

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Immun- és bakteriális szenzorok fejlesztése optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópiai detektálással, és alkalmazásuk az élelmiszerbiztonság valamint a környezetvédelem területén

Adányiné Dr. Kisbocskói Nóra



Központ Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

2013

1. BEVEZETÉS

Napjainkban az érdeklődés középpontjába került az élelmiszer-minőség és -biztonság kérdése. Az orvostudomány, a biológia, a kémia és fizika új eredményei alapján lehetőség nyílik arra, hogy a táplálkozás során az emberi szervezetbe jutó anyagok pozitív és negatív hatásait mind jobban megismerjük. A globalizáció, az élelmiszerek szabad kereskedelme a világban szükségessé teszi az élelmiszer-biztonság feltételeinek megteremtését, a kockázatelemzés megvalósítását az emberi egészség védelme érdekében. Az élelmiszerekből származó egészségveszélyeztetés megítélése kockázatbecsléssel lehetséges. A kockázatbecslés nem nélkülözheti olyan analitikai módszerek alkalmazását, amelyek biztosítják a vizsgálandó anyagok/komponensek nagy érzékenységu ($\mu\text{g}/\text{kg}$ vagy ng/kg), szelektív mérését, kimutatását, valamint a gyors eredményszolgáltatást.

Az elmúlt három évtizedben előtérbe került a hagyományos mikrobiológiai és kémiai analitikai módszerek mellett a sorozatvizsgálatokra alkalmas, gyors, nagy érzékenységu automatizálható módszerek fejlesztése. Ezzel párhuzamosan, a '60-as években indultak meg a bioszenzor-kutatások, és dinamikus fejlődnek világszerte mind a meghatározandó szubsztrátok körét, mind pedig a technikai eszköztárat tekintve. A KÉKI-ben a '90-es években kezdődtek meg a bioszenzor-kutatások, amit hazai és nemzetközi együttműködések, pályázatok keretében két fő irányban folytattunk. Az első lépésként enzim alapú amperometriás szenzorokat fejlesztettünk, amelyek vizes közegben működtek különböző szubsztrátok meghatározására (glükóz, maltóz, galaktóz, laktóz, *L*- és *D*-aminosavak stb.). Ezen munka eredményeként kaptam meg a BME dr. univ címét a „Szelektív biokatalitikus érzékelők és analitikai reaktorok fejlesztése élelmiszeripari és biotechnológiai alkalmazásra” című disszertációra. Később az enzim alapú bioszenzorok alkalmazhatóságát vizsgáltuk szerves fázisú közegben (glükózoxidáz, kataláz és koleszterinoxidáz enzimek alkalmazásával), ami „Szerves fázisban működő enzim alapú bioszenzorok fejlesztése és alkalmazása élelmiszerminták vizsgálatára” című PhD dolgozatom témája lett.

A bioszenzor-kutatások folytán kerültünk kapcsolatba a MikroVákuum Kft.-vel, majd közös projektek keretében megindítottuk szenzorkutatásaink másik irányát. E munkában az optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópia (OWLS) alkalmazásának lehetőségeit kívántuk kibővíteni. Immunszenzorok és bakteriális szenzorok fejlesztését kezdtük meg. Együttműködésünk célja elsősorban alkalmazástechnikai fejlesztés volt, különös tekintettel az élelmiszer- és környezeti minták vizsgálatának előmozdítására. A kutatás-fejlesztési pályázatok keretében kidolgozott szenzoros mérési eljárásokat, új alkalmazási irányokat, eredményeket foglaltam össze a jelen dolgozatban.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az ipari és környezeti szennyező anyagok a mezőgazdaság és az ipari létesítmények működése következtében jutnak közvetlenül a környezetbe, vagy közvetve az élelmiszerekbe. Kémiai és toxikológiai tulajdonságaikat tekintve igen sokfélék, számos rendkívül veszélyes és igen perzisztens, a táplálékláncon át feldúsuló anyag van közöttük, amelyeknek minőségi és mennyiségi kimutatására az analitika széles tárházát alkalmazzák.

A trifluralin (CAS No 1582098) dinitro-anilin-származék növényvédőszer-hatóanyag a mezőgazdaságban szelektív, vetés illetve palántázás előtt alkalmazható herbicid. Talajbeli perzisztenciát mutat, máj- és vesekárosító, valamint immunszuppresszív hatású és endokrin zavaró vegyület [1-3].

A gombák jelenléte az élelmiszerek, illetve élelmiszer-nyersanyagok minőségét hátrányosan befolyásolja, jelentős szerepük van az élelmiszerek érzékszervi tulajdonságainak romlásában, tápértékének csökkenésében és az általuk termelt mikotoxinok egészségkárosító hatásában. A mikotoxinok közül a legfontosabbak a zearalenon (ZON, F-2 toxin), az aflatoxin, az ochratoxin és a deoxinivalenol (DON) valamint ezek származékai [4]. A *Fusarium* gombatörzsek által termelt ZON a növényi termékek természetes szennyezője, kémiai szerkezetét tekintve rezorcilakton. A zearalenon ösztrogénhatású anyag, a gabonaféléken felületi szennyeződként jelenik meg, a malomipari feldolgozás után a korpába kerül [5,6]. Az

aflatoxinokat elsősorban az *Aspergillus flavus* és az *A. parasiticus* termeli. Az aflatoxinok benzpirén szerkezetű, többszörösen konjugált, policiklusos vegyületek, amelyek májkárosodást okoznak, genotoxikus és immunszuppresszív hatásúak. Az ochratoxinokat az *Aspergillus*- és *Penicillium*-fajok termelik; a gabonafélékben, hüvelyesekben, rizsben, borban, aszalt gyümölcsökben, fűszerekben fordulnak elő. Kémiai szerkezetük szerint dihidro-kumarinhoz kapcsolódó β -fenilalanin-származékok, vesekárosító, rákkeltő, immunszuppresszív hatásúak. A deoxinivalenol (DON) B-típusú trichotecénvázis vegyület, elsősorban gabonákban fordul elő, elsősorban a *Fusarium graminearum* és a *F. culmorum* gombák termelik [5,7,8]. A DON akut hatásai közé az émelygés, hányás, hasmenés, sertéseknél csökkenő súlygyarapodás [6,9].

A biogén aminok jelen vannak az élő szervezetekben, és részt vesznek különböző nélkülözhetetlen élettani folyamatokban, ugyanakkor nagy koncentrációban felelősek az élelmiszer-mérgezésekért [10,11]. Kisebb mennyiségben élelmiszer-intoleranciát válthatnak ki [12,13], elsősorban a hisztaminlebontás genetikai zavara miatt [14]. A biogén aminok elsősorban halakban és halkészítményekben, hústermékekben, sajtokban, fermentált zöldségekben, szójatermékekben, borokban és sörökben fordulhatnak elő [15], a hisztamin koncentrációja a biogén aminok kumulatív szennyezésének indikátora lehet.

A mezőgazdaságban a termés védelme érdekében számos, az emberi szervezetre káros növényvédő szert alkalmaznak világszerte. Ezen anyagok egyik csoportját alkotják az élőlények hormonális rendszerét már kis koncentrációban is károsító, ún. endokrin zavaró (ED) vegyületek. Biotesztekkel igazolták, hogy az állati szervezetekben (halakban, kételtűekben) termelődő, hagyományos úton nehezen meghatározható vitellogenin fehérje vérbeli koncentrációja az ED hatású szennyezők hatására a hímek vérszérumában is abnormális szintre emelkedhet, ezért alkalmas [16,17].

A bioszenzorkutatások területén a mikrobiológiai vizsgálatok több irányban folynak, egyrészt nagyon fontos feladat egyes mikroorganizmusok jelenlétének szelektív meghatározása az élelmiszer-alapanyagokban és az élelmiszerekben. Másrészt pedig

különböző baktériumok alkalmazásával mikrobiális szenzor készíthető pl. növényvédőszer-maradványok, antibiotikumok jelenlétének gyors monitorozására, vagy szennyvizek biológiai oxigénigényének meghatározására. A mikrobák biofilmképző tulajdonsága és a biofilmben kialakuló fiziológiai tulajdonságaik (pl. fertőtlenítőszerekkel szembeni rezisztencia, jobb túlélési stratégia) az utóbbi évtizedben a kutatások középpontjába kerültek. Az *E. coli* igen alkalmas modell organizmus biofilmképződési tulajdonságának vizsgálatára [18]. A biofilmek képződését akadályozó vegyületek kiválasztására, a felszín kezelésére, és a különböző fizikai-kémiai paraméterek hatásának valós idejű tanulmányozására a különböző szenzorok jó lehetőséget biztosítanak.

A patogén mikrobák vizsgálatán és a szermaradványok baktériumgátló hatásának meghatározásán túl a fermentációs technológiák során számos probiotikus mikroorganizmus tanulmányozása vált szükségessé. A tejsavbaktériumok jelen vannak a természetes humán bélflórában, és fontos szerepet játszanak a különböző élelmiszerek (pl. tejtermékek, sajtok, probiotikus zöldséglevelek, húskészítmények) fermentálásában, ezek közül a *Lactobacillus*ok és a *Bifidobacterium*ok játszanak kiemelt szerepet [19]. A fermentációs folyamatok során a tejsavbaktériumok számos gátló anyaggal, kémiai közeggel találkoznak. Ilyen pl. a nagy sókoncentráció, a hőmérséklet változása, szerves savak jelenléte.

A mikrobiális szenzorok fejlesztése során igen kritikus feladat az élő sejtek rögzítése a szenzor felületén. Korábban német kutatók a szilíciumtartalmú exopolimert képző szivacsokból (*Suberites domuncula*: *Porifera*, *Demospongiae*, *Hadromerida*, Lim-csatorna, Isztria, Horvátország) enzimatikusan aktív fehérjecsoportot, ún. szilikateinokat izoláltak, amelyek a szilícium-alkoxid (tetraetoxiszilán, TEOS) polimerizációját / polikondenzációját katalizálják poliszilikáttá, amorf szilikaszálakat képezve kíméletes körülmények között (alacsony hőmérséklet, fiziológiai pH.) [20,21].

E. coli BL21AI módosított sejtekben szilikatein rekombináns fehérje termelődik, amelynek hatására megfelelő körülmények között polisziliká-háló képződik, lehetővé téve a sejtek fiziológiai körülmények között való rögzítését STO szenzor felületén.

3. CÉLKITŰZÉS

Az OWLS és az EC-OWLS technika fejlesztése és alkalmazási területének kibővítése érdekében végzett sokoldalú hazai (OTKA, NKFP, BIOTECH, GVOP) és nemzetközi együttműködés (EU5, FP7, Tét) keretében a szenzor felületének kémiai módosítását, immun- és mikrobiális szenzorok fejlesztését tűztük ki célul.

- A biomolekulák immobilizálásának elősegítésére APTS és GOPS reagenssel módosított szenzorokat készítettünk, kidolgoztuk a rögzítési eljárást.

Immunszenzorokat fejlesztettünk ki gabona-, élelmiszer- és környezeti minták kis koncentrációban előforduló szennyezésének szelektív és érzékeny kimutatására:

- Trifluralin növényvédőszer-maradvány kimutatására felszíni vizekből és gyümölcsleiből.
- Mikotoxinok kimutatására, ezen belül zearalenon kimutatására kukoricából, aflatoxin meghatározására gabonákból és fűszerpaprikából, ochratoxin meghatározására gabonákból és vörösborból, deoxinivalenol kimutatására búzából.
- Hisztamin szelektív vizsgálatára fermentált zöldséglevelekből.
- Az endokrin zavaró anyagok biomarkerének, a vitellogenin fehérjének pontyban és vöröshasú unkában történő meghatározására.

Mikrobiológiai vizsgálataink során:

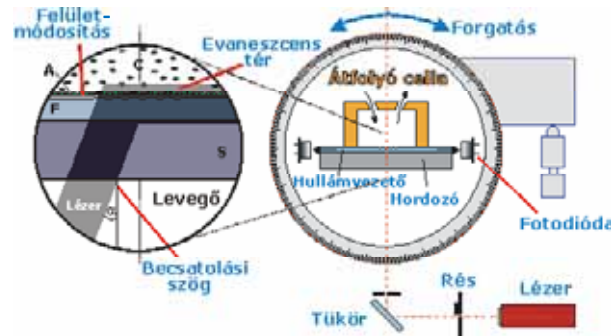
- *E. coli*-sejtek szelektív vizsgálatára immunszenzoros eljárást dolgoztunk ki, vizsgáltuk az élő és a hőkezeléssel elpusztított sejtek jele közötti különbséget.
- Mikrobiális szenzorokat fejlesztettünk EC-OWLS technikával *Lactobacillus plantarum* 2142 sejtek (LAB) sejtekben különböző kémiai stresszhatások vizsgálatára.
- Bioszilika keletkezését és kötődését vizsgáltuk az OWLS szenzoron, meghatároztuk a szilikatein enzim látszólagos KM értékét.
- Anti-szilikatein antitesttel végzett immunvizsgálatokkal igazoltuk a szilikatein jelenlétét módosított *E. coli*-sejtek felszínén.

- Szilikatein termelő módosított *E. coli*-sejteket bioszilika segítségével rögzítve az STO szenzoron mikrobiális szenzort készítettünk, és különböző gátló szerek hatását vizsgáltuk.

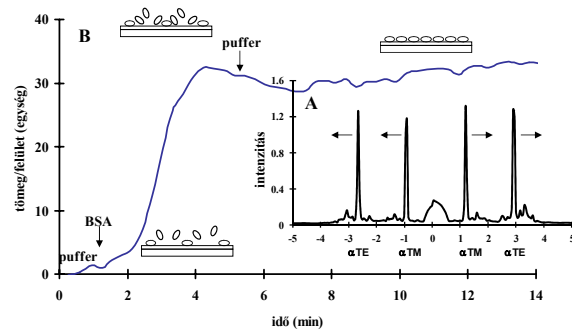
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS)

Az OWLS technika alapja az integrált optikai hullámvezető szenzor, amely két rétegből áll: az alsó üveghordozó felületén vékony, nagy törésmutatójú szilícium-oxid – titán-oxid (STO) réteget alakítanak ki (1. ábra). Ebben a rétegben található az aktív becsatoló rács. A szenzort a mérőberendezés mintatartó átfolyó cellájába helyezzük. A mérőműszer a He-Ne fényforrás által kibocsátott lézersugarat ($\lambda = 632,8$ nm) prizma és tükrök segítségével s és p síkban polarizált transzverz elektromos (TE) és mágneses (TM) módusra bontja, alulról felfelé az üveghordozó irányából a rácsra irányítja. A szenzort tengelye mentén kis szögtartományban ($\pm 10^\circ$) forgatva a lézernyaláb felett, a fény a rácson megtörik, illetve szóródik, és meghatározott szögértékeknél – az ún. becsatolási szögnél – belép a hullámvezetőbe, ahol teljes visszaverődések sorozatával terjed. A fény hullámvezetőbe történő becsatolása erősen függ a szenzor felett elhelyezkedő anyag törésmutatójától, a szenzor a jellemző becsatolási szög megváltozásával érzékenyen reagál a határfelületen történő változásokra. A becsatolt fény intenzitását a chip két végén elhelyezett fotodiódákkal detektáljuk. A pillanatnyi becsatolási szögeket mechanikus goniométerrel lehet meghatározni, 10^{-4} fok szögfelbontással mérhetők. A pillanatnyi becsatolási szögek helyét (értékét) az intenzitás spektrum mutatja (2. A ábra). A jel felbontása az effektív törésmutatóra vonatkoztatva $\Delta N \sim 10^{-6}$. A fény mindkét síkban poláros módusának számított effektív törésmutatójából megkapjuk a hullámvezető felszínén a folyamatosan áramló oldatból megkötődött molekulák (pl. fehérjék) réteg vastagságát, illetve a felületi borítottságot (ng/cm^2 , 2. B ábra). Az intenzitás spektrumok alapján mért becsatolási szögek időbeli változása alapján kapjuk a mérési görbét [22-24].



1. ábra Az OWLS berendezés működési sémája



2. ábra A hullámvezető felszínén a megkötődött réteg vastagságának, felületi borítottságának ábrázolása a lézertény beesési szögének függvényében

(A (inzert) – adott *chip*-re jellemző pillanatnyi intenzitáspektrum,

α_{TE} — transzverz elektromos fénymódus becsatolási szöge,

α_{TM} – transzverz mágneses fénymódus becsatolási szöge,

B – a hullámvezető felszínén a megkötődött réteg vastagságának időbeli alakulása)

Az optikai hullámvezető fénymódus-spektroszkópiát új szenzorral bővítve lehetővé vált a szenzor felületén végbemenő folyamatok elektrokémiai vizsgálata is (EC-OWLS). A szenzor felszínét borító

hullámvezető réteget indium-oxid – ón-oxidból (ITO) készítve az optikai szenzornak megfelelően nagy a törésmutatója, ugyanakkor elektromosan vezető réteg készíthető, ezt alkalmazzuk munkaelektrodként. Az elektrokémiai átfolyó cellában az ITO-munkaelektrod mellett a Pt-referencia- és az Ag-segédelektrod teszi lehetővé az elektrokémiai vizsgálatokat [25,26].

Munkánk során a MikroVákuum Kft. által gyártott berendezéssel (OWLS 120) dolgoztunk, az eredmények kiértékeléséhez BioSense 2.6. programot alkalmaztuk.

4.2. Immunizálás, antitestek előállítása, tisztítása

Az adott antigénre specifikus nyúlserumot fejlesztettünk vadas nyúlban történő immunizálással, Harboe és Inglid [27] módszerét adaptálva. Az immunizálást a KÉKI Biológia Osztályán működő Állatházban végeztük. Az immunizálás kis molekulatömegű antigén esetén az antigén konjugátumával történt. Az alapimmunizálás Freund-komplett adjuvánnal, míg az emlékeztető immunizálások Freund-inkomplett adjuvánnal történtek. A kapott immunszérumokat antitestkicsapásos módszerrel IgG-re tisztítottuk. A tisztított szérum egy részét liofilizáltuk, másik részét mélyhűtőben tároltuk.

4.3. Minták

Trifluralin meghatározása

A felszíni vízmintát a Keleti Főcsatornából vettük 2001. július 18-án. Az almalé és kivilé kereskedelmi forgalomból származott.

Zearalenon meghatározása

A zearalenonmentes kukorica-vetőmagokat Labmill típusú darálóval 1/60 szitaméretet alkalmazva ledaráltuk, majd az őrleményt különböző mennyiségű zearalenonstandarddal mesterségesen szennyeztünk (spike) 0,01-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ koncentrációtartományban.

Aflatoxin meghatározása

Az aflatoxinmentes búza- és árpamintából mesterséges szennyezéssel koncentrációsort készítettünk a kalibrációs görbe elkészítéséhez (0,001-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Kereskedelmi fűszerpaprika minták aflatoxintartalmát vizsgáltuk. A mátrixhatás kiküszöbölésére az aflatoxinstandardokat igazoltan tiszta mintába mesterségesen szennyezve (1-100 µg/kg) készítettünk kalibrációs görbét a 4.3.2. szerint.

Ochratoxin meghatározása

Az ochratoxin A-mentes búza- és árpamintából mesterséges szennyezéssel koncentrációsort készítettünk (0,001-100 µg/kg).

Vörösborok ochratoxin A-szennyezettségének vizsgálatához 3 különböző kereskedelmi bormintát alkalmaztunk. A borokba 0,1-100 ng/l koncentrációjú ochratoxin A standardot mesterségesen szennyeztünk (spike).

DON meghatározása

GC-MS módszerrel ellenőrzött (LOD: 0,01 mg/kg), DON-mentes búzalisztet mesterségesen szennyeztünk (spike) 0-100 mg/kg DON tartományban.

Hisztamin meghatározása

Savanyú káposzta, kovászos uborka, csalamádé levét használtuk fel a mérésekhez. A fermentált zöldséglevet (sárgarépalé) a BCE Élelmiszer-tudományi Kar Sör- és Szeszipari Tanszékéről kaptuk.

Vitellogenin meghatározása

A hím és nőstény pontyok (*Cyprinus carpio*) az Aranyponty Zrt. (Rácegres, Rétimajor) ökológiai halgazdaságból származtak.

Tekintettel arra, hogy minden hazai békafaj védett, ezért a Természetvédelmi Felügyelőség engedélye alapján a természetből begyűjtött petecsomókból laboratóriumi tenyészetben neveltünk vöröshasú unkat (*Bombina bombina*).

***E. coli*-sejtek kimutatása**

E. coli (NCAIM B.00200) -sejtek szaporításához ferde agarról 1 kacsnyi sejttel beoltottuk az LB-táplevest, majd 37 °C-on 24 órás rázatott tenyészetet készítettünk.

LAB-sejtek alkalmazása

Lactobacillus plantarum 2142-sejtek szaporításához MRS táplevesbe 1% sejtuszpenziót adtunk és 30 °C-on 24 órás rázatott tenyészetet készítettünk (rázógépből, sebesség 100 fordulat/perc).

Rekombináns *E. coli* BL21AI -sejtek alkalmazása

A rekombináns *E. coli* BL21AI-sejteket, a rekombináns α-szilikatein enzimet (24 mg/ml), valamint az anti-szilikatein antitestet a NanotecMARIN GmbH (Mainz, Germany) bocsátotta rendelkezésünkre. A rekombináns *E. coli* BL21AI-sejteket 10 µg/ml ampicillintartalmú LB ferde agarra 1-1,5 havonta átoltva tartottuk fenn.

4.4. Az alkalmazott matematikai statisztikai módszerek

Az eredmények ábrázolásához, valamint statisztikai értékeléséhez az EXCEL (Microsoft Office professional Edition 2003) és az ORIGIN Scientific Graphing and Analysis Software (version 7) statisztikai programot alkalmaztuk. Az eredmények összehasonlításához a Student-féle kétmintás t-próbát alkalmaztuk, az átlagértékek közötti különbségeket $p < 0,05$ szignifikanciaszinten vizsgáltuk.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az értekezésben összefoglalt eredmények, amelyek sokrétű hazai és nemzetközi együttműködések keretében jöttek létre, bizonyítják, hogy az OWLS technika igen sokoldalúan alkalmazható mind immunszenzorok, mind mikrobiális szenzorok fejlesztésére. A folyamatosan áramló mérő rendszer kialakítását követően az STO felületű szenzorok módosítására eljárásokat dolgoztunk ki, amelyek lehetővé tették az immunszenzorok kialakítását, az adott célvegyület meghatározásához szükséges biomolekulák rögzítését. Ezen szenzorokkal elsősorban kismolekulájú szennyezőanyagok (növényvédő szerek, mikotoxinok, biogén aminok) kimutatására, valamint a biomarkernek tekinthető vitellogenin fehérje meghatározására alkalmas eljárásokat dolgoztunk ki. Kísérleteink során ugyan minden esetben a szenzorfejlesztés volt a fő célunk,

azonban minden új célvegyület meghatározására kialakított eljárás kidolgozása egyedi problémákat vetett fel. Megállapítható, hogy szelektivitás tekintetében eredményeink megfelelnek a versengő ELISA módszerek szelektivitásának, a kimutatási határ azonban több nagyságrenddel alacsonyabb, mint a hasonló biológiai, biokémiai rendszert alkalmazó eljárásé, egyszerű mintaelőkészítési eljárásokat alkalmazva gyors mérési / monitorozási lehetőség biztosítható.

Az elektrokémiai (EC)-OWLS mérés technika lehetőségeit kihasználva mikrobiális szenzorokat fejlesztettünk probiotikus sejteket rögzítve az ITO szenzorok felületén és kémiai stresszfaktorok hatását vizsgáltuk.

Bioszilika képződésének segítségével *E. coli* BL21AI-sejtek újszerű rögzítésével fejlesztettünk ki inhibíciós szenzort szennyező anyagok sejtekre gyakorolt gátló hatásának vizsgálatára.

Az új mérési módszerek felhasználhatóságát lehetőség szerint valós minták vizsgálatával igazoltuk, és ezen eredményeket referenciaeljárásokkal nyert adatokkal hasonlítottuk össze.

5.1. Immunszenzorok fejlesztése és analitikai alkalmazása

5.1.1. Szenzor felületének módosítása laboratóriumi és kisüzemi körülmények között

Mivel a hullámvezető szenzor felületén a hidroxilcsoportok nem alkalmasak a biomolekulák közvetlen rögzítésére, a felületet kémiaileg módosítani kell. Így szilanizálással lehet különböző funkciós csoportokat biztosítani, amihez már megfelelő kémiai lépésekkel rögzíthetőek a biomolekulák. Szilanizálási kísérleteket végeztünk vizes vagy szerves oldószeres oldatban, illetve gőzölögtetéssel. A szilanizálással kapcsolatos eredményeinket Trummer és mtsai (2001), Levkovets és mtsai (2004) valamint Székács és mtsai (2009) közleményekben foglaltuk össze.

Új tudományos eredmények:

A szenzor időben állandó, stabil működésének érdekében folyamatosan áramló injektálós rendszert állítottunk össze. Biomolekulák rögzítésére alkalmas amino- és epoxicsoportokat tartalmazó szenzorfelületet alakítottunk ki a szilanizálási eljárás

optimalizálásával laboratóriumi körülmények között. Vizsgáltuk a vákuumszilanizálással készített szenzorok alkalmazhatóságát a különböző rögzítési eljárások során. Az aminocsoportokat hordozó hullámvezetőn glutáraldehiddel (2,5%) közvetlenül rögzítettük a biomolekulákat, illetve borostyánkősav anhidriddel (0,2%) karboxilcsoporttá alakítva, az 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimid (EDC), valamint az N-hidroxi-szukcinimidet (NHS) reagensek összetételét optimalizálva (0,4 mol/l EDC / 0,1 mol/l NHS; 1:1) immobilizáltuk a fehérjemolekulákat. Az epoxicsoportokat hordozó szenzoron közvetlenül lúgos közegben (pH=9,5) rögzítettük a biomolekulákat.

5.1.2. Immunszenzor fejlesztése trifluralin meghatározására

A trifluralin a mezőgazdaságban rendszeresen alkalmazott gyomirtó szer-hatóanyag, amely vegyületről a széleskörű biológiai vizsgálatok során kimutatták, hogy kis koncentrációban endokrin zavaró hatást okoz a vízi élőhelyeken élő állatokban. Ezért volt indokolt, hogy a trifluralin kimutatására szelektív, nagy érzékenységű immunszenzoros mérési eljárást fejlesszünk ki, melynek eredményeit Székács és mtsai (2003), Levkovets és mtsai (2004), Székács és mtsai (2009) közleményekben publikáltuk.

Új tudományos eredmények:

Versengő immunszenzort fejlesztettük ki trifluralin növényvédőszer-maradvány meghatározására felszíni vizekből, valamint gyümölcslevekből. A trifluralin növényvédőszer-hatóanyag kimutatására a célvegyületből haptént, konjugátumokat és ellenanyagot készítettünk. Az optimalizált működési paraméterek mellett a TRIS puffer oldatban (42 mmol/dm³, pH 7,4) mért kalibrációs görbe alapján a szenzor gátlási középértéke (IC₅₀) 1,05x10⁻⁶±0,52x10⁻⁶ ng/ml-nek adódott, ami több nagyságrenddel kisebb, mint ELISA módszerrel (2,87±0,39 ng/ml) mérve. Felszíni víz és gyümölcslevek vizsgálatánál az immunszenzorról mért eredmények megfeleltek az ELISA és GS-MS referenciamódszerrel mért értékeknek a független kétmintás t-próba alapján P<0,05 szignifikanciaszinten.

5.1.3. Immunszenzor fejlesztése zearalenon meghatározására

A zearalenon (ZON) a *Fusarium*-gombák által felületi fertőzősként kerül a gabonákra, és nem megfelelő tárolás során a termelt toxin mennyisége növekszik. Ezért vált szükségessé a gyors, jelölésmentes immunszenzor fejlesztése, aminek eredményeiről a Székács és mtsai (2009) közleményben számoltunk be.

Új tudományos eredmények:

Sikeresen fejlesztettük ki jelölésmentes kompetitív immunszenzort zearalenon meghatározására. A zearalenonból haptént, majd BSA és ConA fehérjékhez kötve konjugátumokat készítettünk. A ConA-t tartalmazó konjugátummal antitestet termeltettünk, majd a megfelelően tisztított biomolekulákkal immunszenzort alakítottunk ki. Az aminosoportokat hordozó felületen készített szenzorral 10^{-2} - 10^1 pg/ml ZON-koncentráció között találtuk a dinamikus méréstartományt, míg a detektálás alsó határa 5×10^{-3} pg/ml ZON értékűnek adódott. A karboxilcsoportokat tartalmazó szenzorral nyert immunszenzor dinamikus méréstartománya 10^{-2} - 10^2 pg/ml közé esett, a detektálás alsó határa 2×10^{-3} pg/ml ZON. Az optimalizált mérési eljárással mesterségesen szennyezett (*spike*) kukoricamintákat mérve a gátlási középérték (IC_{50}) $0,053 \pm 0,013$ pg/ml értékűnek adódott, míg az ELISA mérésnél meghatározható IC_{50} értéke $2,04 \pm 0,66$ ng/ml volt. A kukoricaminták immunszenzorral mért eredményei valamint az ELISA referenciamódszerrel mért értékek között független kétmintás t-próba alapján $P < 0,05$ szignifikanciaszinten nincs szignifikáns különbség.

5.1.4. Immunszenzor fejlesztése aflatoxin meghatározására

A módosított felületű szenzorokra alapozva eljárást dolgoztunk ki az *Aspergillus flavus* által termelt aflatoxin B1 toxin versengő és nem versengő immunanalitikai kimutatására. Méréseinkhez monoklonális antitestet (1G7-1E2) alkalmaztunk. Eredményeinket az Adányi és mtsai (2007) tudományos publikációban foglaltuk össze.

Új tudományos eredmények:

Versengő immunszenzort fejlesztettük ki aflatoxin B1 mikotoxin meghatározására búza, árpa- és fűszerpaprika-mintákból. Az

optimalizált mérési eljárást alkalmazva $0,001$ - 1 ng/ml tartományban kaptuk a dinamikus méréstartományt, a gátlási középérték (IC_{50}) $0,023 \pm 0,009$ ng/ml (χ^2 /szabadsági fok: $1,14$, R^2 : $0,99$), a detektálás alsó határa $0,0005$ ng/ml értékűnek adódott. A búza-, árpa- és fűszerpaprika-minták vizsgálatánál az immunszenzorral mért eredmények független kétmintás t-próba alapján $P < 0,05$ szignifikanciaszinten megfeleltek az ELISA referenciamódszerrel mért értékeknek.

5.1.5. Immunszenzor fejlesztése ochratoxin meghatározására

A *Penicillium* és *Aspergillus* nemzetségekbe tartozó gombafajok által termelt mikotoxin, az ochratoxin A meghatározására immunszenzoros kimutatási eljárást dolgoztunk ki anti-ochratoxin A monoklonális antitest (AF-12) alkalmazásával. Eredményeinket az Adányi és mtsai (2007) tudományos publikációban foglaltuk össze.

Új tudományos eredmények:

Versengő immunszenzort fejlesztettük ki ochratoxin A meghatározására búza-, árpa- és vörösbormintákból. Az optimalizált mérési eljárást alkalmazva a dinamikus méréstartományt $0,5$ - 10 ng/ml között kaptuk, a gátlási középértéket (IC_{50}) $2,01 \pm 0,47$ ng/ml (χ^2 /szabadsági fok= $0,093$; $R^2=0,983$), a detektálás alsó határát $0,1$ ng/ml értékűnek találtuk. A búza-, árpa- és vörösborminták vizsgálatánál az immunszenzorral mért eredmények független kétmintás t-próba alapján $P < 0,05$ szignifikanciaszinten megfeleltek az ELISA referenciamódszerrel mért értékeknek.

5.1.6. Immunszenzor fejlesztése deoxinivalenol meghatározására

A búzán a szemek üszkösödését, kukoricában a kalász rothadását okozó, a *F. graminearum* és a *F. culmorum* gombák termelte deoxinivalenol (DON) kimutatására nagyérzékenységű, szelektív immunszenzoros mérési módszer kifejlesztésére került sor. Az eljárást és az eredményeket a Majer-Baranyi és mtsai (2011) tudományos közleményben ismertettük.

Új tudományos eredmények:

Sikeresen dolgoztunk ki búza deoxinivalenol-tartalmának meghatározására szelektív immunszenzoros mérési eljárást. A DON mikotoxinból nátrium-perjodátos kezelés után konjugátumot készítettünk OVA és BSA alkalmazásával. A DON-OVA konjugátum segítségével poliklonális antitestet készítettünk. A biomolekulák alkalmazásával fejlesztettük ki a versengő immunszenzort. A DON-standardokat vizsgálva a dinamikus méréstartomány 0,005-50 ng/ml, a gátlási középérték (IC_{50}) $0,15 \pm 0,08$ ng/ml (χ^2 /szabadsági fok=1,57, $r^2=0,99$), a kimutatás alsó határa 0,001 ng/ml értékűnek adódott. A deoxinivalenollal adalékolt búzalisztmintákkal nyert kalibrációs görbe alapján a dinamikus méréstartomány a lisztmintára számolva 0,01-10 mg/kg volt, a gátlási középérték (IC_{50}) $0,13 \pm 0,04$ mg/kg értékűnek adódott, ami megfelel az előírásokban foglalt követelményeknek.

5.1.7. Hisztamin meghatározására szolgáló immunszenzor fejlesztése

A fermentált zöldségvekben megjelenő biogén aminok meghatározására alkalmas immunszenzort fejlesztettünk ki. Az optimalizált mérési eljárásról és a zöldségvek mérési eredményeiről az Adányi és mtsai (2012) publikációban számoltunk be.

Új tudományos eredmények:

Nagy érzékenységű, jelölésmentes immunszenzort fejlesztettünk ki fermentált zöldségvek hisztaminkoncentrációjának gyors meghatározására. A versengő immunszenzor kialakításához a célvegyület BSA-konjugátumát készítettük el és rögzítettük a szenzor felületén. A kifejlesztett eljárással a dinamikus méréstartomány 10^{-2} -1 pg/ml közé esett, a gátlási középérték (IC_{50}) $0,08 \pm 0,02$ pg/ml (szigmoid illesztés, χ^2 /szabadsági fok=0,19), a kimutatás alsó határa 0,005 pg/ml értékűnek adódott. Fermentált zöldségvekben lévő hisztamin koncentrációjának meghatározása során megállapítottuk, hogy ha az egyes biogén aminok (putreszcin, kadaverin, agmatin) a hisztaminnál lényegesen nagyobb koncentrációban vannak jelen, akkor ezek befolyásolják a szenzorral mért eredményeket. Bebizonyítottuk, hogy ha az adott biogén aminoknak a HPLC

módszerrel meghatározott koncentrációját az immunszenzorral mért keresztreakció %-ának arányában vettük figyelembe (normált HPLC értékek), akkor igen jó egyezést ($R^2=0,97$) kaptunk a fermentált zöldségvek különböző technikával mért biogén aminkoncentrációja között. Annak ellenére, hogy az immunszenzorral mért hisztaminkoncentrációt a különböző biogén aminok nagy koncentrációban való jelenléte befolyásolja, a szenzor gyors mérésre alkalmas, csak az adott határértéket meghaladó koncentrációt mutató mintákat kell további vizsgálatokba bevonni.

5.1.8. Immunszenzor fejlesztése vitellogenin meghatározására

A környezetet szennyező szermaradványok egy része az élőlények hormonális rendszerét károsító, ún. endokrin zavaró (ED) vegyületek közé tartozik, amelyek különböző mechanizmusokon keresztül megzavarhatják az egyes állatok hormonháztartását. Ennek a hatásnak a gyors, átfogó vizsgálatára alkalmas biomarker vegyületnek bizonyult a nemi működést befolyásoló vitellogenin (Vtg) fehérje, ezért immunszenzort fejlesztettünk hal (ponty, *Cyprinus carpio*) és kételtű (vöröshasú unka, *Bombina bombina*) Vtg kimutatására. Az eredményeket az Adányi és mtsai (2013c), valamint a Székács és mtsai (2009) tudományos közleményekben ismertettük.

Új tudományos eredmények:

Versengő immunszenzort fejlesztettünk ki OWLS detektálással hal (ponty, *Cyprinus carpio*) és béka (vöröshasú unka, *Bombina bombina*) vitellogenin fehérjéjének kimutatására. A Vtg fehérjével az azonos fajban 95% keresztreakciót mutató lipovitellin (Lpv) fehérje tisztítását nőstény ponty és keleti unka petefészkéből végeztük. A tisztított Lpv fehérjékkel nyulakat immunizálva antitesteket termeltettünk. A tisztított Lpv fehérjék és az antitestek alkalmazásával alakítottuk ki az immunszenzorokat. A ponty-Lpv dinamikus méréstartománya 3 és 150 ng/ml Lpv közé esett, a gátlási középérték (IC_{50}) $21,18 \pm 2,86$ ng/ml, a kimutatás alsó határa 0,7 ng/ml értékűnek adódott. A béka-Lpv fehérjét vizsgálva a dinamikus méréstartomány 0,5-10 ng/ml értékűnek adódott. Az Lpv kimutatásának alsó határára 0,1 mg/ml, míg a gátlási középértékre (IC_{50}) $1,04 \pm 0,14$ ng/ml értéket kaptunk. Ökológiai tenyésztésből

származó hím és nőstény pontyok vérszérumban vizsgáltuk a Vtg-szintet, eredményeink alapján a hím egyedek Vtg-szintje $0,5 \pm 0,3$, illetve $5,7 \pm 1,8$ $\mu\text{g/ml}$, a nőstény egyedekben $246,1 \pm 19,6$, $367,5 \pm 54,7$ és $465,4 \pm 46,9$ $\mu\text{g/ml}$ Vtg fehérjét mértünk az immunszenzorral. Nőstény és hím békaegyedek máj-, szív- és vér-, illetve ivarmirigy-preparátumából vizsgáltuk a természetes Vtg-szintet. A minták közül a legnagyobb koncentrációt – a várakozásnak megfelelően – a petefészkekben és a petében találtuk ($754,5 \pm 73,5$ és $1030,0 \pm 298,5$ $\mu\text{g/g}$). Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az immunszenzoros mérési eljárás alkalmas hal (ponty, *Cyprinus carpio*) és béka (vöröshasú unka, *Bombina bombina*) Vtg fehérjéjének kimutatására. A hím egyedekben mérhető Vtg-szint alapján monitorizni lehet a felszíni vizek, illetve vizes élőhelyek endokrin zavaró hatású szermaradványokkal való szennyezettségét.

5.2. Mikrobiális szenzorok fejlesztése és alkalmazása

A bioszenzoros fejlesztések terén nagy figyelem irányult a mikrobák kimutatására, valamint a baktériumok rögzítésével kialakított mikrobiális szenzorok alkalmazására is. Az élő sejtek rögzítését OWLS és EC-OWLS technikára alapozva vizsgáltuk, gátláson alapuló szenzorokat alakítottunk ki kémiai zavaró vegyületek *Lactobacillus*-sejtekre (LAB) gyakorolt hatásának kimutatására, *E. coli*-sejtek szelektív kimutatására immunszenzort, valamint bioszilika alapú rögzítési eljárással gátlási szenzort dolgoztunk ki szermaradványok gyors kimutatására.

5.2.1. Kémiai stresszfaktorok hatásának vizsgálata *Lactobacillus plantarum* 2142-sejteken

Fermentált savanyúságok készítéséhez különböző LAB-törzseket alkalmaznak, azonban a sejtek optimális működésének biztosítása érdekében vizsgálni kell, hogy az alkalmazott sejtek hogyan tolerálják a fermentáció során keletkező szerves savakat, hidrogén-peroxidot. E hatások tanulmányozására szenzort fejlesztettünk ki, amelyben az élő LAB-sejteket rögzítettük a szenzor felületére, ügyelve arra, hogy a rögzítés során a sejteket ne károsítsuk agresszív ágensek használatával. Eredményeinket az Adányi és mtsai (2006a) valamint a Németh és mtsai (2007) közleményekben ismertettük.

Új tudományos eredmények:

EC-OWLS technika alkalmazásával polarizáló potenciál (1 V) hatására natív *L. plantarum* 2142-sejtek rögzítését sikerült megvalósítani a szenzorcellában. A vizsgálatok bizonyították, hogy az élő és hőkezeléssel elpusztított sejtek megkülönböztethetőek, ha a minták azonos koncentrációjú sejtet tartalmaznak. A LAB-sejtek elektrokémiai cellában való rögzítése lehetővé tette a kémiai stresszt okozó vegyületek hatásának tanulmányozását. A különböző kémiai kezelések LAB-sejtek szaporodására kifejtett hatására EC-OWLS módszerrel kapott eredményeket referenciamódszerként mikro-assay eljárással hasonlítottuk össze. Az EC-OWLS mérések eredményei igazolták, hogy a *L. plantarum* 2142-sejtek szaporodásra a vizsgált stresszfaktorok közül legnagyobb hatása a 9 mmol/dm^3 hidrogén-peroxidnak és az 5 mol/dm^3 tejsavnak van.

5.2.2. *Escherichia coli* sejtek mennyiségének meghatározása immunszenzorral

E. coli B200 baktérium szelektív meghatározására immunszenzort fejlesztettünk ki és vizsgáltuk az élő és hőkezeléssel elpusztított sejtek mérésekor kapott jelek nagyságát OWLS detektálással. Az eredményeket az Adányi és mtsai (2006b), Szendrő és mtsai (2008), valamint a Szendrő és mtsai (2012) tudományos cikkekben ismertettük.

Új tudományos eredmények:

Eljárást dolgoztunk ki *E. coli*-sejtek koncentrációjának gyors meghatározására. Különbséget találtunk az élő és a hőkezeléssel elpusztított sejtek szenzoros jele között, a hőkezeléssel elpusztított sejtek szignifikánsan nagyobb jelet adtak azonos koncentrációban az élő sejteknél. Az élő sejtekkel a dinamikus méréstartomány 10^5 - 10^9 TKE/ml értékűnek adódott, a 10^9 TKE/ml töménységű minta esetében a jel nagysága $21,3 \pm 3,6$ egység. A hőkezeléssel elpusztított sejtek esetében a dinamikus méréstartományt 10^3 - 10^9 TKE/ml között találtuk, a 10^9 TKE/ml minta esetében a jel nagysága $33,8 \pm 4,5$ egység.

5.2.3. Bioszilika alapú immobilizálás valós idejű bioszenzorok fejlesztésére

Munkánk során szilícium-oxid-tartalmú szenzor felületén vizsgáltuk szilikatein enzim és tetra-etoxi-szilán (TEOS) jelenlétében a bioszilikaréteg kialakulását, majd a szilikateinnel módosított baktériumsejtek kíméletes körülmények között történő rögzítését. Az új eljárással rögzített *E. coli* BL21AI-sejteket mikrobiális szenzorként alkalmazva tanulmányoztuk a különböző szermaradvány és antibiotikum kimutatásának lehetőségét.

Korábbi eredmények igazolták, hogy az OWLS technika alkalmas az élő és hőkezeléssel elpusztított sejtek megkülönböztetésére, valamint a sejteket ITO-szenzor felületén rögzítve különböző stresszfaktorok mikrobákra gyakorolt hatását is tanulmányoztuk. Ennek a munkának mintegy folytatásaként új típusú mikrobiális bioszenzorokat fejlesztettünk, amelyeket szilikatein enzimmel katalizált bioszilika segítségével rögzítettünk. A rögzített sejtekkel felszíni vizekben és élelmiszerekben előforduló szennyező anyagok koncentrációját vizsgáltuk a gátló hatás alapján. Az eredményeket az Adányi és mtsai (2013a, 2013b) tudományos közleményekben ismertettük.

Új tudományos eredmények:

Bioszilika képződésének időbeli követését valósítottuk meg szilikatein enzim és TEOS monomer jelenlétében az OWLS szenzor szilícium-oxid –titán-oxid (STO) felületén. Meghatároztuk a szilikatein enzim látszólagos Michaelis-konstansát az STO-szenzoron való immobilizálásra / polimerizációra vonatkozóan. Az eredmények alapján beigazolódott, hogy a TEOS spontán polimerizációra hajlamos ($5,09 \times 10^{-12}$ mol/cm², 15°C). A hőmérséklet jelentősen befolyásolta a polimerizációt és az immobilizációt, különösen érdekesnek találtuk, hogy 25°C-on a látszólagos K_M ($1,02 \times 10^{-11}$ mol/cm²) kissé csökkent a 15°C-on mért értékhez ($1,62 \times 10^{-11}$ mol/cm²) képest. Az eredmények alapján a további kísérleteket minden esetben 15°C-on végeztük.

Anti-szilikatein antitestet rögzítve immunszenzorral igazoltuk, hogy a szilikatein enzim jelenléte kimutatható a rekombináns *E. coli*-sejtek felületén. Míg az *E. coli* B200-törzs esetében mindössze 2-5

tömegegységnyi jelet kaptunk, addig a rekombináns *E. coli* BL21AI-törzs esetében 20-35 tömegegységnyi jelet mértünk az injektált mikroba koncentrációjától függően.

TEOS reagenssel előkezelt *E. coli* BL21AI-sejteket alkalmazva vizsgáltuk a sejtkoncentráció függvényében a mért jelek nagyságát, azaz a szenzor felületén való kötődést. A 10^7 - 10^8 TKE/ml koncentrációjú oldat injektálásával a jelek exponenciálisan növekedtek, majd 10^8 TKE/ml sejtkoncentráció felett a jelek az adott körülmények között már nem nőttek tovább.

A módosított *E. coli* BL21AI alkalmazásával új típusú gátlási szenzorokat fejlesztettünk ki, majd a szenzorok gyakorlatban történő alkalmazhatóságát szennyezőanyagok, szermaradványok kimutatásával igazoltuk.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik irányították, a kezdetektől segítették kutatói fejlődésemet, kísérletes munkámat:

Dr. Váradi Mária egyetemi tanárnak,
aki oly sok éven át bízott bennem és támogatta a kutatásainkat,

a KÉKI korábbi **főigazgatóinak**, akik lehetővé tették a kutatási terület művelését,

Dr. Szendrő Istvánnak, a MikroVákuum Kft. ügyvezető igazgatójának, aki hosszú éveken keresztül biztosította és biztosítja a műszeres háttérrel a kísérletekhez, partnerünk volt számos kutatási projektben,

Prof. Dr. Székács Andrásnak, akivel közös pályázatok keretében alakítottunk ki gyümölcsöző szakmai kapcsolatot, és mint a KÉKI főigazgatója biztatott és támogatott a disszertáció elkészítésében,

a közvetlen kollégáimnak, **Trummer Nikolettának**, **Székács Innának**, **Majerné Baranyi Krisztinának**, **Bori Zsuzsannának**, akik lelkes közreműködése nélkül ez a sokirányú munka nem készülhetett volna el,

az **Intézet munkatársainak**, különösen a **Biológiai Osztályon**, a **Mikrobiológiai Osztályon** és nem utolsósorban az **Analitikai Osztályon** dolgozó kollégáknak, hogy számos esetben szakmai segítségével járultak hozzá az eredményekhez.

Köszönöm **férjemnek** és a **családomnak**, hogy elfogadták és támogatták szakmai érdeklődésemet, kutatói aktivitásomat.

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Adányi, N., Bori, Zs., Szendrő, I., Erdélyi, K., Wang, X., Schröder, H.C., Müller, W.E.G. (2013a) Biosilica-based immobilization strategy for label-free OWLS sensors. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 177, 1-7.

Adányi, N., Bori, Zs., Szendrő, I., Erdélyi, K., Wang, X., Schröder, H.C., Müller, W.E.G. (2013b) Bacterial sensors based on biosilica immobilization for label-free OWLS detection. *New Biotechnology* Available online 4 February 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2013.01.006>

Adányi, N., Levkovets, I.A., Rodriguez, G.S., Ronald, A., Váradi, M., Szendrő, I. (2007) Development of immunosensor based on owls technique for determining aflatoxin B1 and ochratoxin A. *Biosens. Bioelectron.*, 22 (6) 797-802.

Adányi, N., Majer-Baranyi, K., Nagy, A., Németh, Gy., Szendrő, I., Székács A. (2013c) Optical waveguide light-mode spectroscopy immunosensor for detection of carp vitellogenin. *Sensor. Actuat. B-Chem.*, 176, 932-939.

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. *Anal. Chim. Acta*, 573, 41-47.

Adányi, N., Székács, I., Szendrő, I., Székács, A. (2012) Determination of histamine content in vegetable juices by using direct and competitive immunosensors. *Food and Agricultural Immunology*, <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09540105.2012.731686>

Adányi, N., Váradi, M., Kim, N., Szendrő, I. (2006b) Development of new immunosensors for determination of contaminants in food. *Curr. Appl. Phys.*, 6 (2) 279-286.

Levkovets, I., Adányi, N., Trummer, N., Váradi, M., Szendrő, I., Starodub, N.F., Székács, A. (2004) Development of optical (OWLS) immunosensors for macromolecules. *Biokémia*, XXVIII, 7-15.

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. *Eur. Food Res. Technol.*, 233 (6) 1041-1047.
- Németh, E., Adányi, N., Halász, A., Váradi, M., Szendrő, I. (2007) Real-time study of the effect of different stress factors on lactic acid bacteria by electrochemical optical waveguide lightmode spectroscopy. *Biomol. Eng.*, 24 (6) 631-637.
- Székács, A., Adányi, N., Székács, I., Majer-Baranyi, K., Szendrő, I. (2009) Optical waveguide light-mode spectroscopy immunosensors for environmental monitoring. *Appl. Optics*, 48 (4) 151-158.
- Székács, A., Trummer, N., Adányi, N., Váradi, M., Szendrő, I. (2003) Development of a non-labeled immunosensor for the herbicide trifluralin via OWLS detection. *Anal. Chim. Acta*, 487, 31-42.
- Szendrő, I., Erdélyi, K., Fábán, M., Puskás, Z., Adányi, N., Somogyi, K. (2008) Combination of the optical waveguide lightmode spectroscopy method with electrochemical measurements. *Thin Solid Films*, 516 (22) 8165-8169.
- Szendrő, I., Erdélyi, K., Puskás, Z., Fábán, M., Adányi, N., Somogyi, K. (2012) Development and experiments with conductive oxide nanofilm coated planar waveguide sensors. *Nanopages*, 7, (1) 17-24.
- Trummer, N., Adányi, N., Váradi, M., Szendrő, I. (2001) Modification of the surface of integrated optical wave-guide sensors for immunosensor applications. *FRESENIUS J. Anal. Chem.* 371 (1) 21-24.
5. Pleadin, J., Sokolović, M., Perši, N., *et al.* (2012) *Food Control*, 28 (1) 94.
6. Modrá, H., Svobodová, Z. (2009) *Interdisc. Toxicol.*, 2, 48.
7. Papadopoulou-Bourou, A., Vrabcheva, T., Valzacchi, S., *et al.* (2004) *Food Addit. Contam.*, 21, 607.
8. Schollenberger, M., Müller, H.M., Rühle, M., *et al.* (2005) *Int. J. Food Microbiol.*, 97, 317.
9. D'Mello, J.P.F., Placinta C.M., Macdonald A.M.C. (1999) *Anim. Feed Sci. Tech.*, 80, 183.
10. Schwelberger, H.G. (2009) *Inflamm. Res.*, 58, 51.
11. Zaman, M.Z., Abdulmir, A.S., Bakar, F.A., *et al.* (2009) *Am. J. Appl. Sci.*, 6, 1199.
12. Maintz, L., Novak, N. (2007) *Am. J. Clin. Nutr.*, 85, 1185.
13. Jansen, S.C., Dusseldorp, M., Bottema, K.C., *et al.* (2003) *Ann. Allerg. Asthma Im.*, 91, 233.
14. Maintz, L., Yu, C.F., Rodríguez, E., *et al.* (2011) *Allergy*, 66, 893.
15. Shalaby, A.R. (1996) *Food Res. Int.*, 29, 675.
16. Sumpter, J.P., Jobling, S. (1995) *Environ. Health Persp.*, 103, 173.
17. Wheeler, J.R., Gimeno, S., Crane, M., *et al.* (2005) *Toxicol. Mech. Method.*, 15, 293.
18. Corona-Izquierdo, F.P., Membrillo-Hernández, J. (2002) *Res. Microbiology*, 153, 181.
19. Fioramonti, J., Theodorou, V., Bueno, L. (2003) *Best Pract. Res. Cl. Ga.*, 17, 711.
20. Müller, WEG, Boreiko, A., Schlossmacher, U., *et al.* (2007) *Biomaterials*, 28, 4501.
21. Müller, WEG, Schröder, HC, Lorenz, B., Krasko, A., (2007) US Patent No. US 7,169,589 B2
22. Nellen, P.M., Lukosz, W. (1990) *Sensor. Actuat. B-Chem*, 1, 592.
23. Tiefenthaler, K., Lukosz, W., (1989). US Patent No. 4,815,843
24. Erdélyi, K., Frutos, A.G., Ramsden, J.J., *et al.* (2008) DOI 10.1002/9780470061565.hbb056
25. Brusatori, M.A., Van Tassel, P.R. (2003) *Biosens. Bioelectron.*, 18, 1269.
26. Vörös, J., Ramsden, J.J., Csúcs, G., *et al.* (2002) *Biomaterials*, 23, 3699.
27. Harboe, N., Inglied, A. (1973) *Scand. J. Immunol., Suppl* 1., 161.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Byrd, R.A., Markham, J.K., Emmerson, J.L. (1995) *Fundam. Appl. Toxicol.*, 26, 181.
2. Gunier, R.B., Harnly, M.E., Reynolds, R., *et al.* (2001) *Environ. Health Persp.*, 109, 1018.
3. Commission of the European Communities, COM (2001) 262.
4. Sohár, P.; Varga, I. (2003) In: *Élelmiszerbiztonság és táplálkozásegészségügy.* (Rodler, I., Ed.), OKK OÉTI, Budapest. pp. 215.