



Élelmiszertudományi Kar

Doktori értekezés tézisei

**LAKTOBACILLUSZOK VIZSGÁLATA
TOVÁBBFEJLESZTETT KOLORIMETRIÁS MÓDSZERREL**

Hegyi Ferenc

**Nemzeti Agrárkutatói és Innovációs Központ
Élelmiszertudományi Kutatóintézet
Biológiai Osztály**

**Budapest
2014**

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Felföldi József, PhD**

Egyetemi tanár

Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar,

Fizika-Automatika Tanszék

Témavezető: **Dr. Halász Anna, DSc**

Tudományos tanácsadó

Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2014. június 03-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Farkas József, MHAS

Tagjai

Takács Krisztina, PhD

Kukolya József, PhD

Rezessyné Szabó Judit, PhD

Beczner Judit, CSc

Belák Ágnes, PhD

Opponensek

Mohácsiné Farkas Csilla, PhD

Varga László, PhD

Titkár

Takács Krisztina, PhD

1. BEVEZETÉS

Nem túlzás kijelenteni, hogy az utóbbi 30 év alatt szinte forradalom játszódott le a mikrobiológiában. Jóllehet ez még kevésbé ismert, még kevésbé értékelt, következményei mégis új távlatokat és lehetőségeket nyitnak az orvostudományban, a mezőgazdaságban és az élelmiszeriparban is. Az új, elsősorban molekuláris biológiai módszerek és eljárások feltárták, hogy a földi életformák túlnyomó része a mikrodimenziókban teljesebben ki. A vírusok, baktériumok, gombák, algák, protozoonok sokfélesége messze felülmúlja a makroorganizmusok, a növény- és állatvilág mégoly gazdag és sokkal jobban ismert változatosságát.

Az új, még felfedezésre, megismerésre váró mikroorganizmusokban a genetikai sokoldalúság és anyagcsere-képesség gazdag tárháza rejlik. Ennek feltárása messzeható következményekkel fog járni, és kihat a gyakorlati élet számos területére, mint amilyenek a mezőgazdasági termelés fokozása, az élelmiszerek megőrzése, azok biztonságának és minőségének javítása, új, hatékony gyógyszerek előállításának, a hulladékok újrahasznosítása, a környezetkárosító szennyezések ártalmatlanítása.

Nagy általánosságban azt mondhatjuk, hogy az élelmiszerekben és alapanyagokban lévő mikroorganizmusok elszaporodva rontják a termék minőségét, romlást okoznak, de számos esetben hozzájárulhatnak a termék jellegéhez, sőt javítják annak eltarthatóságát, élvezeti értékét és a fogyasztó egészségére is jótékony hatást fejtenek ki. Az élelmiszer mikrobiológiai vizsgálatok kiterjednek az alapanyagok, a feldolgozási vonal és végtermékek vizsgálatára, de az élelmiszerlánc szemlélet érvényesítése szükségessé teszi a környezet mikrobiológiai állapotának vizsgálatát, valamint a szállítás és forgalmazás során végbemenő mikrobiológiai változások monitorozását is a fogyasztók számára biztonságos és megfelelő élelmiszerek előállításának érdekében.

Számos ma is használt mikrobiológiai vizsgálati módszer több mint száz éve alakult ki. Világszerte a vizsgálatok millióit végzik évente ezekkel a hagyományos tenyésztési módszerekkel annak ellenére, hogy idő- munka- és anyagigényesek, illetve az eredmény gyakran csak több napos vizsgálatosorozat után értékelhető (DEÁK, 2006a; DEÁK, 2006b). Emiatt a hagyományos tenyésztési élősejt számlálási módszerek nem alkalmasak arra, hogy a proaktív és megelőző jellegű, korszerű minőségszabályozás igényeinek megfelelően gyors, hatékony beavatkozást lehetővé tevő módon jussunk a mikrobiológiai eredményekhez. A módszerek korszerűsítésének mozgatórugója, hogy az élelmiszerek mikrobiológiai biztonsága világszerte növekvő gondot jelent, s alkalmazkodni kell a vizsgálati módszerekkel is a változó

élelmiszertermelési, feldolgozási és forgalmazási viszonyokhoz. Fontos lehet még a különböző okokból károsodott, szaporodásra képtelen, de mégis élő mikroorganizmusok megbízható kimutatása. Mindezek a megváltozott igények azt követelik meg, hogy gyorsabban, több mintából, kevesebb élő munkával, olcsóbban és mégis informatívabban jussunk eredményekhez. Ezeknek az igényeknek a kielégítésére a mikrobiológia számos társtudomány és szakterület eszköztárát hívhatja segítségül, mint például az analitikai kémiát, a fizikai kémiát vagy az enzimológiát, az immun-biokémiát, a biotechnológiát, sőt a molekulárbiológia és génebszét eredményeit is, mind pedig a szenzor- és műszerfejlesztést, valamint az elektronika és számítástechnika eszköztárát, amelyek segítségével a korszerű mikrobiológiai módszerek képesek a mikroba-biomassza szelektív kimutatására, a mikrobaszaporodás, illetve anyagcsere-termékeik meghatározására (FARKAS, 1998).

A műszeres módszerek érzékenysége, vagyis a kimutatható sejtkoncentráció alsó határa sajnos még jelentősen elmarad a klasszikus tenyésztési eljárásokétól, illetve azok érzékenységének növelése általában a vizsgálatok időigényének a növekedését vonja maga után. A további fejlesztésekben nagy hangsúlyt fektetnek a gyorsmódszerek érzékenységének növelésére és specifikusságának fokozására, valamint az élő, de nem tenyészthető („VNC = *viable but non culturable*”) sejtek kimutathatóságára.

A tejsavbaktériumok és köztük a *Lactobacillus*-ok évezredek óta közeli kapcsolatban állnak az emberrel, amely nem annyira meglepő, mivel ezek a mikroorganizmusok a környezetünkben számos helyen megtalálhatóak, mint például a növények felszínén, a talajban és még az emberi béltraktusnak is szerves részét képezik, amelyek így nagymértékben hozzájárulnak az egészséges immunrendszer fenntartásához és az emésztési folyamatokat is segítik. A *Lactobacillus*-ok jótékony hatásukat az anyagcseréjük során termelt elsődleges és másodlagos anyagcsere-termékeik segítségével fejtik ki. Már időszámításunk előtti korszakokban kihasználta az ember ezeket az előnyös tulajdonságokat, zöldség, hús és tej fermentációjára is, így hosszabítva meg az élelmiszereik eltarthatóságát. Az élelmiszerek eltarthatóságának meghosszabításán túl, élvezeti értéküket és emészthetőségüket is nagymértékben növelik e mikroorganizmusok.

Mindezen áldásos tevékenységükön felül, a napi rendszerességgel megfelelő mennyiségben fogyasztott, laktobacillust tartalmazó, úgynevezett probiotikus élelmiszerek bizonyítottan javítják az immunrendszerünk működését, illetve számos betegség kialakulásának kockázatát csökkentik.

„Nincs a baktériumoknak még egy olyan csoportja, amely az emberrel olyan sokoldalú viszonyban állna, mint a tejsavbaktériumok. Ezért fontos és szükséges őket jobban megismerni” (DEÁK, 2005).

Ezért munkám céljával azt tűztem ki, hogy a *Lactobacillus* nemzetség tagjaiból molekuláris biológiai módszer segítségével szelektálok bakteriocin termelő törzseket, illetve a bakteriocin gátló aktivitásának mérésére kidolgozok egy dehidrogenáz enzimaktivitás mérésen alapuló kolorimetriás gyorsmódszert, amely a mikroorganizmusok élősejtszámának gyors kimutatását is lehetővé teszi.

1.1. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám céljaul tűztem ki:

- Egy dehidrogenáz enzimaktivitás mérésen alapuló kolorimetriás módszer adaptálását *Laktobacillus* törzsek élő sejtszámának gyors meghatározására, ami bakteriocin gátló aktivitásának méréséhez is alkalmazható.
- Az új kidolgozott módszert befolyásoló paraméterek (pH, táptalaj, inkubációs idő) feltárását valamint a módszer esetleges validálásához szükséges teljesítmény jellemzőinek meghatározását, illetve a módszer összehasonlítását hagyományos élő sejtszám meghatározási módszerekkel.
- Bakteriocin termelést kódoló gének kimutatásához DNS izolálási módszer kidolgozását valamint a PCR eljárás optimalizálását.
- A PCR technikával igazolt bakteriocin (plantaricin) termelést kódoló gént tartalmazó törzsek felülűszójából a fehérje jellegű gátlóanyag izolálását gélkromatográfiás módszer segítségével valamint molekulatömegének meghatározását.
- Az izolált bakteriocin gátlóaktivitásának igazolását.

2. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

2.1. Kísérletekben alkalmazott mikroorganizmusok

Lactobacillus törzsek:

Lactobacillus acidophilus N2, *Lb. casei* subsp. *casei* DMF 30120 154, *Lb. casei* 2107, *Lb. casei* 2752, *Lb. casei* 2756, *Lb. casei* 2763, *Lb. casei* Shirota, *Lb. curvatus* 2768, *Lb. curvatus* 2770, *Lb. curvatus* 2771, *Lb. curvatus* 2775, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B397, *Lb. fermentum* D13, *Lb. fermentum* DT41, *Lb. paracasei* subsp. *casei* DMF 30136 SF1, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* DMF 30134 05, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 2749, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 2750, *Lb. plantarum* DMF 30131 01, *Lb. plantarum* 2108, *Lb. plantarum* 2142, *Lb. plantarum* 2741, *Lb. plantarum* DSM 9843 299v, *Lb. plantarum* VE56, *Lb. rhamnosus* DMF 30105 VT1, *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. sakei* DSM 20017 *sakei*

Kontrollként használt baktérium törzsek:

Thermoplasma acidophilum DSM 1728, *Thermobifida cellulolytica* DSM 44535,
Escherichia coli DH10B

2.2. Alkalmazott táptalajok

Szintetikus, laboratóriumi táptalajok: de Man, Ragosa, Sharpe (MRS) tápleves, MRS agar, MRS lágyagar, Tejtáplé

Természetes táptalajok: Csicsóka táplé, Céklalé

2.3. Alkalmazott módszerek

A vizsgált tejsavbaktérium törzsek sejtszámát, szaporodását, illetve gátlóanyagokkal szembeni érzékenységét, lemezöntéssel, agardiffúziós módszerrel, turbiditásméréssel (mikrotiterlemezen, 630-nm-en), illetve továbbfejlesztett 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid (MTT) kolorimetriás módszerrel vizsgáltam.

A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz szükséges, megfelelő mennyiségű és minőségű örökítőanyagot a Wizard és QuickGene-mini80 DNS izoláló módszerek kombinálásával nyertem ki a vizsgált mikroorganizmusokból. Az adaptált PCR technika segítségével felszorzozott DNS fragmentumokat poliakrilamid-gélelektroforézissel detektáltam.

A bakteriocin termelést kódoló gén jelenléte alapján, PCR-technika segítségével szelektált *Lactobacillus*-ok felülúszójában lévő fehérjéket, gélkromatográfia segítségével, Molselect G-25 elnevezésű, 40-120 µm szemcseátmérőjű felszintetikus gélképző anyagot használva molekulaméret alapján fracionáltam. Az elválasztott frakciók *Lb sakei* DSM20017 törzsre kifejtett gátlóaktivitását turbiditásméréssel, mikrotiterlemezen ellenőriztem. A gátló frakció molekulatömegét SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) határoztam meg.

3. EREDMÉNYEK

Munkám céljával tűztem ki, hogy a *Lactobacillus* törzsek vizsgálatához kidolgozok egy gyors alternatív, dehidrogenáz enzimaktivitás mérésen alapuló módszert, amely alkalmas az élő sejtek sejtszámának, illetve azok különböző gátlóanyagokkal szembeni érzékenységének meghatározására a hagyományos tenyésztésen alapuló módszerekhez szükséges idő töredéke alatt. Az eredetileg emlős sejtek vizsgálatára kidolgozott 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid (MTT) klorimetriás módszer adaptálása során az első lépés a tetrazólium bromid optimális koncentrációjának (8-9 mg/ml MTT), a vizsgált *Lactobacillus* törzsek mérési tartományba eső sejtkoncentrációjának (10^7 - 10^8 sejt/ml) és az inkubációs időnek a meghatározása volt.

A módszer kidolgozása során azt tapasztaltam - összhangban a szakirodalomban leírtakkal miszerint számos vegyület befolyásolhatja az MTT redukcióját, hogy a tejsavbaktériumok szaporítására alkalmazott MRS, illetve csicsóka tápleves a tetrazólium bromid redukálódását okozza, zavarva így a mérés pontosságát. Ebből következett, hogy minden esetben szükséges a szaporító közeg eltávolítása a baktérium sejtekről a tetrazólium bromid hozzáadása és az ezt követő inkubálás előtt. Az optimalizálás során a 2 órás 37 °C-os inkubáció bizonyult ideálisnak szem előtt tartva, hogy gyorsmódszer kidolgozása volt a cél. A módszer alkalmazása során világossá vált továbbá, hogy a *Lactobacillus* sejtek dehidrogenáz enzimaktivitása az élő sejtszámon és a szaporodási sebességen kívül törzsfüggő, illetve jelentősen befolyásolja a sejtek szaporítására alkalmazott táptalaj összetétele. Tehát megállapítható, hogy a kifejlesztett MTT módszerrel pontos élősejtszám meghatározásához előzetesen minden egyes *Lactobacillus* törzs esetén külön kalibráció szükséges, figyelembe véve a szaporításra alkalmazott táptalajt is. Továbbá a sejtek tetrazólium bromid redukáló képessége a pH esésével csökkenő tendenciát mutat. A meghatározott körülmények és paraméterek mellett a keletkezett formazán kristályok koncentrációja és az élősejtszám között szoros korreláció áll fenn. A kidolgozott kolorimetriás módszer alkalmas *Lactobacillus* törzsek élő sejtszámának meghatározására kevesebb mint 4 óra alatt. A gyorsmódszert kidolgoztam 2 ml-es eppendorf csőre (9 mg/ml MTT koncentráció, 2 óra inkubáció, 37 °C), illetve miniaturizáltam 96-lyukú mikrotiter lemezre (8 mg/ml MTT koncentráció, 2 óra inkubáció, 37 °C), amely még kevesebb vegyszert igényel, illetve párhuzamosan akár 32 minta (3 párhuzamos) vizsgálatát teszi lehetővé.

További célom volt a törzsgyűjteményünkben lévő *Lactobacillus* törzsek szelektálása bakteriocin termelésük alapján molekuláris biológiai módszer segítségével. A feladat

megvalósításához egy új, a *Lactobacillus*-ok DNS-ének kivonására alkalmas izolálási módszert dolgoztam ki, Wizard és a QickGene-mini80 DNS izoláló módszer kombinálásával, amely segítségével megfelelő mennyiségű és tisztaságú örökítőanyag nyerhető ki a baktérium sejtekből. PCR módszert optimalizáltam *Lactobacillus*-ok azonosítására, valamint a plantaricin bakteriocin termelést kódoló gén kimutatására. A vizsgálatok során első lépésként meg kellett határoznom az adott, egyszálú templát DNS sokszorozásához szükséges PCR-reakció optimális paramétereit. Ezek a vizsgálatok kiterjedtek többek között az optimális primer-és templát DNS koncentrációjának meghatározása mellett, az optimális primer-kapcsolódási hőmérséklet és a ciklusszám meghatározására.

Tejsavbaktérium törzsek fajspecifikus kimutatása során (IFL-IRL primerek) reakciónként 100 ng templát és 0,8 μ M primer végkoncentráció alkalmazása során kaptam a gélelektroforézises kiértékelés során a legélesebb fragmentumokat. A következő lépés a megfelelő primer-kapcsolódási vagy annealing hőmérséklet kiválasztása volt. Az előzőekben optimált összetételű reakcióelegyet alkalmazva, 52-68 °C közötti primerkapcsolódási hőmérsékleteken végeztem el a vizsgálatokat. Az agaróz gélelektroforézises kiértékelést követően kapott eredményeim alapján a legmegfelelőbb primerkötődési hőmérsékletnek az 59 °C bizonyult. Ezen paraméterek beállítása mellett 33 ciklusos reakciót alkalmaztam.

A plantaricin gén-specifikus reakció optimalálása során is a PCR reakcióhoz a legmegfelelőbb 100 ng templát- és 0,8 μ M primer (PInA1-PInA2) végkoncentráció alkalmazása bizonyult a legmegfelelőbbnek. Az optimális primerkötődési hőmérsékletet 55 °C, a megfelelő PCR reakció lezajlásához ebben az esetben is elegendőnek bizonyult a 33 ciklus.

Több törzsből (01; 2108; 2142; 2750; 2756; 2768; 2775; 299v; sakei; VE56; N2) sikeresen kimutattam a plantaricin termelést kódoló gén jelenlétét. E gén alapján szelektált törzsek felülúszóit oszlopkromatográfiás módszerrel frakcionáltam, a tesztmikroorganizmus (*Lactobacillus sakei* DSM 20017) szaporodását gátló frakciókból SDS-PAGE módszer segítségével kimutattam a bakteriocin jelenlétét valamint meghatároztam a molekulatömegét (1.43 kDa). Agarlemez módszer segítségével igazoltam, hogy a *Lactobacillus sakei* DSM 20017 törzs szaporodásának gátlásáért valóban a kimutatott fehérje felelős.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. **Sikeresen adaptáltam Wang és munkatársai (2007), eredetileg Mosman-által (1983) humán sejtekre kidolgozott MTT módszerét *Lactobacillus*-ok élősejtszám meghatározására. Megállapítottam az optimális paramétereket: baktériumsejt koncentrációt, MTT koncentrációt, inkubációs időt, pH hatást, amelyek esetén szoros korreláció áll fenn a sejtszám és a keletkezett formazán koncentráció között. A módszert miniaturizáltam; mikrotiter lemez segítségével (HEGYI et al., 2012).**
2. **Megállapítottam, hogy a formazán képződés (dehidrogenáz aktivitás) egyes törzseknél jelentősen eltér. Adott törzsnél is jelentősen befolyásolja a szaporító táplevés összetétele. Igazoltam, hogy azonos szaporodási sebességet eredményező, de eltérő szénhidrát bázisú tápoldat esetén is fenn áll a dehidrogenáz aktivitásban a különbség.**
3. **Igazoltam, hogy a kidolgozott módszer nem érzékeny a holt sejtekre. Adott törzsre felvett MTT-sejtkoncentráció kalibrációs görbe és az adott minta optikai denzitásának ismeretében az élő/holt sejtarány meghatározható.**
4. **A kifejlesztett eljárás alkalmas egyes törzsek mikroba szaporodását gátló komponensekkel szembeni érzékenységének vizsgálatára, illetve a minimális gátlókoncentráció meghatározására, ezt nizin esetre igazoltam.**
5. **PCR módszert adaptáltam, *Lactobacillus*-ok DNS alapú kimutatására. PCR technikával igazoltam plantaricin gén jelenlétét, a gént tartalmazó törzsek bakteriocin termelését, illetve vizsgáltam a gén expresszálódását, molekulatömegüket meghatároztam.**

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Kutatásaim alapján megállapítottam, hogy 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid (MTT) kolorimetriás módszer alkalmazható *Lactobacillus*-ok élő sejtszámának megállapítására, gátló anyagok hatásának gyors meghatározására, illetve a különböző környezeti paraméterek sejtek életképességére kifejtett hatásának vizsgálatára. A módszer a laboratóriumi kutatásokban megkérdőjelezhetetlen létjogosultsága mellett a gyakorlatban is hasznosítható számos élelmiszeripari termék, legfőképpen olyan funkcionális termékek gyors vizsgálatához, amelyeknek a fogyasztás pillanatáig meghatározott számú élő sejtet kell tartalmaznia a hozzáfűzött jótékony hatás kifejtése érdekében (probiotikumok), illetve ami még lényegesebb lehet, az élelmiszerekben előforduló romlást okozó és patogén mikroorganizmusok gyors kimutatására, ami a módszer paramétereinek további módosításaival elérhető.

Az emberek változó táplálkozási szokásainak köszönhetően megnövekedett az igény a természetes, kedvező beltartalmi tulajdonságok mellett hosszú minőség megőrzési idővel rendelkező élelmiszerek iránt, amelyek mindemellett kíméletes tartósítási eljárással, illetve természetes tartósító szerekkel kezelnek. A tejsavas fermentáció ideális módszer az ilyen típusú élelmiszerek előállításához, amelynél savnyító hatás mellett antimikrobás anyagok, köztük bakteriocinek képződhetnek, hozzájárulva így az élelmiszerek hosszabb eltarthatóságához, illetve kedvező beltartalmi tulajdonsággal ruházzák fel azt.

Így nagy jelentőséggel bír a tejsavbaktériumok bakteriocin termelés alapján történő szelektálása. Ehhez elengedhetetlen egy megfelelően kidolgozott molekuláris biológiai módszer, aminek segítségével a vizsgált törzsekben kimutatható a termelést hordozó gén jelenléte, illetve annak hiánya. Emellett igen fontos megbizonyosodnunk arról, hogy a bakteriocint kódoló gén expresszálódik is adott technológiai feltételek mellett.

A kutatás folytatásaként fontos a kidolgozott módszerek segítségével azoknak a környezeti tényezőknek a részletes vizsgálata, amelyek a bakteriocin termelést indukálják az egyes törzseknél, illetve fokozhatják azok termelését.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Publikáció folyóiratban

IF-es folyóiratcikk:

ZALÁN, ZS., HUDÁČEK, J., TÓTH-MARKUS, M., HUSOVÁ, E., SOLICHOVÁ, K., HEGYI, F., PLOCKOVÁ, M., CHUMCHALOVÁ, J., HALÁSZ, A. (2011): Sensorically and antimicrobially active metabolite production of *Lactobacillus* strains on Jerusalem artichoke juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91 (4), 672–679. IF₂₀₁₁: 1,436

HEGYI, F., ZALÁN, ZS., HALÁSZ, A. (2012):

Improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay for measuring the viability of lactic acid bacteria. *Acta Alimentaria*, 41 (4), 506-512. IF₂₀₁₂: 0,475

NEM IF-es folyóiratcikk:

LÁSZTITY, R., HALÁSZ, A., ZALÁN, ZS., NAGY, A., HEGYI, F., GELENCSÉR, É. (2010): Probiotikus tejsavbaktériumok felhasználhatók-e a kenyérgyártásban? Sütőiparosok, Pékek. 57 (2), 25-26.

Publikáció konferencia kiadványban

Magyar nyelvű (összefoglaló):

HEGYI, F., ZALÁN, ZS., HALÁSZ, A., (2010): 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium-bromid (MTT) alkalmazása tejsavbaktériumok enzimaktivitásának mérésére. XXXIII. Kémiai Előadói Napok Szeged, 2010. október 25-27, program és előadás-összefoglalók, p. 195.

Nemzetközi konferencia (teljes):

HALÁSZ, A., ZALÁN, ZS., NAGY, A., **HEGYI, F.**, GELENCSÉR, E. (2009): Can probiotic LAB strains be used to improve nutritional quality of bread? *5th International Congress FLOUR-BREAD '09 Proceedings*, p. 30-38. ISBN 978-953-7005-21-4

ZALÁN, ZS., **HEGYI, F.**, HALÁSZ, A. (2012): Improvement of whole grain breads microbial safety. *6th International Congress FLOUR-BREAD '11 Proceedings*, p. 22-29. ISSN 1848-2562

Nemzetközi konferencia (összefoglaló):

HALÁSZ, A., ZALÁN, ZS., NAGY, A., **HEGYI, F.**, GELENCSÉR, E. (2009): Can probiotic LAB strains be used to improve nutritional quality of bread. *5th International Congress FLOUR-BREAD '09 Abstract book* (ISBN 978-953-7005-19-1), p. 30.

HEGYI, F., ZALÁN, ZS., HALÁSZ, A. (2009): Development of Colorimetric Assay for Measuring of Bacteriocin Activity. Poszter- in: EFFoST 2009 Conference: New Challenges in Food Preservation Abstract CD, [P275].

HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., MÁTRAI, B., ZALÁN, ZS., **HEGYI, F.**, NÉMETH M. E., KING-DOBOZI, SZ. (2010): From SCP to probiotics - Challenges for foodchemists. *Women Chemists and Innovation, October 20-22, 2010- Keszthely, Hungary, Programme and Book of Abstracts*, p. 25. ISBN 978-963-9970-08-3.