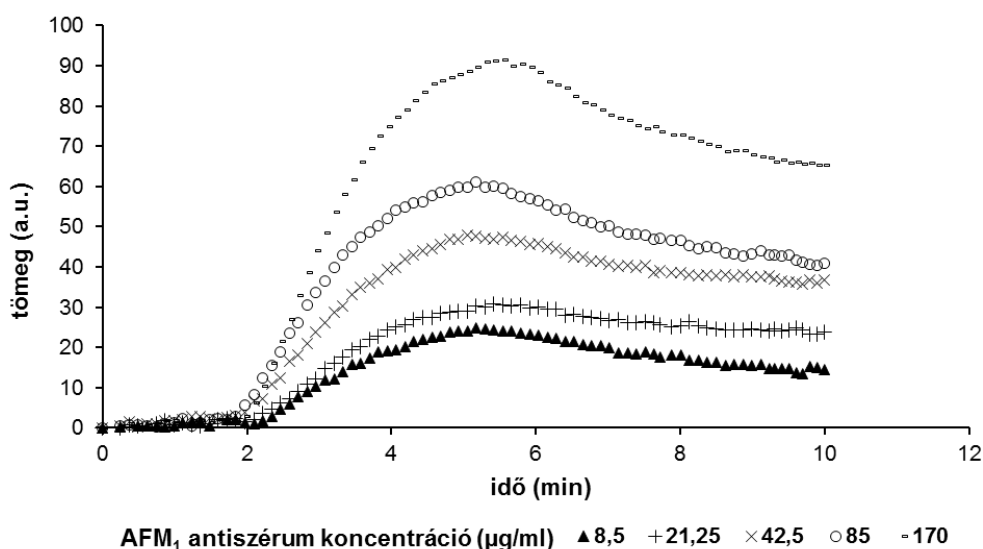
Egy másik, *E. coli* kimutatására korábban fejlesztett (ADÁNYI *et al.*, 2006b) OWLS-alapú direkt immunszenzor dinamikus méréstartománya pufferes baktérium szuszpenziókat mérve $3\times 10^4 - 3\times 10^7$ sejt/ml. Habár a méréstartomány itt kb. egy nagyságrenddel szélesebb, mint az általam leírt szenzor esetében, a *B. bifidum* és az *L. acidophilus* szenzorokkal kisebb koncentrációkat eredményesebben lehet mérni. Hasonló jelölésmentes, poliklonális antitest-alapú szenzort fejlesztettek SPR detektorral Koubová és munkatársai (2001), amelynek kimutatási határa *Listeria monocytogenes* és *Salmonella enteritidis* baktériumokra 1×10^6 sejt/ml. Szintén SPR szenzorról, direkt módszerrel mutattak ki *E. coli* O157:H7 baktériumot monoklonális antitestek alkalmazásával 10^6 sejt/ml kimutatási határt elérve (SUBRAMANIAN *et al.*, 2006a), valamint poliklonális antitestekkel *Staphylococcus aureus* (LOD 10^7 sejt/ml) (SUBRAMANIAN *et al.*, 2006b).

5.3 Aflatoxin M₁ bioszenzor

A kis molekulatömegű vegyületek kimutatására a direkt mérési módszer alkalmazása kevésbé elterjedt a jelölésmentes technikák között, mivel ezen célvegyületek kis koncentrációinak meghatározása a szenzorfelületen rögzített antitestekkel nem érhető el, azaz nem lesz megfelelő az érzékenység (MAJER-BARANYI *et al.*, 2011). Ennek kiküszöbölésére alkalmazzák az indirekt kimutatási módszert (4.4.5.2 fejezet), amikor is a szenzorfelületen, általában fehérjével konjugált formában rögzítik a célvegyületet, amellyel a mintaoldathoz adott specifikus antitest keverékből - megfelelő inkubációs idő elteltével - mérik vissza az immunkomplexet nem képző, szabadon maradt antitesteket. Az indirekt meghatározások fejlesztésének sarkalatos pontjai a szenzorfelületen rögzítendő célvegyület-fehérje konjugátum koncentrációjának, és az alkalmazásra kerülő specifikus antitest koncentrációjának meghatározása.

5.3.1 Az alkalmazott poliklonális aflatoxin M₁ antitest koncentrációjának meghatározása

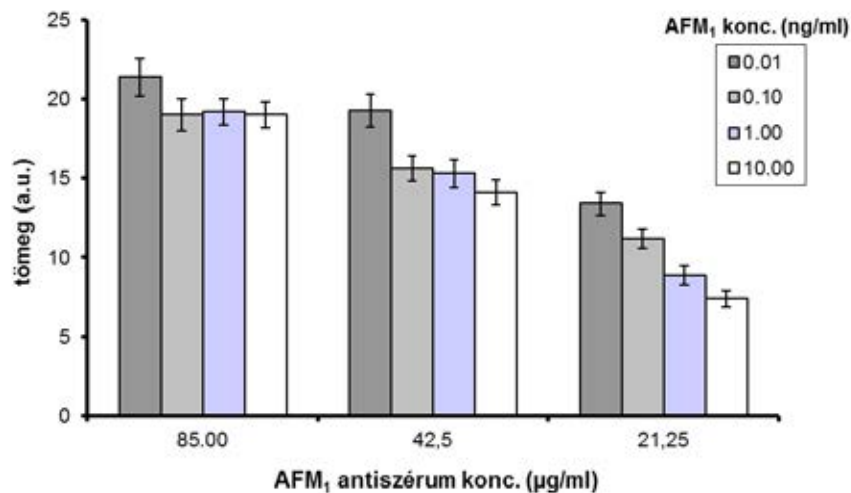
Az AFM₁ specifikus antitest optimális koncentrációjának meghatározására 3,0 µg/ml aflatoxin M₁-HRP konjugátumot rögzítettem a szenzor chipen a 4.4.5.1 fejezetben leírt eljárással, majd az így előkészített szenzorról különböző koncentrációjú (8,5; 21,25; 42,5; 85 és 170 µg/ml) antitest oldatokat mértem. Az 5.25 ábrán az antitest oldatokra kapott jelválaszok kerültek összegzésre.



5.25 ábra: Különböző koncentrációjú AFM₁ antiszérumokra kapott jelválaszok (3,0 µg/ml AFM₁-HRP rögzítve; 0,16 ml/min; 24 °C) (SZALONTAI *et al.*, 2014b)

A legkisebb koncentrációjú (8,5 $\mu\text{g/ml}$) antiszérum kevésnek bizonyult a stabil immunkomplexek képződéséhez, amit a kis detektált tömeg értékek, a jelválaszok instabilitása, azaz az antitestek szenzorfelzínről való lemosódása jelzett. Az antiszérumok 85 és 170 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációi megfelelően mérhető, stabil jeleket adtak, ezen koncentrációknál azonban az oldatok túl sok antitestet tartalmaztak, a szenzorfelzín túltelítődött, amit a további vizsgálataim, standardok és a minták mérésekor jelentkező csökkent érzékenység mutatott. Ha a vizsgált oldatban az AFM₁-hez képest nagy feleslegben vannak az antitestek, túlzottan sok, immunkomplexet nem kialakító, szabadon maradt antitest kerül a szenzorfelzínre, túltelítve annak érzékelő antigén rétegét.

További méréseimhez a 21,25 $\mu\text{g/ml}$ antiszérum koncentrációt választottam, amely már jól mérhető, stabil jelet ad (~20 a.u.), de nem tartalmaz túl sok antitestet, így elég érzékenyen lehet mérni az antigén kis koncentrációit (5.26 ábra).

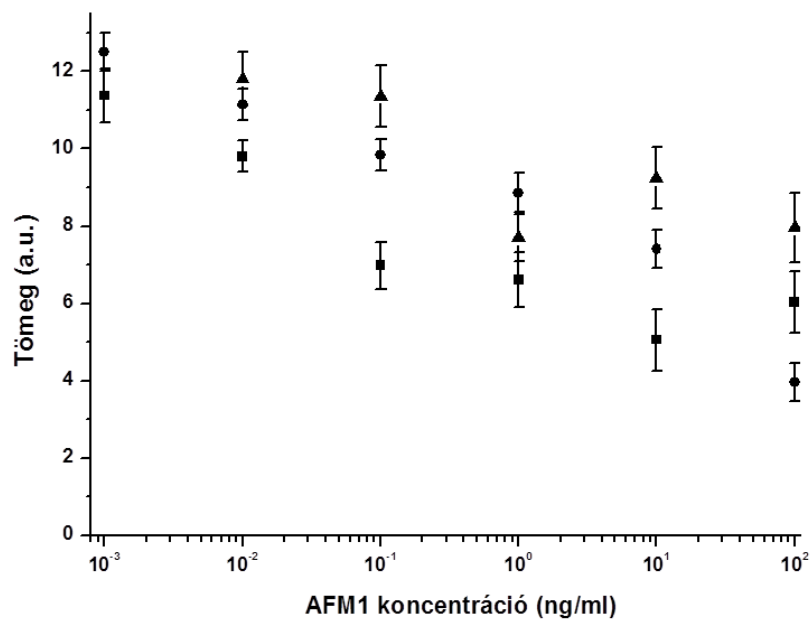


5.26 ábra: AFM₁ antiszérum különböző koncentrációinak (85; 42,5 és 21,25 $\mu\text{g/ml}$) alkalmazása 0,01-10 ng/ml AFM₁ standardok mérésére (200 μl minta, 0,12 ml/min, 24 °C)

5.3.2 Az optimális, rögzítendő AFM₁-HRP konjugátum koncentráció meghatározása

A szenzorfelzín antigén borításának hatás-vizsgálatára az AFM₁-HRP konjugátumot különböző koncentrációban (2,2; 3,0; 4,4 $\mu\text{g/ml}$) rögzítettem a szilanizálással előkészített chipen, és indirekt méréseket végeztem áramló injektációs rendszerben. A 42,5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú antiszérumot 1:1 arányban elegyítve a megfelelő koncentrációjú (0,0002-200 ng/ml) AFM₁ standard oldattal, 3 perces inkubációt (24 °C) követően mértem a mintákat, amelyek 21,25 $\mu\text{g/ml}$ antiszérumot és 0,0001-100 ng/ml aflatoxin M₁-et tartalmaztak (5.27 ábra). A 4,4 $\mu\text{g/ml}$

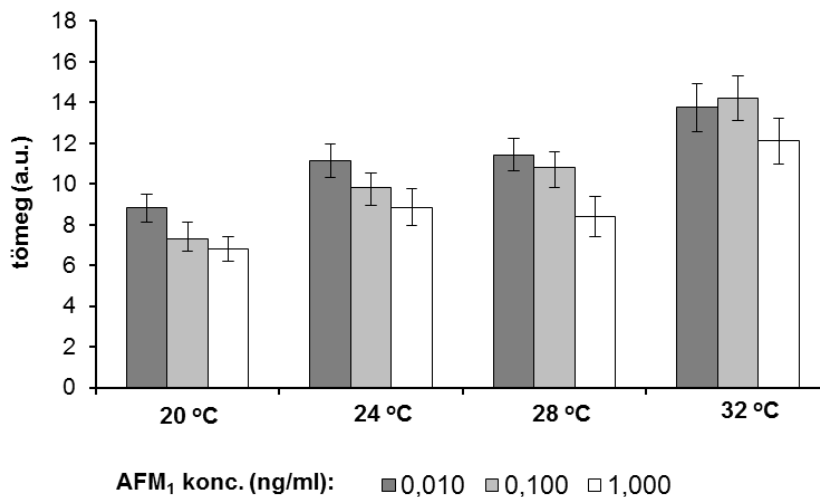
koncentrációjú AFM₁-HRP konjugátumot szenzorfelületen immobilizálva 0,01-1 ng/ml volt az aflatoxin dinamikus méréstartománya. Ugyanezzel a konjugátummal nagyobb AFM₁ koncentrációkat (10-100 ng/ml) mérve a jelek instabillá váltak. A 3,0 µg/ml konjugátumot alkalmazva szélesebb volt a toxin méréstartománya (0,001-100 ng/ml), és ekkor volt a legkisebb a standard hiba ($\pm 0,3-0,5$), összehasonlítva a 2,2 és 4,4 µg/ml konjugátumot hordozó szenzorokkal ($\pm 0,4-1,2$). Habár a 2,2 µg/ml konjugátumot használva volt a szenzor a legérzékenyebb a legkisebb AFM₁ koncentrációkra (0,001-0,1 ng/ml), azonban 0,1 ng/ml toxintartalom fölött instabillá váltak a detektált jelek. A mérési eredményeim alapján a további vizsgálatokhoz 3,0 µg/ml AFM₁-HRP konjugátumot rögzítettem a szenzorokon.



5.27 ábra: Szenzorfelületen rögzített AFM₁-HRP konjugátum koncentrációjának hatása a mért jelre (■: 2,2 µg/ml; ●: 3,0 µg/ml; ▲: 4,4 µg/ml)
(200 µl minta, 0,12 ml/min, 24 °C)

5.3.3 Mérési hőmérséklet hatása

A mérési hőmérséklet vizsgálatát 20-32 °C tartományban végeztem el, 0,01-1,0 ng/ml koncentrációjú AFM₁ mintákat mértem indirekt eljárással. (5.28 ábra).

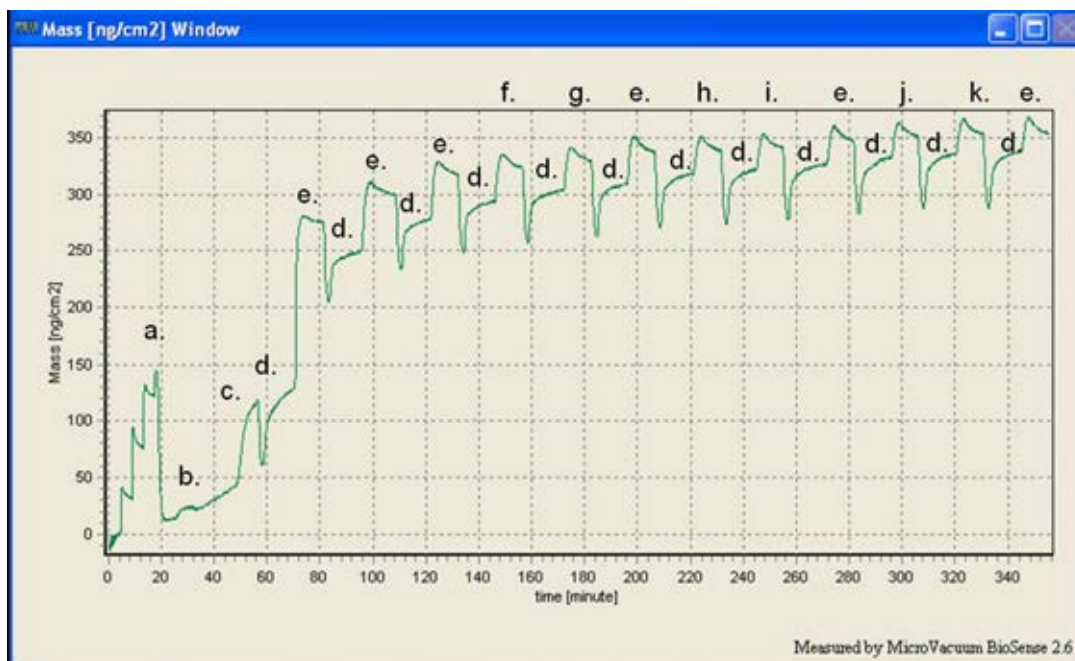


5.28 ábra: A mérési hőmérséklet hatása az immunszenzor érzékenységére (3,0 µg/ml AFM₁-HRP, 21,25 µg/ml antiszérum, 200 µl minta, 0,12 ml/min)

Az alkalmazott hőmérsékletek közül 20 és 24 °C-on megfelelő jelintenzitást mértem az egyes AFM₁ mintákra, de ahogy az ábrán is látható, 24 °C-on nőtt az antitest affinitása az AFM₁-hez, így több kötődött meg a szenzorfelületen, nagyobb jeleket eredményezve. Hasonlóan hatékonyak bizonyult a 28 °C is, habár a hőmérséklet emelésével fokozódó pufferből történő buborékkiválás nehezítette a mérési folyamatot. Ez a hatás 32 °C-on tovább erősödött, instabillá vált a mérőrendszer. Mindezeket figyelembe véve a 24 °C-os hőmérsékletet alkalmaztam további vizsgálataimhoz.

5.3.4 Tejminták vizsgálata

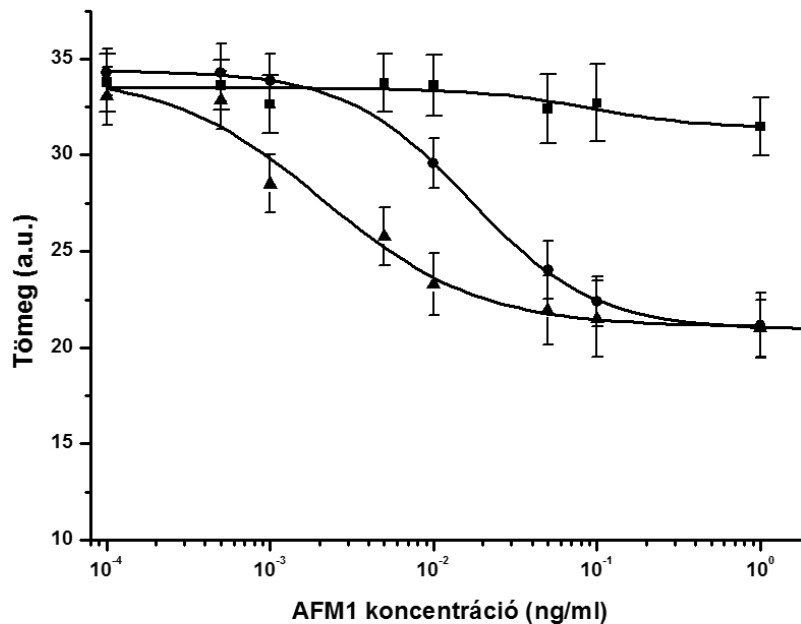
Az immunszenzorban alkalmazott AFM₁-HRP és antitest koncentrációjának meghatározását követően aflatoxin M₁ standard addícióval (4.4.6.2 fejezet) készített tejmintákat vizsgáltam. A tejmintához adtam a megfelelő koncentrációjú AFM₁ standardokat, majd szűrést, vagy centrifugálást, vagy méretkizárásos centrifugálást alkalmaztam. Ezt követően a mintákat pufferrel (42 mmol/l Tris, pH 7,4) hígítottam (50× ill. 100×), végül 1:1 arányban elegyítettem a megfelelő koncentrációjú (42,5 µg/ml) antiszérummal. Az így kapott 100× ill. 200× hígítású tejmintákban az AFM₁ koncentrációja 0,0001-1 ng/ml tartományban volt, míg az antiszérum koncentrációja 21,25 µg/ml. Az 5.29 ábra egy indirekt immunszenzoros OWLS mérési diagramot mutat, az AFM₁-HRP konjugátum szenzorfelületén való rögzítésétől a standard addícióval készített, 100× hígítású tejminták méréséig.



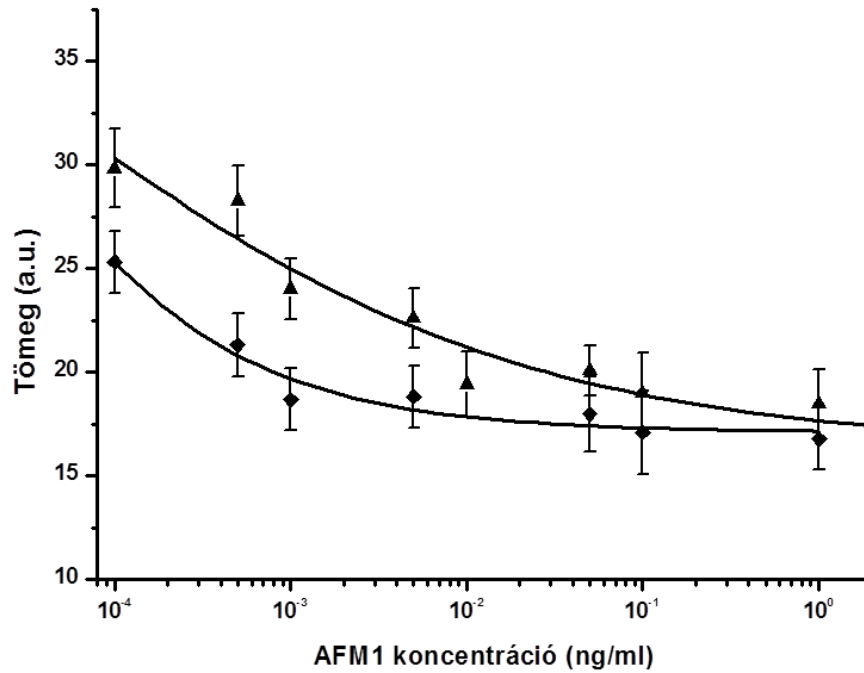
5.29 ábra: Tejminták AFM₁ mérése indirekt OWLS-alapú immunszenzorral (a-b) 3,0 µg/ml AFM₁-HRP konjugátum rögzítése; (c) desztillált víz cseréje pufferre (d) regenerálás (10 mmol/l HCl); (e) 42,5 µg/ml AFM₁ antiszérum + 50× hígított tej; (f-g-h-i-j-k) 100× hígított tej, amely tartalmaz: 0,001(f) – 0,01(g) – 0,05(h) – 0,1(i) – 1(j) – 10(k) ng/ml AFM₁-et + 21,25 µg/ml AFM₁ antiszérumot; 0,12 ml/min, 24 °C)

A különböző mintaelőkészítési módok összehasonlításának célja volt, hogy vizsgáljam a szenzor érzékenységére gyakorolt hatást, a visszanyerési hatékonyságot, melyek alapján kiválasztható a leghatékonyabb előkészítési módszer. Az AFM₁ standard addíciót követően a tejmintákat redős szűrőn szűrtem, vagy centrifugáltam (3500 g, 10 min, 10 °C), vagy méretkizárásos centrifugálást (3K Pall macrosep szűrő, 4500 g, 30 min, 10 °C) alkalmaztam.

A 100× hígítású (5.30 ábra) szűrt mintákban az AFM₁ dinamikus méréstartománya 0,001-0,1 ng/ml (IC₅₀ 0,016 ± 0,002 ng/ml), míg a kimutatási határ 0,0005 ng/ml. Ugyanilyen hígítású centrifugált minták vizsgálatakor jelentősen nőtt a szenzor érzékenysége, az AFM₁-et kb. 1 nagyságrenddel kisebb koncentrációban lehetett mérni (LOD: 0,0001 ng/ml; dinamikus méréstartomány 0,0005-0,01 ng/ml, IC₅₀ 0,0021±0,0004 ng/ml). A méretkizárásos centrifugálással előkészített mintákat mérve nem tudtam kalibrációt felvenni a vizsgált AFM₁ koncentráció tartományban. Ezzel az eljárással minden 3 kDa-nál nagyobb - lényegében a tejfehérjék - komponens kiszűrődött a tejből. Az AFM₁ szemipoláros karakteréből adódóan javarészt a tej nem zsír, a tejfehérjéken belül elsősorban (30 %-ra becsült) a kazein frakcióhoz kapcsolódik (VAN EGMOND et PAULSCH, 1986; MOHAMMADI, 2011), így a 3 kDa-os pórusátmérőjű membrán nem alkalmazható mintaelőkészítésre, mivel a fehérjékkel együtt az aflatoxin M₁-et is eltávolítjuk vele a tejből.



5.30 ábra: Mintaelőkészítés hatása az AFM₁ meghatározására méretkizárásos centrifugálás (■), centrifugálás (▲), szűrés (●) (3,0 µg/ml AFM₁-HRP, 21,25 µg/ml AFM₁ antiszérum, 200 µl 100× hígítású tejminták)



5.31 ábra: Szűrt (▲) és centrifugált (◆) 200× hígítású tejminták bioszenzoros mérése (3,0 µg/ml AFM₁-HRP, 21,25 µg/ml AFM₁ antiszérum, 200 µl minta)

A 200× hígítású, szűréssel előkészített tejmintákban az AFM₁ dinamikus mérésstartománya 0,0005-0,01 ng/ml (IC₅₀ 0,00074 ± 0,00010 ng/ml), centrifugálást alkalmazva 0,0001-0,001 ng/ml (IC₅₀ 0,00051 ± 0,00008 ng/ml) (5.31 ábra). Az eredményeim szerint a 200× hígítású mintákban az aflatoxin dinamikus mérése nem kivitelezhető a vizsgált koncentráció tartományban.

Az AFM₁ kimutatására fejlesztett indirekt immunszenzor 100× hígítású, szűrt, vagy centrifugált tejminták alkalmazásával mutatja a legnagyobb érzékenységet és stabilitást. A fenti mérési paramétereket és mintaelőkészítést alkalmazva a módszer körülbelül egy nagyságrenddel érzékenyebb, mint a hasonló, kompetitív kimutatási elven alapuló, de elektrokémiai detektálást alkalmazó bioszenzoros megoldások (BADEA *et al.*, 2004; MICHELI *et al.*, 2005; PARKER *et al.*, 2009).

A mérési eredményeket ppt-ben megadva a 100× hígítású, szűrt tejben a dinamikus mérésstartomány 1-100 ppt (LOD 0,5 ppt), centrifugált mintáknál 0,5-10 ppt (LOD 0,1 ppt). Ezeket az eredményeket hígítatlan tejjre vonatkoztatva a kimutatási határ szűrt és centrifugált mintáknál 50, ill. 10 ppt. Micheli és mtsai (2005) hígítatlan tejből mutattak ki kompetitív módszerrel, SPE elektródok alkalmazásával AFM₁-et, a LOD 25 ppt-nek adódott. Parker és Tothill (2009) szintén SPE elektróddal hígítatlan tejben mutatta ki az AFM₁-et 39 ppt kimutatási határral, 1000 ppt-ig dinamikusan mérve a toxint. Az aflatoxin M₁ határértéke tejben 0,05 µg/kg (50 ppt), csecsemő tápszerekben 0,025 µg/kg (25 ppt)(1881/2006/EK rendelet). Az eredmények alapján tehát a

kidolgozott immunszenzor eredményesen alkalmazható tejminták aflatoxin szennyezettségének gyors kimutatására.

5.3.5 Referencia mérések

A bioszenzoros mérési eredményeket kompetitív ELISA teszttel kivitelezett referencia mérésekkel hasonlítottam össze. A 0,01 és 0,05 ng/ml AFM₁ tartalmú mintákat szűrtem, ill. centrifugáltam, majd mértem OWLS szenzorral és ELISA-val. Az eredményeket az 5.3 Táblázatban összegeztem. A szűrt, valamint a centrifugált minták ELISA, és bioszenzoros eredményei jó egyezést mutattak, jelezve a fejlesztett bioszenzoros módszer megbízhatóságát. A legpontosabb eredményeket az egyszerűbben előkészített, szűrt mintákra kaptam. Az immunszenzorral mért eredmények független kétmintás t-próba alapján $P < 0,05$ szignifikancia szinten megfeleltek az ELISA referenciamódszerrel mért értékeknek.

5.3 Táblázat: OWLS immunszenzorral és ELISA teszttel meghatározott aflatoxin M₁ tartalmak 100× hígított tejmintákban (RE%: relatív hiba %: (mért érték-valós érték)/valós érték×100; R%: visszanyerés %)

Minta	hozzáadott AFM ₁ (ng/ml)	OWLS			ELISA		
		AFM ₁ (ng/ml)	RE%	R%	AFM ₁ (ng/ml)	RE%	R%
szűrt	0,010	0,011 ± 0,001	10	110	0,012 ± 0,001	20	120
szűrt	0,050	0,048 ± 0,003	-4	96	0,054 ± 0,002	8	108
centrifugált	0,010	0,012 ± 0,001	20	120	0,008 ± 0,001	-20	80
centrifugált	0,050	0,039 ± 0,002	-22	78	0,042 ± 0,003	-16	84

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Az értekezésben összefoglalt eredmények alapján megállapítható, hogy a QCM és az OWLS szenzortechnika alkalmazható probiotikus baktériumok direkt módszerrel, és az OWLS mérőrendszer aflatoxin M₁ indirekt immunanalitikai módszerrel, élelmiszermintákból történő, jelölésmentes kimutatására, mennyiségi meghatározására az alábbi paraméterek mellett:

- A QCM mérőrendszer az előállított poliklonális *L. acidophils* és *B. bifidum* antitestek szulfo-LC-SPDP keresztkötő reagenssel való immobilizálását (50 µg/ml) követően és a megállapított optimális mérési paraméterek (0,1 ml/min, 20 °C, 500 µl minta, 1,2 mol/l NaOH) mellett alkalmas a baktériumok dinamikus, pufferből történő mérésére 10⁴-10⁷ CFU/ml tartományban mind áramló injektációs, mind megállított mintaáramú módszert használva. Eredményeim szerint hatékonyabb viszont az áramló injektációs módszer a tejminták (100× hígítás) vizsgálatakor, szélesebb dinamikus méréstartományt eredményez és rövidebb a mérésidő (10³-5×10⁵, ~20 perc) összehasonlítva a megállított mintaárammal felvett méréstartománnyal (10³-10⁵ CFU/ml, ~30 perc). Megállapítható, hogy a szenzorok maximálisan 4 alkalommal használhatóak (építhetőek újra) az általam használt szenzorfelület-tisztítási eljárást követően az érzékenység jelentős csökkenése nélkül. Ismeretlen sejtszámú, fermentált minták *L. acidophilus* és *B. bifidum* sejtszámára bioszenzorral kapott eredmények jól korreláltak (R² 0,98 ill. 0,89) a telepszámlálással kapott eredményekkel.
- Az OWLS szenzorral az antitestek (10 µg/ml) hullámvezető felületén glutáraldehiddel (2,5%) történő rögzítését követően az *L. acidophilus* és a *B. bifidum* dinamikus méréstartománya pufferben 10³-10⁷ CFU/ml, ill. 10³-10⁶ CFU/ml (42 mmol/l Tris pH 7,4, 0,16 ml/min, 20 °C, 200 µl minta, 10 mmol/l HCl). Tejmintákban mindkét baktérium méréstartománya 10³-5×10⁵ CFU/ml. A fermentált tejminták vizsgálatakor a bioszenzoros eredmények jó egyezést mutattak a referencia mikrobiológiai mérésekkel (*B. bifidum*: R² 0,87 és *L. acidophilus*: R² 0,96).
- Az aflatoxin M₁ kimutatására fejlesztett indirekt immunanalitikai módszerrel 3,0 µg/ml AFM₁-HRP konjugátum rögzítésével és 21,25 µg/ml AFM₁ antitest alkalmazásával a legérzékenyebb (0,001-100 ng/ml dinamikus méréstartomány) a szenzor pufferes mintákat mérve (42 mmol/l Tris pH 7,4, 0,12 ml/min, 24 °C, 200 µl minta, 10 mmol/l HCl). Mesterségesen szennyezett (*spike*) tejminták vizsgálatakor a legjobb eredmények 100× hígítású, szűrt vagy centrifugált minták alkalmazásával érhető el, ekkor a dinamikus méréstartomány 0,001-0,1 ng/ml (LOD: 0,0005 ng/ml), a gátlási középérték (IC₅₀) 0,016

$\pm 0,002$ ng/ml), ill. $0,0005-0,01$ ng/ml (LOD: 0001 ng/ml), az IC_{50} $0,0021\pm 0,0004$ ng/ml. A fermentált tejminták vizsgálatakor a bioszenzoros eredmények jó egyezést mutattak a referencia kompetitív ELISA mérésekkel.

JAVASLATOK:

- A kvarckristály szenzorfelszín tisztítási eljárásának további tanulmányozását tervezem, mivel a hatékonyabb felülettisztítás (pl. UV-ózon kamra alkalmazása) elősegítheti a szenzor chipék többszöri használatát.
- További szenzorfelszín regenerálási kísérletek megvalósítását tervezem mind a QCM, mind az OWLS szenzorok esetében az immunkomplexek hatékonyabb bontása céljából.
- A továbbiakban célul tűzöm ki kevert baktérium tenyészetek mérését a fejlesztett QCM és az OWLS immunszenzorokkal a szelektivitás további vizsgálatára.
- A kutatás folytatásaként a probiotikus szenzorok kapcsán alapvető lenne az élő-holt sejtek és antitestek reakciójának további vizsgálata, a holt sejtekre tapasztalt nagyobb érzékenység okainak keresése, feltárása. Gyakorlati szempontból pedig fontosnak tartom annak a jelenségnek a további bioszenzoros vizsgálatát, hogy az élő és holt sejtek jelkülönbségéből következtetni lehet a specifikus baktérium élő sejtszámára.
- A szenzorok szelektivitásának növelésére javaslom a monoklonális, az antigén egy epitópjára specifikus ellenanyag molekulák előállítását az *L. acidophilus* és *B. bifidum* baktériumokra, ezek egyes szenzorokban való alkalmazását, mellyel elméletben jelentősen növelhető a szelektivitás. Itt is előfordulhat azonban keresztreaktivitás, amennyiben többféle antigén azonos epitópját (pl. azonos szénhidrát vagy lipidoldallánc) ismeri fel az ellenanyag. Számolni kell továbbá azzal is, hogy a nagy, heterogén epitópokkal rendelkező antigént nehezebb egyetlen epitópjára specifikus monoklonális ellenanyaggal jellemezni és kimutatni. Immunszenzor kialakításakor a szelektivitás növekedése mellett várható az érzékenység csökkenése.
- Az AFM₁ kimutatására alkalmas szenzorral az antitest szelektivitását, az aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ keresztreakciójának mértékét tervezem vizsgálni, valamint a mesterségesen szennyezett (spike) mintákon túl valós élelmiszermatrix vizsgálatára (aflatoxin M₁-gyel természetes úton szennyezett) alkalmazni a fejlesztett immunszenzort.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

L. acidophilus és *B. bifidum* baktériumok kimutatására QCM- és OWLS-alapú direkt, áramló oldatos immunanalitikai eljárásokat fejlesztettem, továbbá indirekt eljáráson alapuló immunszenzort OWLS mérőrendszerrel aflatoxin M₁ mennyiségi meghatározására:

1. A QCM szenzorfejlesztés első lépéseként elvégzett modell vizsgálatokkal (BSA – anti-BSA molekulapár) igazoltam az áramló oldatos mérőrendszer direkt immunszenzorként való alkalmazhatóságát a szenzor érzékenységét, stabilitását alapvetően meghatározó paraméterek tanulmányozásával. Megállapítottam, hogy a QCM-szenzor Au felszínén az antitest immobilizálására a szulfo-LC-SPDP heterobifunkciós keresztkötő reagens hatékonyabban alkalmazható, mint az MHDA. A mérési módszerek – áramló injektálásos, megállított mintaáramú – közül a megállított mintaáram (10 perces inkubációs idő) az 500 µl mintahurok alkalmazásával bizonyult hatékonyabbnak a detektált frekvenciaváltozás (Hz) alapján. Megállapítottam, hogy az alkalmazott szenzorfelszín tisztítási eljárás és az azt követő felszínmódosítás maximálisan 4 alkalommal végezhető el az egyes QCM szenzorokon az érzékenység jelentős csökkenése nélkül.
2. A modellkísérletekre és további optimalizálási lépésekre alapozva kidolgoztam a *L. acidophilus* és a *B. bifidum* baktériumok QCM-alapú direkt meghatározásának módszerét. A szenzorokkal pufferben szuszpendált sejteket mérve 10⁴-10⁷ CFU/ml volt a dinamikus méréstartomány mindkét baktériumra. Megállapítottam, hogy a kifejlesztett szenzorokkal 100× hígítású tejmintákat folyamatosan áramló rendszerben vizsgálva mindkét baktériumra szélesebb a dinamikus méréstartomány (10³-5×10⁵ CFU/ml), mint megállított mintaáram mellett (10³-10⁵ CFU/ml). A szenzorok alkalmazhatóságát 100× hígított fermentált tejminták mérésével igazoltam.
3. OWLS-alapú direkt immunszenzorokat fejlesztettem ki *L. acidophilus* és a *B. bifidum* baktériumok kimutatására. Az *L. acidophilus* dinamikus méréstartománya pufferben 10³-10⁷ CFU/ml, *B. bifidum* esetében 10³-10⁶ CFU/ml. A kifejlesztett szenzorokkal 100× hígítású tejmintákat áramló injektálásos módszerrel vizsgálva mindkét baktérium dinamikus méréstartománya 10³-5×10⁵ CFU/ml. A szenzorok alkalmazhatóságát 100× hígított fermentált tejminták mérésével igazoltam. Az OWLS immunszenzorok érzékenységét, szelektivitását tekintve mindkét baktériumot vizsgálva megállapítottam, hogy az antitestek a hővel előlt baktérium sejtekhez nagyobb affinitással kötődnek, mint

az élő sejtekhez, mindazonáltal a szenzor szelektíven szignifikánsan nagyobb jelet ad a specifikus baktériumok holt sejtjeire, mint az élő sejtekre. A nagyobb detektált jelkülönbség az élő és a holt sejtek között a specifikus baktériumok nagyobb számát jelzi.

4. Az aflatoxin M_1 mennyiségi meghatározására indirekt, OWLS-alapú immunszenzort fejlesztettem. Megállapítottam, hogy a vizsgált mintaelőkészítési módszerek közül hatékonyan alkalmazható az egyszerű szűrés vagy centrifugálás. A $100\times$ hígítású szűrt tejmintákban az AFM_1 dinamikus méréstartománya $0,001-0,1$ ng/ml, a kimutatási határ $0,0005$ ng/ml. Centrifugálást alkalmazva a dinamikus méréstartomány $0,0005-0,01$ ng/ml, a kimutatási határ $0,0001$ ng/ml. A kidolgozott immunszenzor eredményesen alkalmazható $100\times$ hígított tejminták aflatoxin M_1 szennyezettségének gyors kimutatására.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám során antitest-alapú jelölésmentes QCM és OWLS-alapú immunszenzorokat fejlesztettem probiotikus baktériumok (*L. acidophilus* és *B. bifidum*) és OWLS szenzort aflatoxin M₁ kimutatására.

A QCM mérőrendszer direkt, antitest alapú kimutatásban való alkalmazhatóságát modellmérésekkel igazoltam. A BSA-antiBSA molekulapárral megvalósított kísérletek során megállapítottam, hogy a szulfo-LC-SPDP keresztkötő reagenssel kialakított önszerveződő monomolekuláris réteg (SAM) hatékonyabb az antitest rögzítésben, mint az MHDA-val történő antitest immobilizálás. QCM immunszenzor esetében az optimális áramlási sebesség 0,1 ml/min, a mintamennyiség 500 µl. Tanulmányoztam a kvarckristály szenzorok többszöri használatának lehetőségét és megállapítottam, hogy az általam alkalmazott szenzor előkészítési eljárással maximálisan 4 alkalommal készíthető elő ugyanaz a szenzor jelentős érzékenységsökkenés nélkül. A probiotikus baktériumok kimutatásához nyúl immunizálással állítottuk elő a specifikus poliklonális antitesteket, és kompetitív ELISA teszttel vizsgáltuk azok szelektivitását, kereszterakcióit. A QCM és OWLS szenzorok fejlesztése során meghatároztam a kvarckristály és a hullámvezető chip felszínén rögzítésre kerülő antitest koncentrációját (50 µg/ml, ill. 10 µg/ml), és további mérési paramétereket (áramlási sebesség, mérési hőmérséklet). A bioszenzorokkal elvégzett szelektivitási vizsgálatok megerősítették az ELISA teszt eredményeit, miszerint a poliklonális antitestek mutatnak kereszterakciót a nem specifikus baktériumokkal, QCM esetében 10⁵ CFU/ml, OWLS szenzorral 10⁴ CFU/ml sejt koncentrációtól. További, OWLS szenzorral kivitelezett kísérleteim azt mutatják, hogy a hővel elölt specifikus sejteket szignifikánsan érzékenyebben mutatja ki a szenzor, mint a kezeletlen sejteket. A baktériumok dinamikus méréstartománya pufferes szuszpenzióban QCM szenzorral 10⁴-10⁷ CFU/ml, OWLS szenzorral *L. acidophilus* esetében 10³-10⁷ CFU/ml, *B. bifidum* baktériumra 10³-10⁶ CFU/ml. Az optimalizált paraméterek alkalmazásával tejmintákra kalibrált szenzorokkal fermentált tejmintákban határoztam meg a *L. acidophilus* és a *B. bifidum* sejtszámot és az eredményeket telepszámlálással kapott sejtszámokkal hasonlítottam össze. A mérési módszer QCM szenzor érzékenységére kifejtett hatását tanulmányozva megállapítottam, hogy áramló injektációs módszerrel mindkét baktériumot vizsgálva szélesebb a dinamikus méréstartomány (10³-5×10⁵ CFU/ml) 100× hígítású tejmintákban, mint a 10 perces inkubációval kivitelezett megállított mintaáram alkalmazásával (10³-10⁵ CFU/ml). OWLS szenzorral a QCM eredményekkel megegyezően 10³-5×10⁵ CFU/ml a baktériumok dinamikus méréstartománya tejmintákban. Az ismeretlen sejtszámú minták vizsgálatakor bioszenzorokkal kapott sejtszám értékek jó egyezést (R² 0,87-0,98) mutattak a

telepszámlálással kapott sejtszámokkal. A szakirodalomban számos példát találunk élelmiszerek mikrobiológia vizsgálatának megkönnyítésére fejlesztett bioszenzorokra, mivel azonban kizárólag szennyező, ill. patogén baktériumokról van szó, túl magas a kimutatási határ (többnyire 10^3 felett, de akár 10^7 CFU/g is lehet). Ilyen magas patogénszám nem megengedhető, ha pedig dúsításra van szükség a vizsgálathoz, elvész a módszer gyorsasága. Probiotikus baktériumok esetében azonban éppen a magas csíraszám az elvárt egy termékben, tehát a mintát meghígítva közvetlen méréssel gyorsan kapunk közelítő eredményt a baktérium sejtszáma.

Aflatoxin M_1 mennyiségi analízisére alkalmas OWLS-alapú szenzorfejlesztés során indirekt kimutatási módszert alkalmaztam, amellyel kisebb molekulatömegű vegyületek alacsony koncentrációjának meghatározása is kivitelezhető. A szenzorfelületen fehérjével (HRP) konjugált aflatoxin M_1 molekulát (antigén) rögzítettem glutáraldehid (2,5%) reagenssel, és az immobilizált antigénnel mértem vissza a mintához az antigén mennyiségéhez képest kis feleslegben hozzáadott, szabadon maradt antitesteket. Megállapítottam, hogy $3,0 \mu\text{g/ml}$ AFM_1 -HRP konjugátum rögzítésével és $21,25 \mu\text{g/ml}$ AFM_1 antitest alkalmazásával a legérzékenyebb a szenzor 24°C -os mérési hőmérsékleten ($0,001$ - 100 ng/ml dinamikus méréstartomány). A működési paraméterek meghatározást követően mesterségesen szennyezett, szűréssel, centrifugálással vagy méretkizárásos centrifugálással előkészített $100\times$ és $200\times$ hígítású tejmintákat vizsgáltam. A legjobb eredményeket a $100\times$ hígítású, szűrt vagy centrifugált minták alkalmazásával kaptam, ekkor a dinamikus méréstartomány $0,001$ - $0,1 \text{ ng/ml}$ (LOD: $0,0005 \text{ ng/ml}$), a gátlási középérték (IC_{50}) $0,016 \pm 0,002 \text{ ng/ml}$, ill. $0,0005$ - $0,01 \text{ ng/ml}$ (LOD: $0,0001 \text{ ng/ml}$), az IC_{50} $0,0021 \pm 0,0004 \text{ ng/ml}$. A mérési eredményeket kompetitív ELISA teszttel kapott eredményekkel összehasonlítva megállapítottam, hogy a fejlesztett jelölésmentes OWLS-alapú indirekt mérési eljárás alkalmas aflatoxin M_1 tejmintákból történő mennyiségi meghatározására.

9. SUMMARY

The aim of this work was to develop antibody-based QCM and OWLS immunosensors for the determination of probiotic bacteria (*L. acidophilus* and *B. bifidum*) and OWLS immunosensor for aflatoxin M₁.

The applicability of the QCM measuring system for direct, antibody based determination was confirmed with model measurements. During the BSA-antiBSA model examinations, it was found that the self assembled monolayer constructed with sulfo-LC-SPDP cross linking agent was more effective in the process of antibody immobilization than the MHDA reagent. In the case of QCM immunosensor, the optimal flow rate was 0.1 ml/min, and the injected sample volume was 500 μ l. The effect of the re-using of the same quartz crystal was examined. It was concluded, that the same sensor crystal could only be used four times with the applied surface cleaning method. No significant signal decrease was observed, when using the same crystal for four consecutive measurement sessions. Specific polyclonal antibodies were raised against the target probiotic bacteria by rabbit immunization. Competitive ELISA test was carried out to determine the cross-reactivity and selectivity of the antibodies. During the development of the QCM and OWLS immunosensors, the optimal immobilized antibody concentration used on the quartz wafer and on the waveguide sensor was 50 μ g/ml and 10 μ g/ml, respectively. Further measuring parameters, flow rate and measuring temperature were also determined. The results of the ELISA confirmed the results of the selectivity investigation performed by the QCM and OWLS biosensors. The polyclonal antibodies showed cross-reactivity with the non specific bacteria from 1.0E+5 CFU/ml using QCM and from 1.0E+4 CFU/ml applying OWLS sensor. Further OWLS investigations regarding selectivity showed, that the sensor was significantly more sensitive for specific heat treated cells than for untreated (native) cells. The dynamic measuring ranges for both bacteria suspended in buffer was 1.0E+4-1.0E+7 CFU/ml using QCM, while 1.0E+3-1.0E+7 CFU/ml for *L. acidophilus* and 1.0E+3-1.0E+6 CFU/ml for *B. bifidum* in the case of OWLS. After the calibration of the sensors with the milk samples containing probiotic bacteria, the quantitative determination of *B. bifidum* and *L. acidophilus* in fermented milk samples were carried out. The cell numbers of fermented samples determined by the immunosensors and plate counting method were compared.

Experiments were carried out to explore the effect of the measuring method on the QCM's sensitivity. It can be stated that wider measuring range could be obtained using flow method for both bacteria (1.0E+3-5.0E+5 CFU/ml) in 100 \times diluted milk samples, than with stopped flow

method including 10 min incubation ($1.0E+3$ - $1.0E+5$ CFU/ml). As for the OWLS sensor, the dynamic measuring range of bacteria was $1.0E+3$ - $5.0E+5$ CFU/ml in milk samples, as in the case of QCM. The cell numbers of fermented milk samples determined by QCM and OWLS immunosensors were in good correlation (R^2 0.87-0.98) with the results of the plate counting method. There are many examples in the literature of biosensors developed to facilitate food microbiological examinations. As these developments target mainly pathogenic bacteria, the detection limits are too high (above $1.0E+3$ CFU/ml, or even $1.0E+7$ CFU/ml). These cell number values are unacceptable. In case a sample enrichment step is needed, the method will no longer be rapid. As for probiotic bacteria, high cell numbers are required in the product. This means, that after the application of a simple dilution step, an appropriate bacteria concentration can quickly be determined.

During the development of the OWLS-based determination method for AFM₁, indirect immunoassay format was applied. This method enabled the sensitive quantification of low molecular weight molecules, as AFM₁ (328.27 g/mol). The protein (HRP) - aflatoxin M₁ conjugate was immobilized on the sensor chip surface by glutaraldehyde (2.5%). The standards or samples were then mixed with the antibody solution of appropriate concentration in 1:1 ratio and incubated for 3 min, then finally injected. Applying this measuring method, only the antibodies remaining in free form in the sample mixture could bind to the antigens immobilized on the sensor chip. We determined, that the sensor showed the best sensitivity (0.001-100 ng/ml dynamic measuring range) using 3.0 µg/ml AFM₁-HRP conjugate and 21.25 µg/ml AFM₁ antibody at 24°C. These investigations were followed by the analysis of spiked milk samples. Three different methods were utilized for the preparation of spiked milk samples: filtration, centrifugation, size exclusion centrifugation. These samples were examined in 100 or 200 fold dilution. Comparing these procedures and the dilution rates, it could be stated, that the best results were obtained when 100 fold diluted filtered or centrifuged samples were examined. The dynamic measuring ranges were 0.001-0.1 ng/ml (IC_{50} : 0.016 ± 0.002 ng/ml; LOD: 0.0005) and 0.0005-0.01 ng/ml (IC_{50} 0.0021 ± 0.0004 ng/ml; LOD: 0.0001 ng/ml), respectively. Based on the results of the biosensor measurements and the reference ELISA test it could be concluded, that the developed label-free OWLS-based indirect immunoassay method was applicable for the quantification of AFM₁ in milk samples.

10. IRODALOMJEGYZÉK

ABERL, F., WOLF, H., KÖBLINGER, C., DROST, S., WOIAS, P., KOCH, S. (1994) HIV serology using piezoelectric immunosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 18: 271–275. doi:10.1016/0925-4005(94)87093-4

ADAMS, M.R., MOSS, M.O. (2008a)(Eds.) *Food Microbiology*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 158–176.

ADAMS, M.R., MOSS, M.O. (2008b)(Eds.) *Food Microbiology*, Royal Society of Chemistry, Cambridge pp. 182–268.

ADÁNYI, N. (2013) Immun- és bakteriális szenzorok fejlesztése optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópiai detektálással, és alkalmazásuk az élelmiszerbiztonság valamint a környezetvédelem területén. MTA doktori értekezés

ADÁNYI, N., LEVKOVETS, I.A., RODRIGUEZ-GIL, S., RONALD, A., VÁRADI, M., SZENDRŐ, I. (2007) Development of immunosensor based on OWLS technique for determining Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 797-802. doi:10.1016/j.bios.2006.02.015

ADÁNYI, N., NÉMETH, E., HALÁSZ, A., SZENDRŐ, I., VÁRADI, M. (2006a) Application of electrochemical optical waveguide lightmode spectroscopy for studying the effect of different stress factors on lactic acid bacteria. *Analytica Chimica Acta: 573–574*: 41–47. doi:10.1016/j.aca.2006.05.001

ADÁNYI, N., VÁRADI, M., KIM, N., SZENDRŐ, I. (2006b) Development of new immunosensors for determination of contaminants in food. *Current Applied Physics*, 6: 279–286. doi:10.1016/j.cap.2005.07.057

AHLUWALIA, A., DE ROSSI, D., RISTORI, C., SCHIRONE, A., SERRA, G. (1992) A comparative study of protein immobilization techniques for optical immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 7: 207-214. doi:10.1016/0956-5663(92)87017-J

AHOUR, F., POURNAGHI-AZAR, M.H., ALIPOUR, E., HEJAZI, M.S. (2013) Detection and discrimination of recombinant plasmid encoding hepatitis C virus core/E1 gene based on PNA and double-stranded DNA hybridization. *Biosensors and Bioelectronics*, 45: 287-291. doi:10.1016/j.bios.2013.01.063

- ALARCÓN, S.H., PALLESCHI, G., COMPAGNONE, D., PASCALE, M., VISCONTI, A., BARNA-VETRÓ, I. (2006) Monoclonal antibody based electrochemical immunosensor for the determination of ochratoxin A in wheat. *Talanta*, 69: 1031-1037. doi:10.1016/j.talanta.2005.12.024
- AMIN, R., KULKARNI, A., KIM, T., PARK, S.H. (2012) DNA thin film coated optical fiber biosensor. *Current Applied Physics*, 12: 841-845. doi:10.1016/j.cap.2011.11.015
- ARAYA-KLEINSTEUBER, B., LOWE, C.R. (2007) Introduction to acoustic technologies, in: Marks, R.S., Cullen, D.C., Karube, I., Lowe, C.R., Weetall, H.H. (ed.), *Handbook of biosensors and biochips*. John Wiley and Sons, England
- ARORA, P., SINDHU, A., DILBAGHI, N., CHAUDHURY, A. (2011) Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, 28: 1-12 doi:10.1016/j.bios.2011.06.002
- AZZAM, R.M.A., BASHARA, N.M. (1977) *Ellipsometry and polarized light*. North-Holland, Amsterdam, The Netherlands.
- BADEA, M., MICHELI, L., MESSIA, C.M., CANDIGLIOTA, T., MARCONI, E., MOTTRAM, T., VELASCO-GARCIA, M., MOSCONE, D., PALLESCHI, G. (2004) Aflatoxin M1 determination in raw milk using a flow-injection immunoassay system. *Analytica Chimica Acta*, 520: 141–148. doi:10.1016/j.aca.2004.05.068
- BALLANTINE, D.S., WHITE, R.M., MARTIN, S.J., RICCO, A.J., FRYE, G.C. (1997) *Acoustic wave sensors: theory, physico-chemical applications*. Academic press, New York.
- BANADA, P.P., HUFF, K., BAE, E., RAJWA, B., AROONNUAL, A., BAYRAKTAR, B., ADIL, A., ROBINSON, J.P., HIRLEMAN, E.D., BHUNIA, A.K. (2009) Label-free detection of multiple bacterial pathogens using light-scattering sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 1685-1692. doi:10.1016/j.bios.2008.08.053
- BARTHELMEBS, L., HAYAT, A., LIMADI, W., MARTY, J., NOGUER, T. (2011) Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection, using superparamagnetic nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 156: 932-937. doi:10.1016/j.snb.2011.03.008
- BBOSA, G. S., KITYA, D., LUBEGA, A., OGWAL-OKENG, J., ANOKBONGGO, W. W., KYEGOMBE, D. B. (2013) Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems. in: *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*, ed.: M. Razzaghi-Abyaneh. 143-170. doi: 10.5772/51031
- BHATTA, D., CHRISTIE, G., MADRIGAL-

- GONZALEZ, B., BLYTH, J., LOWE, C.R. (2007) Holographic sensors for the detection of bacterial spores. *Biosensors and Bioelectronics*, 23: 520–527. doi:10.1016/j.bios.2007.06.006
- BIBEL, D. J. (1988) Elie Metchnikoff's bacillus of long life. *ASM News*, 54: 661-665.
- BIER, F.F., SCHMID, R.D. (1994) Real time analysis of competitive binding using grating coupler immunosensors for pesticide detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 9: 125-130. doi:10.1016/0956-5663(94)80103-7
- BORI, ZS., CSIFFÁRY, G., VIRÁG, D., TÓTH-MARKUS, M., KISS, A., ADÁNYI, N. (2012) Determination of L-lactic acid content in foods by enzyme based amperometric bioreactor. *Electroanalysis*, 24: 158-164. doi: 10.1002/elan.201100409
- BRIGIDI, P., SWENNEN, E., VITALI, B., ROSSI, M., MATTEUZZI, D. (2003) PCR detection of *Bifidobacterium* strains and *Streptococcus thermophilus* in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption. *International Journal of Food Microbiology*, 81: 203-209. doi:10.1016/S0168-1605(02)00245-3
- BRUCKENSTEIN, S., SHAY, M. (1985) Experimental aspects of use of the quartz crystal microbalance in solution. *Electrochimica Acta*, 30: 1295-1300. doi:10.1016/0013-4686(85)85005-2
- BYRNE, B., STACK, E., GILMARTIN, N., O'KENNEDY, R. (2009) Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. *Sensors*, 9: 4407-4445. doi:10.3390/s90604407
- CAMPBELL, G.A., MUTHARASAN, R. (2006) Detection of Bacillus anthracis spores and a model protein using PEMC sensors in a flow cell at 1 mL/min. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 1684-1692. doi:10.1016/j.bios.2005.12.002
- CAVIC, B.A., HAYWARD, G.L., THOMPSON, M. (1999) Acoustic waves and the study of biochemical macromolecules and cells at the sensor-liquid interface. *The Analyst*, 124: 1405-1420. doi: 10.1039/A903236C
- CHEN, L.H., CHAN, C.C., MENON, R., BALAMURALI, P., WONG, W.C., ANG, X.M., HU, P.B., SHAILLENDER, M., NEU, B., ZU, P., TOU, Z.Q., POH, C.L., LEONG, K.C. (2013) Fabry-Perot fiber-optic immunosensor based on suspended layer-by-layer (chitosan/polystyrene sulfonate) membrane. *Sensors and Actuators B*, 188: 185-192. doi:10.1016/j.snb.2013.06.093

- CIMINELLI, C., CAMPANELLA, C.M., DELL'OLIO, F., CAMPANELLA, C.E., ARMENISE, M.N. (2013) Label-free optical resonant sensors for biochemical applications. *Progress in Quantum Electronics*, 37: 51-107. doi:10.1016/j.pquantelec.2013.02.001
- CLERC, D., LUKOSZ, W. (1997) Direct immunosensing with an integrated-optical output grating coupler. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 40: 53-58. doi:10.1016/S0925-4005(97)80199-2
- Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off J Eur Union L364/5
- CONROY, P.J., HEARTY, S., LEONARD, P., O'KENNEDY, R.J. (2009) Antibody production, design and use for biosensor-based applications. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20: 10-26. doi:10.1016/j.semcd.2009.01.010
- CROWTHER, J.R. (Ed.) (1995) ELISA Theory and Practice, 0-89603-279-5, Humana Press Inc., USA.
- CULLEN, J.M., RUEBNER, B.H., HSIEH, L.S., HYDE, D.M., & HSIEH, D.P. (1987). Carcinogenicity of Dietary Aflatoxin M1 in Male Fischer Rats Compared to Aflatoxin B1. *Cancer Research*, 47: 1913-1917.
- CUNNINGHAM, BT. (2009) Label-free optical biosensors: an introduction In: Cooper MA (ed). Label-free biosensors: techniques and applications, New York: Cambridge University Press, p. 4.
- CURIE, J., CURIE, P. (1880) Développement, par pression, de l'électricité polaire dans les cristaux hémédres faces inclinées. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, 91: 294-295.
- DALY, S.J., KEATING, G.J., DILLON, P.P., MANNING, B.M., O'KENNEDY, R., LEE, H.A., MORGAN, M.R.A. (2000) Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5097–5104. doi: 10.1021/jf9911693
- DAVILA, A.P., JANG, J., GUPTA, A.K., WALTER, T., ARONSON, A., BASHIR, R. (2007) Microresonator mass sensors for detection of Bacillus anthracis Sterne spores in air and water. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 3028-3035. doi:10.1016/j.bios.2007.01.012
- DAVIS, F., COLLYER, S.D., HIGSON, S.P.J. (2007) OVERVIEW OF MODERN ANALYTICAL NEEDS, IN: MARKS, R.S., CULLEN, D.C., KARUBE, I., LOWE, C.R., WEETALL, H.H. (ed.), Handbook of biosensors and biochips. John Wiley and Sons, England
- DEISINGH, A.K., THOMPSON, M. (2004) Strategies for the detection of Escherichia coli O157:H7 in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 419-429.

- DELMULLE, B.S., DE SAEGER, S.M.D.G., SIBANDA, L., BARNA-VETRÓ, I., VAN PETEGHEM, C.H. (2005) Development of an immunoassay-based lateral flow dipstick for the rapid detection of aflatoxin B1 in pig feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3364-3368. doi: 10.1021/jf0404804
- DIAZ-GONZALEZ, M., GONZALEZ-GARCIA, M.B., COSTA-GARCIA, A. (2005) Immunosensor for Mycobacterium tuberculosis on screen-printed carbon electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 20: 2035-2043. doi:10.1016/j.bios.2004.09.035
- DOBOLYI, CS., SEBŐK, F., VARGA, J., KOCSUBÉ, S., SZIGETI, GY., BARANYI, N., SZÉCSI, É., LUSTYIK, GY., MICSINAI, A., TÓTH, B., VARGA, M., KRISZT, B., KUKOLYA, J. (2011) Aflatoxin-termelő Aspergillus flavus törzsek előfordulása hazai kukorica szemtermésben. *Növényvédelem*, 47: 125-133.
- DONOVAN, P.E. (1979) An investigation of the ferroelectric properties of Roschelle salt. *Physics Education*, 14: 100.
- DORS, G.C., CALDAS, S.S., FEDDERN, V., BEMVENUTI, R.H., HACKBART, H.C.S., SOUZA, M.M., OLIVEIRA, M.S., GARDA-BUFFON, J., PRIMEL, E.G., & BADIÁLE-FURLONG, E. (2011) Aflatoxins: Contamination, Analysis and Control. In: Guevara-González RG. (Ed), Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology, InTech, 415-438.
- DURANT, J.A., YOUNG, C.R., NISBET, D.J., STANKER, L.H., RICKE, S.C. (1997) Detection and quantification of poultry probiotic bacteria in mixed culture using monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. *International Journal of Food Microbiology*, 38: 181-189. doi:10.1016/S0168-1605(97)00102-5
- EISSA, S., TLILI, C., L'HOCINE, L., ZOUROB, M. (2012) Electrochemical immunosensor for the milk allergen β -lactoglobulin based on electrografting of organic film on graphene modified screen-printed carbon electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 38: 308-313. doi:10.1016/j.bios.2012.06.008
- ELLINGTON, A.D., SZOSTAK, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346: 818-822.
- ENSAFI, A.A., AMINI, M., REZAEI, B. (2013) Biosensor based on ds-DNA decorated chitosan modified multiwall carbon nanotubes for voltammetric biodetection of herbicide amitrole. *Colloids and Surfaces B*, 109: 45-51. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.03.031

European Food Safety Authority (EFSA) (2007) Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal*, 446: 1-127.

FARABULLINI, F., LUCARELLI, F., PALCHETTI, I., MARRAZZA, G., MASCINI, M., (2007) Disposable electrochemical genosensor for the simultaneous analysis of different bacterial food contaminants. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 1544–1549 doi:10.1016/j.bios.2006.06.001

FARKAS, J., BECZNER, J. (2009) A klímaváltozás és a globális felmelegedés várható hatása a mikológiai élelmiszer-biztonságra. „*Klíma-21*” füzetek: *klímaváltozás-hatások-válaszok*, 56: 3-17.

FARKAS, J., SZEITZNÉ SZABÓ, M., VARGA, J., BECZNER, J., KOVÁCS, M., VARGA, L. (2013) A Kárpát-medence éghajlatváltozásának kihatása élelmiszer-biztonságunkra. *Magyar Tudomány*, 2:147-158.

FAZEKAS, B., TAR, A., KOVÁCS, M. (2005) Aflatoxin and Ochratoxin. A content in Spices in Hungary. *Food Additives and Contaminants*, 22:856-863. doi: 10.1080/02652030500198027

FENG, P. (2001) *Escherichia coli*. In: R.G. Labbé, S. Garcia (Eds.), *Guide to Foodborne Pathogens*, John Wiley & Sons, New York pp. 143–162. M.O. Moss, M.R. Adams

FILAZI A., SIRELI U. T. (2013) Occurrence of Aflatoxins in Food, in: *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*, ed.: M. Razzaghi-Abyaneh. 143-170. doi: 10.5772/51031

FILTEAU, M., MATAMOROS, S., SAVARD, P., ROY, D. (2013) Molecular monitoring of fecal microbiota in healthy adults following probiotic yogurt intake. *PharmaNutrition*, 1:123-129. doi:10.1016/j.phanu.2013.05.002

FINDEISEN, A., WACKERLIG, J., SAMARDZIC, R., PITKÄNEN, J., ANTTALAINEN, O., DICKERT, F.L., LIEBERZEIT P.A. (2012) Artificial receptor layers for detecting chemical and biological agent mimics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 170: 196–200. doi:10.1016/j.snb.2011.08.025

FINK-GREMMELS, J. (1999) Mycotoxins: Their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly*, 21: 115-120.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO) (1998). Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Forty seventh report

of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), World Health Organization Technical Report Series, 876: 1-85.

FRATAMICO, P.M. (2003) Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan Salmonella, and Transia Card Salmonella assays for detection of Salmonella spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. *Molecular and Cellular Probes*, 17: 215–221. doi:10.1016/S0890-8508(03)00056-2

FULLER, R. (1999) Probiotics for farm animals, p. 15-22. In G. W. Tannock (ed.), Probiotics: a Critical review. Horizon Scientific Press, Norwich, UK.

GAGNON, M., KHEADR, E.E., DABOUR, N., RICHARD, D., FLISS, I. (2006) Effect of *Bifidobacterium thermacidophilum* probiotic feeding on enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 infection in BALB/c mice. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 26–33.

GAU, J.J., LAN, E.H., DUNN, B., HO, C.M., WOO, J.C. (2001) A MEMS based amperometric detector for E. coli bacteria using self-assembled monolayers. *Biosensors and Bioelectronics*, 16: 745–755. doi:10.1016/S0956-5663(01)00216-0

GFELLER, K.Y., NUGAEVA, N., HEGNER, M. (2005) Micromechanical oscillators as rapid biosensor for the detection of active growth of Escherichia coli. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 528-533. doi:10.1016/j.bios.2004.11.018

GOEL, A.K., DILBAGHI, N., KAMBOJ, D.V., SINGH, L. (2006) Probiotics: Microbial Therapy for Health Modulation. *Defence Science Journal*, 56: 513-529.

GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X. (1999) *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 139-157.

GOODING, J.J. (2006) Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 559: 137–151. doi:10.1016/j.aca.2005.12.020

GRÜNDLER, P. (2007) Chemical sensors – An introduction for scientists and engineers. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, USA. p. 38. doi: 10.1007/978-3-540-45743-5

GUAN, J.G., MIAO, Y.Q., ZHANG, Q.J. (2004) Impedimetric biosensors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97: 219–226. doi:10.1016/S1389-1723(04)70195-4

GUARNER, F., SCHAAFSMA, G.J. (1998) Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 237-238.

- GUNTUPALLI, R., SOROKULOVA, I., KRUMNOW, A., PUSTOVYY, O., OLSEN, E., VODYANOY, V. (2008) Real-time optical detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using lytic phage probes. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 151-154. doi:10.1016/j.bios.2008.03.003
- GYURCSÁNYI, R.E. (2005) Új irányok a biomolekuláris felismerés detektálásában. *Magyar Kémiai Folyóirat – Előadások*, 111: 133-142.
- HAINES, J., PATEL, P.D. (1995) Detection of food borne pathogens using BIA. *BIA Journal*, 2: 31.
- HAO, R., WANG, D., ZHANG, X., ZUO, G., WEI, H., YANG, R., ZHANG, Z., CHENG, Z., GUO, Y., CUI, Z., ZHOU, Y. (2009) Rapid detection of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibody functionalized QCM sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 1330-1335. doi:10.1016/j.bios.2008.07.071
- HARBOE N., INGILD A. (1973) Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1: 161–164.
- HERRANZ, S., MARAZUELA, M.D., MORENO-BONDI, M.C. (2012) Automated portable array biosensor for multisample microcystin analysis in freshwater samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 33: 50-55. doi: 10.1016/j.bios.2011.12.016.
- HO, J.-A.A., WAUCHOPE, R.D. (2002) A strip liposome immunoassay for Aflatoxin B1. *Analytical Chemistry*, 74: 1493-1496. doi: 10.1021/ac010903q
- HODNIK, V., ANDERLUH, G. (2009) Toxin detection by surface plasmon resonance. *Sensors*, 9: 1339-1354. doi:10.3390/s9031339
- HOOGENBOOM, H.R. (2005) Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature Biotechnology*, 23: 1105–1116. 10.1038/nbt1126
- HUANG, S., YANG, H., LAKSHMANAN, R.S., JOHNSON, M.L., WAN, J., CHEN, I.H., WIKLE 3RD, H.C., PETRENKO, V.A., BARBAREE, J.M., CHIN, B.A. (2009) Sequential detection of *Salmonella typhimurium* and *Bacillus anthracis* spores using magnetoelastic biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 1730-1736. doi:10.1016/j.bios.2008.09.006
- IMMONEN, N., KARP, M. (2007) Bioluminescence-based bioassays for rapid detection of nisin in food. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 1982–1987. doi:10.1016/j.bios.2006.08.029
- JANSHOFF, A., GALLA, H.J., STEINEM, C. (2000) Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors – an alternative to optical biosensors? *Angewandte Chemie*, 39: 4004-4032.

- JIN, X., JIN, X., CHEN, L., JIANG, J., SHEN, G., YU, R. (2009) Piezoelectric immunosensor with gold nanoparticles enhanced competitive immunoreaction technique for quantification of aflatoxin B1. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 2580-2585. doi:10.1016/j.bios.2009.01.014
- JOFRÉ, A., MARTIN, B., GARRIGA, M., HUGAS, M., PLA, M., RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., AYMERICH, T. (2005) Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiology*, 22: 109-115. doi:10.1016/j.fm.2004.04.009
- JOHNSSON, B., LÖFÅS, S., LINDQUIST, G. (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Analytical Biochemistry*, 198: 268-277. doi:10.1016/0003-2697(91)90424-R
- KANAZAWA, K.K., GORDON, J.G. (1985) The oscillation of a quartz resonator in contact with liquid. *Analytica Chimica Acta*, 175: 99–105. doi:10.1016/S0003-2670(00)82721-X
- KARYAKIN, A.A., PRESNOVA, G.V., RUBTSOVA, M.Y., EGOROV, A.M. (2000) Oriented immobilization of antibodies onto the gold surfaces via their native thiol group. *Analytical Chemistry*, 72: 3805–3811. doi: 10.1021/ac9907890
- KENDALL, L.V. (2007) Production of polyclonal antibodies, in: Howard, G.C., Kaser, M.R. (Eds.), *Making and using antibodies: a laboratory manual*, CRC Press, Florida, pp. 41–72.
- KLAENHAMMER, T.R. Probiotics and Prebiotics. (2007) In Doyle, Beuchat, and Montville (Eds.). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3rd edition. ASM Press, Washington, DC, pp 891-907.
- KO, S., GRANT, S.A. (2003) Development of a novel FRET method for detection of *Listeria* or *Salmonella*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 96: 372–378. doi:10.1016/S0925-4005(03)00572-0
- KO, S., GRANT, S.A. (2006) A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium*. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 1283-1290. doi:10.1016/j.bios.2005.05.017
- KOENIG, B., GRATZEL, M. (1993) Detection of viruses and bacteria with piezoelectric immunosensors. *Analytical Letters*, 26: 1567–1585.
- KOUBOVÁ, V., BRYNDA, E., KARASOVÁ, L., ŠKVOR, J., HOMOLA, J., DOSTÁLEK, J., TOBIŠKA, P., ROŠICKÝ, J. (2001) Detection of foodborne pathogens using surface plasmon

resonance biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 74: 100-105. doi:10.1016/S0925-4005(00)00717-6

KOVÁCS, F. (szerk) (1998) Mikotoxikózisok a táplálékláncban. (Stratégiai kutatások a Magyar Tudományos Akadémián) MTA Agrártudományok Osztálya, Budapest.

KÖHLER, G., MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497.

KÖBLINGER, C., UTTENTHALER, E., DROST, S., ABERL, F., WOLF, H., BRINK, G., STANGLMAIER, A., SACKMANN, E. (1995) Comparison of the QCM and the SPR method for surface studies and immunological applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 24: 107–112.

KRÖGER, S., PILETSKY, S., TURNER, A.P.F. (2002) Biosensors for marine pollution research, monitoring and control. *Marine Pollution Bulletin*, 45: 24–34.

KUHN, K.G., FALKENHORST, G., CEPER, T., DALBY, T., ETHELBERG, S., MØLBAK, K., KROGFELT, K.A. (2012) Detection of antibodies to *Campylobacter* in humans using enzyme-linked immunosorbent assays: a review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74: 113-118. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.004

KUIPER-GOODMAN, T. in: Miraglia, M., Edmond, van H., Brera, C., Gilbert, J. (Ed.) (1998) Mycotoxins and Phycotoxins – Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety, Alaken Inc., Fort Collins, USA, pp. 25–48.

LARICCHIA-ROBBIO, L., REVOLTELLA, R.P. (2004) Comparison between the surface plasmon resonance (SPR) and the quartz crystal microbalance (QCM) method in a structural analysis of human endothelin-1, *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 1753–1758.

LASCHI, S., PALCHETTI, I., MARRAZZA, G., MASCINI, M. (2006) Development of disposable low density screen-printed electrode arrays for simultaneous electrochemical measurements of the hybridisation reaction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 593: 211–218. doi:10.1016/j.jelechem.2006.04.015

LAZCKA, O., DEL CAMPO, F.J., MUÑOZ, F.X. (2007) Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 1205–1217. doi:10.1016/j.bios.2006.06.036

LEE, D., LEE, S. (1996) Electric-field measurement near a ring antenna by a new field sensor using piezoelectric resonance. *Review of Scientific Instruments*, 67: 3320-3324. doi: 10.1063/1.1147414

LEE, J., NOH, T.G., JANAKIRAMAN, U., TAK, Y. (2001) Epitaxial growth to thin films formation of Cu₂O by electrodeposition (Eds.). In: Kondo, K., Barkey, D.P., Bradley, J.C., Argoul, F., Andricacos, P.C., Stickney, J.L.: Morphological evolution of electrodeposits – and – electrochemical processing in ULSI fabrication and electrodeposition of and on semiconductors IV. The Electrochemical Society, Inc., New Jersey, USA.

LEONI, E., LEGNANI, P.P. (2001) Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of Legionella species from hot water systems. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 27-33. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01178.x

LI, Y., LIU, X., LIN, Z. (2012) Recent developments and applications of surface plasmon resonance biosensors for the detection of mycotoxins in foodstuffs. *Food Chemistry*, 132: 1549-1554. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.109

LILLY, D. M., STILLWELL, R. H. (1965) Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147: 747-748.

LIN, Y.H., CHEN, S.H., CHUANG, Y.C., LU, Y.C., SHEN, T.Y., CHANG, C.A., LIN, C.S. (2008) Disposable amperometric immunosensing strips fabricated by Au nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for the detection of foodborne pathogen Escherichia coli O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 23: 1832-1837. doi:10.1016/j.bios.2008.02.030

LIU, Y, QIN, Z., WU, X., JIANG, H. (2006) Immune-biosensor for aflatoxin B1 based bio-electrocatalytic reaction on micro-comb electrode. *Biochemical Engineering Journal*, 32: 211–217. doi:10.1016/j.bej.2006.10.003

LU, C.-S., CZANDERNA, A.W. (1984) Applications of Piezoelectric Quartz Crystal Microbalances. *Elsevier*, Amsterdam.

LUKOSZ, W. (1991) Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity and immunosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 6: 215-225. doi:10.1016/0956-5663(91)80006-J

LUKOSZ, W. (1995) Integrated optical chemical and direct biochemical sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 29: 37-50. doi:10.1016/0925-4005(95)01661-9

MAJER-BARANYI, K., SZÉKÁCS, A., SZENDRŐ, I., KISS, A., ADÁNYI, N. (2011) Optical waveguide lightmode spectroscopy technique-based immunosensor development for deoxynivalenol determination in wheat samples. *European Food Research and Technology*, 233: 1041-1047. doi: 10.1007/s00217-011-1598-2

- MANNON, J., JOHNSON, E. (1985) Fungi down on the farm. *New Scientist*, 105: 12-16.
- MAO, X., YANG, L., SU, X. L., LI Y. (2006) A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 1178–1185. doi:10.1016/j.bios.2005.04.021
- MARTEAU, P., MINEKUS, M., HAVENAAR, R., HUIS IN'T VELD J. H. H. (1997) Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and effect of bile. *Journal of Dairy Science*, 80: 1031-1037.
- MARX, K.A. (2003) Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution–surface interface. *Biomacromolecules*, 4: 1099-1120. doi: 10.1021/bm020116i
- MATVEEV, S.V. (1994) Controlled modification of the quartz surface by amino groups. *Biosensors and Bioelectronics*, 9: 333-336. doi:10.1016/0956-5663(94)80032-4
- MAUPAS, H., SABY, C., MARTELET, C., JAFFREZIC-RENAULT, N., SOLDATKIN, A., P., CHARLES, M-H., DELAIRE, T., MANDRAND, B. (1996) Impedance analysis of Si/SiO₂ heterostructures grafted with antibodies an approach for immunosensor development. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 406: 53-58. doi:10.1016/0022-0728(95)04443-4
- MAZUMDAR, S.D., HARTMANN, M., KAMPFER, P., KEUSGEN, M. (2007) Rapid method for detection of Salmonella in milk by surface plasmon resonance (SPR). *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 2040-2046. doi:10.1016/j.bios.2006.09.004
- MAZZEI, F., BOTRÈ, F., FAVERO, G. (2007) Peroxidase based biosensors for the selective determination of D,L-lactic acid and L-malic acid in wine. *Microchemical Journal*, 87: 81–86.
- MELLO, L.D., KUBOTA, L.T. (2002) Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77: 237-256. doi:10.1016/S0308-8146(02)00104-8
- MICHELI, L., GRECCO, R., BADEA, M., MOSCONE, D., PALLESCHI, G. (2005) An electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 determination in milk using screen-printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 588-596. doi:10.1016/j.bios.2004.12.017
- MINUNNI, M., MASCINI, M., CARTER, R.M., JACOBS, M.B., LUBRANO, G.J., GUILBAULT, G.G. (1996) A quartz crystal microbalance displacement assay for *Listeria monocytogenes*. *Analytica Chimica Acta*, 325: 169-174. doi:10.1016/0003-2670(96)00033-5
- MO, X.T., ZHOU, Y.P., LEI, H., DENG, L. (2002) Microbalance-DNA probe method for the detection of specific bacteria in water. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 583–589.

- MOHAMMADI, H. (2011) A review of aflatoxin M1, milk, and milk products, aflatoxins. Guevara-Gonzalez, R.G. (Ed.) *Biochemistry and Molecular Biology*, Available at: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-biochemistry-and-molecular-biology/a-review-of-aflatoxin-m1-milk-and-milk-products>
- MOLINA, P.G., ZÓN, M.A., FERNÁNDEZ, H. (1997) Electrochemical behaviour of some mycotoxins of the *Alternaria alternata* genus. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 42: 465-479.
- MOLL, N., PASCAL, E., DINH, D.H., PILLOT, J.P., BENNETAU, B., REBIERE, D., MOYNET, D., MAS, Y., MOSSALAYI, D., PISTRE, J., DEJOURS, C. (2007) A Love wave immunosensor for whole *E. coli* bacteria detection using an innovative two-step immobilisation approach. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 2145-2150. doi:10.1016/j.bios.2006.09.032
- MONOSÍK, R., STREDANSKY, M., GREIF, G., STURDIK, E. (2012) A rapid method for determination of L-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite. *Food Control*, 23: 238–244. doi:10.1016/j.foodcont.2011.07.021
- MORESSI M.B., ZON A., FERNÁNDEZ H, RIVAS G., SOLIS V. (1999) Amperometric quantification of *Alternaria* mycotoxins with a mushroom tyrosinase modified carbon paste electrode. *Electrochemistry Communications*, 1: 472-476.
- MORESSI, M.B., ANDREU, R., CALVENTE, J.J., FERNÁNDEZ, H., ZÓN, M.A. (2004) Improvement of alternariol monomethyl ether detection at gold electrodes modified with a dodecanethiol self-assembled monolayer. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 570: 209-217 doi: 10.1016/j.jelechem.2004.03.031
- MUHAMMAD-TAHIR, Z., ALOCILJA, E.C. (2004) A disposable biosensor for pathogen detection in fresh produce. *Biosyst. Eng.* 88: 145-151. doi:10.1016/j.biosystemseng.2004.03.005
- MUJIKA, M., ARANA, S., CASTANO, E., TIJERO, M., VILARES, R., RUANO-LOPEZ, J.M., CRUZ, A., SAINZ, L., BERGANZA, J. (2009) Magneto-resistive immunosensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 including a microfluidic network. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 1253–1258. doi:10.1016/j.bios.2008.07.024
- MULLETT, W., LAI, E.P.C., YEUNG, J.M. (1998) Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor. *Analytical Biochemistry*, 258: 161-167. doi: 10.1006/abio.1998.2616

- NANDURI, V., BHUNIA, A.K., TU, S.I., PAOLI, G.C., BREWSTER, J.D. (2007) SPR biosensor for the detection of *L. monocytogenes* using phage-displayed antibody. *Biosensors and Bioelectronics*, 23: 248-252. doi:10.1016/j.bios.2007.04.007
- NAYAK, M., KOTIAN, A., MARATHE, S., CHAKRAVORTTY, D. (2009) Detection of microorganisms using biosensors—A smarter way towards detection techniques. *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 661-667 doi:10.1016/j.bios.2009.08.037
- NELSON, B.P., GRIMSRUD, T.E., LILES, M.R., GOODMAN, R.M., CORN, R.M. (2001) Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays. *Analytical Chemistry*, 73:1-7. doi: 10.1021/ac0010431
- NIELSEN, P.E., EGHOLM, M., BERG, R.H., BUCHARDT, O. (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, 254: 1497-1500. doi: 10.1126/science.1962210
- NIKOLAUS, N., STREHLITZ, B. (2008) Amperometric lactate biosensors and their application in (sports) medicine, for life quality and wellbeing. *Microchimica Acta*, 160: 15–55.
- NOMURA, T., OKUHARA, M. (1982) Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids. *Analytica Chimica Acta*, 142: 281–284. doi:10.1016/S0003-2670(01)95290-0
- O’SULLIVAN, D.J. (1999) Methods for the analysis of the intestinal microflora, In G. W. Tannock (ed.), *Probiotics: a critical review*. Horizon Scientific Press, Norwich, UK. p. 23-44.
- OH, B.K., LEE, W., KIM, Y.K., LEE, W. H., CHOI J.W. (2004) Surface plasmon resonance immunosensor using self-assembled protein G for the detection of *Salmonella paratyphi*. *Journal of Biotechnology*, 111: 1–8.
- OUERGI, O., TOUHAMI, A., JAFFREZIC-RENAULT, N., MARTELET, C., BEN OUADA, H., COSNIER, S. (2002) Impedimetric immunosensor using avidin–biotin for antibody immobilization. *Bioelectrochemistry*, 56: 131–133. doi: 10.1016/S1567-5394(02)00029-4
- OZALP, V.C., BAYRAMOGLU, G., ERDEM, Z., ARICA, M.Y. (2015) Pathogen detection in complex samples by quartz crystal microbalance sensor coupled to aptamer functionalized core–shell type magnetic separation. *Analytica Chimica Acta*, 853: 533-540. doi:10.1016/j.aca.2014.10.010
- PALCHETTI, I.; MASCINI, M. (2008) Electroanalytical biosensors and their potential for food pathogen and toxin detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391: 455–471. doi: 10.1007/s00216-008-1876-4

- PALMISANO, F., QUINTO, M., RIZZI, R., ZAMBONIN, P.G. (2001) Flow injection analysis of l-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor. *Analyst*, 126: 866–870. doi: 10.1039/B010180J
- PARK, C.H., VANDEL, N.M., HIXON, D.L. (1996) Rapid Immunoassay for detection of Escherichia coli O157 directly from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 988-990.
- PARK, I.S., KIM, N. (1998) Thiolated Salmonella antibody immobilization onto the gold surface of piezoelectric quartz crystal. *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 1091–1097. doi:10.1016/S0956-5663(98)00067-0
- PARK, I.S., KIM, W.Y., KIM, N. (2000) Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting Salmonella spp. *Biosensors and Bioelectronics*, 15: 167–172. doi:10.1016/S0956-5663(00)00053-1
- PARKER, C.O., TOTHILL, I.E. (2009) Development of an electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 in milk with focus on matrix interference. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 2452–2457. doi:10.1016/j.bios.2008.12.021
- PARRA, A., CASERO, E., VAZQUEZ, L., PARIENTE, F., LORENZO, E. (2006) Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces. *Analytica Chimica Acta*, 555: 308–315. doi:10.1016/j.aca.2005.09.025
- PEDRERO, M., CAMPUZANO, S., PINGARRÓN, J.M. (2009) Electroanalytical Sensors and Devices for Multiplexed Detection of Foodborne Pathogen Microorganisms. *Sensors*, 9: 5503-5520. doi:10.3390/s90705503
- PELLEGRINI, G.E., CARPICO, G., CONI, E. (2004) Electrochemical sensor for the detection and presumptive identification of quinolone and tetracycline residues in milk. *Analytica Chimica Acta*, 520: 13-18. doi:10.1016/j.aca.2004.04.052
- PICHON, V., CHAPUIS-HUGON, F. (2008) Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants-A review. *Analytica Chimica Acta*, 622: 48-61. doi:10.1016/j.aca.2008.05.057
- PIEHLER, J., BRANDENBURG, A., BRECH, A., WAGNER, E., GAUGLITZ, G. (1997) Characterization of grating couplers for affinity-based pesticide sensing. *Applied Optics*, 36: 6554-6562. doi: 10.1364/AO.36.006554

- PILIARIK, M., PÁROVÁ, L., HOMOLA, J. (2009) High-throughput SPR sensor for food safety. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 1399-1404. doi:10.1016/j.bios.2008.08.012
- PISOSCHI, A.M., POP, A., SERBAN, A.I., FAFANEATA, C. (2014) Electrochemical methods for ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*, 121: 443-460. doi:10.1016/j.electacta.2013.12.127
- PITTET, A. (2005) Modern methods and trends in mycotoxin analysis. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 96: 6: 424-444.
- PLOMER, M., GUILBAULT, G.G., HOCK, B. (1992) Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of enterobacteria. *Enzyme and Microbial Technology*, 14: 230-235.
- POWNER, E.T., YALCINKAYA, F. (1997) Intelligent biosensors. *Sensor Review*, 17 (2), 107-116
- PRIETO-SIMÓN, B., NOGUER, T., CAMPÁS, M. (2007) Emerging biotools for assessment of mycotoxins in the past decade. *Trends in Analytical Chemistry*, 26: 689-702. doi:10.1016/j.trac.2007.05.012
- RADKE, S.M., ALOCILJA, E.C. (2005) A high density microelectrode array biosensor for detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 20: 1662–1667. doi:10.1016/j.bios.2004.07.021
- RAMSDEN, J., NÉMETH-SALLAI, M., VÖRÖS, J., SZENDRŐ, I. (1997) Integrált optikai hullámvezető szenzor felületi adszorpció vizsgálatára. *Fizikai Szemle*, XLVII. Évf. 9: 281-285.
- RANDAZZO, C.L., RESTUCCIA, C., ROMANO, A.D., CAGGIA, C. (2004) *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*, 90: 9-14.
- REN, J., HE, F., YI, S., CUI, X. (2008) A new MSPQC for rapid growth and detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 403-409. doi:10.1016/j.bios.2008.04.018
- REN, Y., ZHANG, Y., SHAO, S., CAI, Z., FENG, L., PAN, H., & WANG, Z. (2007) Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1143: 48-64. doi:10.1016/j.chroma.2006.12.064

- RICCI, F., VOLPE, G., MICHELI, L., PALLESCHI, G. (2007) A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta*, 605: 111-129. doi:10.1016/j.aca.2007.10.046
- RODAHL, M., KASEMO, B. (1996) A simple setup to simultaneously measure the resonant frequency and the absolute dissipation factor of a quartz crystal microbalance. *Review of Scientific Instruments*, 67: 3238-3241. doi: 10.1063/1.1147494
- RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., D'AGOSTINO, M., HERREWEGH, A., PLA, M., COOK, N., IKONOMOPOULOS, J. (2005) Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in water and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 101: 93–104. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.09.005
- ROJAS, R., APODACA, G. (2002) Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 3: 944-956. doi:10.1038/nrm972
- ROY, S.K., KUNDU, S.K. (1979) Chemically modified porous silica gel as a bioadsorbent and a biocatalyst. *Analytical Biochemistry*, 98: 238-241. doi:10.1016/0003-2697(79)90733-4
- RUSIN, K.M., FARE, T.L., STEMPLE, J.Z. (1992) Immobilization of flavoproteins on silicon: Effect of cross-linker chain length on enzyme activity. *Biosensors and Bioelectronics*, 7: 367-373. doi:10.1016/0956-5663(92)85033-7
- RUSTOM, I.Y.S. (1997) Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59: 57-67. doi:10.1016/S0308-8146(96)00096-9
- SADIK, O.A.; ALUOCH, A.O.; ZHOU, A. (2009) Status of biomolecular biorecognition using electrochemical techniques. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 2749–2765.
- SALMINEN, S., OUWEHAND, A., BENNO, Y., LEE, Y.K. (1999) Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science and Technology*, 10: 107-110.
- SAUERBREY, G. (1959) Use of quartz vibration for weighing thin films on a microbalance/Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung dünner Schichten und zur Mikrowagung. *Zeitschrift für Medizinische Physik*, 155: 206.
- SAURINA, J., HERNÁNDEZ-CASSOU, S., ALEGRET, S., FÀBREGAS, E. (1999) Determination of lysine in pharmaceutical samples containing endogenous ammonium ions by using a lysine oxidase biosensor based on an all-solid-state potentiometric ammonium electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 14: 67-75. doi:10.1016/S0956-5663(98)00097-9

SHARMA, H., AGARWAL, M., GOSWAMI, M., SHARMA, A., ROY, S.K., RAI, R., MURUGAN, M.S. (2013) Biosensors: tool for food borne pathogen detection. *Veterinary World*, 6: 968-973. doi: 10.14202/vetworld.2013.968-973

SHARMA, S.K., SEHGAL, N., KUMAR, A. (2003) Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics*, 3: 307–316. doi:10.1016/S1567-1739(02)00219-5

SHEEHAN, K.C., (2007) Production of monoclonal antibodies, in: Howard, G.C., Kaser, M.R. (Eds.), *Making and using antibodies: a laboratory manual*, CRC Press, Florida, pp. 73-94.

SHORTT, C. (1998) Living it up for dinner. *Chemical Industry*, 20: 300-303.

SHOTWELL, O.L., GOULDEN, M.L., & HESSELTINE, C.W. (1976) Aflatoxin M1. Occurrence in stored and freshly harvested corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24: 683-684. doi: 10.1021/jf60205a018

SHUAIB, F.M.B., EHIRI, J., ABDULLAHI, A., WILLIAMS, J.H., & JOLLY, P.E. (2010) Reproductive health effects of aflatoxins: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 29: 262-270.

SIONTOROU, C.G., NIKOLELIS, D.P., MIERNIK, A., KRULL, U.J. (1998) Rapid methods for detection of Aflatoxin M1 based on electrochemical transduction by self- assembled metal-supported bilayer lipid membranes (s-BLMs) and on interferences with transduction of DNA hybridization. *Electrochimica Acta*, 43: 3611-3617. doi:10.1016/S0013-4686(98)00108-X

ŠÍPOVÁ, H., HOMOLA, J. (2013) Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: A review. *Analytica Chimica Acta*, 773: 9-23. doi:10.1016/j.aca.2012.12.040

SKERRA, A., PLUCKTHUN, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, 240: 1038-1041. doi: 10.1126/science.3285470

SKOTTRUP, P.D., NICOLAISEN, M., JUSTESEN, A.F. (2008) Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 339–348.

SONG, S., WANG, L., LI, J., FAN, C., ZHAO, J. (2008) Aptamer-based biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 27: 108-117. doi:10.1016/j.trac.2007.12.004

SPANGGAARD, B., HUBER, I., NIELSEN, J., NIELSEN, T., APPEL, K.F., GRAM, L. (2000) The microflora of rainbow trout intestine: A comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture*, 182: 1–15.

- STORRI, S., SANTONI, T., MINUNNI, M., MASCINI, M. (1998) Surface modifications for the development of piezoimmunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 347–357. doi:10.1016/S0956-5663(97)00119-X
- SU, X. L., LI, Y. (2004) A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 563–574.
- SUBRAHMANYAM, S., PILETSKY, S.A., TURNER, A.P.F. (2002) Application of Natural Receptors in Sensors and Assays. *Analytical Chemistry*, 74: 3942-3951. doi: 10.1021/ac025673+
- SUBRAMANIAN, A., IRUDAYARAJ, J., RYAN, T. (2006a) A mixed self-assembled monolayer-based surface plasmon immunosensor for detection of *E. coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 21:998-1006. doi:10.1016/j.bios.2005.03.007
- SUBRAMANIAN, A., IRUDAYARAJ, J., RYAN, T. (2006b) Mono and dithiol surfaces on surface plasmon resonance biosensors for detection of *Staphylococcus aureus*. *Sensors and Actuators: B*, 114: 192-198. doi:10.1016/j.snb.2005.04.030
- SURI, R.C., RAJE, M., MISHRA, G.C. (1994) Determination of immunoglobulin M concentration by piezoelectric crystal immunobiosensor coated with protamine. *Biosensors and Bioelectronics*, 9: 325-332. doi:10.1016/0956-5663(94)80031-6
- SZALONTAI, H., ADÁNYI, N., KISS, A. (2012) Development of Piezoelectric Immunosensor for the Detection of Probiotic Bacteria. *Analytical Letters*, 45: 1214-1229. doi: 10.1080/00032719.2012.673095
- SZALONTAI, H., ADÁNYI, N., KISS, A. (2014a) Comparative determination of two probiotics by QCM and OWLS-based immunosensors. *New Biotechnology*, 31: 395-401. doi: 10.1016/j.nbt.2014.04.001
- SZALONTAI, H., KISS, A., ADÁNYI, N. (2014b) Determination of aflatoxin M1 in milk samples by an OWLS-based immunosensor. *Acta Alimentaria*, 43: 148-155. doi: 10.1556/AAlim.43.2014.Suppl.21
- SZEITNER, ZS., ANDRÁS, J., GYURCSÁNYI, R.E., MÉSZÁROS, T. (2014) Is less more? Lessons from aptamer selection strategies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101: 58-65. doi:10.1016/j.jpba.2014.04.018
- TANG, D.P., YUAN, R., CHAI, Y.Q., ZHONG, X., LIU, Y., DAI, J.Y., ZHANG, L.Y. (2004) Novel potentiometric immunosensor for hepatitis B surface antigen using a gold nanoparticle-

based biomolecular immobilization method. *Analytical Biochemistry*, 333: 345-350. doi:10.1016/j.ab.2004.06.035

TAYLOR, A.D., LADD, J., YU, Q., CHEN, S., HOMOLA, J., JIANG, S. (2006) Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 752–758. doi:10.1016/j.bios.2006.03.012

THÉVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R.A., WILSON, G.S. (1999) Electrochemical Biosensors Recommended Definitions and Classification - IUPAC Report. *Pure Appl. Chem*, 71 (12) 2333-2348.

TIEFENTHALER, K. (1992) Integrated optical couplers as chemical waveguide sensors. *Advances in Biosensors*, 2: 261-289.

TOMBELLI, S., MASCINI, M. (2000) Piezoelectric Quartz Crystal Biosensors: Recent Immobilisation Schemes. *Analytical Letters*, 33: 2129-2151. doi: 10.1080/00032710008543179

TOMBELLI, S., MINUNNI, M., SANTUCCI, A., SPIRITI, M.M., MASCINI, M. (2006) A DNA-based piezoelectric biosensor: Strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices. *Talanta*, 68: 806–812. doi:10.1016/j.talanta.2005.06.007

TOMPKINS, H.G. (1993) A User's guide to Ellipsometry. Academic press, Boston, MA, USA.

TÓTH, K., GYURCSÁNYI, R.E. (2002) Szenzorok az analitikai kémiában. *Magyar Tudomány*, 12: 1614.

TRUMMER, N., ADÁNYI, N., VÁRADI, M., SZENDRŐ, I. (2001) Modification of the surface of integrated optical wave-guide sensors for immunosensor applications. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 371:21–4. doi: 10.1007/s002160100929

TUERK, C., GOLD, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249: 505–510.

TURNER, A.P.F; KARUBE, I., WILSON, S.W. (1986) Biosensors. Fundamentals and Applications. Oxford Science Publications, Oxford.

TURNER, N.W., SUBRAHMANYAM, S., PILETSKY S.A. (2009) Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632: 168-180. doi:10.1016/j.aca.2008.11.010

- TÜDÖS, A.J., LUCAS-VAN DEN BOS, E.R., STIGTER, E.C.A. (2003) Rapid surface plasmon resonance-based inhibition assay of deoxynivalenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5843-5848. doi: 10.1021/jf030244d
- UCHIDA, H., KINOSHITA, H., KAWAI, Y., KITAZAWA, H., MIURA, K., SHIIBA, K., HORII, A., KIMURA, K., TAKETOMO, N., ODA, M., YAJIMA, T., SAITO, T. (2006) Lactobacilli binding human A-antigen expressed in intestinal mucosa. *Research in Microbiology*, 157: 659–665. doi:10.1016/j.resmic.2006.03.001
- UITHOVEN, K.A., SCHMIDT, J.C., BALLMAN, M.E. (2000) Rapid identification of biological warfare agents using an instrument employing a light addressable potentiometric sensor and a flow-through immunofiltration-enzyme assay system. *Biosensors and Bioelectronics*, 14: 761-770. doi:10.1016/S0956-5663(99)00067-6
- VAN DER GAAG, B., SPATH, S., DIETRICH, H., STIGTER, E., BOONZAAIJER, G., VAN OSENBRUGGEN, T., KOOPAL, K. (2003) Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control*, 14: 251-254. doi:10.1016/S0956-7135(03)00008-2
- VAN EGMOND, H.P., PAULSCH, W.E. (1986) Mycotoxins in milk and milk products. *Neth Milk Dairy J*, 40: 175-188.
- VAN HOORDE, K., HEYNDRIKX, M., VANDAMME, P., HUYS, G. (2010) Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*, 27: 425-33. doi: 10.1016/j.fm.2009.12.001.
- VARGA, J., KOCSUBÉ, S., SZIGETI, GY., MAN, V., TÓTH, B., VÁGVÖLGYI, CS., BARTÓK, T. (2012) Black Aspergilli and Fumonisin contamination in onions purchased in Hungary. *Acta Alimentaria*, 41: 414-423. doi: 10.1556/AAlim.41.2012.4.3
- VAUGHAN, R.D., O’SULLIVAN, C.K., GUILBAULT, G.G. (2001) Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Enzyme Microbiology Technology*, 29: 635–638.
- VELASCO-GARCIA, M.N., MOTTRAM, T. (2003) Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. *Biosystems Engineering*, 84: 1–12.
- VILLAMIZAR, R.A., MAROTO, A., RIUS, F.X., INZA, I., FIGUERAS, M.J. (2008) Fast detection of Salmonella Infantis with carbon nanotube field effect transistors. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 279-283. doi:10.1016/j.bios.2008.03.046

- VOINOVA, M.V., JONSON, M., KASEMO, B. (2002) “Missing mass” effect in biosensor’s QCM applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 17: 835–841. doi:10.1016/S0956-5663(02)00050-7
- WANDERMUR, G., RODRIGUES, D., ALLIL, R., QUEIROZ, V., PEIXOTO, R., WERNECK, M., MIGUEL, M. (2014) Plastic optical fiber-based biosensor platform for rapid cell detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 54: 661-666. doi:10.1016/j.bios.2013.11.030
- WANG, J. (2006) Analytical electrochemistry. Third edition, Hoboken New Jersey, John Wiley & Sons Inc.
- WANG, R.; RUAN, C.; KANAYEVA, D.; LASSITER, K.; LI, Y. (2008) TiO₂ nanowire bundle microelectrodebased impedance immunosensor for rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes*. *Nano Letters*, 8: 2625-2631.
- WASWA, J., IRUDAYARAJ, J., DEBROY, C. (2007) Direct detection of *E. Coli* O157:H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor. *LWT* 40: 187-192.
- WATTS, H.J., LOWE, C.R., POLLARD-KNIGHT, D.V. (1994) Optical biosensor for monitoring microbial cells. *Analytical Chemistry*, 66: 2465-2470. doi: 10.1021/ac00087a010
- WEETALL, H.H. (1993) Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 41: 157-188. doi: 10.1007/BF02916421
- WEI, D., OYARZABAL, O.A., HUANG, T.S., BALASUBRAMANIAN, S., SISTA, S., SIMONIAN, A. L. (2007) Development of a surface plasmon resonance biosensor for the identification of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods*, 69: 78–85. doi:10.1016/j.mimet.2006.12.002
- WILLIAMS, R.A., BLANCH, H.W. (1994) Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 9: 159-167. doi:10.1016/0956-5663(94)80108-8
- WILLIAMSON, M.L., ATHA, D.H., REEDER, D.J., SUNDARAM, P.V. (1989) Anti-T2 monoclonal antibody immobilization on quartz fibers: stability and recognition of T2 mycotoxin. *Analytical Letters*, 22: 803-816. doi:10.1080/00032718908051368
- WILLNER, E. KATZ, B. WILLNER. (1997) Electrical contact of redox enzyme layers associated with electrodes: Routes to amperometric biosensors. *Electroanalysis*, 9: 965–977. doi: 10.1002/elan.1140091302

- WINTER, G., GRIFFITHS, A.D., HAWKINS, R.E., HOOGENBOOM, H.R. (1994) Making antibodies by phage display technology. *Immunology*, 12: 433-455. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.002245
- WITTUNG-STAFSHEDE, P., RODAHL, M., KASEMO, B., NIELSEN, P., NORDEN, B. (2000) Detection of point mutations in DNA by PNA-based quartz-crystal biosensor. *Colloids and Surfaces: A*. 174: 269-273. doi:10.1016/S0927-7757(00)00537-9
- WONG, Y.Y., NG, S. P., NG, M. H., SI, S. H., YAO, S. Z., FUNG, Y. S. (2002) Immunosensor for the differentiation and detection of *Salmonella* species based on a quartz crystal microbalance. *Biosensors and Bioelectronics*, 17: 676–684. doi:10.1016/S0956-5663(02)00030-1
- XIAO, S.J., TEXTOR, M., SPENCER, N.D., SIGRIST, H. (1998) Covalent attachment of cell-adhesive, (Arg-Gly-Asp)-containing peptides to titanium surfaces. *Langmuir*, 14: 5507-5516. doi: 10.1021/la980257z
- XIAO, S.J., TEXTOR, M., SPENCER, N.D., WIELAND, M., KELLER, B., SIGRIST, H. (1997) Immobilization of the cell-adhesive peptide Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC) on titanium surfaces by covalent chemical attachment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8: 867-872. doi: 10.1023/A:1018501804943
- YAO, D., CAO, H., WEN, S., LIU, D., BAI, Y., ZHENG, W. (2006) A novel biosensor for sterigmatocystin constructed by multi-walled carbon nanotubes (MWNT) modified with aflatoxin–detoxifizyme (ADTZ). *Bioelectrochemistry*, 68: 126-133. doi:10.1016/j.bioelechem.2005.05.003
- YILMAZ, E., MAJIDI, D., OZGUR, E., DENIZLI, A. (2015) Whole cell imprinting based Escherichia coli sensors: A study for SPR and QCM. *Sensors and Actuators: B*, 209: 714-721. doi:10.1016/j.snb.2014.12.032
- YU, J.C.C., LAI, E.P.C. (2004) Polypyrrole film on miniaturized surface plasmon resonance sensor for ochratoxin A detection. *Synthetic Metals*, 143: 253-258. doi: 10.1016/j.synthmet.2003.12.007
- YUKI, N., WATANABE, K., MIKE, A., TAGAMI, Y., TANAKA, R., OHWAKI, M., MOROTOMI, M. (1999) Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: Selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. *International Journal of Food Microbiology*, 48: 51-57. doi:10.1016/S0168-1605(99)00029-X

ZAGHINI, A., MARTELLI, G., RONCADA, P., SIMIOLI, M., & RIZZI, L. (2005) Mannanligosaccharides and Aflatoxin B1 in Feed for Laying Hens: Effects on Egg Quality, Aflatoxins B1 and M1 Residues in Eggs, and Aflatoxin B1 Levels in Liver. *Poultry Science*, 84: 825-832. doi: 10.1093/ps/84.6.825

ZHOU, T., MARX, K.A., WARREN, M., SCHULZE, H., BRAUNHUT, S.J. (2000) The quartz crystal microbalance as a continuous monitoring tool for the study of endothelial cell surface attachment and growth. *Biotechnology Progress*, 16: 268–277. doi: 10.1021/bp000003f

ZHU, Q., SHIH, W.Y., SHIH, W.H. (2007) In situ, in-liquid, all-electrical detection of Salmonella typhimurium using lead titanate zirconate/gold-coated glass cantilevers at any dipping depth. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 3132-3138. doi:10.1016/j.bios.2007.02.005

11. ÁBRAJEGYZÉK

- 2.1 ábra: A bioszenzorok elvi felépítése
- 2.2 ábra: Immunglobulin (Ig) osztályok és az IgG ellenanyag-molekula általános szerkezete
- 2.3 ábra: Antitest előállítási típusok
- 2.4 ábra: Az SPR rendszer sematikus ábrája
- 2.5 ábra: A kvarckristály tengelyei
- 2.6 ábra: A kvarc alap (a) és AT (b) hasítási módjai
- 2.7 ábra: Fő immobilizálási eljárások a kvarckristályon
- 2.8 ábra: Integrált optikai hullámvezető szenzor fő részei
- 2.9 ábra: OWLS szenzor felépítése, a hullámvezetőbe csatolt fény detektálása
- 2.10 ábra: Becsatolt fény mennyiség a lézer beesési szögének függvényében (adott chipre jellemző intenzitás spektrum)
- 2.11 ábra: Szilanizált SiO₂-TiO₂ hordozó felületmódosítási eljárásai
- 2.12 ábra: Bioszenzorok újabb alkalmazásai mikroorganizmusok kimutatására a mezőgazdaság, az egészségügy, a bioterrorizmus elleni védekezés és az élelmiszer minőség-ellenőrzés ágazatokban
- 2.13 ábra: Aptamer-alapú QCM szenzor felületének kialakítása
- 2.14 ábra: Főbb aflatoxinok kémiai szerkezete
- 2.15 ábra: Aflatoxinok útja a táplálékláncban és az emberben okozott megbetegedések
- 4.1 ábra: QCM mérőrendszer sematikus rajza áramló oldatos mérésekhez összeállítva
- 4.2 ábra: A QCM átfolyó cellája a kvarckristállyal
- 4.3 ábra: Antitest immobilizálás mechanizmusa szulfo-LC-SPDP keresztkötővel
- 4.4 ábra: Antitest immobilizálás mechanizmusa MHDA keresztkötővel
- 4.5 ábra: OWLS mérőrendszer FIA méréshez összeállítva
- 4.6 ábra: OWLS 120 optikai rendszerének sematikus ábrája
- 4.7 ábra: OW2400 chip felületének módosítása szilanizálással és aktiválása glutáraldehiddel
- 5.1 ábra: Frekvenciaváltozás a BSA koncentrációjának függvényében szulfo-LC-SPDP és MHDA keresztkötő reagensek alkalmazásával
- 5.2 ábra: A szenzorfelületen rögzített anti-BSA koncentrációjának hatása a mért jelre
- 5.3 ábra: Injektált mintamennyiség, az áramló injektációs módszer és a megállított mintaáram hatása a mért jelre
- 5.4 ábra: Áramlási sebesség hatása a mért jelre
- 5.5 ábra: Kvarckristályok ismételt használatának hatása a mért frekvenciaváltozásra
- 5.6 ábra: *B. bifidum* poliklonális antitest jellemzése indirekt ELISA teszttel

- 5.7 ábra: *L. acidophilus* poliklonális antitest jellemzése indirekt ELISA teszttel
- 5.8 ábra: Immobilizált *B. bifidum* antitest koncentrációjának hatása a frekvenciaváltozásra
- 5.9 ábra: *B. bifidum* (a) és *L. acidophilus* (b) mintákra kapott frekvenciaváltozás értékek áramló injektálásos és megállított mintaáramú mérési módszerekkel
- 5.10 ábra: *B. bifidum* (a) és *L. acidophilus* (b) antitestek szelektivitásának vizsgálata
- 5.11 ábra: *B. bifidum* mérése 100× hígítású tejben
- 5.12 ábra: *L. acidophilus* mérése 100× hígítású tejben
- 5.13 ábra: Tejminták *L. acidophilus* sejtszámának meghatározása
- 5.14 ábra: *B. bifidum* és *L. acidophilus* sejtszámok QCM bioszenzorral és telepszámlálással meghatározva
- 5.15 ábra: *B. bifidum* antitest mérése a szenzoron rögzített antigénnel
- 5.16 ábra: OWLS szenzorválaszok a különböző koncentrációjú *B. bifidum* antiszérum immobilizálásakor
- 5.17 ábra: *B. bifidum* 10³-10⁶ CFU/ml koncentrációjú szuszpenzióinak mérése különböző koncentrációjú *B. bifidum* antiszérum rögzítésével
- 5.18 ábra: A mérési hőmérséklet hatása az *L. acidophilus* immunszenzorra
- 5.19 ábra: A mintaáramlás sebességének hatása a detektált jelre
- 5.20 ábra: *B. bifidum* és *L. acidophilus* pufferes szuszpenzióinak OWLS szenzorral mért kalibrációs görbéi
- 5.21 ábra: *B. bifidum* szenzor szelektivitása
- 5.22 ábra: Tejminták *B. bifidum* sejtszámának meghatározása 100× hígítású tejben
- 5.23 ábra: *B. bifidum* és *L. acidophilus* baktériumok mérése 100× hígított tejben
- 5.24 ábra: Fermentált tejminták *B. bifidum* és *L. acidophilus* sejtszámait OWLS bioszenzorral és telepszámlálással meghatározva
- 5.25 ábra: Különböző koncentrációjú AFM₁ antiszérumokra kapott jelválaszok
- 5.26 ábra: AFM₁ antiszérum különböző koncentrációinak (85; 42,5 és 21,25 µg/ml) alkalmazása 0,1-10 ng/ml AFM₁ standardok mérésére
- 5.27 ábra: Szenzorfelületen rögzített AFM₁-HRP konjugátum koncentrációjának hatása a mért jelre
- 5.28 ábra: A mérési hőmérséklet hatása az immunszenzor érzékenységére
- 5.29 ábra: Tejminták AFM₁ mérése indirekt OWLS-alapú immunszenzorral
- 5.30 ábra: Mintaelőkészítés hatása az AFM₁ meghatározására
- 5.31 ábra: Szűrt (▲) és centrifugált (◆) 200× hígítású tejminták bioszenzoros mérése

2.1 Táblázat: Bioszenzorok csoportosítása

2.2 Táblázat: Jelölésmentes bioszenzorok az élelmiszereket szennyező baktériumok mennyiségi meghatározására

2.3 Táblázat: Humán egészség helyreállítására és megőrzésére alkalmazott probiotikus baktériumok

2.4 Táblázat: A mikotoxinok fő csoportjai és az érintett termékek

2.5 Táblázat: Mikotoxinok kimutatása SPR immunszenzorokkal

5.1 Táblázat: *B. bifidum* és *L. acidophilus* sejtszámok QCM bioszenzorral és telepszámlálással meghatározva

5.2 Táblázat: *B. bifidum* és *L. acidophilus* antitestek szelektivitása

5.3 Táblázat: OWLS immunszenzorral és ELISA teszttel meghatározott aflatoxin M₁ tartalmak 100× hígított tejmintákban

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik irányították, segítették kutatói tevékenységemet:

Adányiné Dr. Kisbocskói Nóra témavezetőmnek, a NAIK-ÉKI tudományos főmunkatársának, tanácsadójának, alapos, mindenre kiterjedő figyelméért, iránymutató tevékenységéért, a disszertáció tartalmi felépítésében nyújtott szaktanácsaiért,

Dr. Kiss Attilának, az EKF EGERFOOD Tudásközpont korábbi főigazgatójának a kutatói pályán való elindulásomkor nyújtott segítségéért, biztatásáért, a szakmai munka hátterének biztosításáért,

Dr. Váczy Kálmán Zoltánnak, az EKF Regionális Egyetemi Tudásközpont főigazgatójának a disszertáció összeállításakor nyújtott támogatásáért,

További köszönetemet fejezem ki

közvetlen kollégáimnak, **Dr. Bóka Beátának**, **Csiffáry Gábornak**, **Szabó-Hudák Orsolyának** és **Fűtő Péternek** a szakmai támogatásukért, **Fejes Zsuzsannának** a mikrobiológiai vizsgálatok kivitelezésében nyújtott segítségéért,

Hálával és köszönettel tartozom

szüleimnek és **barátaimnak** elfogadó türelmükért, megtartó támogatásukért.