



Élelmiszertudományi Kar

Glutamát, Na-laktát, pH és NaCl kombinált hatásának vizsgálata a *Listeria monocytogenes* növekedésére

TDK dolgozat

Pivarcsi Edina

I. évf. MSc hallgató



Dolgozat készítésének helye:

Mikrobiológiai és Biotechnológia Tanszék
Sör és Szeszipari Tanszék

Témavezető(k):

Dr. Nguyen Duc Quang

egyetemi docens

Dr. Kiskó Gabriella

egyetemi docens

TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0005

TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0023

**Budapest
2012.**

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	1
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	3
2.1.1	Történeti áttekintés	3
2.1.2	A patogén általános jellemzése.....	4
2.2	Liszteriózis	4
2.2.1	Élelmiszeripari jelentősége	6
2.2.2	Szabályozása.....	7
2.3	Stressz hatások.....	7
2.3.1	A hőmérséklet hatása	8
2.3.2	Vízaktivitás hatása	9
2.3.3	A pH hatása	9
2.3.4	A NaCl hatása.....	10
2.3.5	A Na-laktát hatása.....	11
2.3.6	A Na-Glutamát hatása.....	12
2.4	Gát technológia.....	13
3	CÉLKITŰZÉS	15
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
4.1	Felhasznált <i>Listeria monocytogenes</i> törzsek:	16
4.2	Tápközegek.....	16
4.3	A Hatásfelületi analízis	17
4.4	A kísérlet leírása	18
4.5	Hatásfelületi analízis	19
5	EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	21
5.1	A baktérium szaporodása	21
5.2	A hatásfelület analízis eredményei	26
5.2.1	A C1 törzs.....	26
5.2.2	A H10 törzs	29
6	ÖSSZEFOGLALÁS	33
7	IRODALOMJEGYZÉK	35

„Végtelen számú kísérlet sem bizonyíthatja, hogy igazam van, de egyetlen kísérlet is bizonyíthatja, hogy tévedtem.” (Albert Einstein)

1 BEVEZETÉS

Az évek folyamán egyre nagyobb jelentősége van az élelmiszerbiztonságnak, központi kérdéssé vált a fogyasztók védelme. Folyamatosan újabb és újabb probléma megoldásával áll szemben az ipar. Új módszereket fejlesztenek ki a mikrobák hatékony visszaszorítására, majd egy újabb élelmiszer előállítási technológia jelenik meg, és az eddig alkalmazott eljárás már nem hatásos. Az új tulajdonságú kórokozók alkalmazkodnak a megváltozott körülményekhez. Egyre több olyan eredetű megbetegedés következik be, amelyekért ezek a baktériumok a felelősek. A WHO adatai szerint nem csak a fejlődő országokban jelent ez problémát, hanem a fejlett ipari országokban is évente 10-30% közé tehető az élelmiszerfertőzés okozta megbetegedések aránya.

A fogyasztó számtalan termék közül választhat a piacon, és ebben a versengő helyzetben az előállítóknak teljesíteniük kell az egyes, mára már alap követelménynek számító elvárásokat. Többek között, hogy az élelmiszer friss legyen, természetes, minél kevesebb tartósítószerrel és 'E' számmal jelölt komponenst tartalmazzon, ugyanakkor sokáig eltartható, íze és színe az ételre jellemző, és nem utolsó sorban minőségében kifogástalan állapotú. Az élelmiszer minőség számtalan befolyásoló tényező eredménye, így fizikai, biokémiai és mikrobiológiai jellemzőké. Amikor ezek által az össz pozitív hatás elmarad, a fogyasztó is elveszti a bizalmát a termék iránt. Egyes mikrobák jelenléte az élelmiszerben hozzájárul azok minőségének megóvásához. Mások azonban káros tevékenységük révén rontják a termék élvezeti értékét. A fogyasztók és az ipar is azt várja el a tudománytól, hogy élelmiszereink gyártásakor, olyan módszereket alkalmazzanak, amelyekkel megakadályozzák a patogének túlélését az élelmiszereinkbe. Ezek elkerülésére, vagy legalább megelőzése érdekében alkalmazandó a Jó Gyártási Gyakorlat (GMP) és a Veszélyelemzés és kritikus szabályozási pontok rendszerének működtetése, vagyis a HACCP az élelmiszerek gyártásakor.

A *Listeria monocytogenes* patogén baktérium, ami számos élelmiszer eredetű fertőzés okozója volt az elmúlt évtizedekben. Az általa okozott betegséget liszteriózisnak nevezzük, ami súlyos szövődményekkel, és 20-30%-ban halálos kimenetellel is végződhet. A *Listeria monocytogenes* nagyon ellenálló baktérium. A fertőzés elkerülésére az ipar sok kutatást végez, hiszen fontos, hogy élelmiszereink gyártásakor olyan módszereket alkalmazzanak, melyek teljesen kizárják a *Listéria*-t, vagy számát a megengedett szint alá csökkentse. Az USA-ban a *Listeria* fertőzöttség miatt visszahívott termékek visszahívási költségei a gyártóknak évente 1,2 és 2,4

billión dollár közötti összegre tehető veszteséget okoznak (Ivanek et al., 2004). A liszteriózissal fertőzött betegek kezelése pedig 2,3 billió dollár hozzávetőlegesen.

TDK dolgozatom célja, hogy az egyes faktorok különböző *Listeria monocytogenes* törzsek szaporodására gyakorolt hatásait a pH, a NaCl, a Na-laktát és Na-glutamát függvényében vizsgáljam. Valamint a kapott szaporodási görbék és hatásfelületek segítségével meghatározni a baktériumra gátló hatást kifejtő pH, NaCl, Na-laktát és Na-glutamát koncentrációkat.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 *Listeria monocytogenes*

2.1.1 Történeti áttekintés

A svéd Hülphers 1911-ben felfigyelt egy Gram pozitív baktériumra, ami olyan tüneteket okozott a betegekben, mint a később leírt *Listeria monocytogenes*. Hülphers a nyulak májában analizálta, ezért nevezte el *Bacillus hepatis*-nak, feljegyzései a *Listeria*-t jellemezte egyértelműen (Gray és Killinger, 1966). Az organizmus első konkrét leírása Murray és munkatársai nevéhez fűződik 1926-ban. Nyulakban és tengerimalacokban a mononukleózis kialakulását okozta, miszerint a monociták koncentrációja megnövekedett a vérben, ezért *Bacterium monocytogenes*-nek nevezték el. A korokozó rendszertani besorolása nehezebb volt, hiszen nem tudták egy akkor már ismert mikroorganizmussal sem kapcsolatba hozni, ezért a *Bacterium* csoportba sorolták (Murray et al., 1926). Dél-Afrikában Pirie 1926-ban futóegerek szokatlan pusztulását figyelte meg, a Tigris folyó betegség kórokozóját fedezte fel, és a mikroorganizmust *Listerella hepatolytica*-nak nevezte el. Pirie és Murray is elküldte eredményeit az új mikroorganizmusról a londoni Nemzeti Törzsgyűjteménybe. Az igazgató hasonlóságot vélte felfedezni a két eredmény között, így közös megegyezésre a *Listerella monocytogenes* nevet adták neki (Murray, 1963). Pirie javasolta, hogy Lord Lister angol sebész tiszteletére, – aki bevezette az antiszeptikumok alkalmazását, vagyis a sebészeti eszközök fertőtlenítését, ezáltal a műtétek utáni halálozások számát jelentősen csökkentette, – a mikroorganizmus neve legyen *Listeria monocytogenes* (Bíró, 1993).

A *Listeria* baktériumot emberből először 1929-ben Nyfeldt izolálta, aki a fertőző mononukleózis tüneteit három emberben is felfedezte. Gyakran állatokról terjedt a betegség emberre, és nemsokára már azt is felismerték, hogy újszülöttek szepszisének és meningitiszének okozza (Potel, 1952).

A patogénnel az 1980-as években kezdtek többen foglalkozni. Egy Új Skóciában kitört járvány során 41 esetből 14 halállal végződött, főleg terhes nőknél. Kimutatták, hogy a fertőzésért egy káposztasaláta volt a felelős, amit *Listeria*-val fertőzött trágyával kezeltek (Schlech et al., 1983).

2.1.2 A patogén általános jellemzése

A *Listeria monocytogenes* a *Listeria* nemzetségbe tartozik, ami a *Corynebacteriaceae* család tagja, az *Eubacteriales* rendből. A *Lactobacillus*okkal közelebbi rokonságot állapítottak meg (Farber és Peterkin, 2000). A *Listeria* nemzetségbe sorolható fajok a következők: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seegligeri*, valamint 2009-ben két új fajt azonosítottak a *L. marthii*-t és *L. rocourtiae*-t (Graves et al., 2010). Távoli rokonságba tarozik a *L. grayi* (Boerlin et al., 1991). Emberre veszélyességét csak a *L. monocytogenes*nél és *L. invanoviinál* állapították meg, az utóbbi igen ritka és inkább csak a kérődző állatoknál okoz megbetegedést (Orsi et al., 2011).

A *Listeria monocytogenes* Gram-pozitív, fakultatív anaerob, pálca alakú baktérium, ami széles hőmérsékleti tartományban képes szaporodásra, -1,5 és 45°C között (Hudson et al., 1994). Peritrich flagellumai segítik a mozgásban (egész sejtfelületét befedik), ami elég szűk hőmérsékleti tartományban jellemző, 20-25°C-on, azonban 37°C-on már nem kimutatható, mert csökken a flagellin termelődés (Dons et al., 1992). Tokkal és spórával nem rendelkezik (Lecuit, 2007).

A patogén nagymértékben tud alkalmazkodni a szélsőséges környezeti tényezőkhöz, így megél a 4,3-9,6-os pH-jú közegekben (Lou és Yousef, 1996; Farber és Peterkin, 1991), elviseli a 10%-os só koncentrációt (McClure et al., 1989). Az élelmiszerekben pedig akár 0,93 alatti vízaktivitási értéknél is szaporodik. Pszichrofil baktérium, a fagyasztást többnyire túléli. Ellenállása a stressz hatásokkal szemben azzal is magyarázható, hogy képes biofilmet képezni (Rieu et al., 2008).

Abban, hogy igen ellenállóan viselkedik a stressz hatásokkal, mint az alacsony és magas hőmérséklettel, alacsony pH-val, az etanollal és az oxidatív hatásokkal szemben, a σ^B faktor játszik fontos szerepet (Moorhead és Dykes, 2004; Ferreira et al., 2001). A σ^B hozzájárul a virulenciához azáltal, hogy közvetett vagy közvetlen módon szabályozza a *Listeria* virulencia génjét (Kazmierczak et al., 2003).

Széles körben elterjedt a környezetünkben, megtalálható a talajban, természetes vizekben és szennyvizekben. A fertőzött trágyával érintkező zöldségek is könnyen szennyeződhetnek. Előfordulnak az állatok beleiben, húgy- és ivarszerveiben, és tünetmentesen hordozhatják. Az állatokkal való érintkezés során pedig megfertőzhetnek bennünket. Főleg szárnyas, juh, sertés, szarvasmarha által és azok székletével terjed. Előfordulása főleg azoknál az embereknél magasabb, akik házi állatokkal napi érintkezésben vannak (McLauchlin et al., 2004).

2.2 Liszteriózis

A *Listeria monocytogenes* baktériummal szennyezett élelmiszer fogyasztása után kialakuló, súlyos tünetekkel járó betegséget hívjuk liszteriózisnak. E kórokozó élelmiszereinkben gyakran előfordul,

megbetegedést azonban csak nagyobb baktériumszám mellett okoz. Egészséges emberekben sokszor semmilyen tünetet nem vált ki a *Listeria*-val fertőzött élelmiszer fogyasztása. Jó ellenálló képességű felnőttek a fertőzést sokszor tünetmentesen vészelik át, nem betegszenek meg. Nagyobb veszélynek vannak kitéve a csecsemők, a hetvenévesnél idősebbek, a várandós nők, a legyengült immunrendszerűek, mint pl. az alkoholisták, AIDS fertőzöttek, cukorbeteg, kemoterápia alatt állók. A tünetek jelentkezhetnek már a fogyasztást követő napon, de akár egy hét is eltelhet, mire a panaszok megjelennek (McLauchlin et al., 2004). A halálozási arány igen magas 20-30 %-ra tehető (Rocourt, 1996; Ayaz és Erol, 2010). A baktérium 10^3 sejt/g felett okoz megbetegedést (Denny és McLauchlin, 2008). Hasonlít, és ezért könnyen összetéveszthető más élelmiszer-fertőzéssel. Általános tünetei a hányás, hasmenés és fejfájás. Súlyosabb esetben akár agyhártyagyulladást, agyvelőgyulladást, vérmérgezést, várandós nőknél pedig vetélést, koraszülést is okozhat (McLauchlin et al., 2004; Kiss et al., 2004). A magzatban súlyos fertőzés alakulhat ki. A humán liszteriózisok 40%-a magzatot és csecsemőt érint egyes adatok szerint, de az Európai Unióban inkább a felnőtteket és az időseket (EFSA, 2007).

Járványügyi adatok szerint egyes termékek, mint a ready-to-eat (RTE, fogyasztásra kész) élelmiszerek sokkal többször voltak a liszteriózis fertőzések okozói (Lianou és Sofos, 2007; Sofos, 2008). Ezek az élelmiszerek abban különböznek a többitől, hogy nem alkalmaznak speciális tartósítási eljárást, mint például hőkezelést, és tulajdonképpen azonnal fogyaszthatóak. Azért is nyújtanak ideális körülményeket a patogén számára, mert a kezdeti pH-juk magas (pH 6,2-6,4); vízáktivitásuk szintén magas (a_w 0,98-0,99) és alacsony, 2%-os só tartalommal jellemezhetők, valamint sokáig tartják alacsony, hűtési hőmérsékletek között. Abban az esetben, ha *Listeria monocytogenes* volt a hűtött termékben/en, az képes elszaporodni, mire fogyasztása kerül sor (Mataragas et al., 2010).

Az első nagyobb fertőzést Kanadában jelentették 1981-ben, amely fertőzött káposzta fogyasztását követően 40 megbetegedést okozott (Schlech et al., 1983). Az USA-ban pasztörözött tej okozott liszteriózist 1983-ban, 49 esetet jelentettek és 14-en haltak meg. Franciaországban 1992-ben, fogyasztásra kész disznóhús betegített meg 279 embert, melynek körülbelül 30%-a halálos kimenetelű volt. Olaszországban, 1997-ben fertőzött kukorica saláta betegített meg 1566 embert, amelyből 292-öt kórházban ápoltak (Aureli et al., 2000). Mead és társai (1999) azt becsülték, hogy hozzávetőlegesen 2500 klinikai liszteriózis esetből 500 halálos kimenetelű minden évben az Egyesült Államokban. Európában a liszteriózis esetek száma 2000 óta folyamatosan növekszik (Allerberger és Wagner, 2010). A betegség különösen a 65 év felettieket érinti. (European Commission, 2009). 2000 és 2007 között 3,3 eset jutott 1.000.000 lakosra (EFSA, 2007). Valószínű ennek a magas aránynak a fogyasztási szokások megváltozása is az okozója lehet (Swaminathan és Gerner-Smidt, 2007). Európában, 2006-ban az ötödik leggyakoribb betegséget okozó zoonotikus

mikroorganizmus volt (EFSA, 2007) RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) 2008-as adatok szerint a *L. monocytogenes* volt a Salmonella után a második legtöbb fertőzést okozó mikroorganizmus, a közel 80 bejelentés miatt. Főleg vörös hússal és baromfival volt összefüggésbe hozható (European Commission, 2009). Nagyobb méretű megbetegedést Kanadában jelentettek 2008-ban, 57 fertőzést, és 22 halálesetet, főleg időseket (átlag kor 76 év) érintett. A járványt egy ready-to-eat készítmény a Maple Leaf Foods cég hústermékei okozták. A fertőzés a termékekre a hússzeletelő gép által kerülhetett (Anonymus, 2009). Az EFSA 2011-es jelentése szerint 2009-ben az Európai Unióban 1645 liszteriózis esetet jelentettek (100.000 emberre 0,4 eset jutott) és 58,5%-ban a 65 év felettieket, 4,2%-ban pedig az egy év alatti gyermekeket érintette.

Nálunk a megbetegedések száma jóval kevesebb, mint a többi tagállamban. Magyarországon 1998 óta kötelező bejelenteni a betegséget. Azonban hazánkban a felismert esetek száma alul marad a többi EU-s országhoz képest, ugyanis nálunk sokkal ritkább a betegektől vett vér mikrobiológiai vizsgálata. 1998-ban 25 esetet jelentettek, míg 2000-ben csak 4-et, 2003-tól 2009-ig pedig nagyjából hasonlóak a számok, a megbetegedések száma 14 és 19 között mozog (OEK éves adatok). A Reál Élelmiszer Hungária Kft. 2010 áprilisában márkatermékében a Pick Szeged Zrt. által készített, szeletelt párizsiban és szeletelt sonkában megengedett határérték feletti *Listeria*-t találtak. Majd júniusban a ZIMBO Perbál Kft. által gyártott turista felvágottban találtak baktériumot (MÉBIH, 2010).

2.2.1 Élelmiszeripari jelentősége

Gyakran kimutatják az élelmiszer feldolgozás környezetében, különösen, ha az nedves és hűvös. Legtöbbször analizálták olyan élelmiszerekben, mint a főzött húsipari termékekben, füstölt halakban, vágott zöldségekben és a ready-to-eat termékekben, valamint nyers csirkében, tejben és húsokban (Roberts et al., 1996; Bell és Kyriakides, 2002).

A *Listeria* közvetítőjének sok esetben a baromfit jelölték meg (Ryser és Marth, 2007). RASFF jelentés szerint (1. táblázat), mely hat év adatait összesíti, a legtöbb esetben a halételekben fordult elő *Listeria monocytogenes*. Összesen 163 fertőzést regisztráltak. 2004-ben és 2005-ben igen magas, 40 feletti esetben találtak *Listeria*-s terméket. A második és harmadik leggyakoribb élelmiszer a lágú sajtok és vörös húsok voltak, 93 illetve 82 alkalommal. A baromfihús által 2004-ben 32 fertőzést jelentettek be, de ez a szám minimálisra csökkent az évek során.

1. táblázat: *Listeria* helyzet az Európai Unióban (MÉBIH, 2009)

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	Σ	%
Hal, halk.	43	51	9	14	11	35	163	40,4
Sajt (lágy)	21	22	11	5	22	12	93	23,1
Hús (vörös)	19	31	2	8	11	11	82	20,3
Baromfihús	32	1	1	5	2	3	44	10,9
Hidegkonyhai	3	6	0	2	1	1	13	3,2
Egyéb	2	1	0	1	1	3	8	2,0
Σ :	120	112	23	35	48	65	403	

2.2.2 Szabályozása

A *Listeria monocytogenes* megengedhető mennyiségére vonatkozó határértékeket a 1441/2007 EK rendelet foglalja magába. Csecsemőknek szánt fogyasztásra kész élelmiszerek, és speciális gyógyászati célra szánt, fogyasztásra kész élelmiszerek kritériuma 0/25 gramm a forgalomba hozott termék eltarthatósági ideje alatt (10 mintát vizsgálva zéró tolerancia mellett). A fogyasztásra kész élelmiszerek esetében (5 mintát vizsgálnak, zéró tolerancia mellett), ha a termék elősegíti a *Listeria monocytogenes* szaporodását, akkor 25 grammjában egyáltalán nem lehet baktérium mielőtt kikerül az előállító közvetlen ellenőrzése alól. Viszont, ha nem segíti elő a *Listeria monocytogenes* szaporodását, 100 TKE/gramm (telepképző egység) a határérték a forgalomba hozott termék eltarthatósági ideje alatt. Ekkor azonban az előállítónak igazolnia kell a hatóságnak, hogy az eltarthatósági idő alatt mindvégig a *Listeria monocytogenes* száma a határérték alatt marad a termékben. Azok a termékek, amelyek a $pH < 4,4$ vagy $a_w < 0,92$ paraméterekkel rendelkeznek, vagy a kettő kombinációjával $pH < 5,0$ és $a_w < 0,94$, illetve a fogyaszthatósági idő nem több mint 5 nap, ebbe a kategóriába sorolandók.

Rendszeres vizsgálat nem szükséges azoknál a termékeknél, amelyek a *Listeria*-t elpusztító (lisztericid) kezeléssel estek át, és ezután már nem fertőződhet meg (például végső csomagolásban hőkezelték).

Más a szabályozás az USA-ban és Olaszországban, az RTE élelmiszerek 25 grammjában egyetlen sejt sem lehet, tehát zéró tolerancia van a *Listeria monocytogenes*-re vonatkozóan. Kanadában, Dániában és Franciaországban 100 *L. monocytogenes* megengedett grammonként egyes élelmiszerekre, másokra pedig zéró tolerancia működik (ICMSF, 1994).

2.3 Stressz hatások

Amikor az élelmiszerben elszaporodnak a mikroorganizmusok, megváltoztatják annak élvezeti értékét, színét, állagát, illatát, esetleg káros anyagokat termelnek közben, például toxint. Ennek a folyamatnak a megakadályozása érdekében alkalmazzák a tartósítás különféle módszereit. Míg az

élelmiszer eredeti állapotát próbálják megőrizni, fontos, hogy minél kevesebbet veszítsenek az élvezeti értékükből. A tartósítás alapja, hogy olyan körülményeket alakítsanak ki, amik kedvezőtlenek a mikroorganizmusra, így szabályozható az élettevékenységük. A patogén baktériumok megpróbálnak alkalmazkodni az új feltételekhez, képesek olyan állapotot felvenni, mellyel a különböző környezeti stresszeket, mint a hőt vagy a hideget, túl tudják élni. Olyan védőfehérjéket termelnek, amik egy vagy több típusú stressz ellen védenek. Termelésüket gének szabályozzák. Baktériumok esetében jól ismert, hogy a megnövekedett savtűrés megnöveli a patogénok túlélését és virulenciáját. Ezért veszélyes az élelmiszertartósítási eljárások helytelen alkalmazása, mert a nemkívánatos baktériumok szaporodásának a gátlása elősegítheti a virulensek szaporodását.

A *Listeria monocytogenes* nagyon ellenállóan viselkedik az extrém hőmérséklettel, a pH-val vagy akár a vízaktivitással szemben. Ezért fontos, hogy ismereteket szerezzünk a patogén viselkedéséről a különböző stressz hatások függvényében, hiszen ez által könnyebben és hatásosabban, szabályozhatjuk és iktathatjuk ki az élelmiszereinkből.

2.3.1 A hőmérséklet hatása

A leghatásosabb tartósítási módszer a hőközlés vagy hőelvonás. A hőmérséklet hatása a termékben lévő mikroorganizmusra lehet letális, szaporodást gátló vagy serkentő. Azonban a mikroba hőtűrését befolyásolja a mikroorganizmus szaporodási fázisa, a tenyészet szaporodási hőmérséklete, a közegben lévő védőanyagok (zsírok, cukrok, fehérjék), a közeg vízaktivitása és só tartalma, valamint a pH-ja. A hőelvonás (fagypont feletti hőmérsékleten tartás, +16 -2 °C) során az anyagcsere folyamatok sebessége csökken, lappangási fázis nő, szaporodás sebessége csökken, majd végül a szaporodás megáll. Az alacsony hőmérséklet és a fagyás miatt lecsökkent vízaktivitás komplex módon hat a baktériumra (Mohácsiné, 2010).

A *Listeria monocytogenes* hőmérsékleti optimuma 30-37°C között van, de Hudson és munkatársai szerint (1994) széles hőmérsékleti tartományban (-1,5 és 45°C) szaporodik. Mások kicsit magasabbra helyezik az alsó hőmérsékleti határt -0,4 és 45°C (Gray és Killinger, 1966; Walker et al., 1990). Az 50°C feletti hőmérséklet pedig már letális hatást fejt ki (Lado és Yousef, 2004). Visszafordíthatatlanul károsodik a riboszóma, fehérje denaturáció, és enzimkárosodás következik be. Ez a hőmérséklet a virulenciáját is befolyásolja, két órás 48°C-os hőkezelés után a patogén liszteriolizin O termelése leáll. Azonban további 37°C-os inkubálás után a virulencia faktor termelődése jelentősen növekszik (Kim et al., 1994).

2.3.2 Vízáktívítási hatás

A magas vízáktívítási érték kedvez a legtöbb mikroorganizmusnak, így a *Listeria*-nak is. A patogén szaporodási optímuma $a_w \geq 0,97$ érték körül van (Petran és Zottola, 1989). Gyakori tartósítási módszer a vízelvonás. Ekkor az a_w -t 0,7 alatti értékre csökkentik, ami megvalósítható vízelvonással (szárítás) vagy az oldott anyagok koncentrációjának növelésével (sózás). A 1441/2007EK rendelet a vízáktívítási értéket 0,92-re határozza meg. Miller (1992) szerint különböző komponenseket használva azonban a legalacsonyabb vízáktívítási értékek, amelyek mellett körülbelül 6,5 logos növekedést tapasztalt a következők voltak: a_w 0,90 - glicerint alkalmazva, a_w 0,92 - szacharóznál, a_w 0,92 - NaCl mellett, és a_w 0,97 - propilén glikolt alkalmazva. Ezek az értékek 30% glicerín, 39,4% szacharóz, 11,5% NaCl, valamint 16,7% propilén glikol tartalomnak feleltethetők meg hozzávetőlegesen. Egy tanulmány szerint a_w 0,88-nál a *Listeria* szaporodása teljesen gátolt, azonban, ha más kezeléssel kombináljuk a vízáktívítási érték csökkentését (a kísérletben magas hidrosztatikai nyomást (HHP) alkalmaztak) akkor elegendő az $a_w \geq 0,92$ értékre csökkentés is (Rubio et al., 2007). A baktérium ellenállóságát bizonyítja, hogy egy kísérlet során túlélte száraz kolbászban a fermentációt 4,39-4,63-as pH viszonyok között, az ez utáni szárítást a_w 0,76–0,80 értékek mellett, majd a 49 napon át 17-23°C közötti tárolást, és mindössze 3 nagyságrendnyit csökkent (Lahti et al., 2001; Nissen és Holck, 1998; Thévenot et al., 2005). Hasonló eredményeket tettek közzé Gounadaki és társai (2007), mely szerint az a_w 0,80 értéknél és 4,46-os pH mellett negyven napon át életképes maradt egy 5 és 25°C között tárolt szalámban.

2.3.3 A pH hatás

A *Listeria monocytogenes*, a szervezetben a gyomron áthaladva, vagy fermentált élelmiszerben leginkább savas hatásnak van kitéve. Azonban képes ehhez a körülményhez is alkalmazkodni. A szerves savak károsabb hatást fejtenek ki, mint a szervetlenek, mivel a citoplazma alacsonyabb belső pH szintjét vonják maguk után (Ryser és Marth, 1988). A savas pH denaturáló hatással van a sejt felszíni enzimekre, és amikor a protonok beáramlanak a citoplazmába, azok a sejt pH csökkenését idézik elő. Ezáltal károsodásokat okoz a fehérjék és a DNS szerkezetében, a baktériumok anyagcsere folyamataiban. Szaporodásához leginkább a semleges pH az optimális, azonban pH 4,0 és 3,6 közötti értékeknél is képes növekedni (Phan-Thanh és Montagne, 1998).

A fermentált élelmiszerekben a starter kultúrák savanyítanak, így csökkentik a pH-t, ezáltal gátat szabnak a káros mikrobáknak. Azonban, ha nem termelődik elég sav, lassú a pH csökkenés és nem tölti be a védő funkcióját. A tejtermékek esetében ez a csökkenés pH 3,7-4,4; a hústermékeknél viszont csak körülbelül pH 5,2. Ezért fontos, hogy ezt a kisebb csökkenést kompenzáljuk más gátló anyagok hozzáadásával (Deák, 2006).

McKellar és társai (2002) azt vizsgálták, hogy milyen hatással vannak a baktérium lag fázisára a különböző pH értékek. Vizsgálataikban azt tapasztalták, hogy *L. monocytogenes* ideális körülmények között gyorsan alkalmazkodik a környezethez, így a lag fázis rövid. A kísérletben pH 7,2-nél 4 óráig tartott, míg ez megtörtént, majd utána beindult a szaporodás. A pH 5,5-ös értéknél kicsit hosszabb volt a lag fázis, de az 5. órában megkezdődött a növekedés. Megközelítőleg 20 óráig tartott a lag fázis a pH 4,9-nél, csak ezután kezdett szaporodni. Petran és Zottola (1989) eredményei szerint a minimum pH, aminél a *Listeria monocytogenes* még növekedést mutatott, az pH 4,7 volt 30°C hőmérsékleten tartáskor. George és társai (1996) *Listeria monocytogenes*-t vizsgáló kísérletében, a 20°C-on, 50 napig tartó megfigyelésben, azt állapították meg, hogy pH 4,3-as értéknél képes volt még növekedni. A pH 4,0-es körülményeknél viszont már nem. Ezek után, a hőmérsékleteket is változtatták, mint másik stressz hatást kifejtő tényezőt, így már csak pH 5,0-nél volt képes szaporodni 12°C, 8°C és 4°C hőmérsékletek mellett, pH 4,5-nél már egyáltalán nem. Az 1°C-os hőmérsékletnél, a pH tűrése már csak 5,4-ig volt kimutatható. Galdiero (1997) eredményei szerint a hőmérséklet hatásától függetlenül (4, 22 és 30°C), a *Listeria* nem volt képes növekedni a pH≤4,5 körülmények mellett.

2.3.4 A NaCl hatása

A konyhasó az egyetlen ásványi eredetű ízesítő anyag, amelyet, mint fűszert, nem csak az ételek ízesítéséhez, hanem azok tartósításához is használunk. Így például húsrá és halra, mert a szövetekből vizet von el, és ez által meggátolja a káros baktériumok szaporodását. A sózás a kellően fűszerezett étel ízét kiemeli, javítja, de ha túlsózzuk az ételt, a só elnyomja a fűszerek ízét (Nyilas, 1980). Az élelmiszereink nagy része tartalmazza és ezeknek az elfogyasztásából származik a szervezet napi só bevitelének 20%-a (Desmond, 2006; Engstrom et al., 1997). A NaCl fontos alkotója az élelmiszereknek, pozitív hatása van a hús szöveteknek vízmegkötésére, textúrájára, viszkozitására, az íz kialakítására és a minőség megőrzésére (Breslin és Beauchamp, 1997; Sofos, 1993; Terrell, 1983).

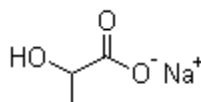
Már régóta ismert, hogy a NaCl véd a baktériumos fertőzésekkel szemben, hiszen a magas sókoncentrációt nehezen tűrik. Így, ha csökkentenék a húsok NaCl tartalmát, azzal a mikrobáknak kedvezőbb feltételek teremtnének (Sofos, 1993; Terrell, 1983). Már említettem, hogy a *Listeria monocytogenes* igen ellenálló a magas sótartalommal szemben, és elviseli a 10%-os NaCl koncentrációt is (McClure et al., 1989). A 14 és 20%-os NaCl koncentráció teljesen hatástalanította a *Listeria*-t (Shabala et al. 2008; Faleiro et al., 2003). Más munkák szerint pedig már a 10,5% is letális volt a baktériumra (Koutsoumanis et al., 2003). Nem tapasztalták hatását a *Listeria*-ra, 22 és 30 °C-on, semleges pH érték mellett, csak akkor gátolta a szaporodását, mikor lecsökkentették a pH-t 5-re. Ezen eredmények szerint is 10% NaCl már csökkentette az életképességét. A

legmagasabb só koncentráció, amit még tolerált 12% volt, azután már nem mutatott növekedést (Galdiero et al., 1997). Lorentzen és társai (2010) azt tapasztalták, hogy a tengeri halakban szárítás és 15-20% só hozzáadása után, a *L. monocytogenes* nem életképes. Mikor azonban áztatták, azt követően a NaCl szint 2% ra csökkent, ezután már ismét találtak *Listeria*-t. Amikor még friss tőkehalat is tettek hozzá, szaporodni is elkezdett.

Chihib és társai szerint (2003) a nagy só koncentráció megnöveli a *Listeria* riboszómáinak denaturációs hőmérsékletét, így az segíti a patogén hőtűrésének a kialakulását.

2.3.5 A Na-laktát hatása

A Na-laktát jele: E 325, $/C_3H_5NaO_3/$, képletét az 1. ábra mutatja. A tejsav nátrium sója, ami színtelen, tiszta folyadék. Felhasználják sav szabályozóként, és antioxidánsként süteményekben, sajtokban, lekvárban és margarinban.



1. ábra Na-laktát (www.vilaglex.hu)

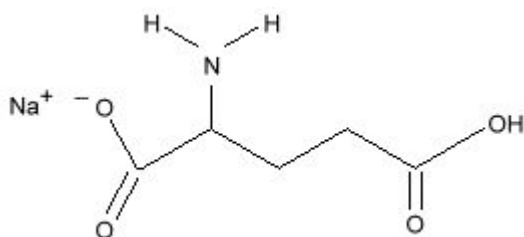
A Na-laktátot már régóta használja az ipar a termékek hosszabb eltarthatóságának, valamint a hústermékek biztonságának megőrzése érdekében (Miller és Acuff, 1994). A kémhatása gyengén savas (pH 6,5), hústermékekhez változó, 2 és 4% közötti mennyiségben adagolják, anélkül, hogy az az élelmiszer érzékszervi tulajdonságait megváltoztatná. A laktátnak antimikrobás hatása a legkevésbé erőteljes (Shelef, 1994). A laktátok mikrobagátló hatását részben a vízaktivitás csökkentésével, de főleg speciális mikrobellenes tulajdonságával magyarázzák. Disszociáltatlan formában növeli a mikroorganizmus lag vagyis nyugvó fázisát. A laktát egy GRAS (U.S-ban) státusszal rendelkező anyag, amit az élelmiszerek pH beállításához, aromaként, és mint antimikrobás anyagként alkalmaznak. Az érzékszervi kutatások szerint, a magas koncentrációban alkalmazott diacetát, egy elfogadhatatlan, kellemetlen ízt okozott a kész húsban. Ezért használták laktáttal kombinálva, 0,12%-ban a húsételekben, és ezáltal még a vízaktivitási érték is csökkent (Schlyter et al., 1993; Shelef és Addala 1994; Stekelenburg és Kant-Muermans, 2001).

A szerves savaknak és azok sóinak, különösen a laktátnak és diacetátnak fontos szerepe van a *L. monocytogenes* szabályozásában (Barmpalia et al., 2004; Bedie et al., 2001; Lu et al., 2005; Porto et al., 2002; Samelis et al., 2005). Schlyter és munkatársai (1993) egyedüli vagy kombinált hatásukat vizsgálták hústartalmú termékekben 1,5 és 3,0% közötti mennyiségben. Azt tapasztalták, hogy gátolta a patogén szaporodását a hűtve tárolás során. A 3%-os Na-laktát hozzáadásával a

Listeria monocytogenes 1 nagyságrendnyi csökkenése következett be (Stekelenburg, 2003). Másik kísérlet szerint is, a 2,5 és 3,3 %-os laktát hozzáadása gátolta a *Listeria* növekedését. A hosszantartó tárolás mellett sem szaporodott, és érzékszervi hibát sem okozott a termékben. Amikor viszont Na-citrátot adtak a rendszerhez, jelentős mértékben elkezdett szaporodni a baktérium, és megszűnt a laktát gátló hatása (Stekelenburg és Kant-Muermans, 2001). Egy *Listeria monocytogenes*-szel szennyezett frankfurti virslit kezeltek Na-laktáttal és Na-diacettál, 0,68-0,097% és 1,36-0,19%-os kombinációs arányokkal. A nulladik percben semmilyen hatás nem volt tapasztalható. Utána viszont a két kombináció szinte egyformán, körülbelül 3,3 log TKE/g-tól 2,7 log TKE/g-ig terjedően csökkentette a *L. monocytogenes* telepek számát csomagonként (Porto-Fett et al., 2010).

2.3.6 A Na-Glutamát hatása

A Na-glutamát jele: E 621, képlete a 2. ábrán látható. Finom, fehér, kristályos por, megjelenésében hasonlít a sóhoz vagy a cukorhoz. Érdekes módon nincsen saját íze. Még ma sem teljesen világos, hogy a glutamát milyen mechanizmussal fokozza más ételek ízét. Egyes vélemények szerint a nyelv ízérző receptorainak ingerküszöbét csökkenti, míg mások szerint a glutamát íze a sós, az édes, a savanyú és a keserű mellett az ötödik alapíz. Ez az "umami", az ízletesség íze, ugyanis japánul ízletességet, finomat jelent (Schiffman, 2000). Mesterségesen 1907-ben fejlesztett ki Dr. Ikeda Kikunae vegyész professzor a Tokiói Császári Egyetemen. Ázsiában legalább kétezer éve használják a Na-glutamátot az ételek ízének fokozására. Korábban a tengeri hínár főzetéből nyerték ki, ma fermentációs eljárással készül nagy mennyiségben, általában keményítőből, cukornádából, cukorrépából vagy melaszából.



2. ábra Na-glutamát (Lölinger, 2000).

A nátrium-glutamát a glutaminsavnak, a fehérjéket felépítő egyik aminosavnak a nátrium sója. A glutaminsav kalcium és kálium sói is íz javító hatásúak. A glutaminsav számos táplálék fehérjénk építőköve, például sajtokban, húsokban, gombafélékben, cukorborsóban és tejben nagyobb koncentrációban mutatható ki. Egy része szabad, más aminosavakhoz nem kötődő formában található. Csak ez a szabad glutamát rendelkezik íz javító tulajdonsággal. A paradicsom és bizonyos sajtok íz javító hatása részben a szabad glutaminsav tartalmuknak köszönhető.

Az élelmiszeriparban főleg húsoknál alkalmazzák, de előfordul leveskockákban, salátákban, felvágottakban, pácolt húsookban, chipsekben, fűszerkeverékekben. Ízfokozóként kizárólag a természetben is megtalálható L-glutamát enantiomer alkalmazható, ugyanis a másik változat nem ízfokozó tulajdonságú. Számos élelmiszerben, mint például a szójaszószban természetes úton fordul elő, sokszor az átlagosnál magasabb koncentrációban (Kimber, et al., 1994, Institute of Food Technologists, 1987). Kísérletek szerint a szervezetbe jutott glutamát 96%-át a bél veszi fel, így mindössze 4% marad a test többi részére, ezért azt szintetizálni kell (www.food-info.net/uk/intol/msg). A glutaminsav a gamma-amino-vajsav prekursora, vagyis a szintetizálásában van fontos szerepe. A szintetizálás az agyban és hasnyálmirigyben nagy mennyiségben található glutamát-dekarboxiláz (GAD) enzim hatására játszódik le.

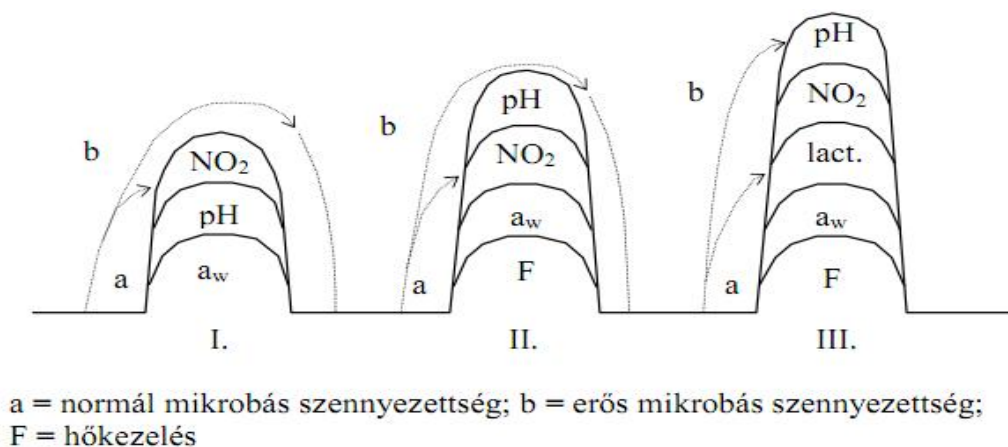
Abban, hogy a *Listeria monocytogenes* igen ellenálló az alacsony pH-jú közegben, kutatások szerint a GAD rendszernek van jelentős szerepe. Ezt egy kísérletben is bizonyították, miszerint azok a mutánsok, melyeknek törölték a GAD homológját -megvizsgálták és nem tapasztalták az enzim aktivitását sem- nem küzdötte le az alacsony pH-t a savanyú tejben, még akkor, sem amikor plusz glutamátot adtak a rendszerhez. Tehát arra mutattak rá, hogy a GAD rendszernek fontos szerepe van a *Listeria* túlélésében a savas élelmiszerekben, még ha abban a szabad glutamát szint alacsony is (Cotter et al., 2001). A működés alapja, hogy a glutamát γ -aminobutiráttá (GABA) alakul át, miközben a sejten belül protont vesz fel, ez enyhíti a citoplazma savasságát. Egy antiporter segítségével ez a sejten belüli GABA felcserélődik egy sejten kívüli másik glutamát molekulával. Ez újabb H^+ felhasználásával megy végbe (Small és Waterman, 1998). A *Listeriának* két glutamát-dekarboxiláz enzime van a GadA és GadB és egy transzporter funkciójú, a GadC (Cotter et al., 2001).

2.4 Gát technológia

Az élelmiszeripar igyekszik a fogyasztók elvárásainak eleget tenni és megfelelni. A vásárló igényli, hogy a termék, amit megvásárol sokáig eltartható legyen minőségét megőrizve. A mai rohanó világban ez kényelmi szempont is, hiszen a fogyasztóknak nincs ideje minden nap boltba menni, így több napra előre bevásárolnak. Régóta alkalmazott tartósítási eljárások a sózás (szalonna), főzés, füstölés (vörös áruk), pácolás (sonka), fermentáció (szalámik). Ezekkel a módszerekkel az áruk sokáig eltarthatók. Azonban új elvárások is megjelentek, így igénylik, hogy az élelmiszer minél "természetesebb" megjelenésű legyen, vagyis érezhető lehessen az illata, eredeti íze, jobb legyen az érzékszervi minősége. Követi a vásárló az összetételt, ezért fontos, hogy minél kevesebb a köztudatban "káros" adalékanyagot tartalmazzon. Valamint nem utolsó szempont a mikrobás fertőzések elkerülése. Az utóbbi években egyre számottevőbb az élelmiszerek okozta

megbetegedések. Így új módszereket fejlesztettek ki a kíméletesebb tartósítás érdekében, mint a magas hidrosztatikai nyomás (HHP), pulzáló elektromos térerő (PEF), a pulzáló nagy intenzitású fény vagy ultrahang, és alkalmazása. Emellett fontos szerepük van az antimikrobás anyagoknak is, hiszen egyes anyagoknak köztudott és bizonyított hatásuk van a mikrobák szaporodásának gátlására (sztatikus). A húsiparban kiemelném a nitritet, ami a *Clostridium botulinum*, a laktátot és diacetátot, mely a *Listeria monocytogenes* és a nizin, ami szintén *Listeria monocytogenes* és más romlást okozók ellen alkalmaznak (Gould, 1996).

A biztonságos tartósítás érdekében ezeket a technológiákat kombinálva alkalmazzák. A módszer lényege, hogy két vagy több tényezőt együttesen alkalmaznak, olyan mértékben, amelyek külön-külön csak részleges mikroba gátlást fejtenének ki. A tényezők együttes hatása összeadódhat, vagy ennél erősebben, szinergens módon érvényesülhet (Leistner, 1992). A módszer neve gáttechnológia, melyet Lothar Leistner dolgozott ki az 1980-as években. A lényege, hogy a termékben a mikroorganizmusok elszaporodásukhoz, vagy életben maradásukhoz több tartósító tényező akadályán kell átjutniuk. Természetesen, minél több a gát, annál kisebb a mikroba túlélési esélye, ezt a 3. ábra szemlélteti (Leistner és Gould, 2002). Kombinációban az egyedi kezelések kisebb "dózisai" is elegendőek az azonos mértékű gátláshoz (Mohácsiné, 2010). Mára már odáig jutott ez a módszer, hogy az élelmiszerbiztonság teljesen megbízik a gáttechnológia hatásosságában (Leistner, 2000). Kombinációkkal jobb eltarthatóságot és termékminőséget lehet elérni, mint az egyedi drasztikus kezelésekkel. A kísérletemben is ezt próbáltam modellezni, miszerint a kisebb koncentrációk is elegendőek a patogén megfelelő gátláshoz.



3. ábra Mikroorganizmusok gátlásának szemléltetése kombinált kezelések esetén (www.ohki.hu)

3 CÉLKITŰZÉS

A patogének élelmiszerekben történő viaszasorításához elengedhetetlen azok stresszvászainak vizsgálata pl. a hőmérsékletre, a pH-ra, NaCl tartalomra. Ezek megértése nagymértékben hozzájárul a kockázatmentes élelmiszerek előállításához, ugyanis a kémiai tartósítás során e tényezők értékei, koncentrációi segítségével próbálják elpusztítani a kórokozó és romlást okozó mikrobákat. Ezen kívül vizsgálni kell olyan molekulák jelenlétét is, melyek a kutatások szerint fontos szerepet töltenek be a patogén védekező rendszerében. Ilyen molekula az alacsony pH okozott stressz kivédésében szerepet játszó glutamát.

Munkámban az egyes faktorok különböző *Listeria monocytogenes* törzsek szaporodására gyakorolt hatásait a pH, NaCl, Na-laktát és Na-glutamát függvényében kívánom vizsgálni. Egyértelmű, hogy a *Listeria*, mint minden más baktérium, a számára optimális körülmények mellett rövid lag fázissal, magas sejtszámmal és gyors szaporodási sebességgel bír. Amint azonban az optimális körülményektől távolodunk a lag fázis növekszik/hosszabb lesz, a szaporodási sebesség lassul.

Célom a kapott szaporodási görbék és hatásfelületek segítségével meghatározni a baktériumra gátló hatást kifejtő pH, NaCl, Na-laktát és Na-glutamát koncentrációkat. A hatásfelületi analízis segítségével a pH, NaCl, Na-laktát és glutamát hatásait megállapítani, hogy az előzetesen meghatározott középponti elrendezési pontok alapján, milyen szaporodást mutattak. Ehhez a statisztikai értékelés a Statistica 9.0 for Windows programmal történt. A mérési pontokra másodfokú polinom illesztésével kívánom meghatározni a különböző törzsek viselkedését modellező hatásfelületeket, a pH tartományok függvényében.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Számtalan esetben azonosították, már a *L. monocytogenes*-t szeletelt, főzött, vagy darabolt sonka, elsősorban RTE készítményekben. (Mataragas et. al., 2010). Ezért választottam a hús mátrixát a kísérletem alapjául.

4.1 Felhasznált *Listeria monocytogenes* törzsek:

- *L.monocytogenes* CCM 4699 törzsgyűjteményi törzs, jelölése: C1
- *L.monocytogenes* húsipari izolátum, jelölése: H10

4.2 Tápközegek

BH agar (Brain Heart Agar)

- | | |
|--------------------|---------|
| •Brain Heart Broth | 37 g |
| •Agar-agar (Merck) | 15 g |
| •Desztillált víz | 1000 ml |

Caso agar (Casein-peptone Soymeal-peptone Agar)

- | | |
|--------------------------------|---------|
| •Tryptic Soy Agar (Caso) Broth | 30 g |
| •Agar-agar (Merck) | 15 g |
| •Desztillált víz | 1000 ml |

Hígító folyadék

- | | |
|------------------|---------|
| •Pepton | 1 g |
| •NaCl | 8,5 g |
| •Desztillált víz | 1000 ml |

A Hatásfelületi analízis

A Hatásfelületi Kísérlettervezési Módszer (Response Surface Method, RSM), matematikai és statisztikai módszereket tartalmaz, és alkalmas a biológiai rendszerekben lévő optimum keresésére, az élelmiszer tudomány és technológia is szívesen alkalmazza (Diniz és Martin, 1996; Guinard et al., 1996). A módszer nemcsak az egyes faktorok hatására ad választ, hanem segítségével feltárhatók a faktorok közötti kölcsönhatások is. A hatásfelületi analízis az egyik legnépszerűbb optimalizáló rendszer, amit Box és Wilson fejlesztett ki 1951-ben. Az RSM a következő három fő témát öleli fel: a kísérleti terv meghatározását a folyamat faktorainak értékén; tapasztalati modellezést a kapcsolatok megközelítésére a felület és faktorok között; optimalizálást a legmegfelelőbb felület értéket a tapasztalati modellben. Az RSM, egy tapasztalati modell, ami a becslést használja, hogy megmutassa milyen a kapcsolat a kísérleti faktorok tagjai és a megfigyelt eredmények között (Li et al., 2002; Lee et al., 2003). Az RSM-ben használt leggyakoribb kísérleti tervezés, a központi elrendezési terv (Central Composite Design), aminél minden irányban egyenlő a távolság a centrumtól (Liu és Tzeng, 1998; Reddy et al., 2000). A vizsgálatok során alacsony számú független változót használunk, ami jelentősen csökkenti az elvégzendő kísérletek számát (Montgomery, 1991).

A függő paramétereket az X_1, X_2, X_3 , stb. jelöli. Az alsó, középső és felső szinteket a -2, -1, 0, +1 és +2. A változókat a következő egyenlet szerint jelöljük:

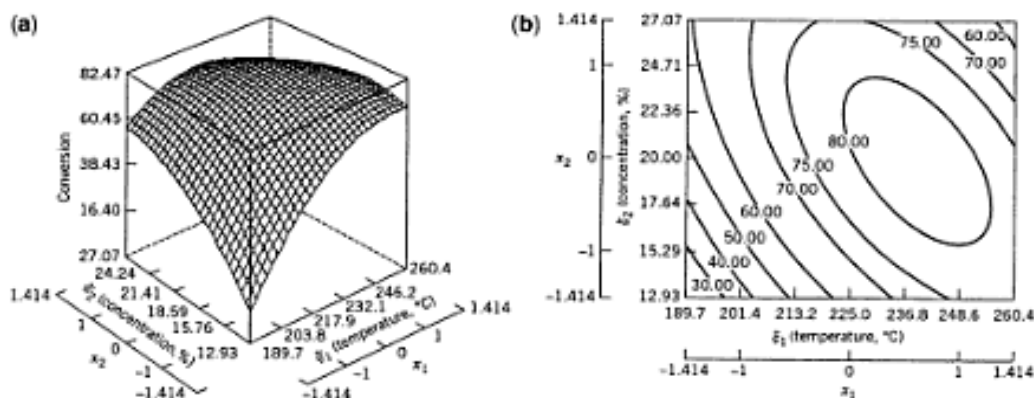
$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X;$$

ahol x_i a X_i változó értékét jelenti dimenziómentesen, az X_0 az X_i értéke a középpontban, és ΔX a lépéstávolság.

A rendszer viselkedését a következő egyenlet írja le:

$$Y = B_0 + \sum B_j X_j + \sum B_{ij} x_i x_j + \sum B_{jj} X_j^2 ;$$

ahol Y a válsz. A regresszió szignifikancia szintjét a Fischer F -teszttel és p -értékkel, valamint a varianciaanalízissel (ANOVA) ellenőrizzük. A determinációs együttható, az R^2_{Adj} azt mutatja, hogy a modell az elfogadható tartományon belül van, nem pedig kísérleti tartományon kívül. A p -érték a szignifikancia szintet ellenőrzi minden egyes együttható között, és minél kisebb p -érték, annál szignifikánsabb a másodfokú egyenlet (Guo et al., 2010). A rendszer viselkedését a hatásfelület segítségével ábrázoljuk. Ez megmutatja a változók egyéni és kölcsönös hatásait továbbá, hogy milyen kölcsönhatások vannak a változók között. A polinomiális egyenletet felszínként ábrázolja és körvonalazza, hogy vizuálisan is el tudjuk képzelni milyen a kapcsolat a válasz és kísérleti szinteken minden egyes faktornál



4.ábra A hatásfelületek (<http://books.google.com>)

4.3 A kísérlet leírása

A *Listeria monocytogenes* C1 és H10 törzsek szaporodását vizsgáltam. A kísérleteket mikrotiter lemezen végeztem. A tenyésztéshez eltérő pH-jú Na-glutamát, NaCl, Na-laktát tartalmú BH tápleveseket állítottam össze a 2. táblázat szerint. A 25, 26, 27 és 28 minták a kontrollok voltak.

A törzseket a mérés előtt leoltottam BH ferde agarra, majd 24 órán át 37°C-os hőmérsékleten történő inkubálás következett. A törzseket 3 ml desztillált vízzel lemostam, majd a kapott szuszpenzió sejtszámát 10^4 sejt/ml koncentrációra állítottam be. A mikrotiterlemez celláiba 270 μ l tápközeget pipettáztam, az előre összemért különböző pH, NaCl, Na-laktát és glutamát tartalmú TSB oldatokból. A mikrotiterlemez celláiba 30 μ l pipettáztam a törzsek a 10^4 sejt/ml koncentrációra beállított szuszpenzióiból. Az eltérő összetételű tápleveseket 3-3 párhuzamosban random elrendezésben mértem ki. A tápleveseknek 24-féle kombinációja készült, valamint 4 kontroll is (2. táblázat).

A mikróbaszususzpenziók tényleges sejtkoncentrációját CASO agarra történő szélesztéssel ellenőriztem. Inkubálás (24 óra, 37°C) után megszámláltam a kinőtt telepeket.

2. táblázat: Kísérlettervezés központi elrendezési tervvel

BH leves jelölése	pH	Na-laktát (%)	NaCl (%)	Glutamát (%)
1	5	0,1	2	0,05
2	5	0,1	2	0,15
3	5	0,1	6	0,05
4	5	0,1	6	0,15
5	5	0,5	2	0,05
6	5	0,5	2	0,15
7	5	0,5	6	0,05
8	5	0,5	6	0,15
9	7	0,1	2	0,05
10	7	0,1	2	0,15
11	7	0,1	6	0,05
12	7	0,1	6	0,15

13	7	0,5	2	0,05
14	7	0,5	2	0,15
15	7	0,5	6	0,05
16	7	0,5	6	0,15
17	4	0,3	4	0,1
18	8	0,3	4	0,1
19	6	0,1	4	0,1
20	6	0,7	4	0,1
21	6	0,3	0	0,1
22	6	0,3	8	0,1
23	6	0,3	4	0,0
24	6	0,3	4	0,2
25 (C), 26 (C), 27 (C) és 28 (C)	6	0,3	4	0,1

A szaporodás detektálása automata optikai denzitás (OD) mérő berendezéssel (Multiskan Ascent) történt 37°C-on 24 órás inkubálás során. A készülék az OD értékeket félóránként, a lemezek előzetes rázatását követően mérte meg. Az OD értékek segítségével vehetők fel a szaporodási görbék az egyes oldatokra vonatkozóan. A statisztikai értékelés Statistica 9.0 for Windows szoftverrel történt.

4.4 Hatásfelületi analízis

A vizsgált *Listeria monocytogenes* törzsek szaporodását, illetve a pH, NaCl, Na-laktát és glutamát hatását a szaporodásra, hatásfelületi analízis segítségével modelleztem. A központi elrendezés a 3. táblázat mutatja, mely szerint a 28 kombinációs kísérlet eredményei alapján másodfokú polinom illesztésével kaptam meg az egyes hatásfelületeket.

3. táblázat a központi elrendezés tervezési sémája

Faktor	Alsó szint 2	Alsó szint 1	Központ	Felső szint 1	Felső szint 2
pH	4	5	6	7	8
Na-laktát	0,1 %	0,3 %	0,5 %	0,7 %	0,9%
NaCl	0 %	2 %	4 %	6 %	8%
Glutamát	0 %	0,05 %	0,1 %	0,15 %	0,2 %

A független faktorok a pH, NaCl, Na-laktát és glutamát, hatásainak függvényében vizsgáltam a sejtszámot, vagyis a függő változót. A módszert leíró másodfokú polinom egyenlete a következő:

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + a_5x_1^2 + a_6x_2^2 + a_7x_3^2 + a_8x_4^2 + a_9x_1x_2 + a_{10}x_1x_3 + a_{11}x_1x_4 + a_{12}x_2x_3 + a_{13}x_2x_4 + a_{14}x_3x_4$$

Ahol: Y : OD₅₉₅ nm,

x₁: pH,

x₂: Na-laktát,

x₃: NaCl,

x₄: glutamát

a₀: a konstans, a₁, a₂, a₃ és a₄ a lineáris koefficiens, a₁₂ a₁₃ a₁₄ a₂₃ a₂₄ és a₃₄ a kereszt eredmény koefficiens, a₁₁ a₂₂ a₃₃ és a₄₄ a négyzetes együtthatók, Y a modell válasza.

A regressziós együtthatók meghatározása, a hatásfelületek létrehozása és a varianciaanalízis elvégzése a Statistica 9.0 for Windows szoftverrel történt.

5 EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

5.1 A baktérium szaporodása

A szaporodás detektálása a Multiskan Ascent műszerrel történt, mely az OD értéket mérte fél óránként előzetes ráztatást követően. Ezeket az OD értékeket ábrázoltam az idő függvényében. A két törzset a pH szerint csoportosítottam és a legváltozatosabb szaporodást mutató görbékét tüntettem fel az 5-8. ábrán. A többi szaporodási görbe a mellékletben található.

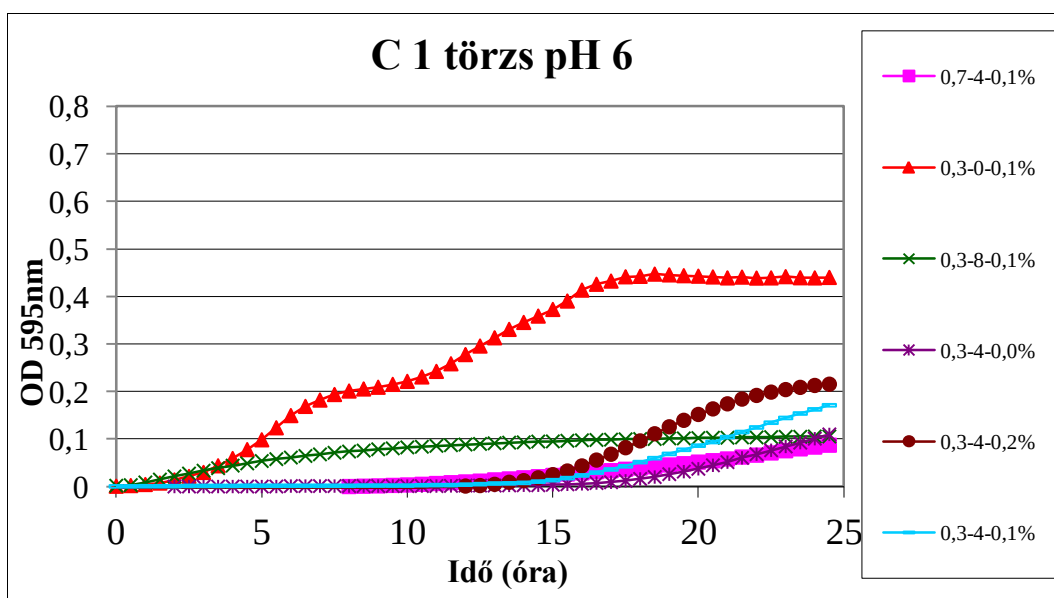
Az 1-től 8-ig tejredő kombinációk egységesen 5-ös pH értékkel rendelkeztek, teljesen hatásosnak bizonyultak a C1 törzs gátlására. Ezen kombinációk esetében a vizsgált idő intervallumban nem történt mikrobaszaporodás. Az alacsony pH kivédésében szerepet játszó glutamát hatása sem volt tapasztalható, pedig 0,05 vagy 0,15%-ban jelen volt a kombinációkban. A 3, 4, 7 és 8-as kombinációk magas, 6%-os NaCl tartalmúak voltak, így a só is plusz gátló tényezőként volt jelen az összetételben. Nyolc kombináció inaktíválta a C1 törzset ebben a pH tartományban a 24 órás inkubáció alatt: a 0,1% Na-laktát - 2% NaCl - 0,05% glutamát; a 0,1% Na-laktát - 2% NaCl - 0,15% glutamát, a 0,1% Na-laktát - 6% NaCl - 0,05% glutamát; a 0,1% Na-laktát - 6% NaCl - 0,15% glutamát; a 0,5% Na-laktát - 2% NaCl - 0,05% glutamát; a 0,5% Na-laktát - 2% NaCl - 0,15% glutamát; a 0,5% Na-laktát - 6% NaCl - 0,05% glutamát; és a 0,5% Na-laktát - 6% NaCl - 0,15% glutamát.

A C1 törzs a pH 6-os tartományban legintenzívebb növekedést a 0,3% Na-laktát, 0,1% glutamát és 0% NaCl összetételű kombinációban mutatott. A rövid lag fázis után a 2. órában indult el a szaporodás, majd a 8. órában 0,2 OD értéknél tartott, 8 óra elteltével pedig megduplázódott. Véleményem szerint a só hiánya miatt mutatkozott itt a legjelentősebbnek a szaporodás. Érdekes, hogy ugyanezen körülmények mellett (0,3% Na-laktát, 0,1% glutamát), a legmagasabb, 8%-os só tartalomnál tapasztaltam a másik kezdeti gyors sejtszám növekedést. Bár 0,1-et nem haladta meg az OD érték, ez is azt a tényt igazolja, miszerint a *Listeria* igen magas sótűréssel rendelkező patogén. A kórokozó a többi kombinációnál hosszú, 10 órás lappangási idő után kezdett szaporodni. A legmagasabb glutamát tartalom, a 0,2% mellett az OD érték emelkedés 0,2-ig tartott, és a második legjelentősebb növekedést mutatta. Annál az összetételnél, amelyik nem tartalmazott glutamátot, fele (0,1) mértékű volt a szaporodás. Tehát a glutamát hatása a patogén alacsony pH kivédésében tapasztalható volt. A legmagasabb, 0,7% Na-laktát koncentrációnál hosszú lag fázis látható, mely a növekedést csak 0,08 OD értékig engedte, bár gátló hatása nem a legjelentősebb.

A C1 törzs esetében, mint minden más mikroorganizmusnál is a semleges körülmények kínálták a legjobb életfeltételeket. A pH 7 tartományban mutatkozott a legtöbb kombinációban szaporodás, a legrövidebb időn belül. A *Listeria monocytogenes* azonnal alkalmazkodott a környezeti feltételekhez és szinte már a beoltást követően szaporodásnak indult a 0,1% Na-laktát, 2% NaCl és

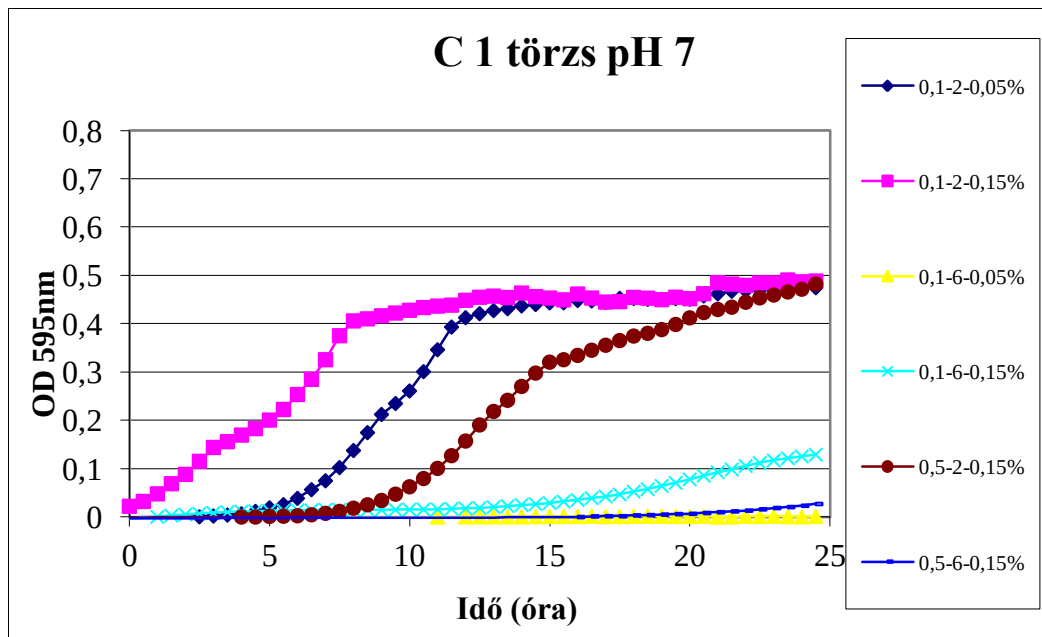
0,15% glutamátos kombinációban, 8 óra elteltével már 0,4 OD értéknél tartott. Ettől kezdve elérte a stacioner fázist, az OD értéke szinte alig növekedett, 0,48 körüli értéknél maradt. Ezzel majdnem megegyező másik kombinációnál (a glutamát 0,05%) hasonló eredményeket tapasztaltam, csak később indult el a szaporodás. Két és fél óra után már gyorsan emelkedett az OD érték, egészen 0,45 körüli értékig. A glutamát két koncentrációjának (0,05-0,15%) hatása között a különbség, hogy a magasabb elősegítette az azonnali növekedést, vagyis a stresszhatás kivédésében játszott szerepét mutatja. A 0,5% Na-laktát gátló hatása miatt, 5 órás lappangási idő után indult el a növekedés. Majd elég meredek exponenciális szakasz után 0,47-ig nőtt az OD érték. A pH 7-nél csak a 2% NaCl tartalom mellett mutatkozott szaporodás, és a görbe hasonló lefutással rendelkeztek. A többi kombinációknál nem volt tapasztalható növekedés, kivétel egynél, az 0,1-ig emelkedett. Mindegyik kombinációnál 6%-os só tartalom volt jelen, ennek tulajdonítom a gátlást. Ez viszont érdekes tény, hiszen ezeknél az összetételeknél a Na-laktát is alacsonyabb volt.

A pH 4 és 8 tartománynál, egy-egy kombinációval szerepelt mind a két törzsnél. A C1 törzset teljesen inaktiválta a pH 4-es kombináció, amely 0,3% Na-laktátot, 4% NaCl-t és 0,1% glutamátot tartalmazott. A 8-as pH-nál 11 óra után indult szaporodásnak és 10 óra alatt 0,4-re nőtt az optikai denzitás.



5. ábra C1 törzs szaporodási görbéi a pH 6 értéknél

Az összetétel alkotóinak sorrendje: Na-laktát, NaCl és glutamát



6. ábra C1 törzs szaporodási görbéi a pH 7 értéknél

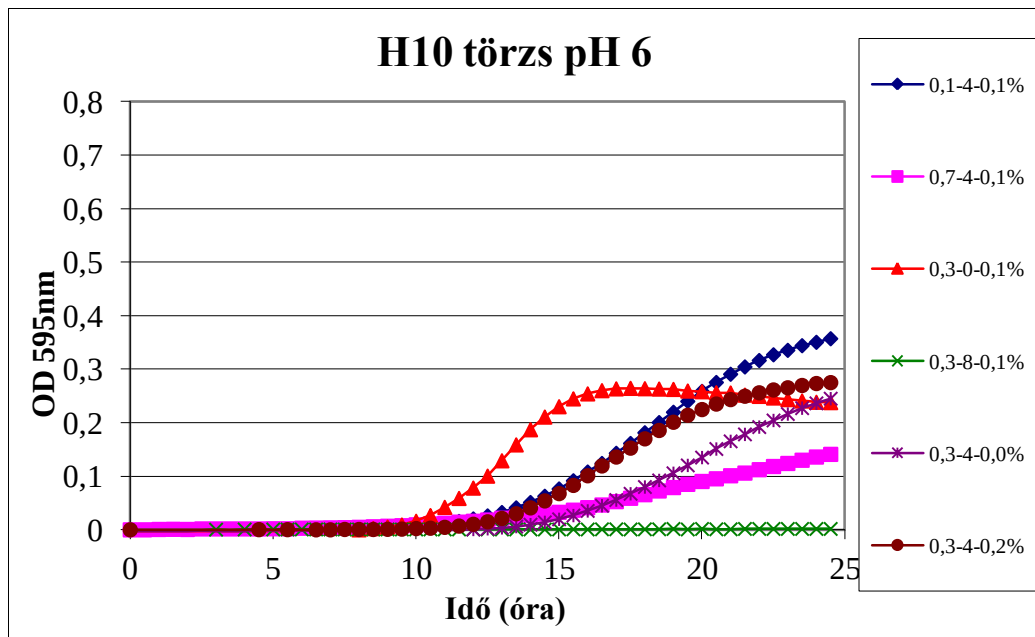
Az összetétel alkotóinak sorrendje: Na-laktát, NaCl és glutamát

A pH 5 tartományban a H10 törzsre is a C1-hez hasonlóan jellemző volt, hogy nem mutatott szaporodást. Az 1. órától kezdődően minimális növekedés volt látható, de ez végig nem haladta meg a 0,019 ezredes OD értéket. Szintén nem érvényesült a glutamát védő hatása. A gátlás az alacsony pH-nak volt tulajdonítható.

A pH 6-nál a H10 törzsről általánosan megállapítható, hogy 10 óra után kezdett szaporodni. Utána a tesztmikroba a NaCl-ot nem tartalmazó összetételben kezdett szaporodni, de nem olyan magas OD értéket ért el (0,26), mint a C1 törzsnél (0,4). A 8%-os NaCl teljesen gátolta a szaporodást, 24 óra alatt. A többi kombináció esetében a szaporodás körülbelül még plusz 3 óra elteltével indult el. Hasonló volt a hatása a 0,2% glutamátnek a húsipari izolátumnál, mint a törzsgyűjteményinél, segítette a szaporodást. Az OD érték 0,27 körüli értékig nőtt. A 0% glutamát tartalmú kombináció eltérése ezzel szemben, hogy a szaporodás lassabban indult el, de a 24. órára majdnem elérte a 0,2% tartalmúhoz hasonló OD értéket. A 0,7%-os Na-laktát visszatartó ereje kisebb mértékű volt, mint a C1 törzsnél, 0,14-es OD értékig emelkedett. A 4%-os só tartalmú kombinációk 0,3 OD értékig növekedtek átlagban, ezzel kiegyensúlyozott szaporodást mutatattak.

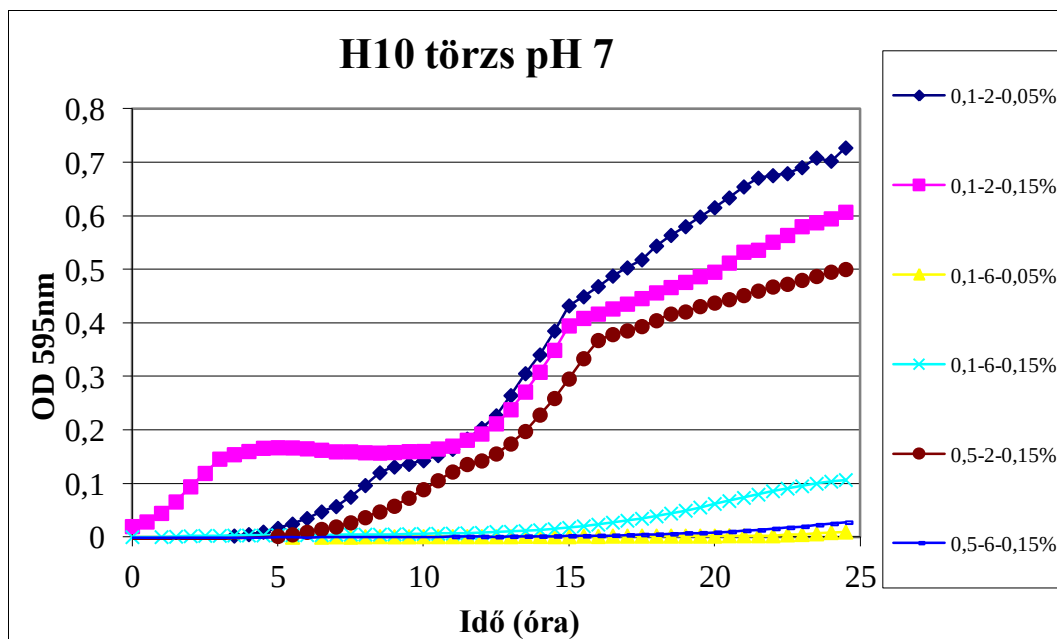
A *Listeria monocytogenes* H10 jelű törzse a pH 7-es értéknél hasonló szaporodást mutatott a C1 törzshöz hasonlóan az egyes kombinációkban, azonban jóval magasabb OD értékig növekedett, mint a törzsgyűjteményi. Ugyanúgy azonnal szaporodásnak indult a 0,1% Na-laktát, 2% NaCl és 0,15% glutamátot tartalmazó kombinációban, csak az OD érték a 24. órában már 0,6-re emelkedett. Viszont az ehhez (csak glutamátban eltérő) hasonló összetételnél, az 5. órától kezdődően a 24. órában már 0,7 körülire emelkedett az optikai denzitás. Az összes kombináció közül ennél tapasztaltam a legmagasabb OD értéket. Hasonlóan a C1 törzshöz a 0,5% Na-laktát-ot, 2% NaCl-ot és 0,05 illetve 0,15%-os glutamátot tartalmazó összetételekben szintén majdnem megegyezően viselkedett. A másik négy kombinációnál is úgy viselkedett a H10 törzs, mint a C1, nem szaporodott, kivétel a 0,15%-os glutamátot tartalmazó kombinációban. Mind a négyenél 6% NaCl mennyiség volt a tápközegben, ennek tulajdonítom itt is a gátlást.

A húsipari izolátum a törzsgyűjteményihez hasonlóan, teljesen gátolva volt a pH 4-es tartományban. A C1-hez hasonlóan szaporodásnak indult a 10. órát követően.



7. ábra H10 törzs szaporodási görbéi pH 6 értéknél

Az összetétel alkotóinak sorrendje: Na-laktát, NaCl és glutamát



8. ábra H10 törzs szaporodási görbéi pH 7 értéknél

Az összetétel alkotóinak sorrendje: Na-laktát, NaCl és glutamát

5.2 A hatásfelület analízis eredményei

5.2.1 A C1 törzs

A kísérlettervet a Statistica program csomag segítségével készítettem független 4 faktorral (5. táblázat). A szaporodás mikrotiter lemezben történt, 3 párhuzamosban. Az 5. táblázatban feltüntetett eredmények (OD_{595nm}) a három párhuzamos mérés átlagából adódtak. A kapott 24-órás OD -értékeket szintén a Statistica szoftver segítségével értékeltem.

5. táblázat: Kísérleti terv és kapott eredmények

pH	Na-laktát (%)	NaCl (%)	Glutamát (%)	OD595nm (24. óra)
5	0,1	2	0,05	0,007
5	0,1	2	0,15	0,005
5	0,1	6	0,05	0,002
5	0,1	6	0,15	0,002
5	0,5	2	0,05	0,003
5	0,5	2	0,15	0,002
5	0,5	6	0,05	0,002
5	0,5	6	0,15	0,002
7	0,1	2	0,05	0,475
7	0,1	2	0,15	0,487
7	0,1	6	0,05	0,000
7	0,1	6	0,15	0,125
7	0,5	2	0,05	0,483
7	0,5	2	0,15	0,472
7	0,5	6	0,05	0,061
7	0,5	6	0,15	0,023
4	0,3	4	0,1	0,002
8	0,3	4	0,1	0,390
6	0,1	4	0,1	0,189
6	0,7	4	0,1	0,083
6	0,3	0	0,1	0,439
6	0,3	8	0,1	0,105
6	0,3	4	0,0	0,101
6	0,3	4	0,2	0,213
6	0,3	4	0,1	0,009
6	0,3	4	0,1	0,083
6	0,3	4	0,1	0,162
6	0,3	4	0,1	0,133

Az értékelésre a polinom modellt választottam és első lépésként megvizsgáltam a modell illesztését varianciai analízissel (6. táblázat). Megállapítottam, hogy 95 % szignifikancia szintet 3 hatás (pH, NaCl lineáris, valamint pH és NaCl közötti kölcsönhatása) mutatott. Sajnos, a biológiai változatosság miatt a többi hatást csak alacsonyabb valószínűséggel tudtam becsülni (7. táblázat).

6. táblázat: Varianciai analízis

ANOVA; Var.:OD595nm@24h CCM; R-sqr=,93666; Adj.:,91448 (Adatok) 4 factors, 1 Blocks, 28 Runs; MS Pure Error=,0045064 DV: OD595nm@24h CCM					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH (L)	0,345360	1	0,345360	76,63692	0,003139
pH (Q)	0,005410	1	0,005410	1,20056	0,353292
(2)Na-laktat(L)	0,002985	1	0,002985	0,66244	0,475300
(3)NaCl (L)	0,236083	1	0,236083	52,38782	0,005439
NaCl (Q)	0,029545	1	0,029545	6,55606	0,083179
(4)Glutamat(L)	0,003978	1	0,003978	0,88282	0,416746
1L by 3L	0,180413	1	0,180413	40,03435	0,007982
Lack of Fit	0,040613	17	0,002389	0,53013	0,829781
Pure Error	0,013519	3	0,004506		
Total SS	0,854570	27			

7. táblázat: Vizsgált faktorok hatás becslése

Effect Estimates; Var.:OD595nm@24h CCM R-sqr=,93666; Adj.:,91448 (Adatok) 4 factors, 1 Blocks, 28 Runs; MS Pure Error=,0045064 DV: OD595nm@24h CCM								
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(3)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.
Mean/Interc.	0,104300	0,021220	4,91362	0,01614	0,036750	0,171860	0,104300	0,021220
(1)pH (L)	0,239917	0,027400	8,75425	0,00313	0,152690	0,327130	0,119958	0,013700
pH (Q)	0,028480	0,025990	1,09570	0,35329	-0,054250	0,111220	0,014240	0,013000
(2)Na-laktat(L)	-0,022300	0,027400	-0,81390	0,47530	-0,109520	0,064910	-0,011150	0,013700
(3)NaCl (L)	-0,198360	0,027400	-7,23790	0,00543	-0,285570	-0,111140	-0,099180	0,013700
NaCl (Q)	0,066570	0,025990	2,56040	0,08317	-0,016170	0,149310	0,033280	0,013000
(4)Glutamat(L)	0,025750	0,027400	0,93950	0,41674	-0,061460	0,112960	0,012870	0,013700
1L by 3L	-0,212370	0,033560	-6,32720	0,00798	-0,319190	-0,105550	-0,106180	0,016780

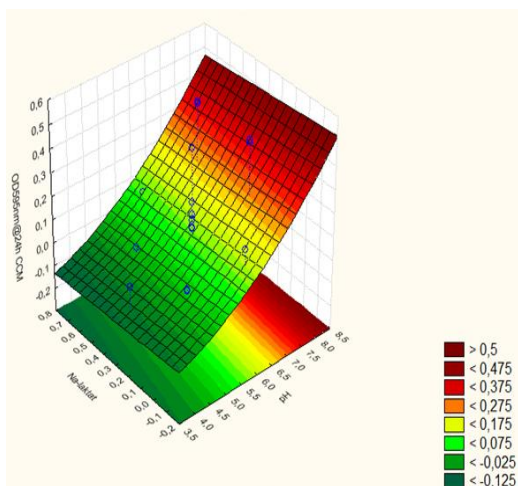
Jó eredménynek tartom, hogy a modell konstansa (mean/interception) 95 % szignifikancia szintet mutatott.

A regresszió eredményeként a következő válaszfüggvényt javaslom a *L. monocytogenes* CCM 4699 törzs szaporodásának leírására:

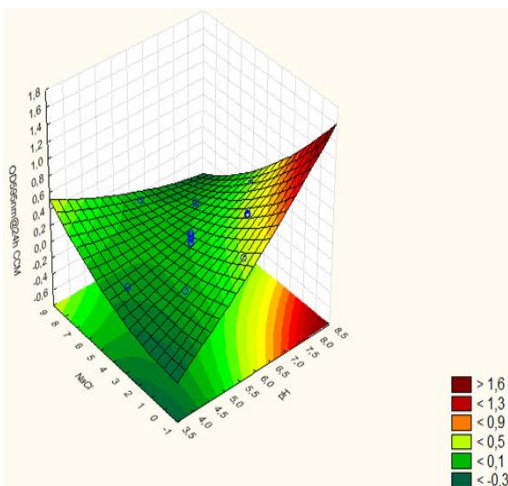
$$Y = -2.62 + 0.61 x_1 - 0.02x_1^2 + 0.25x_2 + 0.02x_2^2 + 0.37x_3 - 0.01x_3^2 - 0.73x_4 + 1.44x_4^2 - 0.11x_1x_2 - 0.07x_1x_3 - 0.01x_1x_4 + 0.05x_2x_3 + 0.17x_2x_4 + 0.12x_3x_4$$

ahol: Y: OD_{595nm}; x₁: pH; x₂: Na-laktát; x₃: NaCl; x₄: Na-glutamát

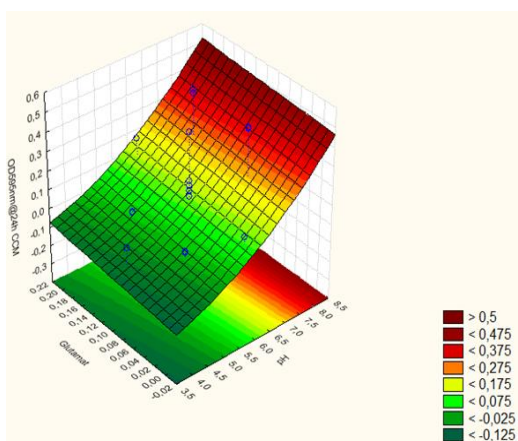
A modell alapján az alábbi hatásfelületeket ábrázoltam, melyeket a 9-12. ábrák szemléltetnek. A grafikonok a *Listeria monocytogenes* szaporodását mutatják 24 óra alatt, a különböző hatások függvényében.



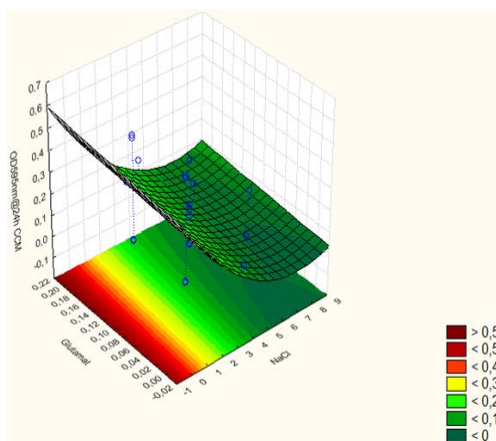
9. ábra C1 törzs szaporodása a Na-laktát és pH függvényében



10. ábra C1 törzs szaporodása a NaCl és pH függvényében



11. ábra C1 törzs szaporodása a glutamát és pH függvényében



12. ábra C1 törzs szaporodása a glutamát és NaCl függvényében

A 9. ábrán a C1 törzs, Na-laktát és pH kombinációnál megállapítható, hogy a pH csökkentésével viaszorítható a *Listeria monocytogenes* szaporodása. A tápközeg pH 6,5 alatti értékénél már nem tapasztalható a baktérium növekedése az általam vizsgált só (4 %) és glutamát (0,1%) koncentráció mellett. A Na-laktát jelenléte nem befolyásolja számottevően a baktérium szaporodását. A NaCl és pH együttes hatása látványosabban jelentkezik a 10. ábrán. Ha a tápközeg pH-ja 6,5 alatt van, eléendő 2 % NaCl koncentráció, amely gátolja a C1 törzs szaporodását akár 24 óráig. A glutamát serkentő hatása a 11. és 12. ábrán figyelhető meg a pH 7 feletti tápközegben vagy 2 % NaCl alatt. A glutamát koncentráció növelésével pH tűrőbbé vált a baktérium.

Ennek alapján azt tapasztaltam, hogy a C1 törzs nem mutatott OD változást akár 24 óráig a pH 6,5 és 2 % NaCl tartalmú tápközegben függetlenül a Na-laktát és glutamát jelenlététől és koncentrációjától, azaz nem volt képes szaporodni. A Na-laktát és a glutamát köztudottan ízfokozószerek és sok esetben támogatják a baktériumok szaporodását.

5.2.2 A H10 törzs

A törzsgyűjteményi törzs vizsgálata után fontosnak tartottam megvizsgálni a húsipari izolátumra gyakorolt különböző stresszhatásokat is. A munkámban szintén rotációs központi elrendezési kísérlettervezési módszert alkalmaztam. A kísérletterv és a kapott eredmények a 8. táblázatban találhatóak.

Az adatok értékelésére teljes másodfokú polinom modellt használtam a sejtsűrűség leírásának megközelítéséhez. A modell illesztési vizsgálatánál szintén varianciai analízist alkalmaztam Fisher F-probával. Az egyes faktorok hatásának becslésére t-probát használtam. A kapott eredményeket a 9. és 10. táblázatban foglaltam össze.

Az ANOVA eredmény szintén azt mutatta, hogy a négy hatás (modell konstans, pH és NaCl, valamint pH és NaCl kölcsönhatás) szignifikanciai szintje meghaladta a 95 %-ot. A modell „Lack of Fit” p értéke ebben az esetben 0,305945 volt. Ez azt jelenti, hogy kb 70 % valószínűséggel illeszkedik a modell a valósághoz. Ennek ellenére ebben az esetben is elfogadhatónak tartottam a modellt.

A statisztikai analízis eredménye alapján, a következő válaszfüggvényt javaslom a *Listeria monocytogenes* H10 törzs szaporodásának leírására (24 óránál) a pH, Na-laktát, NaCl és Na-glutamát változásának összefüggésében:

$$Y = -0,96 + 0,14x_1 + 0,02x_1^2 + 0,15x_2 + 0,01x_2^2 + 0,20x_3 + 0,01x_3^2 - 0,75x_4 + 2,25x_4^2 - 0,01x_1x_2 - 0,05x_1x_3 + 0,11x_1x_4 - 0,01x_2x_3 - 1,17x_2x_4 + 0,06x_3x_4$$

ahol: Y: OD_{595nm}, x₁: pH; x₂: Na-laktát; x₃: NaCl; x₄: Na-glutamát

A javasolt modellt felhasználva az alábbi hatásfelületeket ábrázoltam (13-16. ábrák). A grafikonok az OD_{595nm} értékeket mutatják 24 óra alatt, a különböző hatások függvényében.

8. táblázat: Kísérleti terv és kapott eredmények

pH	Na-laktát (%)	NaCl (%)	Glutamát (%)	OD595nm (24. óra)
5	0,1	2	0,05	0,021
5	0,1	2	0,15	0,004
5	0,1	6	0,05	0,005
5	0,1	6	0,15	0,004
5	0,5	2	0,05	0,000
5	0,5	2	0,15	0,003
5	0,5	6	0,05	0,002
5	0,5	6	0,15	0,004
7	0,1	2	0,05	0,706
7	0,1	2	0,15	0,598
7	0,1	6	0,05	0,012
7	0,1	6	0,15	0,107
7	0,5	2	0,05	0,491
7	0,5	2	0,15	0,499
7	0,5	6	0,05	0,046

7	0,5	6	0,15	0,028
4	0,3	4	0,1	0,010
8	0,3	4	0,1	0,354
6	0,1	4	0,1	0,354
6	0,7	4	0,1	0,140
6	0,3	0	0,1	0,242
6	0,3	8	0,1	0,005
6	0,3	4	0,0	0,240
6	0,3	4	0,2	0,277
6	0,3	4	0,1	0,135
6	0,3	4	0,1	0,244
6	0,3	4	0,1	0,259
6	0,3	4	0,1	0,219

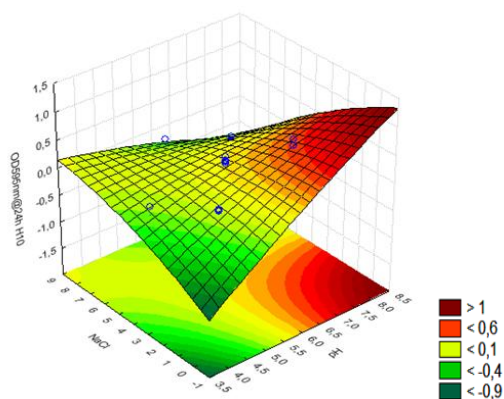
A 13. ábra a NaCl és pH együttes kombinációjának a gátlását szemlélteti a H10 törzs esetében. A tesztmikroba növekedése volt tapasztalható a pH 6 érték alatt vagy 4% NaCl tartalom felett. A 14. ábra a glutamát és pH hatását szemlélteti, ahol látszik, hogy pH 5,5 alatti értéke szintén gátló hatású volt a szaporodásra, viszont a glutamát koncentráció növelése serkentést eredményezett. A Na-laktát és pH hatása a 15. ábrán látható. Azt tapasztaltam, hogy szemben a C1 törzsszel, a Na-laktát gátló hatása a H10 törzsnél jobban érvényesült (15. és 16. ábra). A 0,8-1 % Na-laktát alkalmazásával elegendő 2-4 % NaCl használata vagy pH 7,0 alatti beállítás. Ez az eredmény ígéretesnek tűnik a kombinált tartósítási módszer kidolgozásában, hiszen csökkenthető a felhasználandó NaCl mennyisége, amely - jelenlegi beviteli mennyiség mellett is -számos szív- és érrendszer betegséget okoz.

9. táblázat: Varianciai analízis (ANOVA)

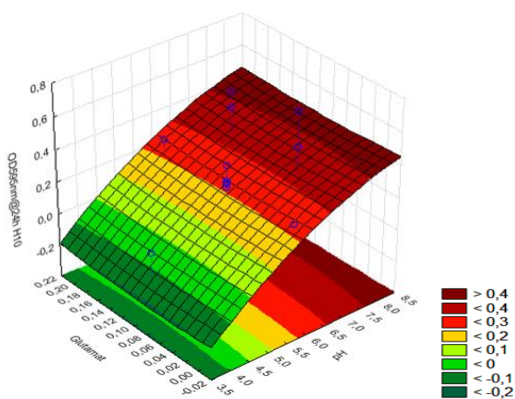
ANOVA; Var.:OD595nm@24h H10 R-sqr=,92024; Adj.:86541 (Adatok) 4 factors, 1 Blocks, 28 Runs; MS Pure Error=,0030372 DV: OD595nm@24h H10					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)pH (L)	0,409074	1	0,409074	134,6886	0,001374
pH (Q)	0,006267	1	0,006267	2,0633	0,246411
(2)Na-laktat(L)	0,027563	1	0,027563	9,0752	0,057098
(3)NaCl (L)	0,278785	1	0,278785	91,7906	0,002413
NaCl (Q)	0,023458	1	0,023458	7,7236	0,069041
(4)Glutamat(L)	0,000056	1	0,000056	0,0184	0,900573
Glutamat(Q)	0,000303	1	0,000303	0,0996	0,772992
1L by 2L	0,007028	1	0,007028	2,3140	0,225561
1L by 3L	0,272136	1	0,272136	89,6014	0,002495
2L by 3L	0,005184	1	0,005184	1,7068	0,282531
3L by 4L	0,002288	1	0,002288	0,7533	0,449280
Lack of Fit	0,080282	13	0,006176	2,0333	0,305945
Pure Error	0,009112	3	0,003037		
Total SS	1,120793	27			

10. táblázat: Statisztikai analízis az egyes faktor hatásának becslésére

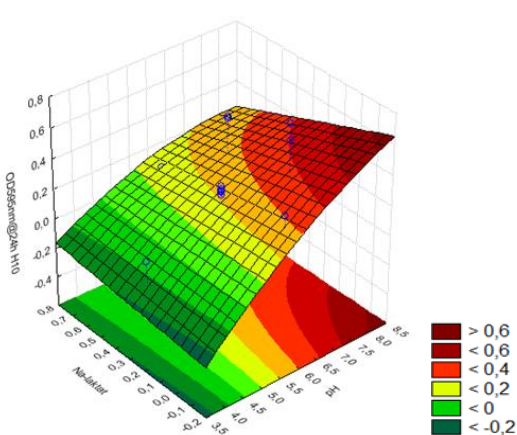
Effect Estimates; Var.:OD595nm@24h H10 R-sqr=,92024; Adj.:86541 (Adatok) 4 factors, 1 Blocks, 28 Runs; MS Pure Error=,0030372 DV: OD595nm@24h H10									
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(3)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,211701	0,021781	9,71831	0,002311	0,142381	0,281031	0,211701	0,021781	0,142381
(1)pH (L)	0,261111	0,022491	11,60551	0,001371	0,189511	0,332711	0,130551	0,011241	0,094711
pH (Q)	-0,031291	0,021781	-1,43641	0,246411	-0,100611	0,038031	-0,015641	0,010891	-0,050311
(2)Na-laktat(L)	-0,067771	0,022491	-3,01251	0,057091	-0,139371	0,003821	-0,033881	0,011241	-0,069041
(3)NaCl (L)	-0,215551	0,022491	-9,58071	0,002411	-0,287151	-0,143951	-0,107771	0,011241	-0,143951
NaCl (Q)	-0,060541	0,021781	-2,77911	0,069041	-0,129861	0,008781	-0,030271	0,010891	-0,064911
(4)Glutamat(L)	0,003051	0,022491	0,13581	0,900571	-0,068541	0,074651	0,001521	0,011241	-0,034411
Glutamat(Q)	0,006871	0,021781	0,31551	0,772991	-0,062451	0,076201	0,003431	0,010891	-0,031211
1L by 2L	-0,041911	0,027551	-1,52111	0,225561	-0,129611	0,045771	-0,020951	0,013771	-0,064411
1L by 3L	-0,260831	0,027551	-9,46581	0,002491	-0,348521	-0,173141	-0,130411	0,013771	-0,174211
2L by 3L	0,036001	0,027551	1,30641	0,282531	-0,051691	0,123691	0,018001	0,013771	-0,025811
3L by 4L	0,023911	0,027551	0,86791	0,449281	-0,063771	0,111611	0,011951	0,013771	-0,031811



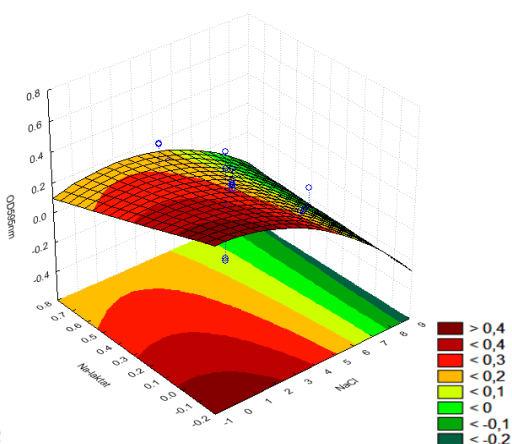
13. ábra H10 törzs szaporodása a NaCl és pH függvényében



14. ábra H10 törzs szaporodása a glutamát és pH függvényében



15. ábra H10 törzs szaporodása a Na-laktát és pH függvényében



16. ábra H10 törzs szaporodása a Na-laktát és NaCl függvényében

Összefoglalva az eredményeket a következő kombinációt tartom elegendőnek a *Listeria monocytogenes* H10 törzs szaporodásának gátlására: NaCl 3 %, pH 6,0-7,0, Na-laktát 0,8-1,0 %. Ebben az esetben a glutamát mennyisége az ízesítésnek megfelelően alkalmazható.

4. táblázat a vizsgált *L. monocytogenes* törzsekre gátló hatást gyakorolt tényezők koncentrációi

	pH	Na-laktát%	NaCl%
C1 törzs	6	-	4
H10 törzs	5,5	0,6	7

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A *Listeria monocytogenes* számos élelmiszer eredetű fertőzés okozója volt az elmúlt vtizedekben. Az általa okozott betegséget liszteriózisnak nevezzük, ami súlyos szövődményekkel, és 20-30%-ban halálos kimenetellel is végződhet. A fertőzés elkerülésére az ipar sok kutatást végez, hiszen fontos, hogy élelmiszereink gyártásakor olyan módszereket alkalmazzanak, melyek teljesen kizárják a *Listéria*-t, vagy számát a megengedett szint alá csökkentse.

Kísérleteim során eltérő pH-ra, NaCl, Na-laktát és Na-glutamát koncentrációra beállított tápvelésben vizsgáltam különböző eredetű *Listeria monocytogenes* törzsek szaporodását turbidimetriás mérésel.

Munkámban az egyes faktorok különböző *Listeria monocytogenes* törzsek szaporodására gyakorolt hatásait a pH, a NaCl, a Na-laktát és Na-glutamát függvényében kívántam vizsgálni. Céлом volt a hatásfelületi analízis segítségével a pH, NaCl, Na-laktát és glutamát hatásait modellező felületek felállítása, a patogén szaporodását gátló kombinációk meghatározása.

A szaporodási kísérletek során a C1 és H10 törzs sem volt képes szaporodni azoknál a kombinációknál, amelyeknél a pH értéke 4 vagy 5 volt. A 6% NaCl-ot tartalmazó összetétel gátolta a szaporodást mind a két törzsnél a pH 7 tartományban. A legmagasabb, 8%-os só kombináció is gátolt, igaz a H10 törzsnél jelentősebb hatást mutatott, mint a C1-nél. A magas (0,7%) Na-laktát tartalmú kombinációnál hosszú lappangási idő után volt szaporodás, azonban az nem fejtett ki jelentős gátlást egyik törzsnél sem. A 0,2% tartalmú glutamát összetétel mindkét törzsnél elősegítette a szaporodást, de a H10-nél jobban. A glutamát védő hatása nyilvánult meg mindkét törzsnél a 7-es pH értéknél, ugyanis a 6%-os só (és 0,05% glutamát) gátolta a törzsek szaporodását, de amikor a 0,05% helyett 0,15% glutamátot tartalmazott az összetétel a vizsgált törzs már szaporodott.

A hatásfelületek alapján megállapítható, hogy a NaCl és pH hatása volt a legjelentősebb a C1 törzs szaporodásának gátlásában, a tesztmikroba, 6,5 pH alatt már nem tudott növekedni 4% NaCl és 0,1% glutamát koncentráció mellett. A H10 törzset is ez a kombináció gátolta a legnagyobb mértékben, azonban alacsonyabb 5,5 pH értéknél. A törzsgyűjteményi törzs már 2% melletti sónál sem tudott növekedni, a húsipari izolátum azonban csak 7% NaCl tartalommal volt visszaszorítható. A C1 törzs gátlására pH 6,5 alatt, viszont elegendő 2% NaCl tartalom is. A Na-laktát a felületek alapján csak a H10 törzsnél mutatott gátló hatást, de akkor amikor a legjobb gátló hatással rendelkező pH-val volt kombinációban. A 0,8-1% Na-laktát alkalmazásával elegendő 2-4 % NaCl használata vagy pH 7,0 alatti beállítás. A glutamát serkentő hatása volt megfigyelhető pH 7 feletti tápközegben vagy 2% NaCl alatt. A varianciaanalízis eredményei szerint a C1 törzsre szignifikáns hatást gyakorolt a pH és a NaCl koncentráció lineáris tagjai, valamint a pH és a NaCl koncentráció

lineáris részei közötti kölcsönhatás. Tehát a pH és a NaCl gátolta a *Listeria* a szaporodását. A húsipari izolátumnál is a C1-hez hasonlóan szintén a pH és a NaCl koncentráció lineáris tagjai, valamint a pH és a NaCl koncentráció lineáris részei közötti kölcsönhatás gyakorolt szignifikáns hatást.

A szakirodalom szerint a glutamát (GAD rendszer) segíti a *Listeria monocytogenes*-t az alacsony pH okozta stressz hatások kivédésében. A kísérleti munkám eredményei a vizsgált koncentráció tartományban ezt alátámasztották a C1, vagyis a törzsgyűjteményi törzs esetében, ugyanis alacsony pH tűrőbbé vált a baktérium. A szaporodásgörbéknél a két, csak glutamát koncentrációban eltérő kombináció alapján (0-0,2%), megállapítható, hogy a C1 törzs szaporodását segítette, a H10-ét nem jelentősen.

Eredményeim alapján a C1 törzs nem szaporodik pH 6,5 és 2% NaCl tartalmú tápközegben, függetlenül a Na-laktát és glutamát jelenlététől. Ez a megállapítás azért fontos, mert a Na-laktát és a glutamát köztudottan ízfokozószerek és sok esetben támogatják a baktériumok szaporodását. A H10 törzsnél a kísérletek alapján a 0,8-1 % Na-laktát alkalmazásával elég a 2-4 % NaCl használata vagy pH 7,0 alatti beállítás a patogén inaktiválására. Ez az eredmény ígéretesnek tűnik a kombinált tartósítási módszer kidolgozásában, hiszen csökkenthető a felhasználandó NaCl mennyisége, amely - jelenlegi beviteli mennyiség mellett is - számos szív- és érrendszer betegséget okoz.

Több összetételnél tapasztaltam, hogy a 24 órás mérés végére indult be a szaporodás. Ezért például más kísérleti pontokat választva a görbék közti különbségek szignifikánsabbak lennének, ami aztán a varianciai analízisben és hatásfelületekben is megmutatkozna. További kísérleteket tartok szükségesnek (pl. valódi húskészítmény mátrixban), hogy biztonságosan megállapítható legyen az egyes faktorok hatása, valamint az íz, illat, állag, megjelenítés stb. változása.

7 IRODALOMJEGYZÉK

- Allerberger, F., Wagner, M., (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clin. Microbiol. Infect. 16, 16–23
- Anonymus (2009). *Listeria monocytogenes* outbreak. Final update: April 17, 2009. Available from http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/listeria/listeria_2009-eng.php
- Aureli, P., Fiorucci, G. C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., Salmaso, S. (2000): An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. New England Journal of Medicine, 342, 1236-1241.
- Ayaz, N. D., & Erol, I. (2010). Relation between serotype distribution and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from ground turkey. Journal of Food Protection, 73(5), 967-972
- Barmpalia, I. M., Geornaras, I., Belk, K. E., Scanga, J. A., Kendall, P. A., Smith, G. C., et al., (2004) Control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters with antimicrobials in the formulation and by dipping in organic acid solutions. Journal of Food Protection, 67, 2456-2464.
- Bedie, G. K., Samelis, J., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., and Smith, G. C. (2001) Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* postprocessing contamination on frankfurters stored at 4°C in vacuum packages. Journal of Food Protection, 64, 1949-1955.
- Bell, C., Kyriakides, A., C.de.W., McClure, P.J. (Eds.) (2002). *Listeria monocytogenes*. In: Blackburn, Foodborne Pathogens—Hazards, Risk Analysis and Control. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 337–361
- Bíró, G.(1993): Élelmiszer higiénia, Budapest, Agroinform Kiadó, 75-76, 111.
- Boerlin, P., Rocourt, J., Piffaretti, J.C., (1991). Taxonomy of the genus *Listeria* by using multilocus enzyme electrophoresis. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 59–64.
- Booth, I. R., Kroll, R. G.,(1989): The Preservations of Foods by Low pH. 119-160. p. In: Gould, G. W. (Szerk.): Mechanisms of action of food preservation procedures. Essex: Elsevier Science Publishers Ltd, UK, 441 p.
- Breslin, P.A., Beauchamp, G.K., (1997). Salt enhances flavour by suppressing bitterness. Nature 387, 563
- Chihib, N. E., Ribeiro, D. S., Delattre, G., Laroche, M., Federighi, M. (2003): Different cellular fatty acid pattern behaviors of two strains of *Listeria monocytogenes* Scott A and CNL 895807 under different temperature and salinity conditions. FEMS Microbiol. Lett. 218, 155-160

- Cotter, P. D; O'Reilly, K.; Hill, C. (2001): Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH foods. J Food Prot., 64 :1362-1368
- Denny, J.; McLauchlin, J. (2008): Human *Listeria monocytogenes* infections in Europa- an opportunity for improved European surveillance. Euro Surveill. 13; pii8082
- Desmond, E., (2006). Reducing salt: a challenge for the meat industry. Meat Science 74,188–196
- Diniz FM, Martin AM. (1996): Use of response surface methodology to describe the combined effects of temperature and E:S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. Int J Food Sci Technol; 31:419–426
- Dons L., Rasmussen, O.F., Olsen, J.E.(1992): Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. 6, 2919-2929.
- EFSA (Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards, BIOHAZ) (2007). Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods and the related risk for human illness
- EFSA (2011). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2009. EFSA Journal, 9, 2090-2477
- Engstrom, A., Tobelmann, R.C., Albertson, A.M., (1997). Sodium intake trends and food choices. American Journal of Clinical Nutrition 65, 704S–707S
- European Commission (2009). The rapid alert system for food and feed (RASFF). Annual Report 2008.
- Faleiro, M.L., Andrew, P.W., Powder, D., (2003): Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. International Journal of Food Microbiology 84, 207–216
- Farber, J. M., and Pterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiological Reviews, 55,476-511.
- Farber, J. M., and Pterkin, P. I. (2000): *Listeria monocytogenes*. In Lund, B. M., Baird-Parker, T. C., Gould, G. W. (ed) The Microbiological Safety and Quality of Food Vol. II., Aspen Publishers Inc., Gathersburg, Maryland, 1178-1232.
- Ferreira, A., O'Byrne, C.P., Boor, K.J., (2001): Role of sigma(B) in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 67 (10), 4454–4457
- Galdiero, E., D'Isanto, M. and Aliberti, F. (1997): Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*. Res. Microbiol. 148, 305-313

- George, S. M; Richardson, L. C.C; Peck, M. W. (1996): Predictive models of the effect of temperature, pH and acetic and lactic acids on the growth of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 32, 73-90
- Gould, G. W. (1996): Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. Journal of Food Protection, Suppl, 82-86
- Gounadaki, A.S., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H., Nychas, G-J.E. (2007). Effect of packaging and storage temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* inoculated postprocessing on sliced salami. Journal of Food Protection 70, 2313–2320
- Gray, M. L. and A. H. Killinger (1966): *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bacteriol, Rev. 30:309-382
- Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., Orsi, R.H., Fortes, E.D., Milillo, S.R., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., Swaminathan, B., Sauders, B.D., (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment. Finger Lakes National Forest. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60,1280–1288
- Guinard JX, Zoumas-Morse C, Mori L, Panyam D, Kilara (1996) A. Effect of sugar and fat on the acceptability of vanilla ice cream. J Dairy Sci Technol; 79:1922–1927
- Guo, X., Zou, X., & Sun, M. (2010). Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary characterization of polysaccharides from *Phellinus igniarius*. Carbohydrate Polymers, 80, 344–349
- Hudson, J.A. (1992): Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 14:178-180
- Hudson, J.A.; Mott, S.J. and Penney N. (1994): Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. J. Food. Prot. 57,204-208
- Hülphers, G.(1911):Lefvernekros hos kanin orsakad af en ej forut beskrifven bakterie. Sven.Vet.Tidskr.16:265-273.Reprinted:1959,Medlemsbl. Sverge. Vet. Forb. 11, 10-16
- Institute of Food Technologists' (1987) Expert Panel on Food Safety and Nutrition. Monosodium Glutamate. Food Technology, 41,143-145
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods(ICMSF)(1994).Choice of sampling and criteria for *Listeria monocytogenes*.Int. J. Food Microbiol. 22, 89–96
- Ivanek, R., Grohn, Y.T., Tauer, L.W., Wiedmann, M., (2004). The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 44, 513–523
- Kazmierczak, M.J., Mithoe, S.C., Boor, K.J., Wiedmann, M., (2003): *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. Journal of Bacteriology 185, 5722–5734

- Kim, K. T., Murano, E. A., Olson, D. G. (1994): Effect heat shock on production of listeriolysin O by *Listeria monocytogenes*. J. Food. Safety 14, 273-279
- Kimber L. Rundlett, Dr. Daniel W. Armstrong (1994.). „Evaluation of free D-glutamate in processed foods”. *Chirality* 6 (4), 277-282
- Kiss, R., Tirczka, T., Szita, G., Bernáth, S., Csikó, Gy. (2004): *Listeria monocytogenes* food monitoring data and incidence of human listeriosis in Hungary. International Journal of Food Microbiology, 112, 71-74
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., Sofos, J.N., (2003). Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology 69, 7514–7516
- Lado, B. H. and Yousef , A. E.(2004): Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In E.T. Ryser and E.H. Marth (eds.), *Listeria*, listeriosis, and food safety. Marcel Dekker . Inc. , New York. (in press)
- Lahti, E., Johansson, T., Honkanen-Buzalski, T., Hill, P., Nurmi, E., (2001). Survival and detection of *Escherichia coli* 0157:H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. Food Microbiology 18, 75–85
- Lecuit, M., (2007). Human listeriosis and animal models. Microbes and Infection 9 (10), 1216–1225
- Leistner, L., (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. International Journal of Food Microbiology 55, 181–186
- Leistner, L., (1992). Food preservation by combined methods. Food. Res. Int. 25, 151–158
- Leistner, L., Gould, G. (2002): Hurdle technologies. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, USA, 194
- Lee, H., Song, M., Hwang, S., (2003). Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. Process Biochemistry 38, 1685–1693
- Li, C., Bai, J., Cai, Z., Ouwang, F., (2002). Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. Journal of Biotechnology 93, 27–34
- Lianou, A., and Sofos, J. N. (2007). A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. Journal of Food Protection, 70, 2172e2198.
- Liu, B.L., Tzeng, Y.M., (1998). Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. Bioprocess Engineering 18, 413–418.

- Lorentzen, G., Olsen, R. L., Bjørkevoll, I., Mikkelsen, H., & Skjerdal, T. (2010). Survival of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in muscle of cod (*Gadus morhua* L.) during salt-curing and growth during chilled storage of rehydrated product. *Food Control*, 21, 292e297.
- Lou, Y., & Yousef, A. E. (1996). Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. *Journal of Food Protection*, 59, 465–471.
- Lu, Z., Sebranek, J. G., Dickson, J. S., Mendonca, A. F., and Bailey, T. B. (2005). Inhibitory effects of organic salts for control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters. *Journal of Food Protection*, 68(3), 499-506.
- Magyar Élelmiszer-biztonsági Hivatal: www.mebih.gov.hu/
- Mataragas M., Zwietering M. H., Skandamis P. N., Drosinos E. H.,(2010). Quantitative microbiological risk assessment as a tool to obtain useful information for risk managers – Specific application of *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat meat products. *International Journal of Food Microbiology* 141, S170- S179
- McClure, P. J., Roberts, T. A., & Oguru, P. O. (1989). Comparison of the effects of sodium chloride, pH, and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and liquid medium. *Letters in Applied Microbiology*, 9, 95–99
- McKellar, R.C., Lu,X.; Knight, K.P.(2002): Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 73,127– 135
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K., (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 15–33
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Breese, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607–625
- Miller, A. J. (1992): Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Scott. A. J. Food Prot.* 55, 414-418
- Miller, R.K.; Acuff, G.R., (1994): Sodium lactate affects pathogens in cooked beef. *J. Food Sci.* 59, 15–19
- Montgomery, D.C., (1991): *Design and Analysis of Experiments*, 3 rd edn.Wiley, and sons Inc, New York, pp. 39–76
- Moorhead, S.M., Dykes, G.A., (2004). Influence of the sigB gene on the cold stress survival and subsequent recovery of two *Listeria monocytogenes* serotypes. *International Journal of Food Microbiology* 91, 63–72

- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R. (1926) A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). J. Pathol. Bacteriol. 29, 407–439
- Murray, E. G. D., (1963): A retrospect of listeriosis. In Second symposium on listeric infection. (ed.): M. L.Gray . Bozeman, MT: Artcraft Printer, 3-6
- Nissen, H., Holck, A., (1998). Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella kentucky* in Norwegian fermented, dry sausage. Food Microbiology 15, 273–279
- Nyfeldt, A. (1929): Etiologie de la Mononucleose infectieuse. Compt. Rend. Soc. Biol. 101, 590-591
- Nyilas J., (1980). Szervetlen kémia. Gondolat Könyvkiadó, Budapest.
- Orsi, Renato H.; Henk C. den Bakker, Martin Wiedmann. (2011): *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic Characteristics. International Journal of Medical Microbiology 301, 79–96
- Országos Epidemiológiai Központ (OEK): Magyarország éves járványügyi helyzete. <http://www.oek.hu/oek.web?nid=509&pid=2&to=838,1248&lang=hun> utolsó megtekintés: 14. 10. 2011
- Petran, R.L. and Zottola, E.A. (1989) A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. Food Sci. 54, 458-460
- Phan-Thanh, I. and Montagne, A. (1998): Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. J. Gen. Appl. Microbiol. 44, 183-191
- Pirie, J. H. H. (1927): A new disease of veld rodents "Tiger River Disease". Publ. S. African Inst. Med. Res. 3, 163-186
- Porto, A. C. S., Franco, B. M. G., Sant'Anna, E. S., Call, J. E, Piva, A., and Luchansky, J. B. (2002). Viability of a five-strain mixture of *Listeria monocytogenes* in vacuum sealed packages of frankfurters, commercially-prepared with and without 2.0 or 3.0% added potassium lactate, during extended storage at 4 and 10°C. Journal of Food Protection, 65(2), 308-315
- Porto-Fett, A.C.S., Campano, S. G., Smith, J. L., Oser, A., Shoyer, B., Call, J. E., Luchansky, J. B. (2010). Control of *Listeria monocytogenes* on commercially-produced frankfurters prepared with and without potassium lactate and sodium diacetate and surface treated with lauric arginate using the Sprayed Lethality in Container (SLIC[®]) delivery method. Meat Science, 85, 312-318
- Potel J. (1952): Zur Granulomatosis infantiseptica. Zentr. Bakteriologie. Parasitenkunde. Abt. I Orig. 158, 329-331
- Reddy, P.R.M., Mrudula, S., Ramesh, B., Reddy, G., Seenayya, G., (2000): Production of thermostable pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state fermentation:

- optimization of enzyme leaching conditions using response surface methodology. *BioProcess Engineering* 23, 107–112
- Rieu, A., Lemaître, J.-P., Guzzo, J., Piveteau, P., (2008). Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 76–82
- Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C., Tompkin, R.B., (1996). *Microorganisms in Foods 5—Microbiological Specifications of Food Pathogens—ICMFS*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 141–182
- Rocourt, J., (1996). Risk factors for listeriosis. *Food Control* 7 (4/5), 195–202
- Rubio, B., Martinez, B., Garcia-Cachan, M. D., Rovira, J., Jaime, I., (2007). The effects of high pressure treatment and storage periods on the quality of vacuum-packed „salsichón” made of raw material enriched in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 180-187
- Ryser, E. T. and Marth, E. H (1988): Growth of *Listeria monocytogenes* at different pH values in uncultured whey or whey cultured with *Penicillium Camamberti*. *Can. J. Microbiol.* 34, 730-735
- Ryser, E. T. and Marth, E. H. (2007). *Listeria, listeriosis and food safety* (3rd ed). Boca Raton, Fl: CRC Press
- Samelis, J., Bedie, G. K., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., and Smith, G. C., (2005). Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bolgna stored at 4°C vacuum packages. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 38(1), 21-28
- Schiffman, S.S.(2000). Intensification of sensory properties of foods for the elderly. *Journal of Nutrition*, 130 , 927S-930S
- Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S., Broome, C. V. (1983): Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food . *New England Journal of Medicine* 308, 203-206
- Schlyter, J.H., Glass, K.A., Loeffelholz, J., Degnan, A.J., Luchansky, J.B., (1993). The effects of diacetate with nitrite, lactate, or pediocin on the viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. *Int. J. Food Microbiol.* 19, 271–281
- Shabala, L., Lee, S.H., Cannesson, P., Ross, T., (2008). Acid and NaCl limits of growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *Journal of Food Protection* 71, 1169–1177
- Shelef, L.A., (1994). Antimicrobial effects of lactates: a review. *J. Food Prot.* 57, 445–450
- Shelef, L.A., Addala, L., (1994). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by sodium diacetate. *J. Food Safety* 14,103–115

- Small, P.L.C., Waterman, S.R., (1998): Acid stress, anaerobiosis and gadCB: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. Trends in Microbiology 6, 214–216
- Sofos, J.N., (1993). Current microbiological considerations in food preservation. International Journal of Food Microbiology 19, 87–108
- Sofos J. N., (2008) Challenges to meat safety in the 21st century. Meat Science 78, 3-13
- Swaminathan, B., and Gerner-Smidt, P., (2007). The epidemiology of human listeriosis. Microbes and Infection, 9, 1236-1243
- Stekelenburg, F. K. (2003). Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* in frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures. Food Microbiology, 20(1), 133-137
- Stekelenburg, F.K., Kant-Muermans, M.L.T., (2001). Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 66, 197–203
- Thévenot, D., Delignette-Muller, M.L., Christieans, S., Vernozzy-Rozand, C., (2005). Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. International Journal of Food Microbiology 101, 189–200
- Terrell, R.N., (1983). Reducing the sodium content of processed meats. Food Technology 37, 66–71
- Walker, S.J., Archer, P. and Banks, J.G. (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J. Appl. Bacteriol. 68, 157-162

Internetes hivatkozások

- 1441/2007/EK rendelet (2007): december 5. Az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól szóló 2073/2005/EK rendelet módosításáról, L 322/12 Az Európai Unió Hivatalos Lapja, 2007.12.7.
http://epa.oszk.hu/00800/00878/01293/pdf/L_2007_322_0012_0029.pdf
- Na-glutamát: <http://terebeess.hu/tiszaorveny/fuszer/glutamat.html>
- Na-glutamát: <http://www.food-info.net/uk/national/msg-report.htm>
- Na-glutamát: <http://Food-Info.net> : E-numbers : E621 : Monosodiumglutamate
- Na-glutamát előállítása: <http://www.ajinomoto.com/amino/eng/product.html>
- Na-glutamát hatása: <http://www.food-info.net/uk/intol/msg.htm>
- Na-laktát: Horváth M. <http://www.vilaglex.hu/Lexikon/Html/NaLactat>.
- Mohácsiné, F. Cs. (2010) Tartósítóiparok II: Konzerv-, hús- és hűtőipari mikrobiológia. előadás, 21-22 dia; <http://mikrobio.unicorvinus.hu/index.php?id=20773>

Ábrák, és táblázat forrásai

1. táblázat: *Listeria* helyzet az Európai Unióban:
www.mebih.gov.hu/attachments/369_ML_Listeriosis.p Cseh Júlia és Mészáros László: 2009. október 20.
1. ábra Na-laktát: Horváth M.; <http://www.vilaglex.hu/Lexikon/Html/NaLactat.htm> utolsó megjelenítés:09-11-2011.
2. ábra Na-glutamát: Lölliger, J. (2000) Function and importance of glutamate for savory foods. *Journal of Nutrition*, 130, 915S-920S
3. ábra A hús- és húskészítmény-fogyasztás kockázata:
www.ohki.hu/tevekenysegunk/szaktanacsadas/kockazat.pdf
4. ábra A hatásfelületek:
http://books.google.com/books?hl=hu&lr=&id=89oznEFHF_MC&oi=fnd&pg=PR11&dq=Response+surface+methodology:+process+and+product+optimization+using+designed+experiments&ots=DhtMW4lTiV&sig=l79m-VnrSXp4vjy7taLJoEhiddY#v=onepage&q&f=false