Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Biológiai Intézet
Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék

# Napraforgó fehérjék biofizikai tulajdonságainak jellemzése és emészthetőségének vizsgálata *in vitro* rendszerben

**Doktori (PhD) értekezés**

Készítette:
Berecz Bernadett

ELTE Biológia Doktori Iskola (Prof. Dr. Erdei Anna)
Kísérletes Növénybiológia Doktori Program (Prof. Dr. Szigeti Zoltán)

Témavezető:
Prof. emer. Láng Ferenc
egyetemi tanár

Konzulens:
Dr. habil. Tamás László
egyetemi docens

2013
Budapest

# RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|---|---|
| **Alb1 és Alb2** | nem-metioningazdag napraforgó Albumin 1 és 2 |
| **APC** | antigén prezentáló sejt (Antigen Presenting Cell) |
| **CD** | cirkuláris dikroizmus (spektroszkópia) |
| **$D_{3,2}$** | az emulzió cseppjeinek átmérője |
| **DBPCFC** | kettős vakplacebo kontrollált terheléses teszt (Double Blinded Placebo Controlled Food Challenge) |
| **DER** | durvafelszínű endoplazmatikus retikulum |
| **DSC** | differenciális pásztázó kalorimetria (Differential Scanning Calorimetry) |
| **DTT** | ditiotreitol |
| **ER** | endoplazmatikus retikulum |
| **ε** | elasztikus modulus |
| **FcR** | Fc receptor |
| **FK** | tojás-1-foszfatidil-kolin |
| **G** | nyíróelaszticitás |
| **GI** | gasztrointesztinális |
| **GM-CSF** | granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) |
| **GSP** | Grain Softness Protein (a gabonafehérjék egy családja) |
| **IgE** | immunoglobulin E |
| **IgG** | immunoglobulin G |
| **IL-3, IL-5** | interleukin-3 és -5 |
| **LTP** | lipid transzfer fehérje (Lipid Transfer Protein) |
| **MALDI-TOF** | tömegspektrométer (Matrix-assisted laser desorption/ionization Time of Flight) |
| **MHC** | fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex) |
| **mRNS** | messenger RNS |
| **nsLTP** | nem-specifikus lipid transzfer fehérje (non-specific Lipid Transfer Protein) |
| **η** | nyíróviszkozitás |
| **OAS** | orális allergia tünetek (Oral Allergy Syndrome) |

| | |
|---|---|
| **oleoil-KoA** | oleoil-KoenzimA |
| **OFC** | nyílt terhelés (Open Food Challenge) (allergiavizsgálat esetén) |
| **PMSF** | fenil-metil-szulfonil-fluorid (phenylmethylsulfonyl fluoride) |
| **PR-14** | 14-es számú patogenezissel összefüggő fehérje (pathogenesis related) |
| **RP-HPLC** | reverz fázisú nagynyomású folyadék-kromatográfia (high pressure liquid chromatography) |
| **Rubisco** | ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz, a Calvin-ciklus kulcsenzime |
| **SDS PAGE** | nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis |
| **SFA8** | napraforgó albumin 8 (Sunflower Albumin 8) |
| **$SFA_{tot}$** | teljes napraforgó albumin frakció (beleértve az LTP-t is) |
| **SGF** | szimulált gasztrális folyadék (simulated gastric fluid) |
| **SPT** | karcolásos bőrteszt (Skin Prick Test) |
| **RAST** | Radioallergosorbent teszt |
| **TFA** | trifluoro-ecetsav (trifluoro-acatic acid) |
| **Th2** | 2-es típusú T helper immunválasz |
| **UV-CD** | ultraibolya cirkuláris dikroizmus spektroszkópia |

# TARTALOMJEGYZÉK

**RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE** 2
**TARTALOMJEGYZÉK** 4
**1. BEVEZETÉS** 7
**2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS** 8
**2.1. A tartalékfehérjék** 8
2.1.1. A prolamin szupercsalád 9
2.1.1.1. Az nsLTP-k 11
2.1.1.1.1. Az nsLTP-k másodlagos szerkezete 12
2.1.1.2. A 2S albuminok 13
2.1.1.2.1. A 2S albuminok másodlagos szerkezete 15
2.1.2. A napraforgó tartalékfehérjéi 16
2.1.2.1. A napraforgó LTP-je 16
2.1.2.2. A napraforgó 2S albuminjai 17
2.1.2.2.1. Kénszegény 2S albuminok (Alb1 és Alb2) a napraforgóban 17
2.1.2.2.2. Kénben gazdag napraforgó albumin (SFA8) 18
**2.2. Növényi fehérjék felhasználása a táplálkozásban** 19
2.2.1. A feldolgozás hatása az allergenicitásra 20
**2.3. Fehérjék az olaj/víz határfelületen** 21
**2.4. Ételallergiák** 22
2.4.1. Az allergiás szenzitizáció 27
2.4.2. IgE epitópok 28
2.4.3. Az allergiás reakció 28
2.4.4. Klinikai megnyilvánulások 29
2.4.5. Diagnózis felállítása 29
2.4.6. Kezelés 30
2.4.7. Ételallergiát okozó növényi fehérjecsaládok 31
2.4.8. Az *in vitro* emésztés mint diagnosztikai módszer allergén ételfehérjék vizsgálatára 33
2.4.9. Napraforgó allergia 35
**3. CÉLKITŰZÉSEK** 37
**4. ANYAG ÉS MÓDSZER** 39

**4.1. Az albumin frakció tisztítása napraforgómagból** 39
**4.2. Az albuminok kromatográfiás elválasztása** 40
**4.3. Fehérjék azonosítása** 40
4.3.1. Nátrium-dedecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) 40
4.3.2. Peptidek analízise 41
**4.4. Fehérjeszerkezeti vizsgálatok** 41
4.4.1. A fehérjék törzsoldatainak előállítása 41
4.4.2. Távoli-UV cirkuláris dikroizmus spektroszkópia 41
4.4.3. Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) 42
**4.5. Határfelületi vizsgálatok** 42
4.5.1. Határfelületi feszültség-mérések 43
4.5.2. Határfelületi reológiai vizsgálatok 43
4.5.3. Emuziókészítés és jellemzés 44
4.6. *In vitro* szimulált gasztro-intesztinális emésztés 44
4.6.1. Fehérjeoldatok előállítása a gasztro-intesztinális emésztéshez 44
4.6.2. Foszfolipid-vezikulák (liposzómák) előállítása 45
4.6.3. Az emésztés in vitro modellje 46
4.6.3.1. *In vitro* gasztrális emésztés (1. fázis) 46
4.6.3.2. *In vitro* intesztinális emésztés (2. fázis) 46
4.6.4. SDS-PAGE analízis 47
**5. EREDMÉNYEK** 48
**5.1. A fehérjék azonosítása** 48
**5.2. Fehérjeszerkezeti vizsgálatok** 50
5.2.1. Távoli UV-CD-spektroszkópia 50
5.2.2. Differenciális pásztázó kalirometria (DSC) 57
**5.3. Határfelületi vizsgálatok** 58
5.3.1. Határfelületi feszültség és dilatációs reológiai vizsgálatok 58
5.3.2. Határfelületi reológia 60
5.3.3. Emulzióképzés 62
**5.4. Az *in vitro* gasztro-intesztinális emésztés** 64
5.4.1. Az LTP emésztése 64
5.4.1.1. Gasztrális fázis (1. fázis) 64
5.4.1.2. Intesztinális fázis (2. fázis) 65
5.4.2. A napraforgó 2S albuminok három kevert frakciójának emésztése 68

5.4.2.1. Az A frakció emésztése 68
5.4.2.1.1. Gasztrális fázis (1. fázis) 68
5.4.2.1.2. Intesztinális fázis (2. fázis) 69
5.4.2.2. A B frakció emésztése 70
5.4.2.1.1. Gasztrális fázis (1. fázis) 70
5.4.2.1.2. Intesztinális fázis (2. fázis) 71
5.4.2.3. A C frakció emésztése 72
5.4.2.1.1. Gasztrális fázis (1. fázis) 72
5.4.2.1.2. Intesztinális fázis (2. fázis) 73
5.4.3. Az SFA8 fehérje emésztése 74
5.4.3.1. A natív SFA8 fehérje emésztése 74
5.4.3.1.1. Gasztrális fázis 74
5.4.3.2. Az emulgeált SFA8 fehérje emésztése 75
5.4.3.2.1. Gasztrális fázis 75
5.4.3.2.2. Intesztinális fázis 76
**6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA** 79
**6.1. Molekulaszerkezeti vizsgálatok** 80
**6.2. Határfelületi vizsgálatok** 81
**6.3. Emulzióképzés** 83
**6.4. *In vitro* gasztrointesztinális emészthetőség** 84
**6.5. Az eredmények összefoglalása** 88
**7. ÖSSZEFOGLALÁS** 90
**8. SUMMARY** 92
**9. FÜGGELÉK** 93
**IRODALOMJEGYZÉK** 96
**KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS** 105

# 1. BEVEZETÉS

A növényi magvak szerepe az emberiség élelmezésében igen sokrétű. Ennek túlnyomó része a magvak, köztük az olajnövények magvainak elfogyasztása. Magyarországon a legnagyobb területen termesztett olajnövény a napraforgó, amely világviszonylatban is kiemelkedő jelentőségű. Magva nagy mennyiségben tartalmaz fehérjéket és olajakat. Az olajnövények magvaiból történő olajextrakció után fehérjedús hulladék marad hátra, amely felhasználható állati takarmányként, többek között magas kéntartalma miatt is.

A napraforgó magvainak egyes tartalékfehérjéi kiváló emulgeáló tulajdonságai miatt alkalmasak ételemulziók stabilizálására, mint amilyen többek között a majonéz. A napraforgó tartalékfehérjék közül néhány azonban allergénnek bizonyult, ezért komoly veszélyt jelentenek az arra érzékeny egyének számára. A napraforgó széles alkalmazási területe miatt ez kockázatot jelent a fogyasztókra nézve globálisan is.

Az allergén ételfehérjék közös jellemzője, hogy sértetlenül vagy közel intakt szerkezettel képesek átvészelni az ételkészítés, az elfogyasztás és az emésztés során zajló folyamatokat és ezek körülményeit. A bekövetkező hőhatás illetve emulgeálás során módosulhatnak egyes fehérjék tulajdonságai s ezen keresztül allergenicitásuk is. A fehérje-emulziók gasztro-intesztinális (gyomor-bél–rendszeri) feldolgozásának, lebontásának pontosabb megértése hozzásegíthet kevésbé allergén ételkészítmények előállításához.

Ennek érdekében vizsgáltuk a napraforgó tartalékfehérjéi közül azokat, amelyeket korábban potenciálisan alkalmasak találtak ételemulziók stabilizálására. Tanulmányoztuk a napraforgó lipid-transzfer fehérjéjét (LTP) és a 2S albuminjai közé tartozó SFA8-at valamint három kevert frakciót, amelyek fő komponense az Alb1 és az Alb2 fehérje volt. Megvizsgáltuk e fehérjék másodlagos szerkezetének változását hőkezelés hatására, valamint az olaj/víz határfelületen mutatott felületaktivitásukat és emulgeáló képességeiket. Az LTP és az SFA8 fehérje képes allergiás reakciót kiváltani arra érzékeny egyénekben. Ezért tanulmányoztuk ugyanezen öt fehérjefrakció allergenicitását: mesterséges gyomor-bél–modellben emésztettük a fehérjéket és vizsgáltuk, milyen mintázat és ütem szerint bontják le őket a proteázok. Tanulmányoztuk az emulgeálás, valamint egy természetes körülmények között az ételekben és az emésztőrendszerben is jelen lévő lipid hatását a fehérjék emészthetőségére.

# 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 2.1. A tartalékfehérjék

A növények magja több mint szaporító és terjesztő növényi szerv, ez az a növényi rész, amelyből a legtöbbet betakarít és elfogyaszt az emberiség. Az emberi fogyasztásra szánt ételek és az állati takarmány minőségét a tartalékfehérjék határozzák meg legnagyobb részben. Az ételkészítés során felhasználják a magban lévő tartalékfehérjék funkcionális tulajdonságaikat is.

A gabonamagvak fehérjetartalma kb. 10%, míg a pillangósok és az olajnövények magvaiban ez az arány elérheti a száraz tömeg 40%-át is (Shewry és mtsai., 1995). Ezek a fehérjék kiemelt szerepet játszanak étkezésünkben. Az érett magban jelenlévő fehérjék nagy része metabolikus vagy szerkezeti fehérje. Minden növényfaj magja tartalmaz egy vagy több olyan fehérjecsoportot, amely nagy mennyiségben van jelen és biológiai funkciója, hogy aminosavakkal lássa el a fejlődő csíranövényt a csírázás alatt és a magonc illetve a palánta kezdeti fejlődése során. Ezek a tartalékfehérjék szén, nitrogén és kénforrást biztosítanak a kikelő növény számára. A tartalékfehérjék határozzák meg a magvak minőségét a humán felhasználás szempontjából is. A nem kérődző állatok takarmányozásában kisebb értékkel bírnak az alacsony lizin-, treonin- és triptofán-tartalmú gabonafélék, valamint az alacsony cisztein- és metionin-tartalmú hüvelyesek.

A tartalékfehérjék szintézise az egyedfejlődés meghatározott fázisaiban specifikus szövetekben igen intenzíven megy végbe. Szintézisüket a tápanyag-ellátottság szabályozza. A tartalékfehérjék kulcsszerepet játszanak a többlet nitrogén tárolásában. A kén is részt vesz a tartalékfehérjék szintézisének szabályozásában: a tartalékfehérjék nagy része cisztein és metionin aminosavakat tartalmaz. A legtöbb magban a tartalékfehérjék több különböző csoportját is megtalálhatjuk: a kénben gazdag és a kénszegény tartalékfehérjéket. A kétféle fehérjecsoport kialakulásának evolúciós oka, hogy ezáltal a tartalékfehérjék szintézise független a kénellátottságtól, tehát akkor is folyhat a szintézis, amikor nem áll rendelkezésre kén.

A tartalékfehérjék szekréciós fehérjék, amelyek szignálpeptidjükkel együtt szintetizálódnak. A szignálpeptid révén transzlokálódnak az endoplazmatikus retikulum (ER) lumenébe, miközben lehasad a szignálpeptidjük, majd a poszttranszlációs módosítás során kialakul az érett fehérje. A módosítás fajonként és fajon belül is változó, függ a fehérje

típusától és a fejlődési fázistól. Az érett fehérjék fehérjetestekben (protein body) raktározódnak. A fehérjetestek egyszikű növényekben az ER-ból vagy a vakuólum fragmentálódásával keletkeznek. A rizs endospermiumában kétféle fehérjetest-populáció található: a vakuóláris eredetű, amely glutenineket és globulinokat tartalmaz és az ER eredetű, amely a prolaminokat tárolja (Shewry és mtsai., 2004).

A kétszikűek 2S albuminjai a Golgin keresztül jutnak a vakuólumba, amely fragmentálódva hozza létre a fehérjetesteket. Valószínűleg egy vagy több fehérjerészlet felismerésével zajlik a válogatódás (sorting).

A tartalékfehérje-frakciók különböző összetevők keverékei, polimorfizmus mutatható ki az egyes genotípusok között és azokon belül is. A polimorfizmus egyik oka, hogy a tartalékfehérjék multigén családokban kódoltak, másik oka a poszttranszlációs hasítások eltéréseiben keresendő, valamint különbözik a fehérjék glikoziláltsága is (Shewry és mtsai., 2004).

Az összes fehérjecsoport közül a tartalékfehérjék voltak az első, amelyeket – humánélelmezési és mezőgazdasági fontosságukra, valamint könnyen és nagy mennyiségben hozzáférhetőségükre tekintettel – mintegy 250 éve jellemezni kezdtek.

1745-ben Jacopo Beccari jellemezte először a gluténeket. 1859-ben Maschke brazil dióból kristályosított globulinokat. Thomas Burr Osborne 1924-ben adta ki „The Vegetables' Proteins" című könyvét, amelyben a növényi tartalékfehérjéket oldhatóságuk és kivonásuk módja szerint osztályozta. Az Osborne-frakciók a következők: az albuminok a vízoldható fehérjék, a globulinok híg sóoldatban, a prolaminok alkohol és víz elegyében, a gluteninek pedig híg savban vagy lúgban oldódnak.

Napjainkban a fehérjéket inkább funkciójuk (illetve feltételezett funkciójuk) alapján csoportosítják. A valószínűleg leglogikusabb csoportosítás a szerkezeti és evolúciós rokonságon alapul. Ilyen csoportosítást alkalmaz a Pfam adatbázis. Az adatbázis olyan fehérjecsaládjait csoportosították fehérje-szupercsaládokat kialakítva, amelyek alacsony vagy semmilyen szekvencia hasonlóságot nem mutatnak egymással, viszont közös konzervatív szerkezeti tulajdonságaik vannak, pl. diszulfid-kötés mintázat.

### 2.1.1. A prolamin szupercsalád

A szupercsalád létrehozását Kreis és mtsai. (1985) javasolták a nyolc ciszteinből álló konzervatív váz (C–Xn–CXn–CC–Xn–CXC–Xn–CXn–C) (Shewry és mtsai., 1995;

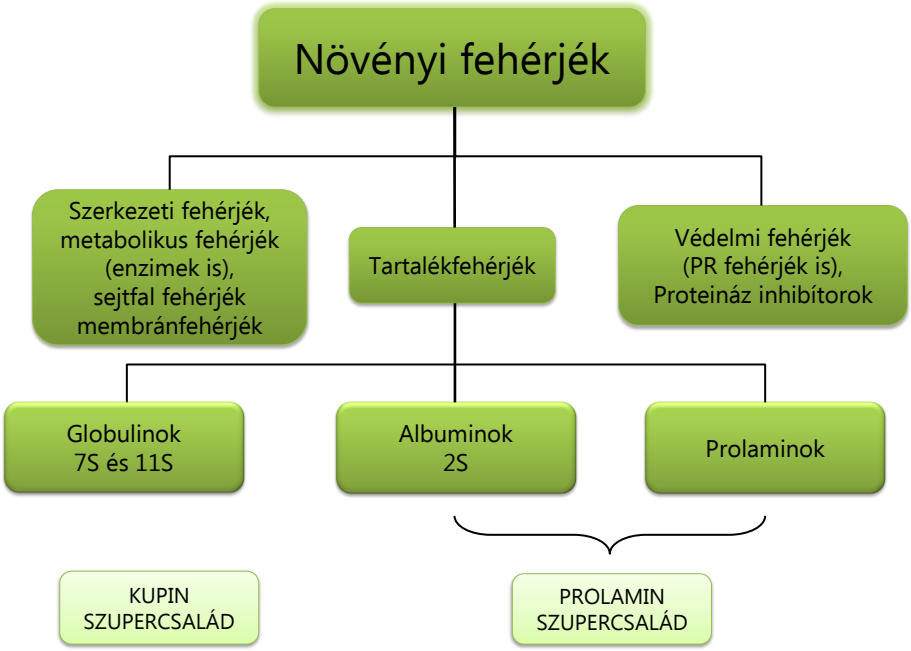
Breitender és Mills, 2005) alapján, amely a szupercsalád legfontosabb jellemzője (**1. ábra**). E nyolc cisztein négy intramolekuláris diszulfid-kötést alakít ki (Monsalve és mtsai., 2004). Önmagában e mintázat alapján azonosították a szupercsalád egyes új tagjait, amelyek csupán minimális vagy egyáltalán semmilyen szekvencia azonosságot nem mutatnak a szupercsalád más tagjaival.

```
           ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
               5         15         25         35         45         55
LTP        ---------- ---------- --   C  --- VSSSLAPCIS YLTKG----- ----------
Alb1       ---------- -------PIS EQRQCWQ-QV QGQRLNQCRM FLQQGQ---- ----------
Alb2       FEIPFDMPFD IPWPF-RPSS ESQQCRQ-SE IQRPVSQCQR YVEQQIQSSR PYQQSPYDRR
SFA8       ---------- ---PYGRGRT E-SGCYQQME EAEMLNHCGM YLMKNLG--- ----------

           ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
               65         75         85         95        105        115
LTP        -------GAV ---------- ---------- ---PP----- ----ACCSGV KSLNSAAKTT
Alb1       ------RGQQ ---------- ---------H QQQQHQQQEQ QLLQQCCQEL QNIEGQ----
Alb2       QQSPYDRRQQ SPYEQRQGPY EQRPYEQRPY QQRGGRQQEQ QGLQQCCNEL QNVRRE----
SFA8       -----ERSQ- ---------- ---------- --VSPRMREE DHKQLCCMQL KNLDEK----

           ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              125        135        145        155        165        175
LTP        PDRQAACGCL KSAYNSI--- ---------- -SGVNAGN-- ---AASFPGK CGVSI-PYKI
Alb1       ------CQCE AVKQVVRDAQ RHEQQRPRVP FQGSQQSQQL KQRAQILPNV CNLQSRR---
Alb2       ------CQCE AIKEVGQRMR QQ-QQQQRRQ -YGGQQTQTV ERILENLPNQ CDLDVQQ---
SFA8       ------CMCP AIMMMLNEPM W--------- ---IRMRDQV MSMAHNLPIE CNLMSQP---

           ....|....| ....|...
              185        195
LTP        SPSTDCSKVQ --------
Alb1       -----CEIES VRSVAESN
Alb2       -----CNIPY --------
SFA8       -----CQM-- --------
```

**1. ábra**. Az LTP, az Alb1, az Alb2 és az SFA8 aminosav-szekvenciáinak összehasonlítása, kiemelve mind a négy fehérje aminosavai közül a konzervatív ciszteineket. Az összehasonlítást a CLUSTAL FORMAT for T-COFFEE Version_4.99 alkalmazással készítettük.

A prolamin szupercsalád legtöbb tagja magfehérje (**2. ábra**), amelyek két csoportba sorolhatók: i) alacsony molekulatömegű kéngazdag magfehérjék és a prolaminok, a gabonafélék tartalékfehérjéi, valamint ii) a hidroxiprolin-gazdag sejtfal-glikoproteinek (Shewry és mtsai., 2002).

Az első csoportba tartoznak a kétszikűek 2S albuminjai, az α-amiláz és tripszin inhibítorok, a puroindolinok, a gabonák GSP-i (grain softness protein), a szója hidrofób fehérjéi és a nem specifikus lipid transzfer fehérjék (nsLTP-k) – ez utóbbi csoport számos tagját izolálták magon kívüli szövetekből is (lásd 2.1.1.1. fejezet). A prolaminok molekulatömege 15 kDa alatt van, nyolc vagy több konzervatív helyzetű ciszteint tartalmaznak. Hajtogatódásuk hasonló, négy, diszulfid-kötésekkel stabilizált α-hélixet tartalmaznak, jobbcsavaros szuperhélix és összehajtott levél szerkezet jellemzi őket, diszulfid-kötésekben gazdagok (Murzin és mtsai., 1995).




**2. ábra.** A növényi fehérjék csoportosítása (Mills és Shewry, 2004).

#### 2.1.1.1. Az nsLTP-k

A nem-specifikus lipid transzfer fehérjék nevüket egyedi tulajdonságukról kapták: képesek fokozni lipidek membrántranszportját lipid-specificitás nélkül.

A lipidek számos fontos feladatot töltenek be a növények fiziológiájában. Hidrofób természetükből eredően vízben oldhatatlanok, ezért a sejtek és az intercelluláris terek vizes oldataiban speciális transzportereket igényelnek szállításukhoz. Az nsLTP-ket (továbbiakban LTP-k) a lipidek intracelluláris transzportját vizsgálva fedezték fel több mint 30 évvel ezelőtt

(Kader, 1996). Biológiai szerepüket azóta is kutatják, ám ez a mai napig sem tisztázott teljesen. Az LTP-k képesek foszfolipidek és zsírsavak *in vitro* megkötésére (Duliez és mtsai., 2000; Gomar és mtsai., 1996). Úgy tűnik azonban, hogy az LTP-k nem vesznek részt a lipidek intracelluláris transzportjában. Fontos szerepet töltenek be viszont a hidrofób kutin és szuberin képzésében, mely anyagok a növények külső felületeinek védelmét látják el (Gomar és mtsai., 1996; Kader, 1996). Részt vesznek különböző patogének elleni védelemben is azáltal, hogy gátolják a gombák növekedését, mert megváltoztatják membránjaik permeabilitását (Molina és mtsai., 1993; Garcia-Olmedo és mtsai., 1995). A növényt ért patogéntámadás indukálja az LTP-k génjeinek transzkripcióját (Regente és de la Canal, 2003). Az LTP-ket a patogenezissel összefüggő fehérjék közé sorolták és a PR-14 nevet kapták (van Loon és Van Strein, 1999).

Az LTP-k szerepet játszanak környezeti stresszek – pl. hidegstressz – kivédésében is (Osborn és mtsai. 1999). A fentieket alátámasztja, hogy az LTP az epidermális szövetekben expresszálódik és az extracelluláris térbe transzportálódik (Kader, 1996).

Két LTP fehérjecsaládot különböztetünk meg: az LTP1, melynek molekulatömege 9 kDa körül van, és a 7 kDa körüli LTP2 (Marion és mtsai., 2004). Mindkettő multigén fehérjecsalád. Génjeik egy- és kétszikűekben egyaránt kifejeződnek, minden növényi szervben (pl. mag, pollen, gyümölcs, levél, gyökér, szár, virág) jelen vannak transzkriptumaik. Duliez és mtsai. (2000) megállapították, hogy míg az LTP1 a kutin, az LTP2 a szuberin réteg kialakításában vesz részt.

#### 2.1.1.1.1. Az nsLTP-k másodlagos szerkezete

Több LTP-molekula 3D szerkezetét meghatározták (pl. a napraforgó LTP-jét Luckett és mtsai., 2001; a kukoricáét Gomar és mtsai., 1996; a búzáét Tassin-Moindrot és mtsai., 2000). E fehérjecsaládra jellemző egy tipikus hajtogatódás: négy hélixes szerkezet, melyet a C-terminus ölel körbe, szaxofon-szerű szerkezetet kialakítva. A hajtogatódást négy diszulfid-kötés stabilizálja. Valószínűleg ez a négy diszulfid-kötés felel az LTP-k nagy stabilitásáért. A szerkezetből eredően egy hatalmas belső üreg van az LTP-molekula belsejében, amelynek mérete rugalmasan változhat, így egy vagy akár két foszfolipidet vagy zsírsavat is képes befogadni *in vitro* (Duliez és mtsai., 2000; Gomar és mtsai., 1996). A csatorna plaszticitására jellemző, hogy többféle ligandum, így szfingolipidek, prosztaglandinok, és egyéb hidrofób anyagok megkötésére képes (Marion és mtsai., 2004). Mono- és a diacil lipidek megkötésekor

a ligandum foszfát- vagy karboxilát csoportját hidrogén-hidak kötik a C-terminus régió tirozinjához. Amennyiben két lipidmolekulát köt meg a fehérje, a lipidek egymással szemben helyezkednek el, úgy, hogy mindkét lipidmolekula poláris feje a csatorna külső része felé néz (Chavrolin és mtsai., 1999). Az üreg belsejének felületét hidrofób aminosavak oldalláncai alkotják, míg a hélixek és a C-terminus amfipatikus aminosavakból állnak (Heinemann és mtsai., 1996). Az üreg belsejében elhelyezkedő hidrofób aminosavak, amelyek a pepszin potenciális hasítási helyei, nem hozzáférhetőek az enzim számára (Asero és mtsai., 2000). A lipidek megkötése befolyásolja néhány LTP stabilitását és ezen keresztül a hidrolízissel szembeni rezisztenciáját (Douliez és mtsai., 2000; Marion és mtsai., 2004; Breitender és Mills, 2005; Vassilopoulou és mtsai., 2006). A pepszin proteolízisével szembeni rezisztencia a kisméretű allergén fehérjék fontos közös jellemzője (Astwood és mtsai., 1996; Asero és mtsai., 2000).

Az LTP-k sajátos hajtogatódása (ún. LTP-fold) a nyolc ciszteinből álló váz, a „cisztein-aláírás" (Marion és mtsai., 2004) miatt alakul ki (részletesen ld. a prolaminok leírásában, 2. fejezet), melyet elsőként az LTP-k esetében írtak le (Shewry és mtsai., 1995). A prolamin fehérje-szupercsalád valamennyi tagja rendelkezik e jellegzetes motívummal, ezért hajtogatódásuk is hasonló (Rico és mtsai., 1996). Más fehérjék szerkezete viszont nem tartalmazza a hidrofób üreget, tehát lipidek megkötésére sem képesek. A 2S albuminok és az LTP-k allergizáló tulajdonságai hasonlóak azonban, nem lehet tehát összefüggés a lipidkötő csatorna megléte és az allergenicitás között.

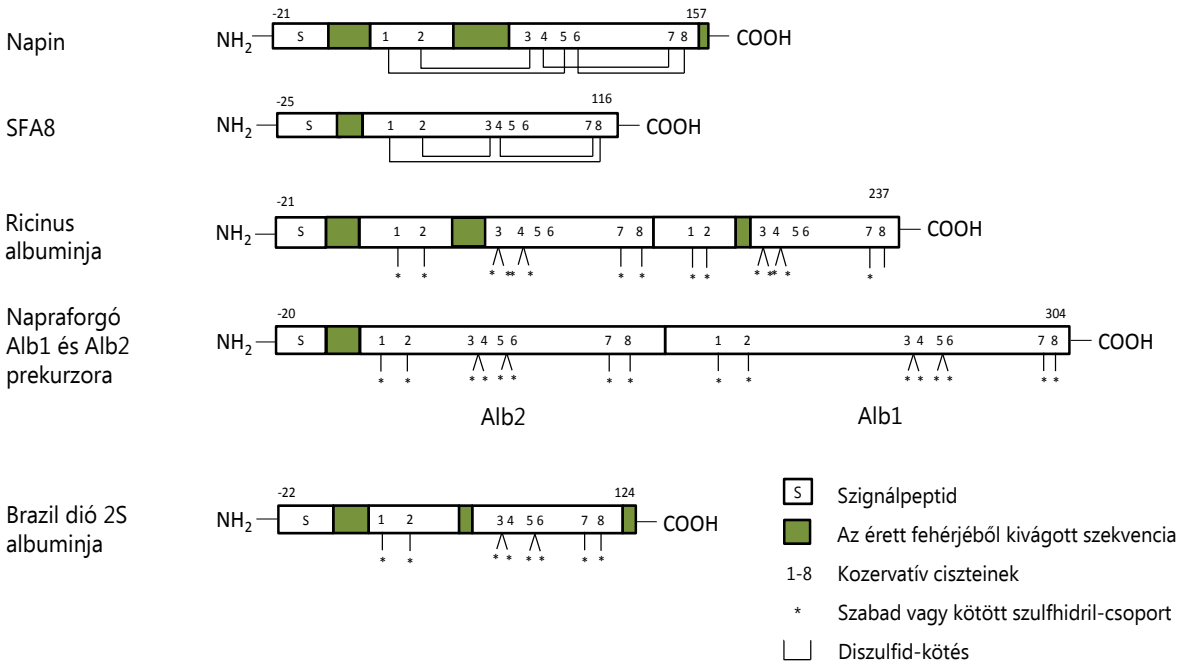
#### 2.1.1.2. A 2S albuminok

A 2S albuminok sokféle kétszikű növény és három nyitvatermő nemzetség (*Pinus, Picea* és *Pseudotsn nuga*) fajainak magvában megtalálhatók nagy mennyiségben (Shewry és Pandya, 1995; Monsalve és mtsai., 2004). A csírázás során szénnel, nitrogénnel és kénnel látják el a csíranövényt (Youle és Huang, 1981). E fehérjék kis géncsaládokban kódolt, szerkezetileg rokon fehérjék polimorf keverékei (Monsalve és mtsai., 2004).

A 2S albuminok a durvafelszínű endoplazmatikus retukulunon (DER) szintetizálódnak, majd szignálszekvenciájuk lehasítása során az ER lumenjébe transzportálódnak, ahol hajtogatódásuk végbemegy. Itt alakul ki a jellemző négy intramolekuláris diszulfid híd is. Ezután a fehérjék a Golgi érintésével a vakuólumba transzportálódnak, ahol fehérjetestekké alakulnak. Glikozilációjukat mindeddig nem írták le,

proteolítikus hasítás azonban bizonyítottan történik a vakuólumban. A hasítás során alakul ki a legtöbb 2S albuminra jellemző, kis és nagy alegységből álló heterodimer szerkezet. A két alegységet a DER-ben kialakault diszulfid-kötések tartják egyben.

E minta alól kivételt képez a napraforgó SFA8 fehérjéje, amelynek szignálszekvenciája proteolítikusan levágódik ugyan, de nem hasad két alegységre (Kortt és Caldwell, 1990; Anisimova és mtsai., 1994). Napraforgóban és ricinusban van olyan 2S albumin, amely párosan szintetizálódik, egyetlen mRNS-en kódolva transzlálódik prekurzor fehérjévé, amely aztán proteolítikus hasításon megy át, feltételezhetően a vakuólumban. A módosítás a napraforgóban két egyláncú fehérjét eredményez (Alb1 és Alb2) (Allen és mtsai., 1987; Thoyts és mtsai., 1996), míg ricinusban két heterodimer fehérje jön létre (Irwin és mtsai., 1990). Az alegységek szerkezetének és szintézisük eltérései ellenére a 2S albuminok mind kompakt, globuláris fehérjék, konzervatív cisztein-vázzal stabilizálva (**3. ábra**).




**3. ábra.** 2S albuminok sematikus szerkezete (Shewry és Mills, 2004 könyve alapján; eredeti források: Irwin és mtsai., 1990; Kortt és Caldwell, 1990; Thoyts és mtsai., 1996; Egorov és mtsai., 1996; Moreno és mtsai., 2004; Monsalve és mtsai., 2004).

A 2S albuminok biológiai szerepe kétségkívül a fentebb említett elemek raktározása a csírázás és a fejlődés korai fázisának idejére (Monsalve és mtsai., 2004). Mindemellett a retek (*Raphanus sativus*) 2S albuminjáról Terras és mtsai. (1992) leírták, hogy képes patogén

gombák csírázásának gátlására. A repcében (*Brassica napus*) a napin és a rokon fajokban pl. a karfiolban (*B. napus* var. *rapifera*), az erdei mustárban (*Sinapis arvensis*) és a fekete mustárban (*Sinapis nigra*) termelődő napin-szerű fehérjék szerin-proteáz inhibítor aktivitással bírnak, amely egybevág a védekezésben betöltött szerepükkel.

Az 2S albuminokat a magas kéntartalmuk miatt használják takarmánynövények minőségének növelésére. A farkasbab (*Lupinus angustifolius)* (Molvig és mtsai., 1997) és a lucerna (*Medicago sativa)* (Tabe és mtsai., 2002) metionintartalmának növelése érdekében agrobaktériumos kezeléssel genetikailag módosították e gazdanövényeket. A kísérlet sikerrel járt: a módosított növények metionintartalma 30%-kal megnőtt (Tabe és mtsai., 2002). Altenbach és mtsai. (1992) a brazil dió (*Bertollethia excelsa*) 2S albuminját expresszáltatták dohányban. Amennyiben e módosított növényeket emberi fogyasztásra is szánják, elengedhetetlenül szükséges allergén potenciáljuk megállapítása, hiszen feljegyeztek napraforgó által kiváltott anafilaxiás reakciót (Axelsson és mtsai., 1994; Noyes és mtsai., 1979; Yagami, 2010), lásd (2.4.4. fejezet).

#### 2.1.1.2.1. A 2S albuminok másodlagos szerkezete

A 2S albuminok szerkezeti hasonlóságot mutatnak az LTP-kkel (Gomar és mtsai., 1996). Szerkezetük a prolaminokra jellemző, korábban részletezett négy, diszulfid-kötésekkel stabilizált α-hélix, jobbcsavaros szuperhélix, összehajtott levél szerkezet. Tartalmazzák a konzervatív cisztein-vázat. E szerkezeti hasonlóság ihletett néhány kutatót, hogy javasoljanak egy közös, ősi fehérjét, melyből kialakultak az evolúció során az az itt tárgyalt, különböző funkciójú, de hasonló, konzervatív szerkezetű fehérjék (Rico és mtsai., 1996; Pandya és mtsai., 2000).

A 2S albuminok allergizáló tulajdonságaival összefüggő szerkezeti tulajdonság a diszulfid-kötésekkel stabilizált kompakt 3D szerkezet. Ez nagymértékű hőstabilitást és proteázokkal szembeni rezisztenciát eredményez (Onaderra és mtsai., 1994; Asero és mtsai., 2000; Luckett és mtsai., 2001).

A szerkezeti tulajdonságok másik fontos következménye a lipidekkel való kölcsönhatás képessége, amint azt leírták 2S albuminok (Onaderra és mtsai., 1994) és LTP-k esetén egyaránt (Gomar és mtsai., 1996).

Mindkét tulajdonság alátámasztja e fehérjék allergenicitását, hiszen az allergiához elengedhetetlen mind az emésztéssel szembeni rezisztencia, mind a membránokkal való kölcsönhatás képessége (Onaderra és mtsai., 1994; Astwood és mtsai., 1996).

Összefoglalva, a 2S albuminok olyan fontos allergén fehérjecsalád, amely szerkezetileg rokon más allergén fehérjékkel.

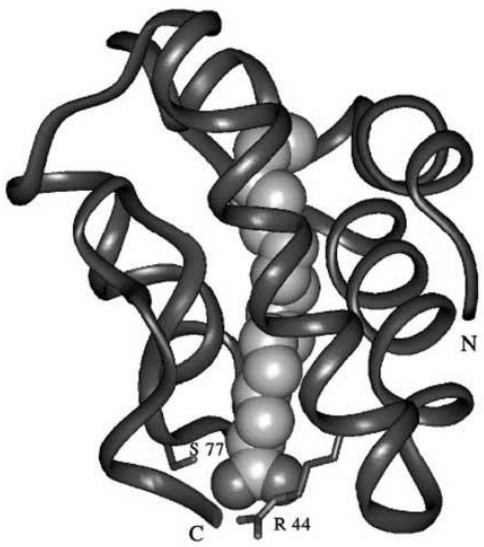
### 2.1.2. A napraforgó tartalékfehérjéi

A napraforgó tartalékfehérjék a 2S albuminok és a 11S glubulinok 2:1 arányú keverékei. A napraforgó tartalékfehérjéinek 60%-át a 2S albuminok teszik ki (Youle és Huang, 1981), az összes magfehérjének pedig 20%-át alkotják (Kortt és Caldwell, 1990). E fehérjekeverék igen nagymértékű polimorfizmussal jellemezhető, 10-13 fehérjét és különböző genotípusokból származó komponenseket tartalmaz (Kortt és Caldwell, 1990; Anisimova és mtsai., 1995). A fehérjék molekulatömege 10-18 kDa között mozog (Kortt és Caldwell, 1990).

#### 2.1.2.1. A napraforgó LTP-je

A napraforgóban található érett LTP 90 aminosav hosszúságú monomer fehérje, molekulatömege 9,2 kDa (Luckett és mtsai., 2001). A többi LTP-hez hasonlóan a napraforgóból tisztított LTP is képes gombák növekedését gátolni, Regente és de la Canal (2000) leírta, hogy a patogén *Fusarium solani* spóráinak csírázását megakadályozta. A napraforgó LTP képes a foszfatidil-kolin (oleoil-KoA) membránok közötti szállítására *in vitro* (Arondel és mtsai., 1990).

Luckett és mtsai. (2001) modellezték a napraforgó LTP-t. A modell szintén tartalmazott egy hidrofób üreget, amely képes lehet a fent említett oleoil-KoA befogadására és szállítására (**4. ábra**).




**4. ábra.** A napraforgó LTP – palmitinsav komplex energetikailag legkedvezőbb orientációban. A fehérje szürke szalagként ábrázolva látható, az Arg44 és a Ser77 aminosavak oldalláncait és a fehérje N- és C-terminusát megjelölték. A palmitinsavat világosszürke térkitöltő modellként ábrázolták, az oxigén- és a nitrogénatomokat közép szürkén jelzik (Luckett és mtsai., 2001).

#### 2.1.2.2. A napraforgó 2S albuminjai

##### 2.1.2.2.1. Kénszegény 2S albuminok (Alb1 és Alb2) a napraforgóban

A napraforgóban előforduló két kénszegény 2S albumin prekurzorként szintetizálódik, majd egy poszttranszlációs hasítás során a preproproteinből két polipeptidlánc, az érett Alb1 és az Alb2 fehérje (Albumin 1 és 2) alakul ki (Allen és mtsai., 1987; Thoyts és mtsai., 1996; Kortt és Caldwell, 1990; Anisimova és mtsai., 1995). Az Alb2 fehérje a közös prekurzor N-terminális végi részéből, az Alb1 pedig a C-terminális végi részéből alakul ki a poszttranszlációs módosítás során (**3. ábra**). Az Alb1 és az Alb2 fehérje közel azonos molekulatömegű (14,5 és 15,3 kDa). Sem az Alb1, sem az Alb2 nem megy át további fehérje módosításokon – szemben a legtöbb, más fajokból származó 2S albuminnal, ahol diszulfidkötésekkel összekapcsolt kis- és nagy alegységek alakulnak ki (Shewry és mtsai., 1995; Anisimova és mtsai., 1995) –, hanem megmaradnak monomer formájában.

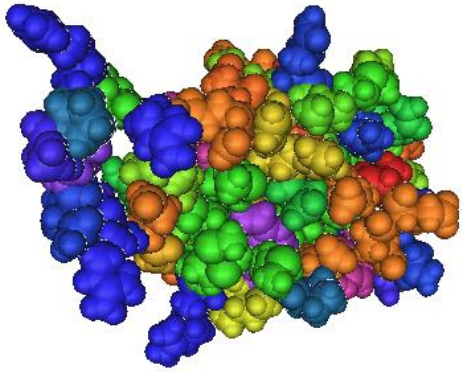
Allen és mtsai. (1987) meghatározták a napraforgó *Ha*G5 génjének nukleotid szekvenciáját, amely a két kénszegény 2S albumint kódolja. Azt találták, hogy a *Ha*G5 egy kis géncsalád tagja, amely legalább két, divergens génből áll (*Ha*G5 és Ha5), valamint távoli, de határozott homológiát mutat a repce (*Brassica napus*) napin albuminjával. A napraforgó

két 2S albuminja ugyanazon a DNS-szakaszon kódolt (Allen és mtsai., 1987) – csakúgy, mint a ricinus (*Ricinus communis*) 2S albuminja (Machado és mtsai., 1992). Nincs bizonyíték azonban még arra, hogy a *Ha*G5 gén nem pszeudogén-e. Thoyts és mtsai. (1996) leírták a pHAO gént, amelynek DNS-e két különböző albumint kódol: 33-15 aminosavig ($M_r$ 13 388) és 156-323 aminosavig ($M_r$ 20 191). 19-31 aminosavig a proszekvencia található, amelyet feltehetően a vakuólum egyik proteáza hasít le, előtte pedig a szignálszekvencia helyezkedik el (Thoyts és mtsai., 1996). Mindkét kódolt albumin tartalmazza a konzervált, 8 ciszteinből álló cisztein-vázat (**1. és 3. ábra**).

#### 2.1.2.2.2. Kénben gazdag napraforgó albumin (SFA8)

Az érett SFA8 egyetlen polipeptidláncból áll (**5. ábra**). Különlegessége, hogy rendkívül magas a kéntartalma (24%), 103 aminosavból 16 metionint és 8 ciszteint tartalmaz (Kortt és Caldwell, 1990). Értékes, a mezőgazdaságban és az élelmiszeriparban hasznosítható tulajdonságai miatt az SFA8-at részletesen tanulmányozták (Pantoja-Uceda, és mtsai., 2004; Pandya és mtsai., 2000). Nem csak a napraforgó LTP-je, hanem az SFA8 is mutat antifungális tulajdonságokat *in vitro* (Regente és de la Canal, 2001).

A fehérje 5 hélixből és a köztük elhelyezkedő random csavarulatokból áll: 11-22, 27-38, 50-60, 66-75 és 80-90 aminosavig. A hélixek jobbkezes szuperhélixbe rendeződtek. Ezt a hajtogatódási módot először az nsLTP-k esetén írtak le, majd később 2S albuminoknál is megtalálták (Pantoja-Uceda és mtsai., 2002). A fehérje egyetlen, triptofánt (Trp76) tartalamz, amely igen fontos szerepet tölt be. E triptofán vizes oldatban a molekula felszínén van, ám az indol-csoportja a molekula belseje felé irányul (Pandya és mtsai., 2000). Amennyiben azonban a fehérje olaj/víz határfelülethez abszorbeálódott, a triptofán indol-csoportja az olajfázisba merül. Ez úgy lehetséges, hogy a triptofán egy random szerkezetnek éppen a közepén helyezkedik el, tehát a fehérjemolekulának egy viszonylag flexibilis részén van. Ezen felül a Trp76 a molekula hidrofób részén lokalizált, körülvéve négy metioninnal, amelyek mintegy koronát formálnak a Trp76 körül (Pantoja-Uceda és mtsai., 2004). A hidrofobicitás és a flexibilitás eme kombinációja elősegíti a triptofán orientációjának könnyű változását az olaj/víz határfelületen. Ennek köszönhetőek az SFA8 kiváló emulgeáló tulajdonságai is.



**5. ábra**. Az SFA8 fehérje térkitöltő modellje. Kék színnel jelölve láthatóak a hidrofób aminosavak (Arg, Gln, Ser, Pro); lilával a Trp, amelyet koronaként ölel körbe a zölddel jelölt Met és Asn. (A kép elkészítéséhez a Cn3D szoftvert használtuk.)

### 2.2. Növényi fehérjék felhasználása a táplálkozásban

A fehérjék, amellett, hogy kiváló tápanyagok, fontos szerepet töltenek be az élelmiszerekben, ahol stabilizálnak habokat (sör habja, habcsók), gélhálózatokat (tojásfehérje, fehérjegélek a főtt húsokban) és emulziókat (majonéz, ahol a fehérjék az olajcsepp körül egy összefüggő, abszorbeált réteget hoznak létre).

Az élelmiszeripar kihasználja egyes fehérjék azon tulajdonságát, hogy képesek stabilizálni olaj/víz határfelületeket. Ezen fehérjék a legfontosabb felületaktív anyagok számos étel kolloid fázisában, pl. emulziókban és habokban (Murray és mtsai., 2001). E fehérjék a határfelületre diffundálnak és ott adszorbeálódnak új hidrofób és elektroszatikus kölcsönhatásokat létrehozva az olaj- és a vízfázisban egyaránt, valamint a szomszédos fehérjék között is. Amikor megfelelő mennyiségű fehérje adszorbeálódott a felületen, viszkoelasztikus filmet hoznak létre az olajcsepp körül, megakadályozva ezzel a koaleszcenciát, ezáltal a fázisok szétválását is. A határfelületeken adszorbeált fehérjék konformációja megváltozik a vizes fázisban felvett konformációhoz képest, kihajtogatódnak (unfolding) az adszorpció hatására (Husband és mtsai, 2001). A legtöbb fehérje, amelyet az élelmiszeriparban e célra használnak, állati eredetű. Növekszik az igény azonban a növényi eredetű fehérjék iránt. A napraforgó magjában található tartalékfehérjék között számos olyan

fehérje található, amely emulgeáló tulajdonságainak köszönhetően potenciálisan felhasználható lehet az élelmiszeriparban.

### 2.2.1. A feldolgozás hatása az allergenicitásra

Az ételallergiákkal kapcsolatban két alapvető kérdés merül fel: i) mitől lesz egyik ember allergiás, míg a másik nem, ii) mi teszi egyik ételt illetve ételfehérjét allergénné, míg a másik nem okoz allergiát. A növényekben legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje a Rubisco (ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz), amelyről még egyetlen esetben sem írtak le allergiát.

E kérdések megválaszolása igen bonyolult, hiszen a fehérjék az ételeken belül összetett komplexek részeként vannak jelen; ezen felül pedig az ételkészítés, majd az emésztés során számos változáson mennek keresztül. E változások hatással vannak a fehérjék lebomlására és a formára, melyben a bélen keresztül felvehetővé válnak és prezentálódnak az immunrendszerben (Mills és mtsai., 2009). Az ételmátrix szerkezete nagy hatással bír az allergiás reakció elicitálására, hiszen a magas zsírtartalmú mátrix megváltoztathatja az allergén felszabadulásának kinetikáját, amely az allergiás reakció súlyosságát is befolyásolja (Mills és mtsai., 2009). E komplex kérdéskör csak nemrégiben vált a kutatások tárgyává, mely sok nehézséget rejt magában.

A feldolgozás során a fehérjék a kémiai módosulásokon felül kihajtogatódhatnak és aggregálódhatnak. Emiatt a natív fehérjék harmadlagos, és bizonyos mértékben a másodlagos szerkezete is megváltozhat a hőhatás és a határfelülethez történő adszorpció következményeként (Mills és mtsai., 2009). A kihajtogatódást gyakorta követi a felületi hidrofobicitásban beálló változás, amely a felületaktivitásra is hatást gyakorol; ezáltal megváltozhat a fehérje emésztéssel szembeni rezisztenciája is.

A változások mértéke függ a feldolgozás során alkalmazott kezeléstől. Az alkalmazott hőmérséklet és a kezelés hosszának kombinációja, egyéb összetevők jelenléte (pl. olaj, cukrok) szintén befolyásolják a kialakuló aggregáció illetve denaturáció mintázatát és kinetikáját. Egyes ételallergén fehérjék hőhatásra könnyen elveszítik allergenicitásukat, mások igen jól ellenállnak a hőkezelésnek, pl. az LTP-k, amelyek viszonylag magas hőmérsékletet, legalább 75°C-t igényelnek ahhoz, hogy megkezdjék a kihajtogatódást (Mills és mtsai., 2009). A malátázás és a sörfőzés során az árpa LTP-je és egy szerin proteáz típusú fehérjéje, a Z fehérje fontos szerepet tölt be a felszíni hab stabilizálásában (Sorensen és mtsai.,

1993). Mindkét fehérje allergén tulajdonságokkal bír (Garcia-Olmedo és mtsai., 2001). Szerencsére az árpa LTP1 fehérjéje a sörfőzés során glikozilálódik a Maillard reakció során (Marion és mtsai., 2004), ezen felül a glikozilált fehérje denaturálódik a főzés folyamán, a diszulfid-kötések redukciójának és a hőkezelésnek köszönhetően. Összefoglalva, az allergén LTP allergenicitása csökken a sörfőzés során, mert a fehérje módosul. Emellett a részleges redukció és denaturáció elősegíti az emésztőenzimek általi hidrolízist. Ezeket a tényeket figyelembe kell venni, amikor ételkészítési folyamat során törekszünk a hőkezelés csökkentésére, pl. a vitaminok megőrzése érdekében, mert ez esetleg erősítheti az étel allergén jellegét. Ehhez hasonló hatást érhet el a redox-adalékok hozzáadása, pl. aszkorbinsav, cisztein, szulfit).

### 2.3. Fehérjék az olaj/víz határfelületen

A fehérjék a legfontosabb felületaktív anyagok a legtöbb ételemulzióban, habban és egyéb ételkolloidban (Murray, 2002). Ennek oka, hogy nem csupán kiváló emulgeáló anyagok, hanem emellett az ételek tápértékét is növelik (Singh és Sarkar, 2011). A fehérjék jó felületaktivitásának oka, hogy képesek csökkenteni a *felületi feszültség*et (ld. függelék) az olaj/víz határfelületen, valamint határfelületi filmet tudnak létrehozni.

Az utóbbi években az érdeklődés a fehérjék elfogyasztása közben tapasztalt hatások felé fordult, vagyis a fiziológiás feldolgozás, azaz emésztés felé. Általánosságban, rágás és nyelés során az ételemulzió ki van téve fizikai (pl. nyíróhatás, hőmérséklet) és biokémiai (pl. hígítás, pH, amiláz, pepszin, pankreatin, mucin és epesók) hatásnak, amint végighalad az emésztőcsatornán a szájtól a belekig. Jelenleg viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk arról, mi megy végbe a fehérje-emulziók szerkezetében, fiziko-kémiai tulajdonságaiban, amikor végighaladnak e fiziológiásan aktív rendszeren.

A határfelületi reológiai vizsgálatok nagyon érzékenyek a fehérjék szerkezetében beálló igen csekély változásokra is (Gao és mtsai., 2008), ezért jól használható módszereket nyújtanak a változások követésére. A határfelületi reológia a *határfelületi stressz* (ld. függelék) és a határfelület ennek következményeként fellépő torzulását tanulmányozza (Murray, 2002). A nyíróreológia különösen érzékeny a kolloid rendszer összetételére és az összetevők között fennálló kölcsönhatásokra. A makromolekulákon belül és az azok között kialakuló összes létező inter- és intramolekuláris kötés befolyásolja a nyíróreológiát. Tehát bármilyen hatás, amely erősíti a szomszédos molekulák közötti kölcsönhatást, növeli a nyíróelaszticitást és a nyíróviszkozitást. Kivételt képez az az eset, amikor ugyanaz a tényező

gátolja a felülethez történő adszorpciót, pl. az aggregáció (Murray, 2002). A határfelülethez adszorbeálódó fehérje szerkezete jelentősen megváltozhat attól függően, milyen kötések stabilizálják a felületen, ahová adszorbeálódik. Ezért a határfelületen végbemenő kihajtogatódás előidézeti egyes aminosavak felszínre kerülését, amelyek egyéb esetben nem vennének részt a szomszédos molekulák közötti kötések kialakításában (Murray, 2002). A legtöbb tényező, amely befolyásolja a molekulák közötti kötések kialakulását a határfelületen, egyben befolyásolja a fehérjék kihajtogatódásra való hajlamát is.

Korábbi kutatások alapján tudjuk, hogy a napraforgó albumin frakciója kiváló emulgeáló tulajdonságokkal rendelkezik (Guéguen és mtsai., 1996; Gonzalez-Perez és mtsai., 2005). Az albumin frakció fehérjéi közül kiemelkedik remek emulgeáló tulajdonságaival az SFA8 fehérje (Sunflower albumin 8) (Guéguen és mtsai., 1996; Gonzalez-Perez és mtsai., 2005; Burnett[a] és mtsai., 2002). A napraforgó LTP és SFA8 fehérjéit részletes vizsgálatoknak is alávetette több kutatócsoport (Burnett[a] és mtsai., 2002; Pantoja-Uceda és mtsai., 2004; Pandya és mtsai., 1999; Pandya és mtsai., 2000; Luckett és mtsai., 2001). A kromatográfiás elválasztás során az LTP és az SFA8 között eluálódó két 2S albumin típusú fehérje (Alb1 és Alb2) határfelületi tulajdonságairól azonban nem találtunk irodalmi hivatkozást.

### 2.4. Ételallergiák

Az ételallergia olyan egészségügyi probléma, amely akár életveszélyes is lehet. Minden 100. felnőttet és 10. gyermeket érint Európában és Észak-Amerikában. A legtöbb ember számára tápláló ételek, illetve azok összetevői az allergiás betegek számára veszélyesek, olykor akár halálos veszedelmet is jelenthetnek.

Az ételallergiás emberek életminősége jelentősen javult azáltal, hogy a kutatások során egyre jobban megismerjük az ételallergén fehérjék természetét. Azonban még mindig félelmet okoz az allergénnel való véletlen találkozás lehetősége a betegek, illetve a beteg gyermekek szülei számára.

A lakosság nagy része az ételallergiát a fő egészségügyi problémák közé sorolja, mert az emberek mintegy 20%-a tapasztalt magán allergiásnak vélt tüneteket. A saját maguk által allergiásnak tartott emberek csekély része tartozik a klinikailag bizonyított allergiás betegek közé. Klinikai tesztekkel bizonyított ételallergiában a lakosság 1-2%-a szenved, a három évesnél fiatalabb gyerekek esetén ez az arány a 8%-ot is elérheti, de az Egyesült Államokbeli gyerekek 28%-a tapasztalt valamilyen kóros ételspecifikus reakciót. Hasonló arányokat

találtak Európa országaiban is, tehát a tapasztalt kóros reakciók száma nagyobb, mint a klinikailag bizonyított eseteké. A számokból látható, hogy a legtöbb gyerek három éves kora környékén „kinövi” az ételallergiát.

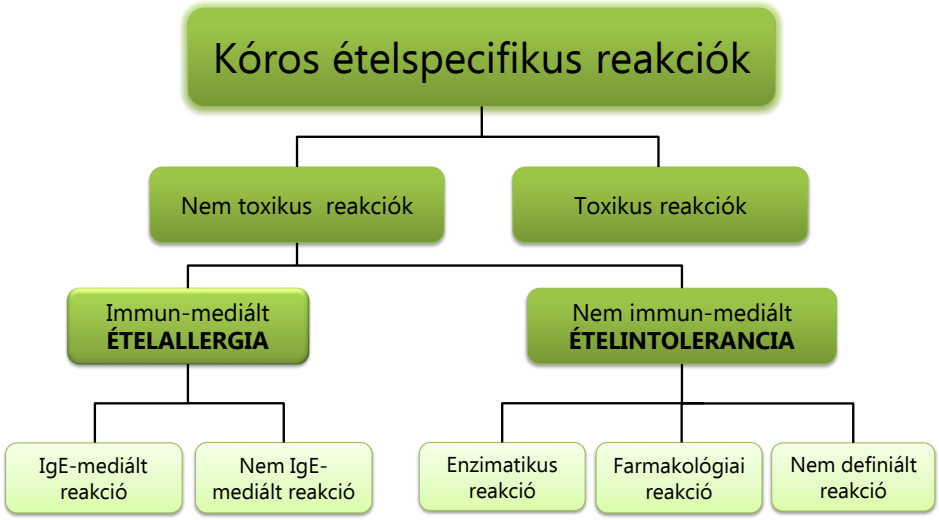
A legfontosabb allergiát okozó ételek a gyakoriság sorrendjében: a tej, tojás, mogyoró (főképpen az Egyesült Államokban, ahol nagy mennyiségben fogyasztanak mogyorókrémet), csonthéjasok, hal, kagyló, szója, búza, gyümölcsök és hüvelyesek (Fernández-Rivas és Miles, 2004). Ezen ételek allergológiai jelentősége az életkortól és a földrajzi elhelyezkedéstől függően változó (a különböző populációk genetikai érzékenysége miatt). Az étkezési szokások is változnak országonként, ezzel párhuzamosan az allergiák megjelenése és gyakorisága is különböző. Például a halallergia Spanyolországban és Japánban a leggyakoribb, ahol már 12 hónapos kortól bevezetik a gyerekek étrendjébe a halat, s a halallergia általában még a 24. hónap előtt megjelenik (Fernández-Rivas és Miles, 2004). Az allergén fehérjék étrendbe való bevezetésének ideje tehát kulcsfontosságú kérdés. Nem mindegy, az immunrendszer milyen fejlettségi állapotban találkozik először az allergénnel, azaz mikor történik meg a szenzitizáció.

Az allergia gyakorisága csökken az életkor előrehaladtával, részint azért, mert a tolerancia kialakulhat magától is, részint pedig azért, mert az allergén étrendből történő eliminálása elegendő időtartamra megszüntetheti az allergiát (Fernández-Rivas és Miles, 2004). Ilyen allergiák pl. a tej-, a tojás és a halallergia, míg a mogyoró, a csonthéjasok és a kagylóallergia általában élethosszig tartanak. Előfordul, hogy felnőttkorban alakul ki ételallergia, valamint arra is van példa, bár kevésbé kutatott jelenség, hogy felnőttkori allergén-eliminációval múlt el egyes betegek ételallergiája (Fernández-Rivas és Miles, 2004).

A gyerekkorban és a felnőttkorban kialakuló ételallergia nagymértékben különbözik egymástól. A gyerekkorban kialakult ételallergia általában gasztrointesztinális szenzitizációval kezdődik, a résztvevő allergén többnyire rezisztens az emésztéssel szemben. A gyermekkori ételallergia leggyakoribb allergénjei a tej, a tojás és a hüvelyesek. A tolerancia kialakulhat, miután az allergént eliminálják az étrendből. Ezzel szemben a felnőttkorban (bármely életszakaszban) kialakuló ételallergia esetén általában a belélegzett aeroallergén szenzitizálja az immunrendszert, és a kialakuló specifikus antitestek később keresztreakcióba lépnek a kérdéses étellel, ezáltal allergiás reakciót okozva (Fernández-Rivas és Miles, 2004). Számos tünetet leírtak a nyír, a feketeüröm és a parlagfű pollenallergénjeivel, a poratka asztmatikus allergiával valamint madár-eredetű antigénekkel légzőszervi allergiák kapcsán. A pollen- és a latexallergiával kapcsolatba hozott ételek növényi eredetűek, főként friss gyümölcsök, csonthéjasok és zöldségek, míg a kagylóallergia a poratka-allergiával áll

összefüggésben. A pollenallergia a leggyakoribb felnőttkori allergia, a pollenallergiás betegek mintegy 40%-a allergiás növényi eredetű ételre is, ez a szám a nyír pollenjére allergiásoknál a 70%-ot is elérheti. Ezekben az esetekben az ételallergén étrendből történő kivonása nem szünteti meg az allergiát, hiszen a szenzitizáció sem orális úton történt.

Az ételallergiának még nincsen kialakult, egyezményes definíciója, sem kidolgozott diagnosztikai kritériumrendszere. Az *„kóros ételspecifikus reakció”* kifejezés magába foglal bármilyen klinikailag abnormális választ, amelyet étel (vagy ételadalék) lenyelése, érintése, belélegzése okoz. Az *kóros ételspecifikus reakciók* két csoportját különböztetjük meg: toxikus és nem toxikus reakciót, attól függően, a reakció az étel eredendő toxicitásától vagy az egyén érzékenységétől váltódik ki (**6. ábra**). Bármilyen étel képes bárkiben *toxikus reakciót* kiváltani, amennyiben a mérgezést kiváltó anyag dózisa megfelelően nagy. A *nem-toxikus kóros reakciók* lehetnek *immun-mediáltak* vagy *nem immun-mediáltak*. Az *ételallergia* kifejezés az *immun-mediált kóros reakciók*ra vonatkozik, míg az *ételintolerancia* kizárólag a *nem immun-mediált reakciók*at foglalja magába. Újabban az *ételintolerancia* szót felváltja a *nem-allergiás ételhiperszenzitivitás* kifejezés (Fernández-Rivas és Miles, 2004). Az ételallergiákat tovább oszthatjuk *IgE-mediált* és *nem IgE-mediált reackiókra*. Az *(étel)allergének* tehát azok az antigén molekulák, amelyek immunválaszt indukálnak, azaz allergiát okoznak.




**6. ábra.** A kóros ételspecifikus reakciók csoportosítása (Fernández-Rivas és Miles, 2004).

Összefoglalva, az *ételallergia* ételre adott hiperszenzitív reakciók azon összessége, amelyek esetén a tünetek gyorsan alakulnak ki; kiváltó oka pedig az exogén makromolekuláknak – azaz allergéneknek – való kitettség.

Az *IgE-mediált* reakciókat alaposan körülírták és bizonyították klinikai tüneteiket a szubjektivitás teljes kizárását biztosító kettős vakplacebo kontrollált terheléses tesztekkel (Double Blinded Placebo Controlled Food Challenge, a továbbiakban DBPCFC).

Az *ételintoleranciát enzimatikus, farmakológiai reakciók* is okozhatják, valamint egy harmadik, *nem definiált* csoport is ide tartozik. Az *ételintolerancia* reprodukálható, nem immun-mediált folyamat, amely tüneteinek kialakulásáig akár napok is eltelhetnek. Ezek körébe tartozik a gluténintolerancia, más néven cöliákia.

Az *enzimatikus ételintolerancia* hátterében olyan enzim hiánya áll, amely részt vesz az adott étel metabolizmusában, pl. a laktáz enzim másodlagos hiánya a laktózintolerancia estében, amely a felnőtt lakosság jelentős részénél előfordul.

A *farmakológiai ételintoleranciát* olyan anyagok okozzák, amelyek normálisan jelen vannak az ételekben, pl. vazoaktív (vérnyomásnövelő) aminok, hisztamin, triamin, amelyekre néhány egyén abnormálisan érzékeny (Fernández-Rivas és Miles, 2004).

A továbbiakban az ***IgE-mediált ételallergiák*** jellemzőit tekintjük át.

*Ételallergia* akkor alakul ki, amikor egy előzőleg szenzitizált egyénben egy ételfehérje keresztköti a specifikus IgE-antitesteket egy hízósejt vagy bazofil sejt felszínén. A keresztkötés hisztamin és egyéb mediátorok felszabadulását okozza, amelyek kiváltják az allergiás reakció azonnali tüneteit.

Az ételallergia általában egy IgE-mediált túlérzékenységi mechanizmus, melynek két fázisa van: (i) általában az allergénnel történő elsődleges kontaktus a naiv immunrendszer *szenzitizáció*ját okozza, és specifikus IgE-k termelődnek, amelyek hízósejtek felszínén található nagy affinitású Fcε receptorokhoz (FcεR) kötődnek; (ii) a későbbi, ismétlődő találkozás során az allergén az IgE molekulákat keresztköti, ami a hízósejtek azonnali aktiválódásához vezet, kiváltja az *allergiás reakció*t és klinikai tüneteket okoz (Mills és mtsai., 2003). Az allergiás reakció során az IgE-antitestek megkötik felszínükön az antigéneket, ez esetben az allergént. Az immunrendszer normális körülmények között toleráns a szájon át felvett antigénekre. Ezt az ún. orális toleranciát a mukóza (bélnyálkahártya) immunrendszerének összetett mechanizmusai biztosítják. Amennyiben ez a tolerancia sérül, ételallergia alakulhat ki. Az itt tárgyalt ételallergiák az I-es típusú hiperszenzitív reakciók

körébe tartoznak. Az *I-es típusú hiperszenzitív reakciók* IgE-mediált, gyors lefolyású, rövid ideig tartó immunreakciók.

Felmerül a kérdés, miért alakulhatott ki ez a veszélyes és látszólag haszontalan mechanizmus. Mi az IgE-mediált reakció kialakulásának evolúciós oka s haszna? Valószínű, hogy az IgE a soksejtű parazita ellenes immunválaszban játszik szerepet, erre utal, hogy bélparazita megtelepedésekor megnövekszik az IgE szintje (Erb, 2007). Az IgE fő sejtfelszíni receptora a nagy affinitású FcεRI, ami eozinofil és bazofil granulociták és hízósejtek felszínén expresszálódik. Az eozinofil granulociták kulcsszerepet töltenek be a bélférgek elleni védelemben. Az eozinofil sejtek képesek a parazita felszínéhez kötődni féreg-specifikus IgE-ken keresztül, a sejtek aktiválódnak, majd a felszabaduló anyagok elpusztítják a bélférget. A folyamatban részt vevő eozinofil sejtek, IgE-k és egyéb faktorok bonyolult összjátéka eredményezi, hogy az immunrendszer képes megbirkózni egy olyan hatalmas parazita elpusztításával, amilyen egy bélféreg.

Az allergiás reakcióban szintén az IgE- és a FcεRI-expresszáló sejtek játszanak szerepet. Allergén specifikus IgE-k mutathatók ki és az eozinofil granulociták száma is sokszorosára nő a vérben az allergiás reakció során.

Mindezek alapján valószínűnek látszik, hogy az allergiás reakció egy félresiklott parazita-ellenes immunválasz, súlyosbítva az allergén oldhatóságával és igen gyors elterjedésével a vérben. Modern, higiénikus életstílusunk következtében – melyben immunrendszerünk alig, vagy egyáltalán nem találkozik bélférgekkel – összetett parazita-ellenes védőmechanizmusaink tétlenül várakoznak, hogy támadásba lendülhessenek. Így lehetséges, hogy túl könnyen, még megfelelő cél hiányában is megindul az immunreakció az érzékeny egyénekben ártalmatlan ételfehérjék ellen. Valószínűleg az allergiák kialakulása kéretlen hagyatéka a paraziták elleni harc vezérelte szelekciónknak (Yazdanbakhsh és mtsai., 2002). Immunrendszerünk az ősi, kevésbé steril körülményekhez adaptálódott, amelyek csak a múlt században változtak meg.

A *higiénia hipotézis* (Yazdanbakhsh és mtsai., 2002) szerint a korai gyerekkorban allergénekkel történő találkozás csökkenti az allergia kialakulásának valószínűségét az immunrendszer működésének fellendítése által. A túlságosan tiszta, sterilitásra törekvő környezet az immunrendszert – adekvát cél hiányában – az allergia felé mozdítja. A paraziták gyakran igen hosszú ideig élnek a gazdaszervezetben. Nem meglepő, hogy képesek olyan molekulák szintézisére, amelyek a gazdaszervezet immunrendszerét megváltoztatják, hogy minél hosszabb ideig tudjanak túlélni. A gazda-parazita kapcsolat genetikájának, valamint a

paraziták egyes immunmoduláns molekuláinak és hatásuknak részletesebb megismerése közelebb vihet bennünket az allergia gyógyításához, anélkül hogy viselnünk kellene e kellemetlen és ártalmas patogénekkel való fertőzöttség következményit (Yazdanbakhsh és mtsai., 2002).

### 2.4.1. Az allergiás szenzitizáció

Az allergiás szenzitizáció során az allergénnel szemben immunválasz játszódik le. Ennek során az allergént antigén-prezentáló sejtek (antigen-presenting cells, APC), mint makrofágok, dendritikus sejtek és B-limfociták veszik fel. Az APC-k a legközelebbi nyirokcsomóba vándorolnak, miközben az antigén processzálódik, lebontódik, majd a belőle származó peptidek bemutatásra kerülnek az APC-k felszínen a II-es típusú fő hisztokompatibilitási komplexhez (major histocompatibility complex, MHC) kötődve. A nyirokcsomóban az APC-n az MHC-hez kötött peptideket specifikus T (helper) limfociták ismerik fel, amelyek ezúton aktiválódnak, elindítják és koordináljak a kialakuló immunválaszt. Ennek során specifikus B sejtek aktiválódnak és megindul az antitestek termelése.

A kialakuló immunválaszt számos faktor befolyásolja, mint például az antitest természete, anatómiai lokalizációja, a gyulladás természete, a patogén tulajdonságai, stb. A T (helper) sejtek többek között a citokinek szekréciója útján határozzák meg a kialakuló immunválasz jellegét, ami a patogéntól függően lehet ún. Th1 (főleg sejtes immunitás, vírusok, intracelluláris baktériumok) vagy Th2 (főleg humorális immunitás, extracelluláris baktériumok, paraziták) típusú.

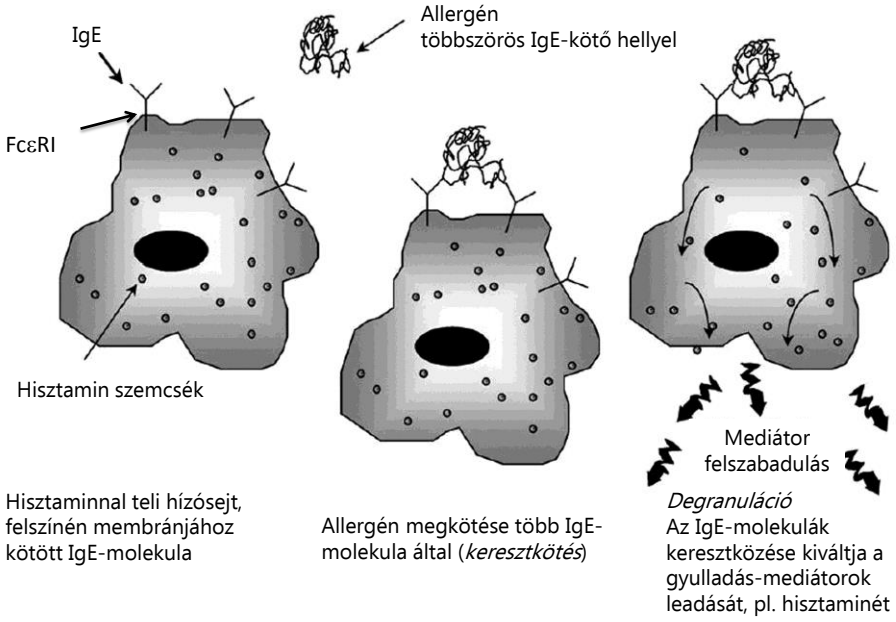
Az allergiára fogékony egyéneknél az allergén Th2 típusú immunválaszt okoz, ami specifikus IgE antitestek termelésével jár. A folyamat komplexitását és többgénes jellegét érzékelteti, hogy még az allergiára fogékony egyénekben sem minden fehérje-allergén indukál IgE-szekréciót. Nem tudjuk még, hogy az allergénnek milyen szerkezeti tulajdonságai (ha egyáltalán vannak ilyen jellemző tulajdonságok) vagy egyéb faktorok (citokinek, egyéb sejtfelszíni molekulák) tolják el az immunválaszt a Th2 reakció irányába (Mills és mtsai., 2003).

### 2.4.2. IgE epitópok

Az antigénnek azt a részét nevezzük *epitóp*nak, amelyet az immunrendszer felismer. Az epitópok két típusát különböztetjük meg: a lineáris és a konformációs epitópokat. A *lineáris epitópok* esetén a polipeptid elsődleges szerkezetét, azaz aminosav-szekvenciáját ismerik fel a T sejtek. A sejtek csak MHC molekulákhoz kötött peptidek felismerésére képesek. Az MHC lineáris epitópok általában 12-18 aminosav hosszúságú polipeptid-részletek (Soler-Rivas és mtsai., 2001). Az antitestek *konformációs epitópok*at ismernek fel, amit a polipeptid lánc néhány, egymástól akár távol eső szekvenciarészlete alakít ki, amelyek térben közel kerülnek egymáshoz a hajtogatódás által a fehérje 3D szerkezetében. A legtöbb epitóp a konformációs típusba tartozik, ezért különösen nehéz megtalálni ételfehérjék esetén, ahol a feldolgozás során jelentősen módosul a fehérjék térszerkezete.

### 2.4.3. Az allergiás reakció

Az antitestek sejtfelszíni receptorok, ún. Fc receptorok (FcR) útján kommunikálnak az immunsejtekkel. Az szenzitizált egyénekben az antigén-specifikus IgE antitestek a nagy affinitású IgE Fc receptorhoz (FcεRI) kötődnek monomer formában a hízósejtek és a bazofil granulociták felszínén. Mivel az allergén multivalens, ezért egyszerre több sejtfelszíni FcεRI-kötött IgE-t képes keresztkötni. Ez a keresztkötés egy erős intracelluláris reakciót vált ki; ez *degranulációt* eredményez, melynek során felszabadulnak a sejtben termelődött mediátorok (**7. ábra**). Ezek lehetnek vazoaktív aminok, pl. hisztamin, amely megnöveli az erek permeabilitást és átmérőjét, a hörgők görcsös összehúzodását és nyálkaszekréciót okoz. Másodlagos mediátorok is felszabadulnak, pl. leukotriének, prosztaglandin $D_2$, valamint kemotaktikus mediátorok, amelyek vonzzák a vér sejtes elemeit, főként a bazofil és az eozinofil sejteket. Néhány óra elteltével az aktivált hízósejtek különböző citokineket kezdenek termelni, pl. IL-3-at, IL-5-öt (interleukin-3 és -5) és GM-CSF-et (granulocyte macrophage colony stimulating factor, granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor), melyek beindítják a gyulladásos reakciót. Az allergén a hízósejtekkel párhuzamosan a Th2-típusú T limfocitákat is aktiválja, amelyek a hízósejtekéhez hasonló citokineket termelnek. Az allergiás reakció késői fázisában számos sejttípus valamint szolubilis mediátor (citokinek és kemokinek) vesz részt a folyamatban (Mills és mtsai., 2003).




**7. ábra.** Allergiás reakció kiváltódása – IgE kötés és hízósejtek degranulációja. (Mills és mtsai., 2003).

### 2.4.4. Klinikai megnyilvánulások

Az IgE-mediált ételallergiák során az ételallergénre adott reakciók több szervet is érinthetnek: a bőrt, a gasztrointesztinális emésztőrendszert, a légzőszerveket valamint a szívet és a keringési rendszert. Részletesen ld. a Függelékben.

### 2.4.5. Diagnózis felállítása

Az ételallergia diagnosztizálása három lépésben történik (Fernández-Rivas és Miles, 2004). Első lépés az anamnézis felvétele és a fizikai vizsgálat, mely során az orvos megpróbálja meghatározni a tüneteket kiváltó ételt, valamint eldönteni, vajon immunreakció is zajlik-e. Második lépésben bőrtesztet (Skin Prick Test, továbbiakban SPT), amely során kimutatható a specifikus IgE-válasz a bőrön és *in vitro* IgE-assay kivitelezése, amelyek megerősíthetik a szenzitizáció megtörténtét. A harmadik, elengedhetetlen lépés az ételallergia diagnosztizálásában a nyílt terhelés, annak eldöntésére, hogy a szenzitizációt okozó ételallergén felel-e a kialakult tünetek megjelenéséért. Az orális terhelést csak a gyanított allergén étrendből való kivonása után érdemes elvégezni. Nem szükséges és nem is ajánlott

azonban nagyon heves szisztemikus reakció esetén elvégezni a terhelést. Amennyiben precízen betartják az allergént elimináló diétát, főképpen gyerekek esetében, orális tolerancia alakulhat ki. Ilyenkor hosszútávú megfigyelésre és újbóli terhelésekre van szükség a pontos, esetleg újbóli diagnózis felállításához.

A terheléses tesztet végezhetik nyíltan, amikor a beteg és az orvos egyaránt tudja, hogy milyen ételt fogyaszt el a beteg, vagy egyszeresen vakon, amikor csak az orvos ismeri az elfogyasztott tesztanyag tartalmát, valamint a nagy megbízhatóságú *kettős vakplacebo kontrollált terheléses tesztet*tel (Double Blinded Placebo Controlled Food Challenge, továbbiakban DBPCFC), amely során sem a terhelést végző orvos, sem a beteg nem ismeri a felhasznált anyag összetételét a terhelés időpontjában. Alkalmazzák még ezeken kívül a *nyílt terhelés*t (Open Food Challenge, továbbiakban OFC), amely során a beteg étrendjébe visszakerül az eliminált étel, miután az SPT negatív lett. Amennyiben az OFC negatív, a beteg étrendjébe visszakerülhet az allergén. Amennyiben az OFC pozitív, egy DBPCFC-t végeznek az eredmény ellenőrzése végett.

### 2.4.6. Kezelés

Az ételallergia egyetlen, bizonyítottan hatásos kezelési módszere az allergén elkerülése. Ez azonban alultápláltsághoz vezethet, amennyiben sokféle ételt érint a szükséges diéta. Elengedhetetlen tehát, legfőbbképpen növésben lévő gyermekek esetén, hogy allergológus és dietetikus kövesse az allergén eliminálását és az új étrend kialakítását.

A diétát nagyon szigorúan be kell tartani, amely főleg gyerekek esetén nagy odafigyelést igényel. Folytonos éberséget követel meg a betegtől illetve szüleitől, figyelniük kell az ételek összetételét, meg kell tanulniuk illetve tanítaniuk gyermeküknek az allergént potenciálisan tartalmazó ételek listáját. Veszélyt jelenthet a közétkeztetés, a házon kívüli egyéb étkezés, például éttermek, ismerősök otthona, stb. Mindez befolyással bír a beteg és családjának általános életére, a folyamatos figyelem stresszt okoz, a speciális étrend anyagi vonzatai sem elhanyagolhatóak. Összefoglalva a beteg és családja életszínvonala csökkenhet, szociális viszonyaik a diéta miatt változhatnak.

Nyilvánvaló tehát, hogy az ételallergia problematikája szerteágazó, egyaránt magába foglal biológiai, orvosi, pszichológiai és szociális kérdéseket.

### 2.4.7. Ételallergiát okozó növényi fehérjecsaládok

Tömérdek fehérje található a növényi szövetekben, köztük azokban, amelyeket az emberiség elfogyaszt. Ezek között vannak olyanok, amelyek igen kis mennyiségben vagy csak átmenetileg vannak jelen a növényekben. Azok a fehérje-allergének, amelyek nagy része az emésztőrendszeren keresztül allergizál (kevés kivétel a légzőrendszeren át), a növényi fehérjék három fő csoportjába tartoznak: a prolamin, a kupin és a cisztein-proteáz szupercsaládokba (Mills és mtsai., 2003) (**2. ábra**). Az eddig leírt allegének 50%-a pedig az előbbi két fehérje-szupercsalád tagja (Shewry és mtsai., 2002).

A 2S albuminok közé tartozó fehérje allergéneket az **1. táblázat**ban, az LTP fehérjecsládba tartozó allergéneket a **2. táblázat**ban foglaltuk össze.

**1. táblázat**. Az 2S albuminok közé tartozó fontosabb allergének a teljesség igénye nélkül.

| **Allergén(ek) neve(i)** | **Növény** | | **Hivatkozás** |
|---|---|---|---|
| | **magyar neve** | **latin neve** | |
| Sin a 1 | fehér mustár | *Sinapis alba* | Menéndez-Arias és mtsai., 1998 |
| Bra j 1 | kínai mustár | *Brassica juncea* | Monsalve és mtsai., 1993 |
| Bra n 3<br>BnIB | repce | *Brassica napus* | Monsalve és mtsai., 1991;<br>Monsalve és mtsai., 1997 |
| Ric c 1, 3 | ricinus | *Ricinus communis* | Bashir és mtsai., 1998 |
| Jug r 1 | dió | *Juglans regia*. | Mills és mtsai., 2003 |
| Hel a 2S albumin | napraforgó | *Helianthus annuus* | Kelly és Hefle, 2000 |
| Ara h 1, 2, 6, 7 | földimogyoró | *Arachis hypogaea* | Burks és mtsai., 1991 |
| Ses i 1 | szezám | *Sesamum indicum* | Pastorello[b] és mtsai., 2001;<br>Orruno és Morgan., 2011 |
| Ber e 1 | brazil dió | *Bertholletia excelsa* | Nordlee és mtsai., 1996;<br>Pastorello és mtsai., 1998 |
| Mat5-D | gyapot | *Gossypium hyrsutum* | Galau és mtsai., 1992 |

**2. táblázat**. Az LTP fehérjecsaládba tartozó fontosabb allergének a teljesség igénye nélkül.

| **Allergén(ek) neve(i)** | **Növény** | | **Hivatkozás** |
|---|---|---|---|
| | **magyar neve** | **latin neve** | |
| Cas s 8 | gesztenye | *Castanea sativa* | Díaz-Perales és mtsai., 2000 |
| Pru p 1 | őszibarack | *Prunus persica* | Wijesinha-Bettoni és mtsai., 2010 |
| Pru ar 3 | sárgabarack | *Prunus armeniaca* | Borges és mtsai., 2008 |
| Hor v Z4 | árpa | *Hordeum vulgare* | Lindorff-Larsen és Winther, 2001; Wijesinha-Bettoni és mtsai., 2010 |
| Tri a 14 | búza | *Triticum aestivum* | Asero és mtsai., 2000 |
| Dau c 3 | sárgarépa | *Daucus carota* | Asero és mtsai., 2000 |
| Zea m 14 | kukorica | *Zea mays* | Mills és mtsai., 2003 |
| Hel a 3 | napraforgó | *Helianthus annuus* | Yagami, 2010 |
| Sin a 3 | fehér mustár | *Sinapis alba* | Sirvent és mtsai., 2012 |
| Prs a 1 | avokádó | *Persea american* | Díaz-Perales és mtsai., 2003 |
| Act c 10<br>Act d 10 | kivi | *Actinidia chinensis*<br>*Actinidia deliciosa* | Bernardi és mtsai., 2011 |
| Pru av 1, 3, 4 | cseresznye | *Prunus avium* | Scheurer és mtsai., 2004 |
| Pru d 3 | szilva | *Prunus domestica* | Borges és mtsai., 2008 |
| Mal d 3 | alma | *Malus domestica* | Sancho és mtsai., 2005 |
| Pyr c 3 | körte | *Pyrus communis* | Alcocer és mtsai., 2004 |
| Vit v 1 | szőlő | *Vitis vinifera* | Vassilopoulou és mtsai., 2006 |

Az eddig azonosított gyümölcsből és gabonából származó ételallergének és pollenallergének mind az LTP1 családba tartoznak. Az egyetlen eddig leírt kivétel a tarlórépa (*Brassica rapa*) LTP2 családba tartozó LTP-je.

A bélfalon történő átjutáshoz, majd ezt követően a nyálkahártyához asszociált immunrendszer szenzitizálásához az ételben található fehérjéknek képesnek kell lenni megtartani szerkezeti stabilitásukat az ételkészítési folyamatok során (például főzés, sütés, pirítás) valamint az emésztőrendszer kíméletlen körülményei között (például a gyomornedvek alacsony pH-ja, emésztőenzimek, felületaktív anyagok, például foszfolipidek és epesók hatásai). A fentiek fényében nem meglepő, hogy számos emésztőrendszeren keresztül szenzitizáló allergén képes ellenállni a hőhatásoknak és a pepszinolízisnek (Astwood és mtsai, 1996).

Több allergén fehérje képes lipidekkel kölcsönhatásba lépni, membránokhoz asszociálni vagy természetüknél fogva amfipatikusak. Ezek a képességek lehetővé teszik e fehérjék számára, hogy adszorbeálódjanak a gyomorban lévő emulzióhoz, amely további rezisztenciát biztosíthat az emésztőenzimekkel szemben (Macierzanka és mtsai., 2009).

Az ételallergének túlnyomó többsége fehérje, egyetlen szénhidrátot találunk az irodalomban, amely ételallergiát okoz, ez a zellerben található. E molekula valószínűleg egy haptén. A haptének kis molekulák, amelyek egy nagyobb szállítóhoz, pl. fehérjéhez kapcsolódva immunreakciót képesek kiváltani (Jankiewicz és mtsai., 1997).

### 2.4.8. Az *in vitro* emésztés mint diagnosztikai módszer allergén ételfehérjék vizsgálatára

Az első kutatások, amelyek az allergén fehérjék emészthetőségét vizsgálták tisztított fehérjéket alkalmaztak önmagukban - az egyszerűsítő megközelítés mentén –, hogy egy összetett problémát jobban megérthessenek. A rendszer azonban meglehetősen sokrétű: a fehérjék nem önmagukban találhatóak az ételekben, hanem más fehérjékkel és lipidekkel alkotott komplexekben, amelyek egymással is kölcsönhatásban állnak; valamint közös komplexeikben hatnak más összetevőkre. Mindemellett a fehérjék feldolgozott formában találhatóak a rendszerben: főzés, sütés, pirítás előzi meg elfogyasztásukat, majd az evés és az emésztés további hatásokat gyakorol a fehérjékre. Az allergének relatív mennyisége az ételben egy olyan tényező, amelyet szintén figyelembe kell venni, mert a mennyiség is

befolyásolja, mekkora dózisú allergén jut túl az emésztésen a szenzitizáció vagy allergiás reakció kiváltásához megfelelő formában.

Az *in vitro* emésztés jól használható módszer a gasztrointesztinális környezet és az emésztés imitálására (Kopf-Bolanz és mtsai., 2012; Amigo-Benavent és mtsai., 2011).

Az *in vivo* emésztés során fennálló fiziológiai körülmények valamint az étel szerkezete kiemelkedően fontosak a fehérje sorsának szempontjából. Nem hagyható figyelmen kívül továbbá az emésztési folyamat többfázisos jellege és az egész emésztőtraktus környezete sem. Nem elegendő csupán a hőhatással és a pepszinolízissel szembeni rezisztenciát (*egyfázisos emésztés*) figyelembe venni ételek illetve fehérjék allergenicitásának becslésekor. A gyomorban termelődő emésztőenzim, a pepszin hasításával szembeni rezisztencia használatos marker potenciális allergének vizsgálatában, mert számos ételallergén fehérje közös tulajdonsága a pepszin-rezisztencia (Astwood és mtsai., 1996). Ezért a szimulált gasztrális folyadékban (simulated gastric fluid, továbbiakban SGF) történő emésztést az új fehérjék allergenicitás-becslésének fontos kritériumává választották. Astwood és mtsai. (1996) munkájában minden vizsgált, fontos allergén fehérje SGF-ben pepszinnel emésztve rezisztenciát mutatott, vagy stabil fragmenteket hozott létre, míg a nem allergén fehérjék kivétel nélkül teljesen lebomlottak 15 mp alatt. Újabb kutatások nyomán kételyek merültek fel a pepszin-rezisztencia mint az allergenicitás előrejelzőjének használatával kapcsolatban, mert a vizsgálatok nem támasztják alá azt az előfeltevést, mely szerint az allergén fehérjék feltétlenül ellenállóbbak, mint a nem allergének. A *nem-szenzitizáló elicitorok*, azaz az olyan ételallergének, melyek az allergiás reakció kiváltása előtt nem szenzitizálják a pácienst, mégis kiváltják az allergiát, pepszin hatására könnyen lebomlanak, tehát esetükben sem használható ismérv a pepszin-rezisztencia (Moreno, 2007).

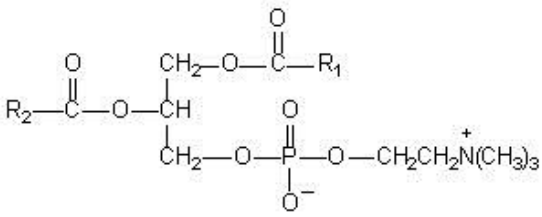
A fentiek miatt szükséges volt egy komplexebb, a fiziológiás történéseket és körülményeket jobban megközelítő rendszer, a *többfázisos emésztési modell* kidolgozása.

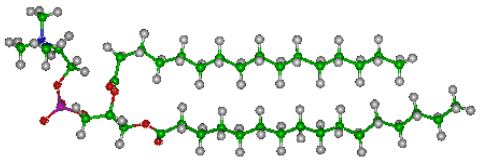
Az *in vitro* emésztés ***első fázisa*** a ***gasztrális fázis***, amely a gyomor környezetét utánozza: a közegként szolgáló SGF pH-ja 2,5, a pepszin/fehérje arány a fiziológiásnak megfelelő és tartalmaz foszfatidil-kolint (FK) foszfolipid vezikulák (más néven liposzómák) formájában (**8. ábra**), amelyet a gyomor nyálkahártyája szekretál. Mindeközben az emésztési elegy normál fiziológiás hőmérsékleten (37°C) rázódik két órán keresztül, hogy a gyomor mozgásait imitálja.

A ***második***, azaz ***intesztinális*** (egyes szerzők, pl. Moreno ***duodenális****nak* nevezik) fázis a gasztrális fázist követi, kiindulási elegye annak végső állapotú elegye. Az elegy pH-ja 6,5, tartalmazza epesavak sóit, fiziológiás sókat és puffereket, lipázt és kolipázt, valamint tripszint és kimotripszint, a vékonybél proteázait (szintén a fizológiásnak megfelelő enzim/szubsztrát arányban) és a vékonybélben is megtalálható FK-t. Akárcsak a gasztrális fázis során, két órán keresztül rázatódik az elegy 37°C-on, a bél mozgásait utánzandó.

A fent részletezett *in vitro gasztrointesztinális* modell statikus, létezik azonban dinamikus modell is, amely a rágáskor fellépő nyíróerőket, a nyelést, a gyomor ürítését a bélbe, valamint a perisztaltikát is modellezi (Moreno, 2007).

B **B**



**8. ábra. A)** A foszfatidil-kolin szerkezeti képlete. **B)** A foszfatidil-kolin golyó-pálcika modellje**.**

### 2.4.9. Napraforgó allergia

A napraforgómagot fogyasztják hámozva és pirítva önmagában, vagy müzlik illetve kenyerek alkotórészeként. A napraforgómagból préselt olajat használják salátákhoz, főzéshez, sütéshez valamint margarinok előállításához. Gyakori fogyasztása ellenére viszonylag ritkán okoz allergiát még az oly nagy mennyiségben fogyasztó országokban is, mint Görögország, Spanyolország vagy Németország. A legkorábbi feljegyzések a napraforgó-allergiáról 1906-ból származnak: Dreyer bebörtönzött és napraforgómag-pucolásra kényszerített prostituáltak körében elterjedt kontakt dermatitiszt és kötőhártya-gyulladást írt le. A leggyakoribb tünetek napraforgómag lenyelését követően az általános csalánkiütés, légszomj, asztmatikus roham és anafilaxia az arra érzékeny egyének esetén (Noyes és mtsai., 1979).

Allergiás reakciót írtak le napraforgómag lenyelése esetén (Noyes és mtsai., 1979; Axelsson és mtsai., 1994), napraforgó olaj fogyasztásakor (Kanny és mtsai., 1994; Zituoni és

mtsai., 2000) – ezt azonban Halsey és mtsai. cáfolták (1986) –, illetve napraforgópollent tartalmazó méz fogyasztásakor (Birnbaum és mtsai., 1989). Allergiás reakció (főként rhinitis és asztma) előfordul olyan munkahelyeken, ahol a napraforgó pollenje (Bousquet és mtsai., 1985; Jiménez és mtsai., 1994; Atis és mtsai., 2002), illetve a napraforgó magjáról lehulló apró szemcsék szállnak a levegőben (Vandenplas és mtsai., 1998) valamint napraforgó-táblák környezetében élők között (Jiménez és mtsai., 1994). Ezen esetek meglehetősen ritkák, mert a napraforgó rovarbeporzású növény, ezért nem juttat nagy mennyiségű pollent a levegőbe. Több esetben leírtak még napraforgó-allergiát díszmadár-tartók körében, akik kedvenceiket napraforgómaggal etették. A szenzitizáció nagy valószínűséggel a levegőben szálló allergén belélegzése útján történhetett (Axelsson és mtsai., 1994; Asero és mtsai., 2004; Vandenplas és mtsai., 1998).

Az allergiás reakció legsúlyosabb esetben lehet anafilaxia (Noyes és mtsai., 1979; Axelsson és mtsai., 1994; Kanny és mtsai., 1994; Birnbaum és mtsai., 1989) amely főként felnőtteket érintett, de (6-7 éves) gyerekeknél bekövetkező súlyos eseteket is találunk az irodalomban (Caubet és mtsai, 2010).

A feltételezett inhalációs szenzitizációs út következtében napraforgó-allergiás betegek esetén gyakori a keresztreakció más fehérjecsaládokból származó allergénekkel, például a Bet v 1 fehérjével (nyírfa allergénje) (Atis 2002), a napraforgóból származó LTP-kkel és egy meg nem határozott, 67 kDa molekulatömegű fehérjével (Zituoni és mtsai., 2000). Leírtak még keresztreakciót zellerrel (Birnbaum és mtsai., 1989) és fekete ürömmel (Kanny és mtsai., 1994), valamint más fészkes fajok allergénjeivel (Noyes és mtsai., 1979). A klinikailag bizonyított napraforgómag-allergiás betegeknek csak egy része allergiás a napraforgó pollenjére is (Vandenplas és mtsai., 1994). Kelly és Hefle (2000) bizonyította, hogy az SFA8 fehérje kötődik a napraforgó-allergiás betegektől származó szérum IgE-jéhez. Yagami (2010) leírt egy esetet, amelyben a napraforgó LTP-je IgE-t köt egy allergiás beteg szérumából.

# 3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja a napraforgó tartalékfehérjék közül kiválasztott öt fehérje illetve fehérje-frakció vizsgálata, amelyek egy részéről ismert, hogy alkalmasak lehetnek ételemulziók stabilizálására. E fehérjék közül néhányat összefüggésbe hoztak ételallergiával vagy jellegzetes szerkezetük miatt feltételezhető, hogy allergiát okozhatnak. Ezek a fehérjék az LTP, az SFA8, és a kénszegény 2S albuminok három kevert frakciója, amelyek az Alb1 és ALb2 fehérjét tartalmazzák.

Annak érdekében, hogy tisztább képet kaphassunk arról, vajon egyes ételfeldolgozási folyamatok befolyásolják-e a napraforgó vizsgált tartalékfehérjéinek allergenicitását azáltal, hogy megváltoztatják a proteolízissel szembeni ellenállóképességüket, vizsgáltuk, hogyan változik a fehérjék szerkezete hőhatásra.

Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

**i) Használhatók-e a fenti fehérjék emulziók stabilizálására? (Milyen felületaktív tulajdonságokkal bírnak?)**

**ii) Az ételkészítési folyamatokat imitáló hőkezelés hatására hogyan változik a fehérjék felületaktivitása?**

**iii) Okozhatnak-e allergiát a vizsgált fehérjék?**

A fehérjék reológiai tulajdonságainak megismeréséhez, a szerkezetükben bekövetkező változások követéséhez, valamint emészthetőségük vizsgálatához az alábbi célokat tűztük ki:

1. Megvizsgáljuk a fehérjék szerkezetében hőkezelésre beálló változásokat és azok mértékét.
2. Meghatározzuk a fehérjék olaj/víz határfelületen mérhető felületaktivitását és ennek változását hőkezelés hatására.
3. Jellemezzük a fehérjék emulgeáló tulajdonságait.
4. Meghatározzuk a fehérjék emésztőenzimekkel (pepszin, tripszin, kimotripszin) szembeni rezisztenciáját modellezett gyomor-bél–rendszerben (mesterséges emésztés).

5. Vizsgáljuk egy természetes lipid, a foszfatidil-kolin a fehérjék emészthetőségére gyakorolt hatását az emésztési modellben.
6. Tanulmányozzuk, milyen hatással van az emulgeálás a fehérjék emészthetőségére.
7. A lipid-fehérje kölcsönhatás (a foszfatidil-kolin és az emulgeálás) szerepének vizsgálata a fehérjék emészthetőségére és ezen keresztül allergenicitására.

# 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

## 4.1. Az albumin frakció tisztítása napraforgómagból

A kísérletekhez használt napraforgómagot (*Helianthus annuus*, L., PR A381 hibrid vonal) a Pioneer Magyarország Kft. biztosította kutatómunkánkhoz. A magvakról eltávolítottuk a maghéjat, a tisztított magvakat 3 napig fagyasztva szárítottuk, majd finomra őröltük. Kortt és Caldwell (1990) módosított tisztítási módszerével (Pandya és mtsai., 2000) extraháltuk és izoláltuk a 2S albuminokat valamint velük együtt az LTP fehérjét. A napraforgómag-lisztet kétszer zsírtalanítottuk petroléterben (60-80°), 20:1 (V/m) petroléter/liszt arányt alkalmazva (összesen 2 L petrolétert adva 100 g tisztított napraforgómaghoz), 1 órán keresztül 4°C-on rázattuk. Az oldószert frissre cseréltük és újabb 1 órás rázatással távolítottuk el a zsiradékok maradványait. A zsírtalanított lisztet tartalmazó folyadékot szűrőpapíron átszűrtük, majd fagyasztva szárítottuk.

Az albumin-frakciót (amely az LTP fehérjét is tartalmazza annak hasonló tulajdonságai miatt) 0,5 mol $L^{-1}$ NaCl-ot és 1 mmol $L^{-1}$ fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) tartalmazó, 20 mmol $L^{-1}$ pH 7,8 Trisz/HCl oldatban oldottuk fel, 10:1 V/m arányban adva a puffert a liszthez. Az oldatot 2 órán keresztül kevertettük 4°C-on, majd az extraktumot centrifugáltuk 13 500 g-vel, 30 percen keresztül 2°C-on. A felülúszót eltávolítottuk, 0°C-ra hűtöttük és hozzáadtunk annyi metanolt, hogy az elegyben a metanol aránya 60% (V/V) legyen. Ezzel a globulinokat csapadékba vittük, az albuminokban gazdag felülúszót újabb 2°C-on történő, 13 500 g, 30 perces centrifugálással nyertük vissza. A felülúszóhoz 3 térfogategységnyi acetont adtunk és 20°C-on állni hagytuk 16 órán (egy éjszakán) át. A kicsapódott albuminokat (és LTP-t) 13 500 g-n, 30 percig, 2°C-on történő centrifugálással nyertük vissza. A felülúszót elöntve vízben feloldottuk az aceton hatására kicsapódott 2S albuminokat, majd vízzel szemben dializáltuk 3500-as pórusméretű membránon keresztül 4°C-on 48 órán keresztül. A dialízis után az albuminok klorogénsav és fenoliodok jelenléte miatt zöldesen pigmentáltak, ezért újra centrifugáltuk a csapadékot 13 500 g-vel 30 percig, 2°C-on. Az oldható fehérje frakciót – amelyeket teljes napraforgó albuminoknak nevezünk ($SFA_{tot}$) – fagyasztva szárítottuk, majd –20°C-on tároltuk felhasználásig.

### 4.2. Az albuminok kromatográfiás elválasztása

A 2S albuminok szétválasztását reverz fázisú folyadékkromatográfiás módszerrel (RP-HPLC) végeztük. Öt frakciót gyűjtöttünk: LTP-t, SFA8-at és három kevert frakciót: A, B és C frakciókat. Ez utóbbi három frakció keverve tartalmazta a szintén 2S albuminok közé tartozó Alb1 és Alb2 fehérjéket. A preparatív elválasztást Phenomenex Jupiter 10 μ C18 300 Å (250 x 10 mm) oszlopon végeztük 45°C-on 20-50%-os acetonitril gradiens alkalmazva. Az A eluens 0,07% (V/V) trifluoro-ecetsav (TFA) volt, B eluensként acetonitrilt használtunk, amely 0,05 % (V/V) TFA-t tartalmazott. Az oszlopot 1 mL $min^{-1}$ áramlási sebességgel a következő profillal eluáltuk: az oszlopot 20% B oldattal, azaz acetonitrillel mostuk, 5 perc elteltével az acetonitril 20%-os arányát az elúció végére 35 percen keresztül lineárisan 50%-ra emeltük, majd az utolsó csúcs után az oszlopot tiszta acetonitrillel mostuk. Az oszlopról távozó folyadék UV-abszorbanciáját 225 nm-en mértük.

A csúcs-frakciókat összegyűjtöttük, fagyasztva szárítottuk és –20°C-on tároltuk szilikagél mellett.

### 4.3. Fehérjék azonosítása

#### 4.3.1. Nátrium-dedecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A fehérjéket nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) vizsgáltuk (Shewry és mtsai., 1995). A fehérjéket ultratiszta vízben feloldottuk és 4x NuPAGE® litium-dodecil-szulfát töltőpufferhez adtuk, majd 70°C-on 10 percig melegítettük. A fehérjék redukáláshoz 0,5 M ditiotreitolt (DTT) adtunk a mintákhoz. A redukált és a redukálatlan mintákhoz egyaránt töltőpuffert adtunk és ezzel együtt melegítettük. A futtatáshoz 12%-os poliakrilamid NuPAGE® Novex Bistris előregyártott gélt és 20x NuPAGE® Mes SDS futtatópuffert használtunk. A gélelektroforézist 35 percen keresztül, 200 V feszültségen és gélenként 120 mA-es áramerősség mellett végeztük. A gélelektroforézis után Colloidal Blue Staining Kittel festettük a géleket. Invitrogen SeeBlue®Plus2 és Mark12™ molekulatömeg-standardot és Phoretix szoftvert (TotalLab) használtunk a molekulatömegek becslésére. A fehérjéket azonosításra tömegspektroszkópiai (MALDI-TOF) vizsgálatra küldtük.

### 4.3.2. Peptidek analízise

Az RP-HPLC-n tisztított frakciókat redukáltuk és piridiletilálás után N-terminális szekvenálásra küldtük. Az N-terminális szekvenálás automata Edman-lebontás módszerrel működő 494 Applied Biosystems típusú fehérjeszekvenáló készüléken történt.

## 4.4. Fehérjeszerkezeti vizsgálatok

### 4.4.1. A fehérjék törzsoldatainak előállítása

A fehérjék törzsoldatait 1 mg $cm^{-3}$ fehérje-koncentrációban készítettük és 4°C-on tároltuk. A tisztított, vízmentes LTP fehérjét 10 mM-os foszfátpufferben (pH 8,0) oldottuk fel. A foszfátpuffer pH-ját az LTP izoelektromos pontjához ($pI_{LTP}$=9.0) képest egy egységgel magasabbnak választottuk. Az érett fehérjék összes poszttranszlációs módosítás utáni izoelektromos pontját az Expasy szerver pI-kalkuláló alkalmazásával számítottuk (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Az SFA8 fehérjét citrát pufferben (pH 5,0) oldottuk, melyet ultra tiszta víz felhasználásával készítettünk. (A törzsoldatot a fentieknek megfelelően pH 5,0 citrátpufferrel állítottuk elő, mivel az SFA8 izoelektromos pontja 5,9.) A desztillált vizet legalább 18,2 MΩ ellenállás, illetve legalább 72,6 mN $m^{-1}$ felületi feszültég eléréséig tisztítottuk.

Az A, B és C frakció törzsoldatait 10 mM foszfátpufferrel (pH 7,0) készítettük. Az összes kísérletet abban a pufferben végeztük, amelyből a törzsoldatot készítettük.

### 4.4.2. Távoli-UV cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A spektrumok felvételéhez a 4.4.1. részben leírt törzsoldatokat és puffereket (azonos pH értéken) használtuk. A cirkuláris dikroizmus (CD) spektrumokat JASCO J-700 spektropolariméterrel (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) rögzítettük 100 nm $min^{-1}$ szkennelési sebességgel, 0,2 nm sávszélesség, 0,2 nm felbontás, 100 mdeg érzékenység és 2 másodperc válaszidő mellett. A mintákat 0,5 mm úthosszúságú kvarcküvettába tettük. A spektrumokat 190 és 260 nm között rögzítettük. Minden ábrán feltüntetett spektrum három spektrum átlagolt értékét mutatja, a küvetta és a puffer okozta háttér levonása után. A spektrumokat először 20°C-on rögzítettük, majd a mintatartót a mintákkal együtt 20 percen át 80°C-ra

melegítettük és így is felvettük a spektrumokat. Ezt követően újabb 20 percig 20°C-on tartottuk a mintákat a spektorpolariméterben *in situ* és így is rögzítettük a spektrumokat. A küvetta megfelelő hőmérsékletét egy külső, állítható hőmérsékletű vízfürdő biztosította.

A spektrumok analízisét a Contin módszer szerint végeztük (Provencher és Glöckner, 1981), 29 fehérjét tartalmazó báziskészlettel. A simítatlan spektrumok moláris CD-t jelölnek (figyelembe véve a mólokat és az amidkötéseket), az aminosavak átlagos molekulatömegét 115-nek véve alapul.

### 4.4.3. Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)

A kalorimetriás mérésekhez egyenként 20 µl térfogatú fehérjeoldatokat készítettünk 10%-os (w/V) LTP 10 mM foszfát pufferben (pH 8,0), 10%-os SFA8 10 mM citrát pufferben (pH 5,0). Referenciaként ribonukleáz 10%-os (w/V) foszfát pufferes (pH 8,0) oldatát használtuk. A mintákat és a referenciát hermetikusan lezárt alumínium mintatartóba tettük. A mintatartók 50 µl térfogatúak és 202,650 kPa (2 atm) nyomáshatárral rendelkeznek. A mintákat Perkin-Elmer DSC7 (Perkin-Elmer, US) készülékben a következő hőmérsékleti profil alapján kezeltük: 5 percig 5°C-on tartottuk, majd 10°C $min^{-1}$ sebességgel melegítettük 5°C-tól 120°C-ig. Ezt követően azonnal lehűtöttük 5°C-ra és megismételtük a mérést a korábbi hőmérsékleti profillal. A készüléket inidiummal és oktadekánnal kalibráltuk. Az alapvonalat üres mintatartó szkennelésével vettük fel és levontuk a kapott értékekből. Az adatok értékelését és a hőkapacitás értékek számítását Perkin–Elmer Thermal Analysis szoftverrel végeztük.

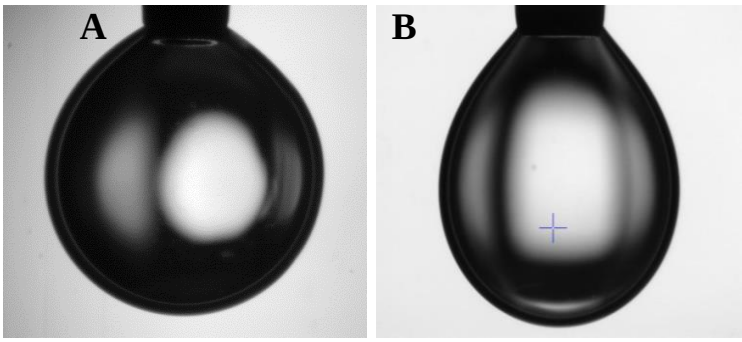
## 4.5. Határfelületi vizsgálatok

A határfelületi mérésekhez a 4.4.1. pontban részletezett módon előállított törzsoldatokat használtuk. A törzsoldatokat két részre osztottuk a kísérletek megkezdése előtt és az egyik részét hőkezeltük az alábbiak szerint: A fehérjeoldatot 90°C-on 20 percig melegítettük, majd jégen 10 percen keresztül hűtöttük. A felületi vizsgálatok megkezdése előtt a fehérjeoldatokat 10 percig állni hagytuk szobahőmérsékleten. A törzsoldat másik részét hőmérsékleti kezelés nélkül vizsgáltuk (kontroll minta).

Mind a kontroll (natív), mind a melegített oldatokat szobahőmérsékleten vizsgáltuk.

### 4.5.1. Határfelületi feszültség-mérések

Öt különböző koncentrációban (0,001; 0,005; 0,01; 0,05 és 0,1 mg $cm^{-3}$) mértük a határfelületi feszültséget és a határfelületi dilatációs reológiai tulajdonságokat az LTP, az A, a B és a C frakció, valamint az SFA8 esetén n-hexadekán/víz határfelületen pulzáló csepp (pulsating drop) módszerrel (Maldonado-Valderrama és mtsai., 2008). A határfelületi mérésekhez FTA32 (First Ten Ångstroms, Portsmouth, Virginia, USA) készüléket használtunk, amely a felületi feszültséget egy hidrofób tű végén függő csepp alakjából számítja a „selected-plane" módszer alapján (Ambwani és Fort, 1979) (**9. ábra**). A tű vége az n-hexadekánba ér, ebben jelenik meg a fehérjeoldat egy cseppje. A készülék digitális kamerával (Pulnix TM500) pillanatfelvételek sorozatát készíti a csepprő és a csepp alakváltozásaiból számítja a felületi feszültséget (γ). A fehérjeoldatok cseppjeinek alakváltozásait 15 percen keresztül mértük, mivel ezután már csak minimális változást észleltünk a csepp formájában. Minden egyes adatpont három független párhuzamos mérés átlaga, melyeket egymástól független cseppeken mértünk.




**9. ábra. A)** Az LTP és **B)** az SFA8 egyik cseppje mérés közben Pulnix TM500 digitális kamerával rögzítve.

### 4.5.2. Határfelületi reológiai vizsgálatok

A felületi dilatációs méréseket CIR100 Interfacial Rheometer (Camtel, UK) típusú határfelületi reométer készüléken végeztük. A felületi feszültséget levegő/víz határfelületen rögzítettük. A készülék egy 100 $cm^2$ felületű Teflon Langmuir filmmel bevont kádhoz és két mozgó gáthoz csatlakozik. A gátak összenyomják a folyadék felületét, miközben egy kerek, üveg Wilhelmy-plate segítségével a készülék rögzíti a felületi feszültség értékét (γ).

A megfelelő (4.4.1. részben részletezett) pufferrel feltöltöttük a kádat és a puffer felületére óvatosan 1 mg $cm^{-3}$ koncentrációjú fehérjeoldatot pipettáztunk; az LTP esetében 0,1 µg $cm^{-2}$, az SFA8 esetében pedig 0,5 µg $cm^{-2}$ végkoncentrációt kialakítva. Ezután a felületet a mozgó gátak zárásával összenyomtuk. A gátak sebessége állandó 0,02 mm $min^{-1}$ volt. A cilinder oszcilláció szinusz görbe szerint változott.

### 4.5.3. Emuziókészítés és jellemzés

Az emulziókat 20%-os n-hexadekán (Aldrich) és 2 mg $mL^{-1}$ koncentrációjú fehérjeoldatból készítettük mind az öt vizsgált fehérjeminta esetében (Burnett[a] és mtsai., 2002). Az emulziók elkészítéséhez a 4.4.1. részben ismertetett fehérje törzsoldatokat használtuk. N-hexadekán és az egyes fehérjeoldatok homogenizálásával 3 mL térfogatú emulziókat készítettünk. A homogenizáláshoz Status 200 típusú szonikáló készüléket alkalmaztunk. A szonikáló ciklus 0,1 s energiaközlésből (10% teljesítményen) és 0,9 s relaxációból állt, 20-szor ismételve. A 20 ciklus szonikálást 2 perc várakozás után megismételtük. Az emulziót tartalmazó edényt jégben tartottuk a szonikálás ideje alatt, így az eljárás során az emulzió hőmérséklete sosem emelkedet 25°C fölé, minimalizálva ezzel a fehérjék szerkezetét befolyásoló hőhatást.

A kialakuló partikulumok méretét LS-230 (Coulter, USA) fényszórásos elven működő (light scattering) részecskeméret meghatározó készülékkel mértük. Három emulziót készítettünk minden fehérjéből és hat független párhuzamos mérést végeztünk minden emulzióval.

## 4.6. *In vitro* szimulált gasztro-intesztinális emésztés

### 4.6.1. Fehérjeoldatok előállítása a gasztro-intesztinális emésztéshez

A fehérjéket szimulált gasztrális folyadékban (simulated gastric fluid, SGF) emésztettük. Az SGF-oldat pH 2,5-es kémhatású 0,15 M NaCl oldat, melynek pH-ját 1M HCl oldattal állítottuk be.

Az emulziókat 2 mL n-hexadekán és 1,8 mL, 5 mg SFA8-at tartalmazó Na-citrát puffer (pH 5,0) homogenizálásával állítottuk elő a 4.5.3. fejezetben leírtak szerint. A létrejövő

emulzió cseppméretét megmértük a 4.5.3. részben részletezett módon LS-230 (Coulter, USA) készüléken.

A nem adszorbeált (intersticiális) fehérjéket Na-citrát pufferrel való mosással és ezt követő centrifugálással (5000 g, 10 perc) távolítottuk el.

A centrifugálás hatására az emulzió két fázisra vált szét: krémre és szubfázisra. A szubfázist, amely nem vett részt az emulzióképzésben, eltávolítottuk és spektrofotométerrel 280 nm-en történő abszorpció alapján kiszámítottuk a fehérjekoncentrációját. Az emulzióhoz citrátpuffert adtunk és összeráztuk, hogy újra eloszlassuk az emulgeált cseppeket. A mosást háromszor megismételtük (Burnett[b] és mtsai., 2002). Az emulgeált cseppek méretét megmértük a mosás előtt és után egyaránt, így megbizonyosodtunk róla, hogy nem történt változás a cseppek méretében a mosás hatására, tehát nem következett be koaleszcenia a centrifugálás következtében. Kiszámítottuk az olajhoz kötött fehérjék mennyiségét és az emulzió azon térfogatát, amely annyi fehérjét tartalmaz, hogy az emésztési elegyhez adva a fehérjekoncentráció 2 mg $mL^{-1}$ legyen.

### 4.6.2. Foszfolipid-vezikulák (liposzómák) előállítása

A foszfolipid-vezikulák előállításához tojásból származó, 99%-os tisztaságú 1-foszfatidilkolint (FK) (Lipid Products, South Nutfield, Redhill, Surrey, UK) használtunk. A FK-ról eltávolítottuk a tároló folyadékot először vízhűtéses rotációs evaporátor (legalább 15 percen át), majd vákuum-sütő használatával, vékony filmréteget létrehozva az üveglombik alján. A kialakult száraz filmréteget argon alatt tartottuk további felhasználásig, hogy elkerüljük a lipidek oxidációját. A száraz FK-filmréteget 37°C-ra előmelegített SGF-ben oldottuk (összetétel a 4.6.1. részben) úgy, hogy 5 üveggyöngyöt tettünk a folyadékba, argonnal azonnal feltöltöttük és a lezárt lombikot 37°C-on 20 percen át inkubáltuk enyhe rázatás mellett. Ezt követően a szuszpenziót vízhűtéses szonikáló készülékbe helyeztük - üveggyöngyök nélkül. A szonikálást 5°C-on 10 percig 30%-os teljesítményen 9/10 ciklussal végeztük Status Ultrasonic (Avestin, Canada) US200 szonikátorral, melyhez TT13 típusú lapos titán fejet csatlakoztattunk. A FK-vezikulákat összegyűjtöttük és Millex-HA 0,45 µm-es kevert cellulóz membránon (Millipore, Billerica, MA, USA) szűrtük, hogy eltávolítsuk a titán-részecskéket.

### 4.6.3. Az emésztés *in vitro* modellje

#### 4.6.3.1. *In vitro* gasztrális emésztés (1. fázis)

A fehérjéket SGF-oldatban oldottuk 1 mg $ml^{-1}$ koncentrációban. Az emésztéseket FK jelenlétében és hiányában is elvégeztük. A FK hatását vizsgáló kísérletekben a fehérjeoldathoz FK-vezikulákat kevertünk (1:1,2 V/V arányban). Amikor nem adtunk FK-t az emésztési elegyhez, akkor a FK térfogatát SGF-oldattal pótoltuk és az oldat pH-ját 1M HCl-oldattal 2,5-re állítottuk, amennyiben szükséges volt. Ezt az elegyet 15 percig inkubáltuk 37°C-on, majd hozzáadtuk a pepszin-oldatot. A pepszint (EC 3.4.23.1) (Sigma, Poole, Dorset, UK., P 6887) (0,32% (w⁄v)) pH 2,5 SGF-ben oldottunk fel. Az szubsztrát:enzim arányát úgy állítottuk be, hogy megközelítőleg a fiziológiás arányt (1:20 w/w) tudjuk modellezni, azaz 182 U pepszint adva a fehérje minden mg-jához. Ez az összeállítás az első fázis emésztési elegyében 4 mL végső térfogatban az alábbi koncentrációkat eredményezte:

6,3 mM FK

2,5 mg $mL^{-1}$ fehérje.

Az emésztést 37°C-os inkubátorban végeztük, gyenge rázatás mellett. Az emésztési elegyből 10 időpontban vettünk 200 µL térfogatú mintákat: 0, 1, 2, 4, 8, 16, 30, 60, 90 és 120 perc elteltével. A mintákat további felhasználásig -20°C-on tároltuk. Az emésztés leállításához az oldat kémhatását $NH_4HCO_3$-oldattal (NDH, Poole, Dorset, UK) pH 7,0-re emeltük.

#### 4.6.3.2. *In vitro* intesztinális emésztés (2. fázis)

Az *in vitro* emésztés 2. fázisának kiindulási anyaga a gasztrális fázis 120 perces emésztési elegye. Az emésztési elegy pH-ját $NH_4HCO_3$-oldattal 6,5-re állítottuk és hozzáadtuk a következőket:

a) epesavak sói, melyek egyenlő moláris mennyiségben tartalmaznak (0,125 M) Na-taurokolátot (Sigma) és glikodeoxikol-savat (Calbiochem, La Jolla, CA, USA),
b) 1 M $CaCl_2$ (BDH),
c) 0,25 M Bisztrisz, pH 6,5 (Sigma),
d) sertés pankreatikus lipáz (EC 3.1.1.3; 20 µL a 10 mL végtérfogathoz) (0,1% w⁄v; Sigma),

e) sertés kolipáz (40 µL a 10 mL végtérfogathoz) (0,055%, w/v; Sigma) (Moreno, 2005).

Közvetlenül a kísérlet indításakor adtuk a 2. fázis emésztési elegyéhez a pankreatikus proteázokat, amelyeket pH 7,0-es SGF-oldatban oldottunk fel a fiziológiai szubsztrát:enzim koncentrációt megközelítő arányban (1:400 :100 (w/w/w); 1 mg/34,5 U/0,44 U):

f) tripszint (EC 3.4.21.4; 0.1% w/v; Sigma)

g) és α-kimotripszint (EC 3.4.21.1; 0.4% w/v; Sigma)

Ezzel az intesztinális fázis emésztési elegyének összetétele az alábbi volt:

5,8 mM FK

2,3 mg $mL^{-1}$ fehérje

7,4 mM epesók

9,2 mM $CaCl_2$

24,7 mM Bisztrisz

Az emésztést 37°C-on végeztük, enyhe rázatás mellett. Mintákat vettünk az elegyből 0, 2, 4, 8, 16, 30, 60, 90 és 120 perc elteltével. Az emésztést szójából származó Bowman-Birk tripszin-kimotripszin inhibítor oldatának hozzáadásával állítottuk le, melynek mennyiségét úgy számítottuk, hogy a 2. fázis emésztési elegyében jelenlévő tripszin és kimotripszin mennyiségének kétszeresére elegendő gátlóhatással bírjon. A mintákat további felhasználásig –20°C-on tartottuk.

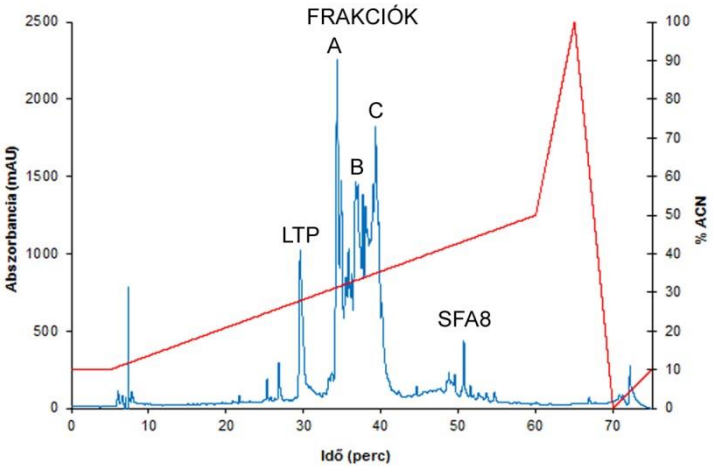
### 4.6.4. SDS-PAGE analízis

Az emésztés különböző fázisaiban vett minták fehérje összetételének változását SDS-PAGE módszerrel vizsgáltuk. Az emésztési elegyhez 20 µL-éhez 17,5 µL ultratiszta vizet és 12,5 µL 4x NuPAGE® lítium-dodecil-szulfát töltőpuffert adtunk. A minták SDS-PAGE analízisét a 4.3.1. pontban részletezett módszerrel végeztük.

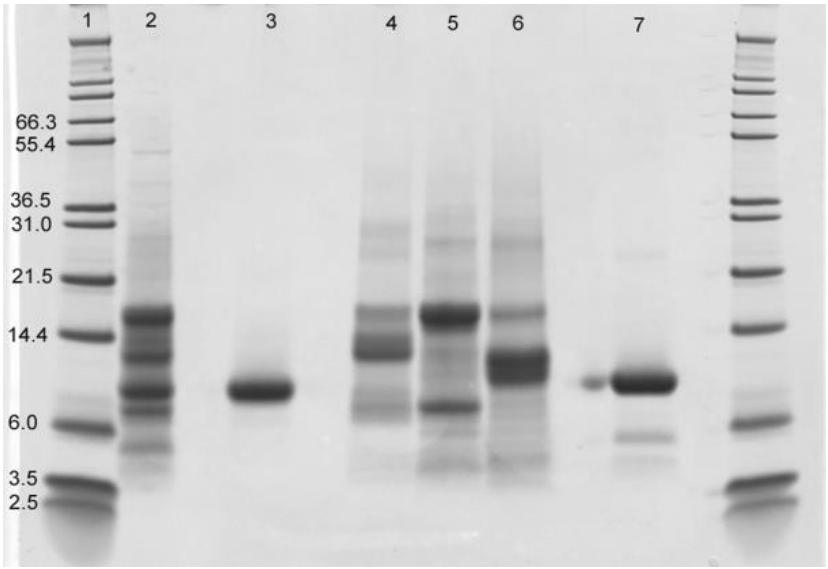
# 5. EREDMÉNYEK

## 5.1. A fehérjék azonosítása

A napraforgómag teljes vízoldható frakcióját tisztítottuk. Ez a frakció főként albuminokat tartalmaz, de hasonló oldékonysága miatt az LTP is az albuminokkal együtt extrahálódik. (Ezt a frakciót nevezik a „teljes albumin frakciónak" ($SFA_{tot}$), noha az albuminokon kívül az LTP-t is tartalmazza.) Ezt a teljes vízoldható frakciót öt további frakcióra választottuk el RP-HPLC módszerrel: LTP, SFA8 és az Alb1 és Alb2 fehérjék három kevert frakciója (A, B és C frakció) (**10. és 11. ábra**).




**10. ábra**. A napraforgó ún. „teljes albumin frakciójának" kromatogrammja. A feliratozott csúcsok a gyűjtött frakciókat jelölik: LTP, A, B és C frakció, valamint SFA8. A bal oldali tengelyen a 225 nm-en mért abszorbancia látható, görbéje kék színű, a jobb oldali tengelyen az acetonitril %-os aránya az eluáló oldatban, görbéje piros színnel feltüntetve látható.




**11. ábra.** A teljes albumin frakció vizsgálata SDS-PAGE-en. A sávok: 1. molekulatömeg marker (az egyes tömegek az ábra bal oldalán feltüntetve, kDa-ban értendő), 2. a teljes albumin frakció, 3. LTP, 4. A frakció, 5. B frakció, 6, C frakció, 7: SFA8.

Az Alb1 és Alb2 fehérje – az SFA8 fehérjével együtt – egyaránt a 2S albuminok csoportjába tartozik. Az SDS-PAGE vizsgálat alapján elmondható, hogy az A frakció 7 és 18 kDa, a B frakció 4 és 20 kDa, a C frakció pedig 4 kDa és 19 kDa közötti molekulatömegű fehérjék keveréke. Az LTP és az SFA8 fehérjét N-terminális szekvenálással és elektrospray-tömegspektroszkópiával azonosítottuk. MALDI-TOF analízissel vizsgálva a három kevert frakciót, megtudtuk, hogy az A frakció főként Alb2 fehérjét tartalmaz, míg a B és a C frakcióban az Alb1 fehérje dominál (**11. ábra**). E három frakcióban található (A, B és C) összes 2S albumin monomer fehérje, amelyek intramolekuláris diszulfid-hidakat tartalmaznak. Molekulatömegük 10 és 18 kDa között változik (Anisimova és mtsai., 2000). A fehérjék jellemző adatait és UniProt azonosítóit az **3. táblázat** tartalmazza.

**3. táblázat**. A vizsgált fehérje frakciók fehérjéinek molekulatömege (Mw), izoelektromos pontja (pI), aminosavainak száma, valamint UniProt azonosítója. *az Alb1 és Alb2 fehérje közös prekurzora.

| Fehérje-frakció | Fehérje | Mw (Da) | pI | Aminosavak száma | UniProt azonosító |
|---|---|---|---|---|---|
| *LTP* | **LTP** | 8990,2 | 9,02 | 91 | Q39950 |
| *A frakció*<br>*B frakció*<br>*C frakció* | **Alb1** | 14482,2 | 8,80 | 124 | Q8GUD8* |
| | **Alb2** | 15299,2 | 8,74 | 128 | Q8GUD8* |
| *SFA8* | **SFA8** | 12155,3 | 5,91 | 103 | P23110 |

### 5.2. Fehérjeszerkezeti vizsgálatok

#### 5.2.1. Távoli UV-CD-spektroszkópia

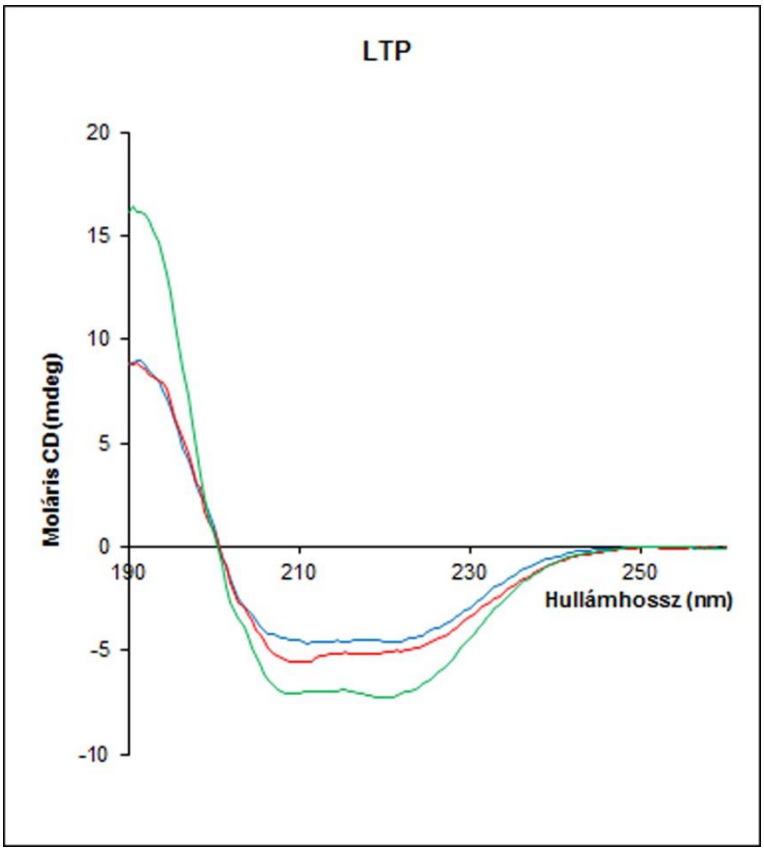
Az öt vizsgált fehérje másodlagos szerkezetét CD-spektrofotometriás mérésekkel tanulmányozktuk három különböző hőmérsékleten: 20°C-on, majd 80°C-ra melegítve, ezt követően visszahűtve 20°C-ra. A hőkezelés hatására a hőstabilitástól függően megváltozott a fehérjék térszerkezete. A kapott spektrumok alapján Contin-módszerrel (Provencher és Glöckner, 1981) számítottuk a különböző térszerkezeti elemek arányát, illetve a hőkezelés következtében bekövetkezett változásokat ezen arányokban (**4. táblázat**).

**4. táblázat.** A fehérjék becsült másodlagos szerkezete a CD-spektrumok Contin-analíziséből számítva.

| | | α-hélix (%) | β-redő (%) | β-turn (%) | Random tekercs (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| **LTP** | 20°C | 44,8 | 8,9 | 18,5 | 27,7 |
| | 80°C | 35,8 | 13,2 | 22,2 | 28,8 |
| | 20°C-ra hűtve | 38,6 | 12,1 | 20,3 | 28,9 |
| **A frakció** | 20°C | 45,6 | 8,7 | 18,5 | 27,2 |
| | 80°C | 36,6 | 15,6 | 22,0 | 25,8 |
| | 20°C-ra hűtve | 42,4 | 12,0 | 18,5 | 27,1 |
| **B frakció** | 20°C | 27,3 | 23,4 | 21,9 | 27,4 |
| | 80°C | 25,7 | 24,6 | 23,3 | 26,4 |
| | 20°C-ra hűtve | 28,7 | 20,9 | 22,4 | 28,0 |
| **C frakció** | 20°C | 27,2 | 22,8 | 22,6 | 27,4 |
| | 80°C | 24,0 | 25,7 | 23,6 | 26,7 |
| | 20°C-ra hűtve | 27,6 | 22,5 | 22,5 | 27,4 |
| **SFA8** | 20°C | 35,4 | 13,4 | 21,1 | 30,1 |
| | 80°C | 42,2 | 8,5 | 32,3 | 17,0 |
| | 20°C-ra hűtve | 39,0 | 8,3 | 22,9 | 29,8 |

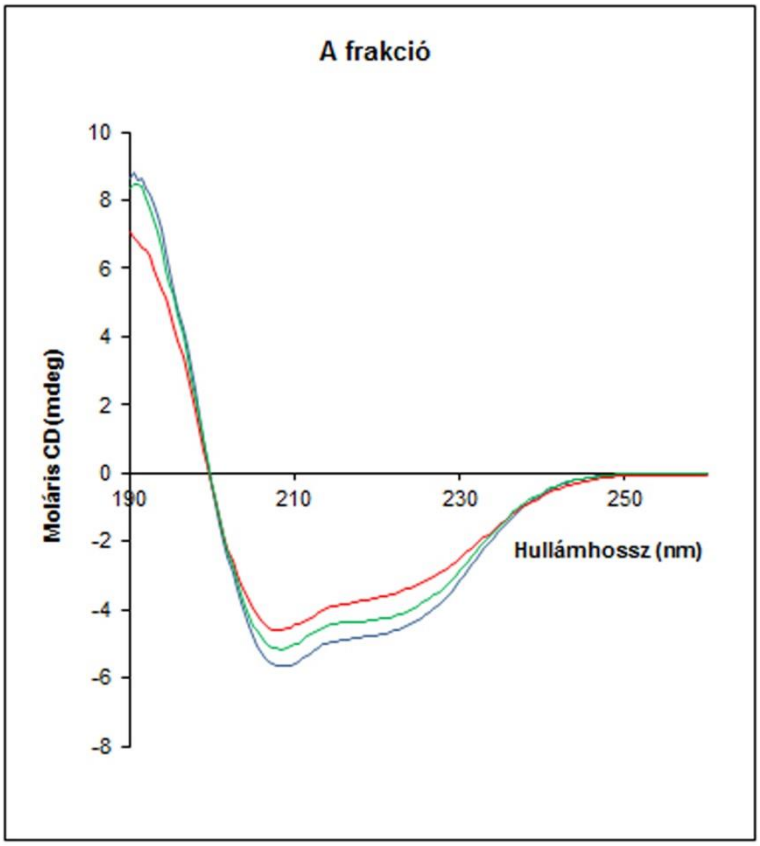
Az LTP fehérje távoli UV-CD spektruma (**12.a ábra**) jellegzetes az α-hélixben gazdag fehérjék körében. A spektrum maximuma 192 nm körül volt, a minimuma széles tartományt ölel fel 206-221 nm környékén. Amikor 80°C-ra melegítettük a fehérje oldatát, a spektrum maximuma csökkent, és akkor is változott, amikor lehűtöttük a fehérjét: a maximum és a minimumok is intenzívebbé váltak. E változások csupán nagyon apró szerkezetbeli módosulásoknak köszönhetőek, ezért a fehérje hőkezelésre mérsékelten rezisztensnek

nevezhető. A melegítést követő lehűtés során bekövetkező szerkezeti változások terén a Contin-analízis kimutatta az α-hélix arányának csökkenését a β-redő szerkezet javára (**4. táblázat**).

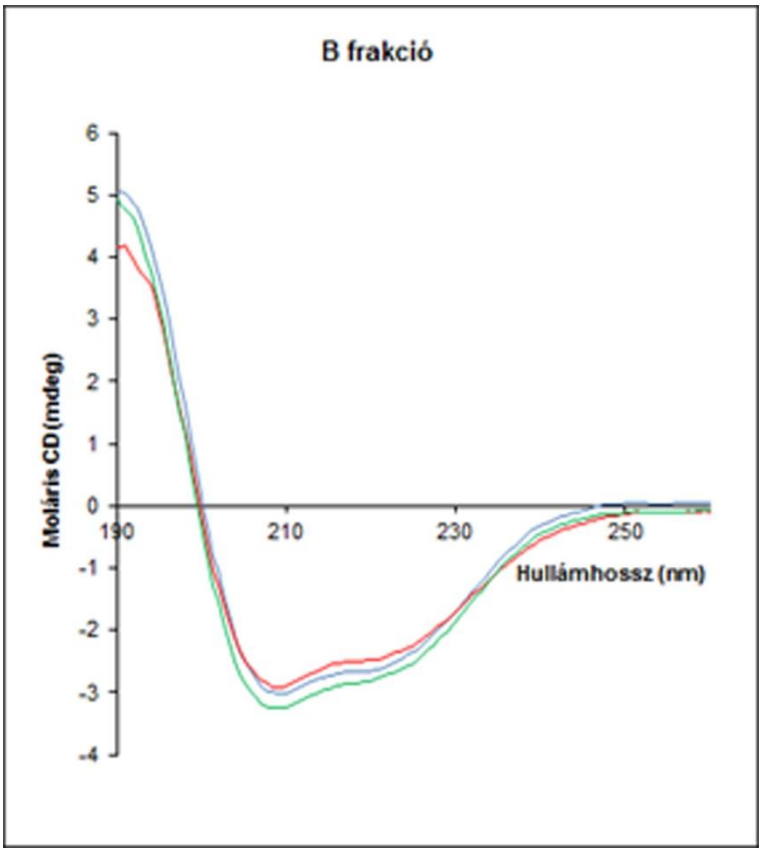



**12.a ábra**. Az LTP távoli UV-CD spektrumai 20°C-on (——), 80°C-on (——) és visszahűtve 20°C-ra (——). A spektrum maximuma 192 nm-nél van, minimuma széles tartományt ölel fel 206-221 nm között.

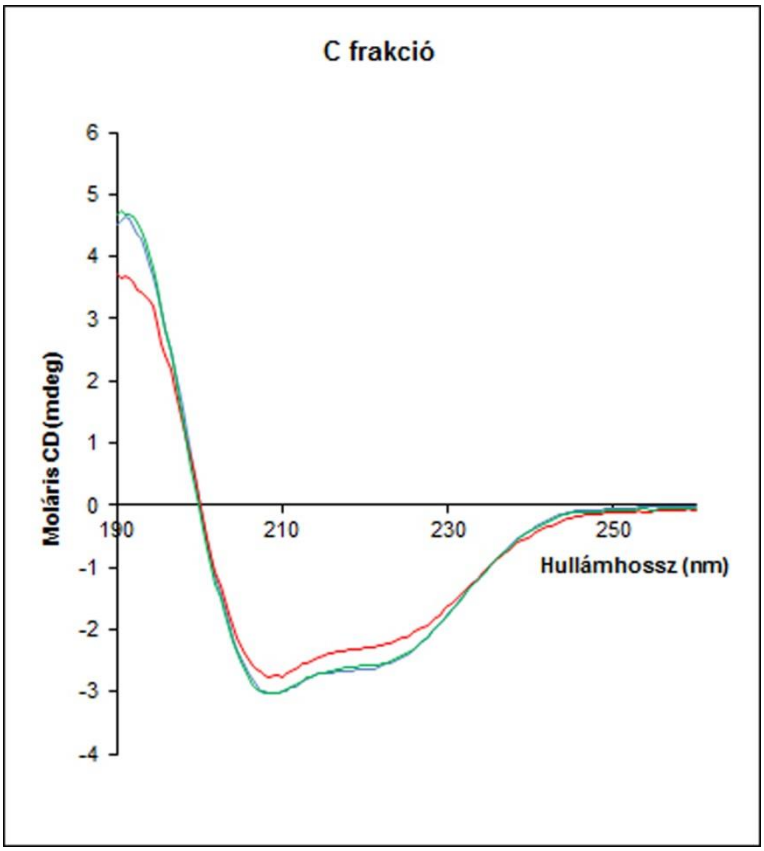
Az A, B és C frakció spektrumai (**12.b, 12.c, 12.d ábra**) egymáshoz hasonlóak voltak, pozitív maximumuk 190 nm körül volt és dupla minimumot mutattak 209 nm-en, amely kissé intenzívebb volt, mint a 225 nm-en mért minimum. Az A frakció sokkal intenzívebb pozitív csúcsot adott, mint a másik két albumin frakció, amely másodlagos szerkezeti különbségeket tükrözhet. Az A frakció esetében a Contin-analízis a β-redő struktúra sokkal alacsonyabb arányát jelzi (8%), mint a B és C frakciók estén (23% körül) (**4. táblázat**).




**12.b ábra**. Az A frakció távoli UV-CD spektrumai 20°C-on (——), 80°C-on (——) és visszahűtve 20°C-ra (———). A spektrumok pozitív maximuma 190 nm körül van, dupla minimum található 209 nm-en, amely kissé intenzívebb, mint a a 225 nm-en mért minimum.



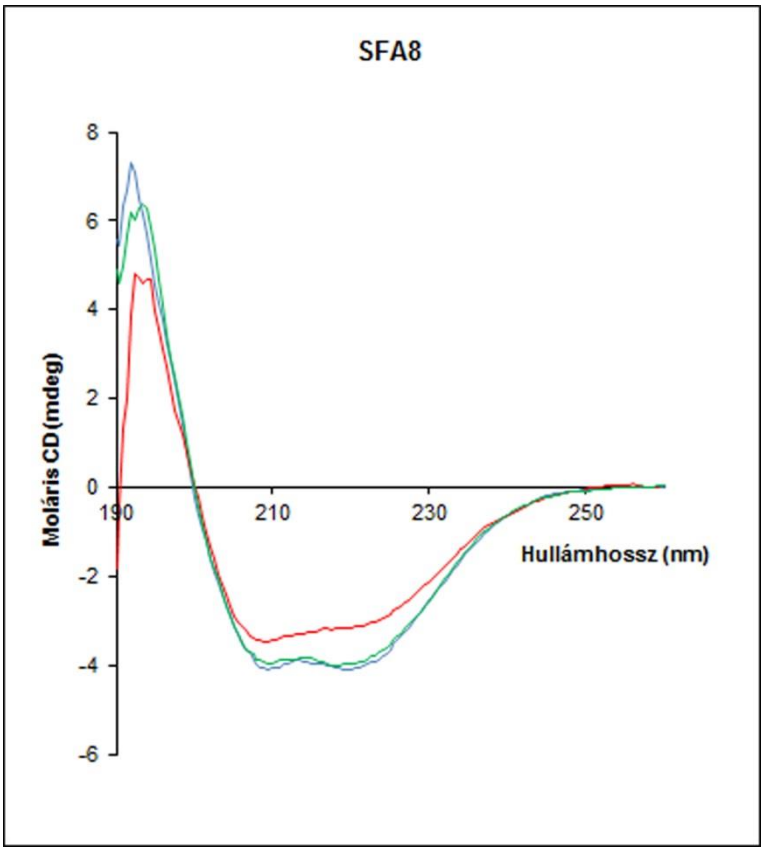

**12.c ábra**. A B frakció távoli UV-CD spektrumai 20°C-on (——), 80°C-on (——) és visszahűtve 20°C-ra (——). A spektrumok pozitív maximuma 190 nm körül van, dupla minimum található 209 nm-en, amely kissé intenzívebb, mint a a 225 nm-en mért minimum.




**12.d ábra**. A C frakció távoli UV-CD spektrumai 20°C-on (——), 80°C-on (——) és visszahűtve 20°C-ra (———). A spektrumok pozitív maximuma 190 nm körül van, dupla minimum található 209 nm-en, amely kissé intenzívebb, mint a a 225 nm-en mért minimum.

Az SFA8 spektruma (**12.e ábra**) megközelítően hasonló volt a többi vizsgált albuminéhoz – éles csúcsot láthatunk 193 nm-nél és dupla minimumot azonos intenzitással 210 és 220 nm-nél.

Az A, B és C frakció, valamint az SFA8 minimumai és maximumai nem változtak sokat sem az intenzitás sem a hullámhosszak tekintetében a melegítés és az ezt követő lehűtés hatására. Mindamellett a spektrumok maximuma és a minimumai enyhén csökkentek 80°C-on az A és a C frakció, valamint az SFA8 esetében, de hűtésre visszatértek az eredetihez nagyon közeli értékekhez, tehát szerkezeti stabilitásuk az LTP-énél nagyobb mértékűnek bizonyult.

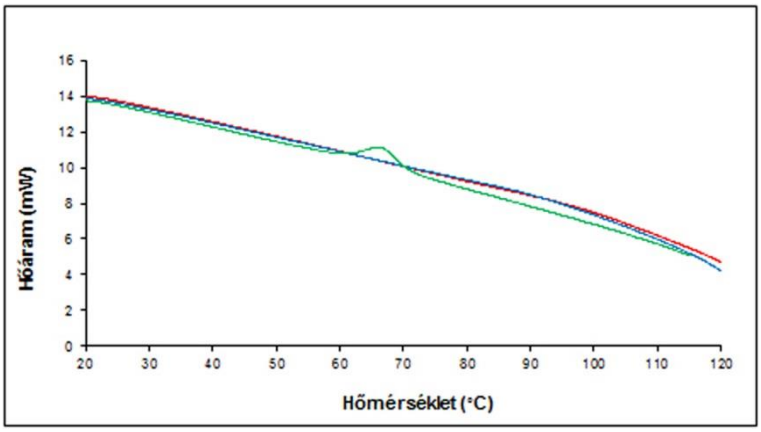



**12.e ábra**. Az SFA8 távoli UV-CD spektrumok 20°C-on (——), 80°C-on (——) és visszahűtve 20°C-ra (——). Éles csúcs látható 193 nm-nél, valamint dupla, azonos intenzitású minimum található 210 és 220 nm-nél.

Összefoglalva, mind az öt vizsgált fehérje mindegyike hőstabil volt, ahogyan az várható a viszonylag nagyszámú diszulfid-kötés jelenléte miatt. (Az LTP, az Alb1 és Alb2 fehérje, valamint az SFA8 molekulánként 4 diszulfid-kötés kialakítására képes.) Csak elenyésző változás következett be a túlnyomóan α-hélixet tartalmazó másodlagos szerkezetben a 80°C-ra történő melegítés hatására.

### 5.2.2. Differenciális pásztázó kalirometria (DSC)

Az LTP és az SFA8 mellett párhuzamosan a ribonukleáz A fehérjét is vizsgáltuk, amelynek ismert az átalakulási hőmérséklete (63,8 °C) (Stelea és mtsai., 2001), hogy lehetővé váljon a különböző pufferek esetleges hatásainak összehasonlítása. A referenciaként használt ribonukleáz A fehérje kalorimetriás görbéjén látható 63,8°C-nál egy csúcs, amely a hőtranzíciót jelzi. Sem az LTP, sem az SFA8 grafikonján nem található hőtranzíciót indikáló csúcs 10°C-ról 120°C-ra történő melegítésekor (**13. ábra**), tehát a vizsgált hőmérséklet-tartományban denaturáció nem történt. Az A, B és C frakciók differenciális pásztázó kalorimetriás vizsgálatának nem volt értelme a minták kevert volta miatt.




**13. ábra.** Az LTP és az SFA8, valamint a referencia ribonukleáz A differenciális pásztázó kalorimetriás grafikonja. Kék: LTP, piros: SFA8, zöld: ribonukleáz A

### 5.3. Határfelületi vizsgálatok

#### 5.3.1. Határfelületi feszültség és dilatációs reológiai vizsgálatok

A fehérjék határfelületen mutatott viselkedését először reológiai módszerekkel vizsgáltuk. A fehérjék aminosav-összetételéből és korábbi kutatásokból következtettünk arra, hogy a napraforgó tartalékfehérjéi között találhatunk olyanokat, amelyek jó felületaktivitással jellemezhetők. Mindemellett a fehérjeszerkezetben végbemenő apró változások követésére is kiváló eszköz a határfelületi reológia.

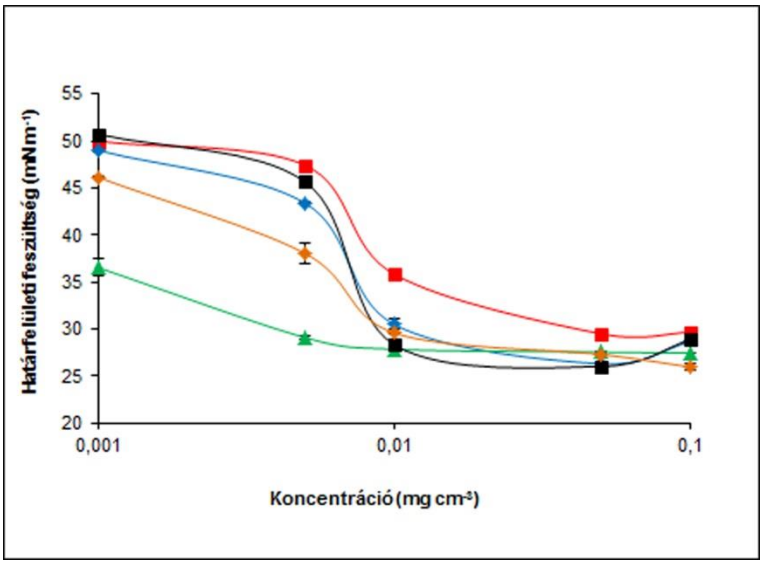
Vizsgálataink során mértük a fehérjeoldatok olaj/víz határfelületen mutatott felületi feszültségét öt különböző koncentrációban. A méréseket elvégeztük kezeletlen valamint előzőleg hőkezelt fehérjéken is. A felületi feszültség-méréseket addig folytattuk, amíg jelentős változás észlelhető volt a felületi feszültség értékeiben, ez 15 percig tartott.

Az LTP fehérje volt a legkevésbé felületaktív a vizsgált fehérjék közül, még a legmagasabb alkalmazott koncentrációban (0,1 mg $cm^{-3}$) is 7 mN $m^{-1}$ felületi feszültség értéket idézett elő (**14.a ábra**). Az A, B és a C frakciók egymáshoz nagyon hasonló felületaktivitási értékeket mutattak 0,01 mg $cm^{-3}$ koncentráció fölött. Alacsonyabb koncentrációk mellett viszont lényeges különbségeket fedezhettünk fel. Az SFA8 csökkentette a felületi feszültséget a legnagyobb mértékben minden alkalmazott koncentrációban – kivéve a 0,001 mg $cm^{-3}$-t, ahol a B frakció alacsonyabb felületi feszültséget generált.

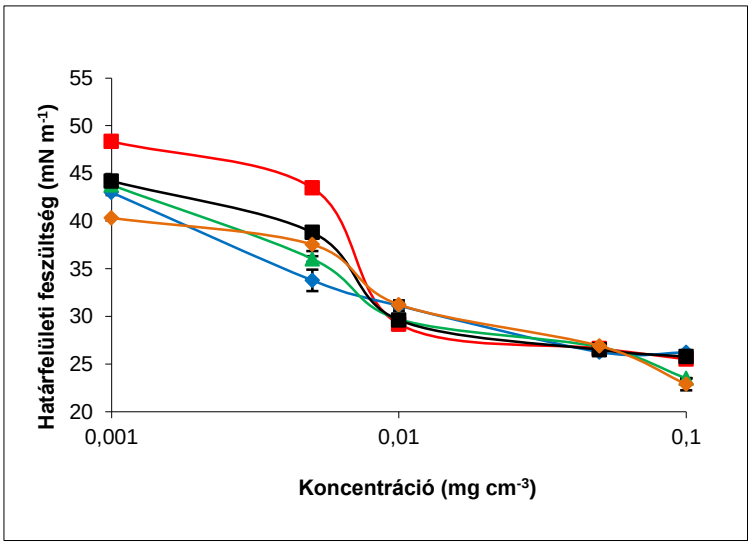
A C frakció és az LTP rendelkezett a legalacsonyabb, a B frakció és az SFA8 fehérje pedig a legmagasabb felületi aktivitással.

Melegítés hatására mind az öt fehérje esetén nőtt a felületi aktivitás az összes vizsgált koncentrációban (**14.b ábra**). Az LTP mutatta a legnagyobb mértékű változást melegítés hatására: 0,1 mg $cm^{-3}$ koncentráció mellett 4 mN $m^{-1}$-rel csökkent a felületi feszültség. Az SFA8 esetében ellenben ugyanebben a koncentrációban csupán 1,3 mN $m^{-1}$ felületi feszültség-csökkenést okozott a melegítés a kezeletlen mintához képest. A legalacsonyabb koncentrációban (0,001 mg $cm^{-3}$) az SFA8 kevésbé volt felületaktív, mint az A, B és a C frakciók. Magasabb koncentrációk (0,005 mg $cm^{-3}$-től) mellett azonban az SFA8 bizonyult a leginkább felületaktív fehérjének.

Összefoglalásul elmondható, hogy az összes vizsgált fehérje képes volt csökkenteni az olaj/víz határfelület feszültségét legalább közepes mértékben és legalább viszonylag magas koncentráció mellett (0,1 mg $cm^{-3}$).




**14.a ábra.** Határfelületi feszültség a koncentráció függvényében natív, azaz kezeletlen mintákon. Az értékek mellett feltüntetve láthatók a hibasávok. Piros színnel az LTP, kékkel az A frakció, zölddel a B frakció, feketével a C frakció, narancssárgával az SFA8 görbéjét tüntettük fel.



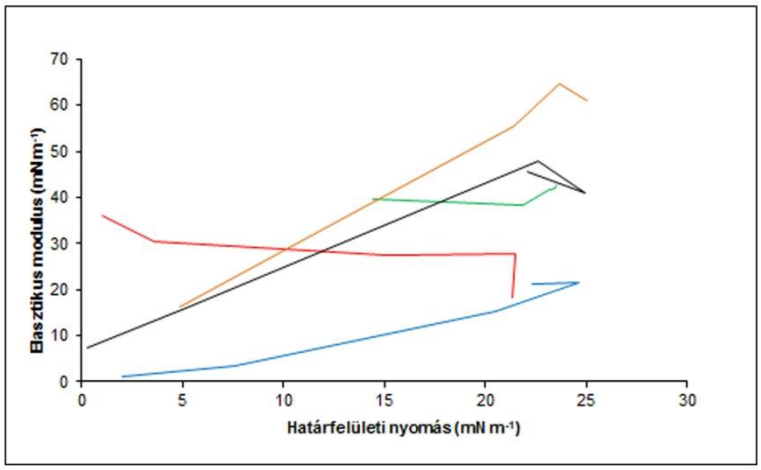

**14.b ábra.** Határfelületi feszültség a koncentráció függvényében melegített mintákon. Az értékek mellett feltüntetve láthatók a hibasávok. Piros színnel az LTP, kékkel az A frakció, zölddel a B frakció, feketével a C frakció, narancssárgával az SFA8 görbéjét tüntettük fel.

### 5.3.2. Határfelületi reológia

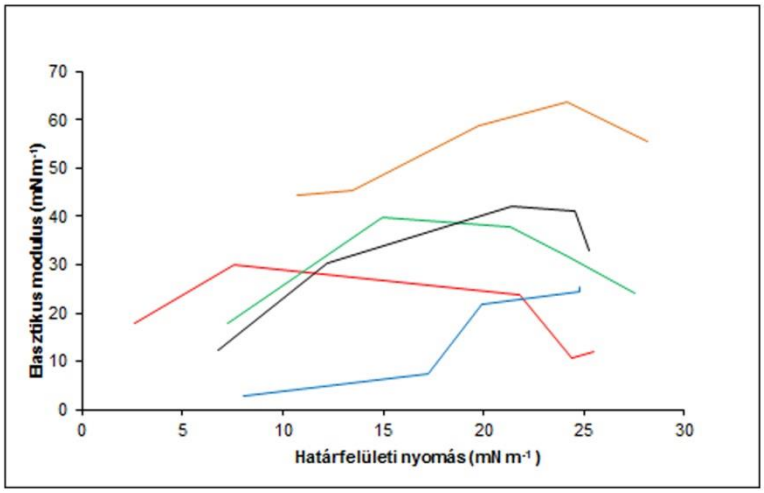
Annak érdekében, hogy meghatározhassuk a felületi feszültség és a felületi koncentráció különbségeit, amelyeket a minták különböző felületi aktivitása eredményez, az elasztikus modulust (ε) a felületi nyomás függvényben ábrázoltuk az egész oldatra vonatkozó koncentráció helyett. Összehasonlítva az öt fehérje határfelületi reológiai tulajdonságait (**15.a ábra**), elmondhatjuk, hogy az SFA8 képezte a leginkább elasztikus filmet és e fehérjénél növekedett az elasztikus modulus a határfelületi nyomás függvényében a legnagyobb mértékben. Az A és a C frakciók hasonlóan viselkedtek, azzal a különbséggel, hogy alacsonyabb elasztikus modulussal rendelkeznek. Az LTP és a B frakció esetén az elasztikus modulus nem változott a határfelületi nyomás növekedésével. A **15.b ábrán** látható, hogy melegítés hatására a görbék a **15.a ábra** görbéihez képest egészen más lefutásúak. Kísérletünkkel kimutattuk, hogy hőkezelés hatására megváltozik a fehérjék felületi nyomás függvényében mért felületi elaszticitása (**15.a** és **15.b ábrák**).

Az SFA8 görbéje alig változott melegítés hatására, kivéve az alacsony határfelületi nyomás mellett számított elasztikus modulus értékeket. Az SFA8 fehérje kivételével a fehérjék a maximális elaszticitást (legmagasabb elasztikus modulus értéket) 20 mN $m^{-1}$ felületi nyomás körül mutatták. Az elasztikus modulus addig növekedett, amíg a határfelületi nyomás elérte az adott fehérjére jellemző értéket, amely után az elasztikus modulus csökkenni kezdett. Az LTP volt az a fehérje, amely a legalacsonyabb elaszticitást mutatta még magas felületi nyomásértékek mellett is.

A három kevert frakció esetén a melegítés után mért határfelületi reológiai adatok (**15.b ábra**) a felületi elaszticitás változását tükrözik, annak ellenére, hogy nem volt CD-spektroszkópiával mérhető változás a másodlagos fehérjeszerkezetben (**4. táblázat**), viszont a reológia képes még a CD-spektroszkópiával sem kimutatható szerkezeti változások bizonyítására. A leginkább felületaktív frakció, a B frakció esetén mértük a legnagyobb változást, amely magyarázható lehet azzal, hogy a B frakció felületaktív összetevője nem a legnagyobb mennyiségben jelenlévő komponense a kevert frakciónak.




**15.a ábra**. Az elasztikus modulus (ε) értéke az olaj/víz határfelületi nyomás függvényében natív fehérjék esetén. Piros színnel az LTP, kékkel az A frakció, zölddel a B frakció, feketével a C frakció, narancssárgával az SFA8 görbéjét tüntettük fel.




**15.b ábra**. Az elasztikus modulus (ε) értéke az olaj/víz határfelületi nyomás függvényében hőkezelt fehérjék esetén. Piros színnel az LTP, kékkel az A frakció, zölddel a B frakció, feketével a C frakció, narancssárgával az SFA8 görbéjét tüntettük fel.

### 5.3.3. Emulzióképzés

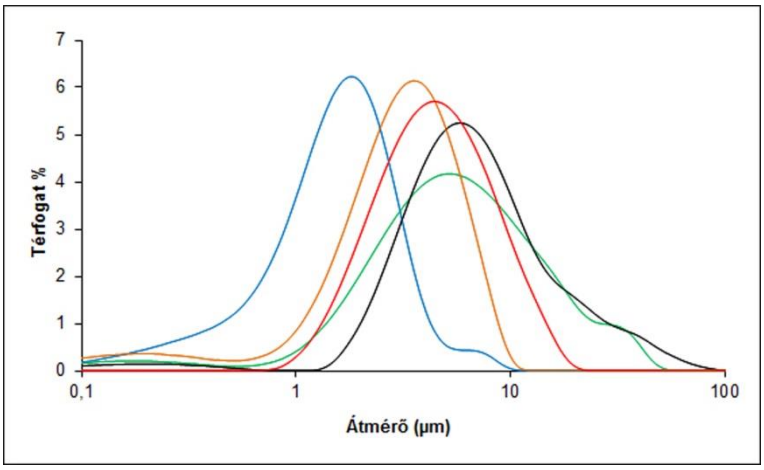
Napraforgó magból izolált és tisztított öt fehérje frakció emulgeáló tulajdonságait vizsgáltuk a fehérjék vizes oldata és n-hexadekán szonikálásával előállított emulziók cseppmérteinek és stabilitásának meghatározásával.

Az LTP által képezett emulzió 2 napig is megőrizte stabilitását (nem vált szét krémre és szubfázisra), ám cseppmérete viszonylag nagy volt (3,84 μm) (**16. ábra** és **5. táblázat**), ami nem utal jó emulgeáló képességre.

A három kevert fehérje frakció (A, B és C) nem képzett stabil emulziókat. Az emulziók két fázisra váltak szét, jelentős szabad olajréteg halmozódott fel az emulziók felszínén. Ez a réteg az emulgeált cseppek összeolvadásával keletkezik (koaleszcencia, ld. Függelék). Néhány nagy olajcsepp rögtön az emulgeálás után észlelhető volt, majd az emulzió felszínén különálló olajréteg jelent meg; jelezve, hogy a rendelkezésre álló olajmennyiségnek csak egy része emulgeálódott a homogenizálási folyamat során. Az A frakció nagy számban tartalmazott nagyon nagy cseppeket, amelyek túl gyorsan összeolvadtak ahhoz, hogy méretük mérhető legyen az LS-230 részecskeméretező készüléken. Mindemellett az A frakció emulgeáló képességének vizsgálatakor kaptunk igen kis méretű cseppeket (0,96 μm) (**5. táblázat**), mely értéket a nagyméretű – ezért mérésre alkalmatlan – cseppek és pelyhek emulzióból távozása után mértünk, azaz a cseppek méreteloszlása nem a valóságos átlagot tükrözi (**16. ábra**). Ezen a mintán a többihez viszonyítva nagyon rövid idő alatt megtörtént az olajréteg szeparációja. Ez esetben a részecskék eloszlása nem pontos mértéke a rendszer tulajdonságainak, mert az igen nagyméretű cseppek túl gyorsan koaguláltak ahhoz, hogy mérhetőek legyenek.

Az SFA8 ezzel szemben figyelemreméltóan kis átlagos átmérőjű cseppeket hozott létre az emulzióban (1,43 μm) (**5. táblázat**). Ezen felül az SFA8 emulziója legalább 2 napig stabil volt és a cseppek átmérőjében nem volt szignifikáns változás. Elmondható tehát, hogy az SFA8 fehérje kiváló emulgeáló tulajdonságokkal bír: kicsi cseppméretű emulziót képez, amely hosszú ideig stabil marad.

Összefoglalásként elmondható, hogy a három kevert frakció nem képes emulziók stabilizálására, az LTP mérsékelten jó emulgeátor, az SFA8 pedig kimagaslóan jó emulgeáló tulajdonságokkal bír.




**16. ábra.** Az emulziók cseppjeinek átlagos térfogat/felület középátmérője (más néven Sauter átmérő, $D_{3,2,}$ ld. Függelék): $D_{3,2}$. Piros színnel az LTP, kékkel az A frakció, zölddel a B frakció, feketével a C frakció, narancssárgával az SFA8 görbéjét tüntettük fel.

**5. táblázat**. Az emulziók cseppjeinek átlagos $D_{3,2}$ méretei. A standard hibák (SE) zárójelben találhatóak.

| **Fehérje** | **$D_{3,2}$ (µm)** |
|---|---|
| **LTP** | 3,84 (0,040) |
| **A frakció** | 0,96 (0,042) |
| **B frakció** | 2,19 (0,104) |
| **C frakció** | 3,24 (0,532) |
| **SFA8** | 1,43 (0,093) |

### 5.4. Az *in vitro* gasztro-intesztinális emésztés

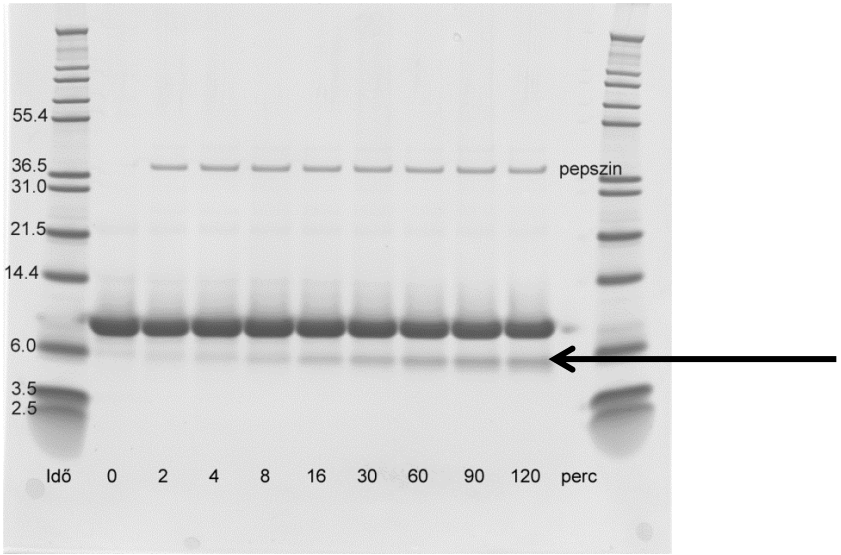
A fehérje-lipid kölcsönhatás proteáz-rezisztenicára gyakorolt hatásának vizsgálatához a tisztított napraforgó fehérjéket FK (foszfatidil-kolin liposzómák) jelenlétében és hiányában is emésztettük a gasztrointesztinális emésztési modellben. Az emésztési elegyből különböző időpontokban vett minták fehérje összetételét SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk.

#### 5.4.1. Az LTP emésztése

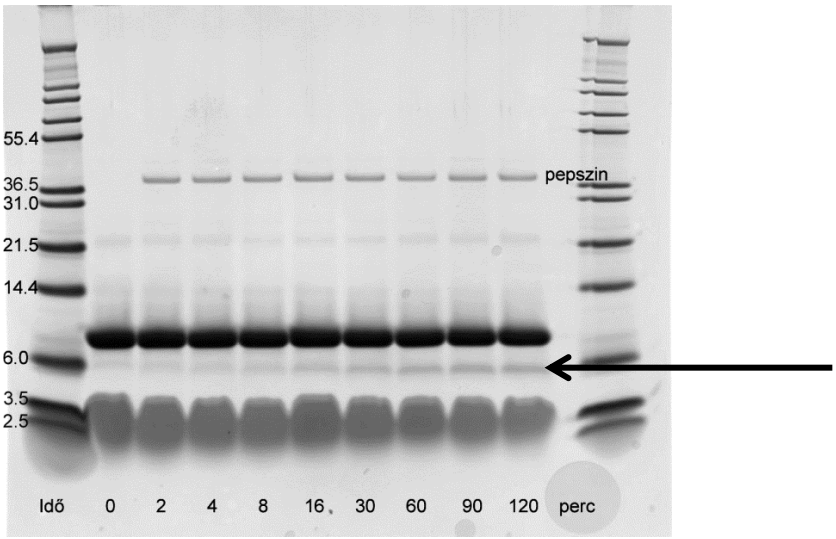
##### 5.4.1.1. Gasztrális fázis (1. fázis)

A gyomor környezetét imitáló modellben a gyomorban jelenlévő emésztőenzimmel, a pepszinnel emésztettük az LTP fehérjét 2 órán keresztül, vizsgálva a FK hatását az emésztés lefolyására.

FK jelenlétében az LTP fehérje 8,4 kDa molekulatömegű sávja alig vesztett intenzitásából a 2 órás gasztrális emésztés végére (**17.b ábra**). Egy második, 5,5 kDa tömegű sáv megjelent viszonylag hamar, már az emésztés 2. percében. Ennek intenzitása folyamatosan nőtt a 2 órás emésztési idő alatt. FK hiányában ez az 5,5 kDa molekulatömegű sáv sokkal kisebb intenzitású volt (**17.a ábra**), amely arra utal, hogy az LTP fehérje pepszin-rezisztencája a FK hatására fokozódott.




**17.a ábra**. Az LTP fehérje gasztrális emésztése FK hiányában, SDS-PAGE gélen. A nyíl az 5,5 kDa méretű fragmentre mutat.

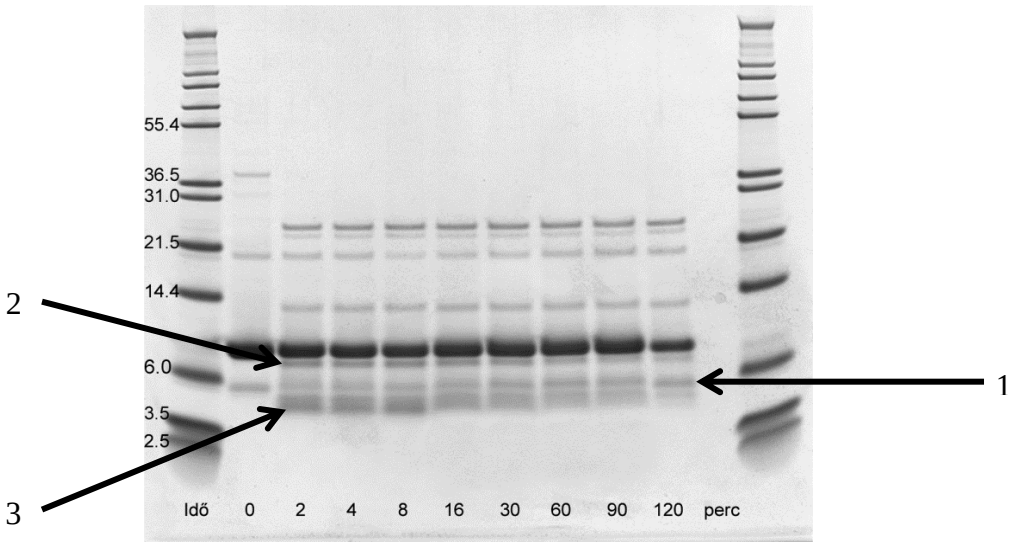



**17.b ábra**. Az LTP fehérje gasztrális emésztése FK jelenlétében, SDS-PAGE gélen. A nyíl az 5,5 kDa méretű fragmentre mutat.

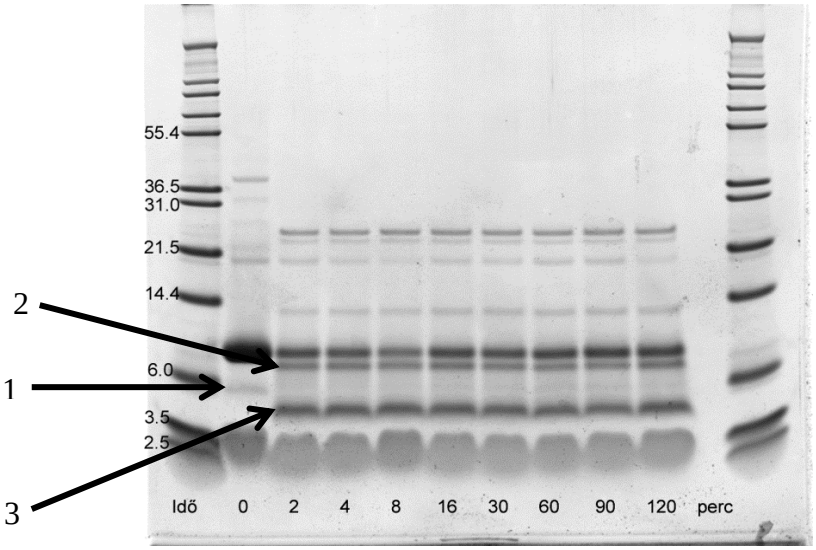
#### 5.4.1.2. Intesztinális fázis (2. fázis)

A 2 órás gasztrális emésztés után az emésztési elegy pH-ját 6,5-re emeltük, majd tripszint és kimotripszint, valamint epesavak sóját adtuk az elegyhez, szimulálva ezzel a vékonybél környezetét. A minták egyik felét FK hiányában emésztettük (**17.c ábra**), másik feléhez FK-t adtunk (**17.d ábra**).

FK hiányában az LTP fehérje meglehetősen stabil volt, csak kismértékű denzitáscsökkenést figyelhetünk meg 120 perces emésztés után is. Az 5,5 kDa-os fragment is megmaradt a 2. fázis végéig. További, nagy denzitású sávok tűntek fel azonban az intesztinális fázis 2. perce után, melyek mérete 7 és 4,5 kDa volt. FK jelenlétében az LTP fő sávja (8,4 kDa) stabil volt. Az 5,5 kDa-os sáv gyorsan lebomlott (kevesebb, mint 2 perc alatt). A FK hiányában megjelenő két sáv (7 és 4,5 kDa méretűek) FK jelenlétében is feltűntek, azonban nagyobb denzitásúak és később nem emésztődtek, ahogyan az FK hiányában megfigyelhető volt. Tehát az LTP fehérje és legalább két kisebb polipeptid FK jelenlétében jobban ellenállt a 2. fázis emésztőenzimeinek, mint FK hiányában.

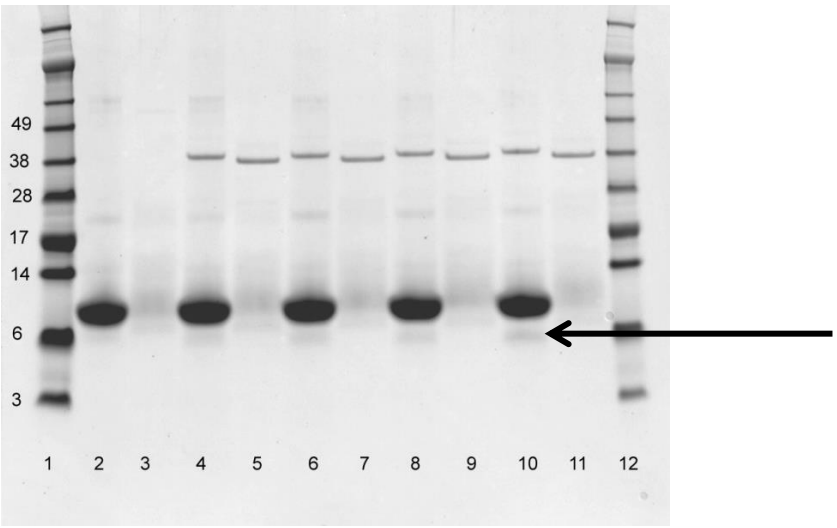



**17.c ábra**. Az LTP fehérje intesztinális emésztése FK hiányában, SDS-PAGE gélen. A nyilak a következő méretű fragmentekre mutatnak: 1: 5,5 kDa, 2: 7 kDa, 3: 4,5 kDa.




**17.d ábra**. Az LTP fehérje intesztinális emésztése FK jelenlétében, SDS-PAGE gélen. A nyilak a következő méretű fragmentekre mutatnak: 1: 5,5 kDa, 2: 7 kDa, 3: 4,5 kDa.

Az LTP fehérje 8,4 kDa-os fő sávja és az 5,5 kDa-os fragment egyaránt megjelenik SDS-PAGE-en redukált körülmények között (DTT kezelés mellett), míg nem redukált körülmények között az 5,5 kDa-os fragmentből csak egy széles, elmosódott folt látható (**17.e ábra**). Ezekből arra következtethetünk, hogy a fő és a kisebb fragment még az emésztés végén is diszulfid-híddal kapcsolódik egymáshoz.



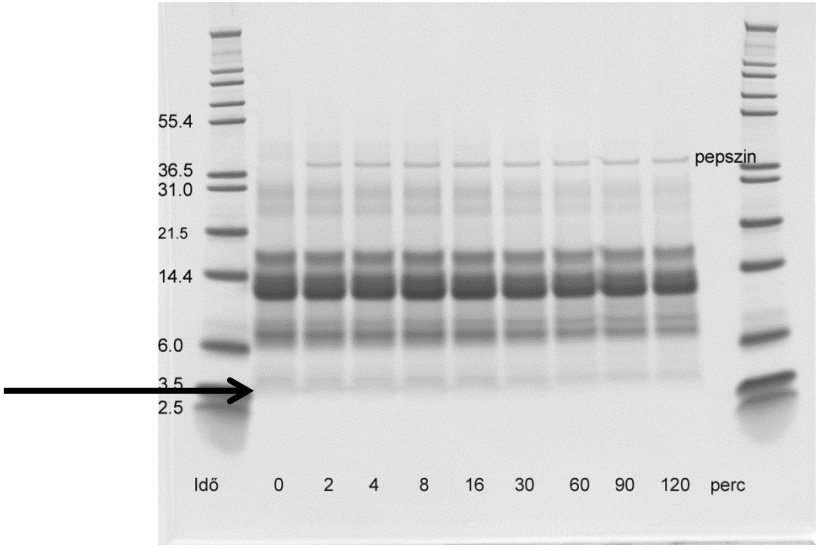

**17.e ábra**. Az LTP fehérje gasztrális emésztése FK hiányában; SDS-PAGE gélen, redukált (R) és nem redukált (N) körülmények között. A sávok sorrendben 1: Molekulasúly marker, 2: 0 perces, kiindulási minta (R), 3: 0 perces, kiindulási minta (N), 4: 2 perc (R), 5: 2 perc (N), 6: 4 perc (R), 7: 4 perc (N), 8: 8 perc (R), 9: 8 perc (N), 10: 16 perc (R), 11: 16 perc (N), 12: Molekulasúly marker. A nyíl az 5,5 kDa méretű fragmentre mutat.

### 5.4.2. A napraforgó 2S albuminok három kevert frakciójának emésztése

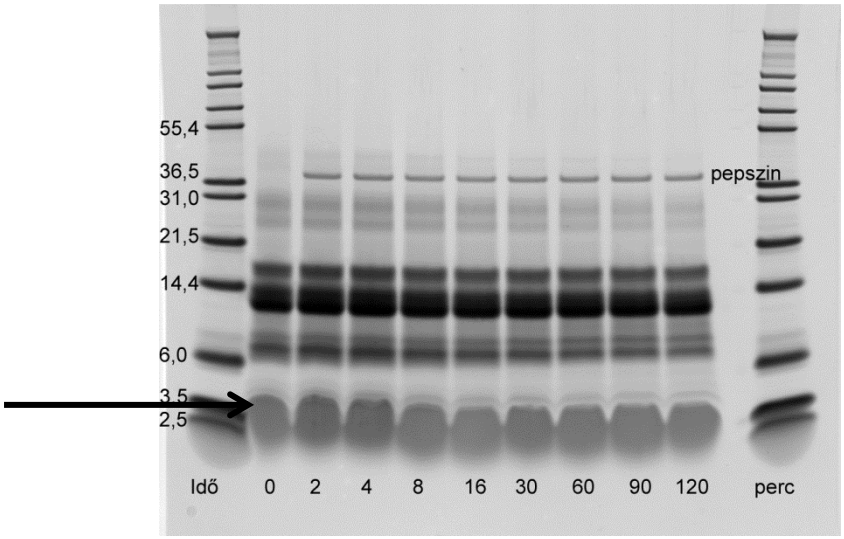
#### 5.4.2.1. Az A frakció emésztése

##### 5.4.2.1.1. Gasztrális fázis (1. fázis)

Az A frakció fehérjéit lebontotta a pepszin, amint az a **18.a ábrán** látható. Mindegyik sáv intenzitása csökkent az emésztés előrehaladtával. A legkisebb mérhető sáv (3,4 kDa) eltűnt az emésztés 16. percére. FK jelenléte nem befolyásolta az emésztés mintázatát (**18.b ábra**).



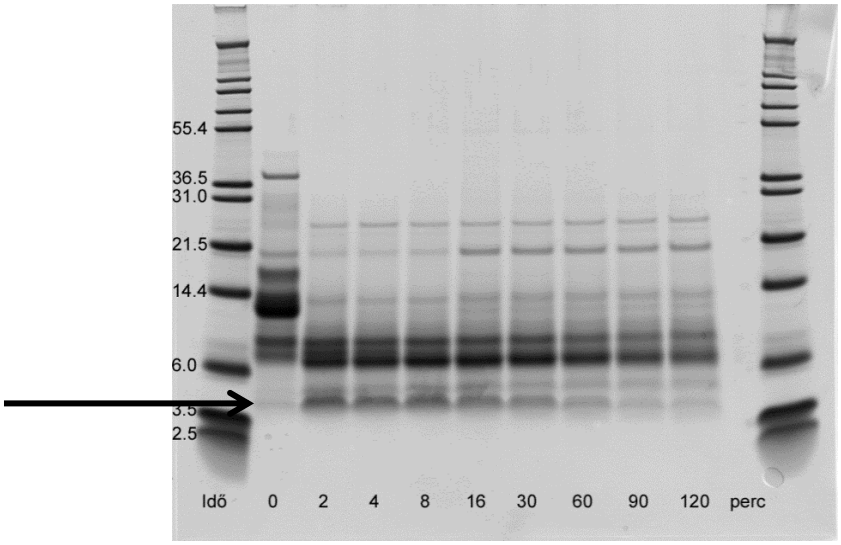

**18.a ábra**. Az A frakció gasztrális emésztése, FK hiányában; SDS-PAGE gélen. A nyíl a 3,4 kDa méretű fragmentre mutat.



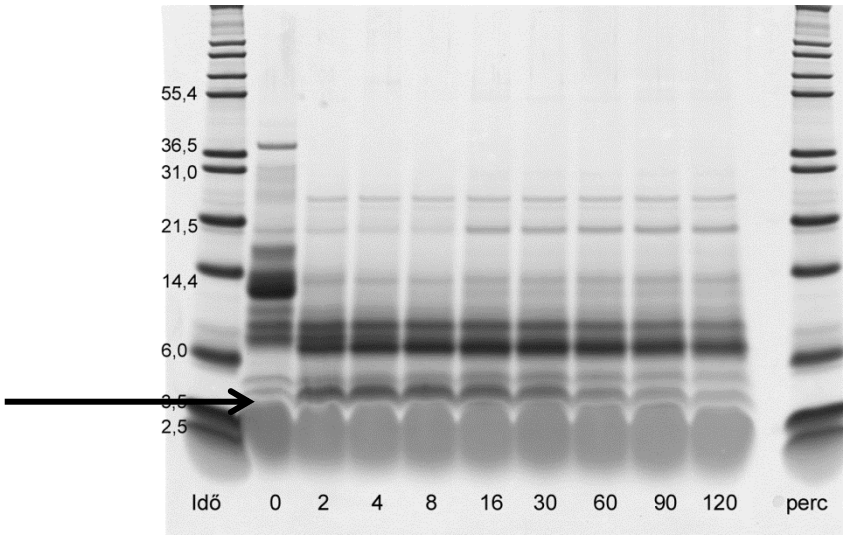

**18.b ábra**. Az A frakció gasztrális emésztése, FK jelenlétében; SDS-PAGE gélen. A nyíl a 3,4 kDa méretű fragment helyére mutat, amelyet a FK foltja elfed.

#### 5.4.2.1.2. Intesztinális fázis (2. fázis)

A frakció fő sávjai gyorsan, az intesztinális enzimek hozzáadása után kevesebb, mint 2 perc alatt lebomlottak (**18.c ábra**). A gasztrális fázis alatt végig látható 4,0 kDa molekulatömegű sáv intenzitása gyorsan növekedett az intesztinális enzimek hozzáadása után, majd fokozatosan lecsökkent az emésztés folyamán. FK hozzáadása e 4,0 kDa molekulatömegű és néhány másik sáv fokozott stabilitást eredményezte (**18.d ábra**).




**18.c ábra**. Az A frakció intesztinális emésztése, FK hiányában; SDS-PAGE gélen. A nyíl a 4,0 kDa méretű fragmentre mutat. A nyíl a 3,4 kDa méretű fragmentre mutat.

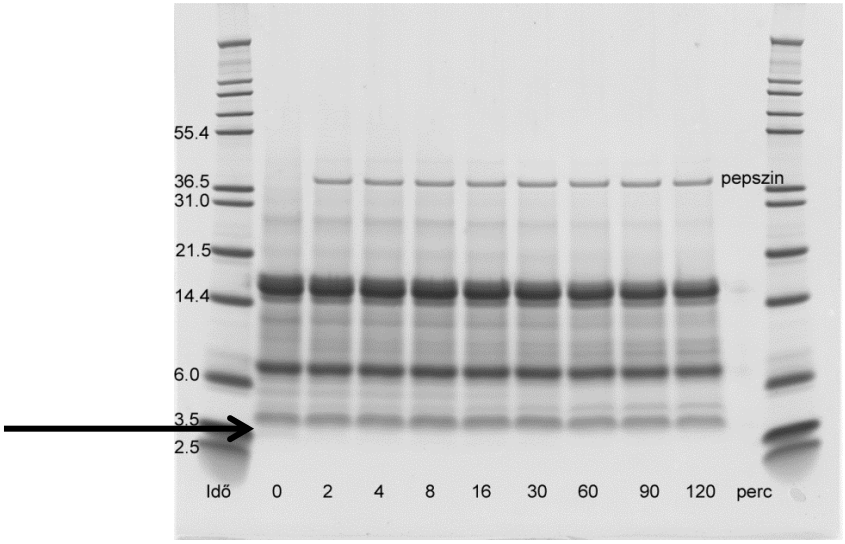



**18.d ábra**. Az A frakció intesztinális emésztése, FK jelenlétében; SDS-PAGE gélen. A nyíl a 4,0 kDa méretű fragment helyére mutat, amelyet a FK foltja elfed.

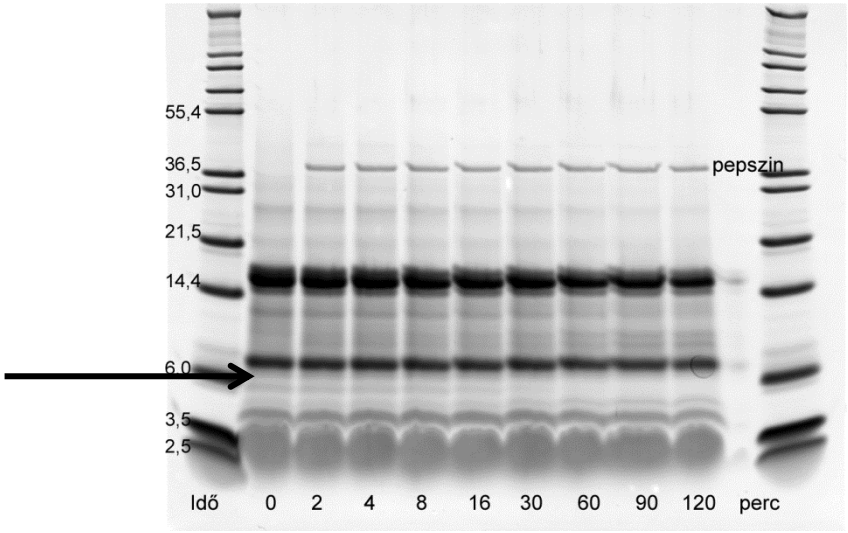
### 5.4.2.2. A B frakció emésztése

#### 5.4.2.1.1. Gasztrális fázis (1. fázis)

A B frakció fehérjéi alig változtak a gasztrális emésztés során. Csupán az a különbség észlelhető, hogy a halvány, 5,3 kDa méretű sáv eltűnt az emésztés 16. percére FK hiányában (**19.a ábra**), míg FK jelenléte mellett még a 30. percben is kimutatható (**19.b ábra**).



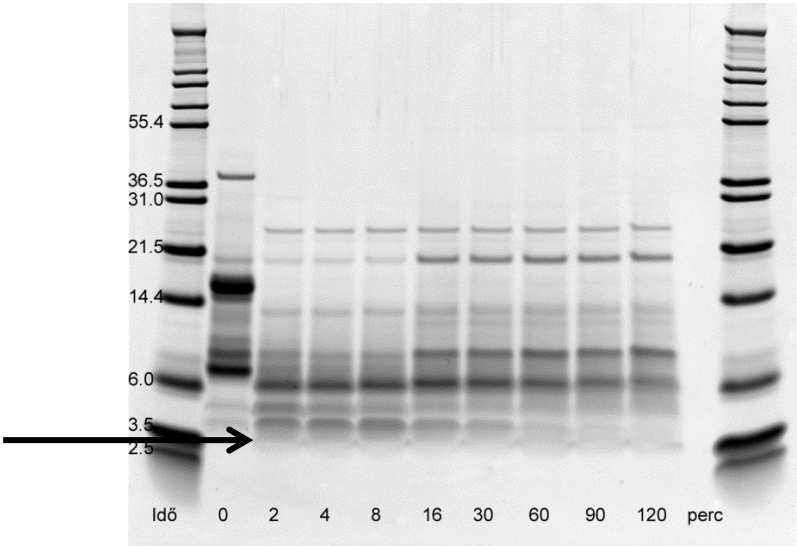

**19.a ábra**. A B frakció gasztrális emésztése, FK hiányában; SDS-PAGE gélen. A nyíl a 3,4 kDa méretű fragmentre mutat.



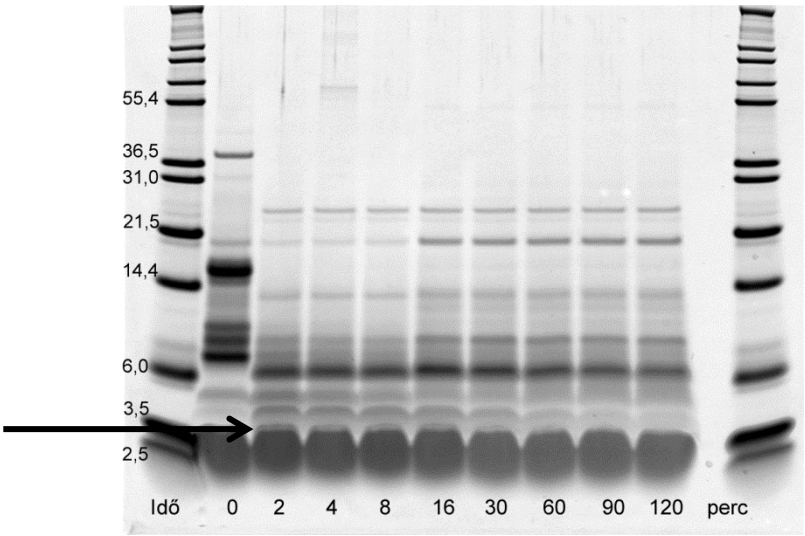

**19.b ábra**. A B frakció gasztrális emésztése, FK jelenlétében; SDS-PAGE gélen. A nyíl az 5,3 kDa méretű fragmentre mutat.

#### 5.4.2.1.2. Intesztinális fázis (2. fázis)

A **19.c ábrán** látható, hogy a sávokat adó fehérjéket nagyon gyorsan, 2 percen belül megemésztik az intesztinális enzimek, viszont a további emésztés sokkal lassabban folyt. A FK hozzáadása lelassította az emésztés folyamatát, az enzimek hozzáadása után 8 perccel még új sávok jelentek meg (**19.d ábra**). Egy további, 3,1 kDa méretű sáv jelent meg a FK-mentes emésztési elegyben, amely talán a FK-os elegyben is jelen lehetett, csak a FK okozta folt a gélen elfedhette a sávot. A FK mérsékelt védőszerepet töltött be az emésztés során, főként a kisebb méretű polipeptidek proteáz-rezisztenciáját idézte elő.




**19.c ábra**. A B frakció intesztinális emésztése, FK hiányában; SDS-PAGE gélen. A nyíl az 3,1 kDa méretű fragmentre mutat.

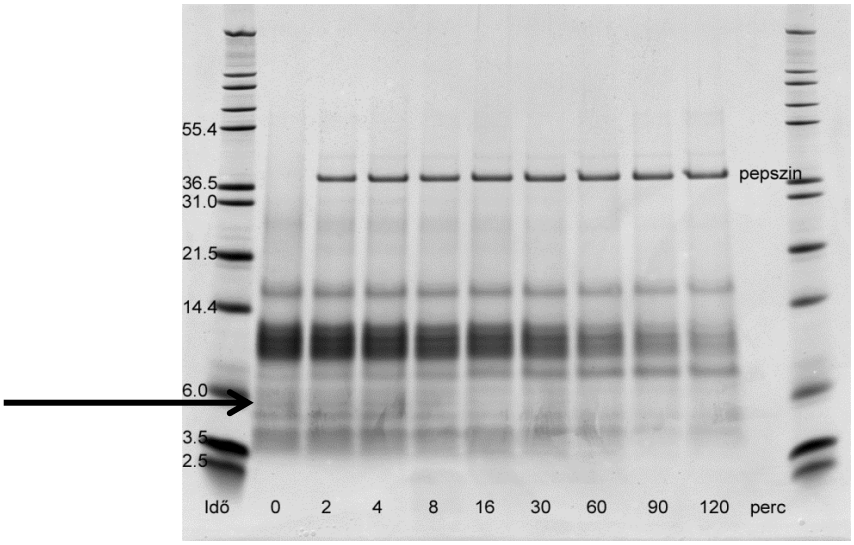



**19.c ábra**. A B frakció intesztinális emésztése, FK jelenlétében; SDS-PAGE gélen A nyíl a 3,1 kDa méretű fragment helyére mutat, amelyet a FK foltja elfed.

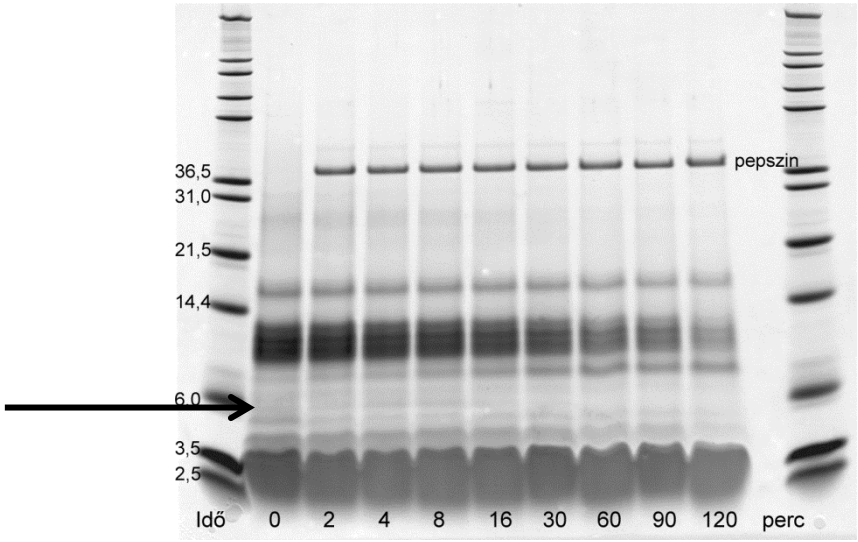
#### 5.4.2.3. A C frakció emésztése

##### 5.4.2.1.1. Gasztrális fázis (1. fázis)

A C frakció fehérjéi FK jelenlétében egyértelműen nagyobb rezisztenciát mutattak a pepszinolízissel szemben. Az 5,7 kDa molekulatömegű fragment csak a 8. percig volt kimutatható FK nélkül (**20.a ábra**), FK jelenlétében azonban még a 30. percben is jelen volt az emésztési elegyben (**20.b ábra**).



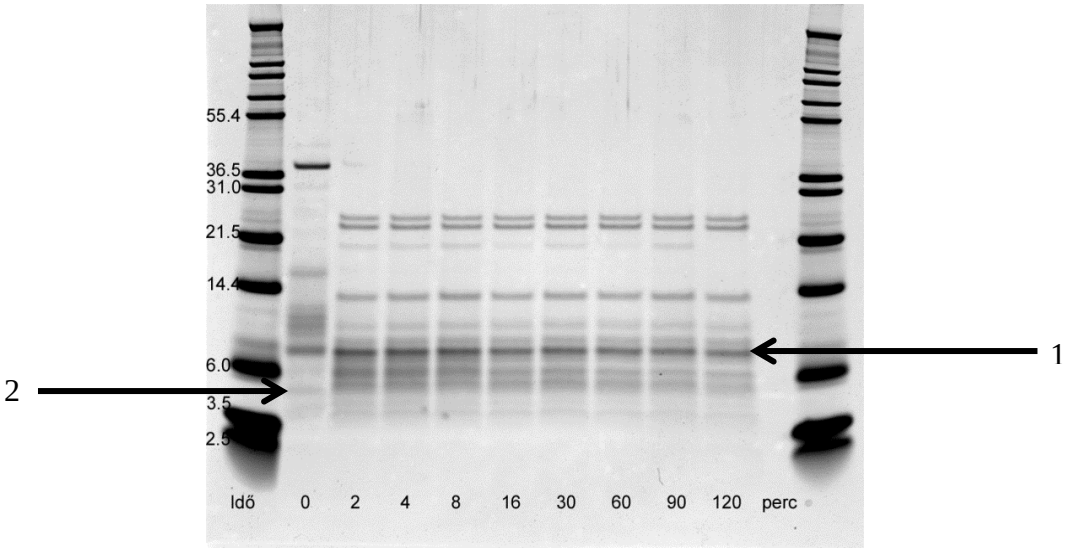

**20.a ábra**. A C frakció gasztrális emésztése, FK hiányában; SDS-PAGE gélen. A nyíl az 5,7 kDa méretű fragmentre mutat.



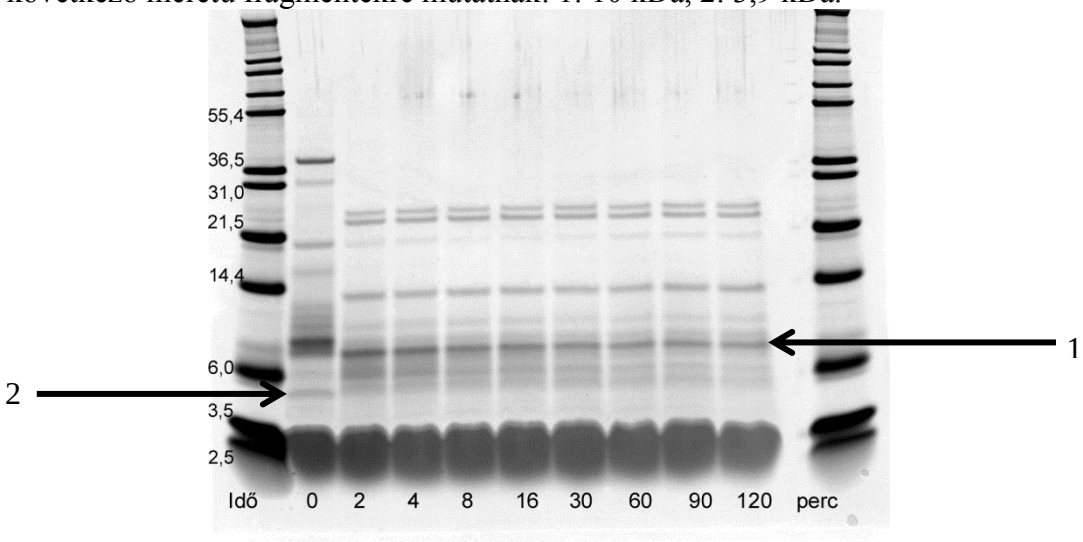

**20.b ábra**. A C frakció gasztrális emésztése, FK jelenlétében; SDS-PAGE gélen. A nyíl az 5,7 kDa méretű fragmentre mutat.

#### 5.4.2.1.2. Intesztinális fázis (2. fázis)

A gasztrális fázis végére maradt fehérjék és polipeptidek hamar, 2 perc elteltével már degradálódtak az intesztinális emésztőenzimek hatására (**20.c ábra**). Később már csak a 10,0 kDa molekulatömegű sáv intenzitásában állt be változás, új sávok nem jelentek meg. A FK jelenléte nem okozott észrevehető változást a rezisztenciában (**20.d ábra**), kivéve egy kicsi, 3,9 kDa molekulatömegű fragmentet, amely csak a FK-mentes emésztés 2. percéig volt jelen az emésztési elegyben. Azonban, ahogy a B frakció esetén is, nem zárható ki, hogy a kisméretű polipeptid jelen volt a FK-os elegyben is, de a FK okozta folt az SDS-PAGE-en elfedte annak jelenlétét.




**20.c ábra**. A C frakció intesztinális emésztése, FK hiányában; SDS-PAGE gélen. A nyilak a következő méretű fragmentekre mutatnak: 1: 10 kDa, 2: 3,9 kDa.




**20.d ábra**. A C frakció intesztinális emésztése, FK jelenlétében; SDS-PAGE gélen. A nyilak a következő méretű fragmentekre mutatnak: 1: 10 kDa, 2: 3,9 kDa méretű fragment helyére mutat.

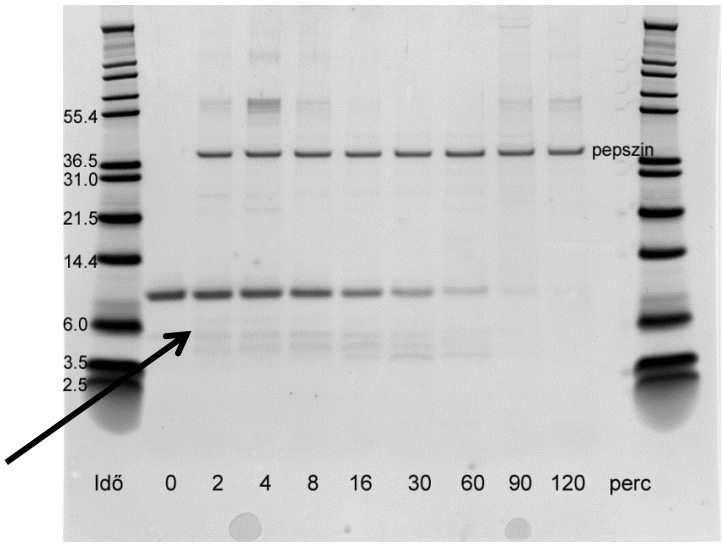
### 5.4.3. Az SFA8 fehérje emésztése

#### 5.4.3.1. A natív SFA8 fehérje emésztése

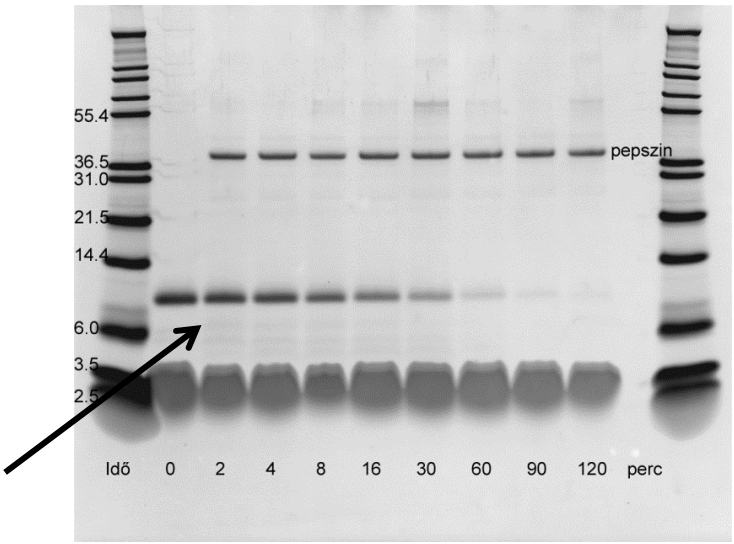
##### 5.4.3.1.1. Gasztrális fázis

A natív SFA8 fehérjét 90 perc alatt megemésztette a pepszin, ez idő után nem volt detektálható fehérje az SDS-PAGE-en (**21.a ábra**). Egy halvány, 5,0 kDa méretű sáv hamar, már 2 perccel a pepszin SGF-hez adása után megjelent. Ezt a sávot csak redukált körülmények között lehet detektálni a gélen, ami arra utal, hogy diszulfid-híddal kapcsolódhat más polipeptidekhez. Mivel az összes fehérjét megemésztette a pepszin 90 perc alatt, az intesztinális fázis kivitelezése értelmét vesztette.

FK jelenlétében a kisebb fragmentek hosszabb ideig megfigyelhetők a gélen (**21.b ábra**), tehát a FK gyenge védőhatást gyakorolt az SFA8 fehérjére.




**21.a ábra**. A natív SFA8 fehérje gasztrális emésztése, FK hiányában; SDS-PAGE gélen. A nyíl az 5,0 kDa méretű fragmentre mutat.



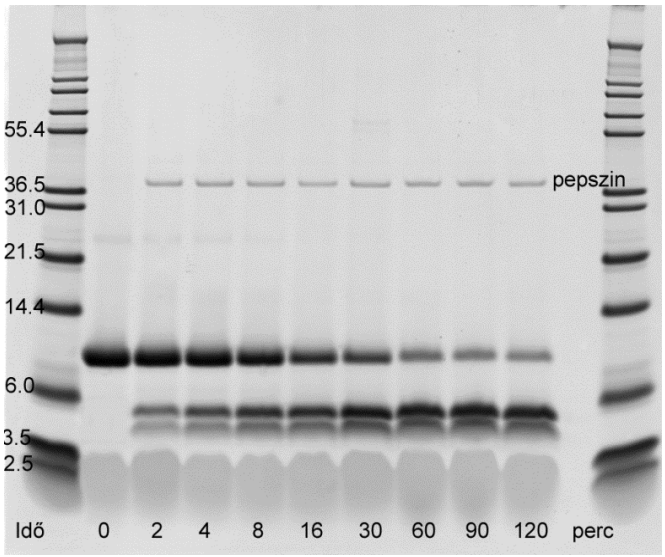

**21.b ábra**. A natív SFA8 fehérje gasztrális emésztése, FK jelenlétében; SDS-PAGE gélen. A nyíl az 5,0 kDa méretű fragmentre mutat.

### 5.4.3.2. Az emulgeált SFA8 fehérje emésztése

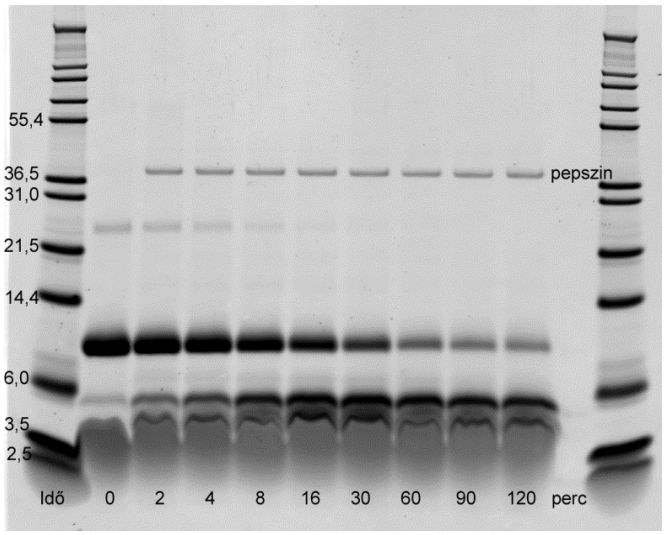
A vizsgált fehérjék közül egyedül az SFA8 rendelkezik jó emulgeáló tulajdonságokkal, ezért e fehérjén tanulmányoztuk az emulzifikáció emészthetőségre gyakorolt hatását.

#### 5.4.3.2.1. Gasztrális fázis

A natív és az emulgeált SFA8 fehérje összehasonlításakor szembetűnő, hogy amíg a natív fehérje 90 perc alatt teljesen degradálódott (**21.a ábra**), az emulgeált fehérje csak részlegesen bomlott le és a 2 órás emésztés végéig viszonylag stabil maradt (**22.c ábra**). FK jelenléte az emulgeált SFA8 fehérjére is gyakorolt védőhatást, csakúgy, mint a natív fehérjére (**21.b ábra**): a kisebb fragmentek tovább megmaradtak az emésztés során (**22.d ábra**).




**22.c ábra**. Az emulgeált SFA8 fehérje gasztrális emésztése, FK hiányában; SDS-PAGE gélen. (A gél alján látható foltok nem a FK jelenlétéből, hanem az emulzióképzéshez használt hexadekánból származnak.)



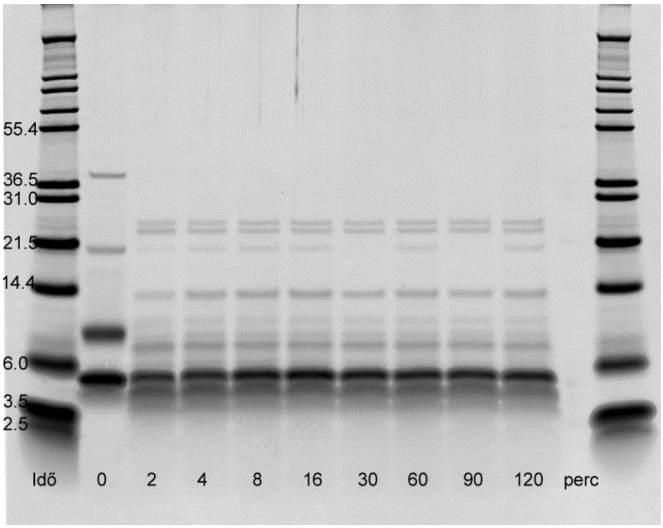

**22.d ábra**. Az emulgeált SFA8 fehérje gasztrális emésztése, FK jelenlétében; SDS-PAGE gélen.

#### 5.4.3.2.2. Intesztinális fázis

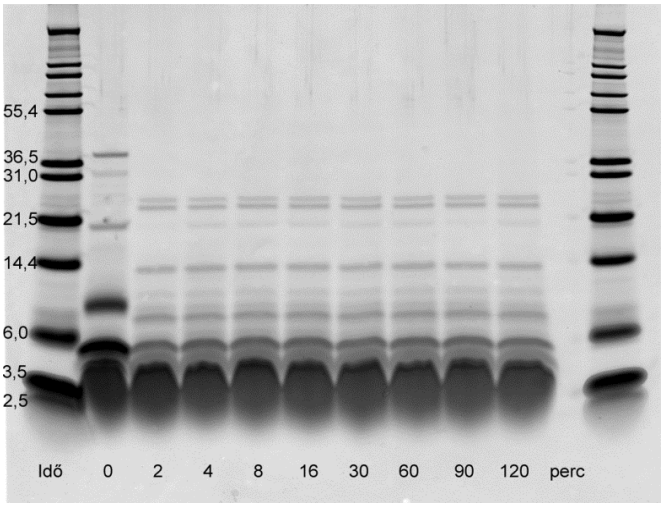
Az intesztinális enzimek hozzáadása nagymértékben átrendezte az emésztés mintázatát az első két percben, ezután azonban már kevés változás történt. Kivételt képez egy 4,8 kDa méretű sáv, amely FK hiányában megjelent a 120 perces mintában (**22.e ábra**).

Az emulgeált SFA8 stabilabb volt FK jelenlétében. Egy 3,8 kDa méretű sáv csak FK hiányában és csak natív SFA8 esetén volt észlelhető (**22.f ábra**).

Összefoglalva, az SFA8 fehérje lassabban emésztődött, tehát ellenállóbb volt a proteázokkal szemben natív állapotban, mint emulgeált formában. Ezt a védőhatást fokozta a FK jelenléte.




**22.e ábra**. Az emulgeált SFA8 fehérje intesztinális emésztése, FK hiányában; SDS-PAGE gélen.




**22.f ábra**. Az emulgeált SFA8 fehérje intesztinális emésztése, FK jelenlétében; SDS-PAGE gélen.

Az eredményeket összefoglalva elmondható, hogy mind az öt fehérjefrakció fehérjéit lebontották a gyomor és a vékonybél emésztőenzimei egyaránt. Az LTP erősen ellenállt mind a gasztrális, mind az intesztinális enzimek hasításának, a három kevert frakció mérsékelten rezisztens volt, az SFA8 fehérjét natív állapotban pedig 90 perc alatt teljesen lebontotta a pepszin. A FK jelenléte fokozta mind az öt frakció proteáz rezisztenciáját. Az SFA8 emulgeált formában sokkal magasabb rezisztenciát mutatott, mint natívan. A legerősebb rezisztenciát akkor tapasztaltuk, amikor az emulgeált SFA8-hoz FK-t adtunk.

# 6. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A fehérjék szerkezeti stabilitása és allergenicitása között szoros összefüggés áll fenn, ám a stabil szerkezet sem nem kizárólagos, sem nem elegendő feltétele az allergenicitásnak.

Az élelmiszerek, köztük a napraforgó feldolgozásának elengedhetetlen lépése a melegítés, akár főzés, akár sütés vagy pörkölés formájában. Ezért vizsgáltuk a kutatás alanyául szolgáló öt napraforgó-fehérje szerkezetében a hőkezelésre bekövetkező változásokat.

A határfelületi reológia pontos mutatója a molekulaszerkezetben bekövetkező apró változásoknak is. Kihasználva ezt az előnyét, vizsgáltuk az öt napraforgó fehérje frakció felületi feszültségének és a reológiai értékekeinek változását melegítés hatására. Ezek mellett követtük a másodlagos szerkezet átalakulását távoli UV-CD spektroszkópiával, amint a mintákat 20°C-ról 80°C-ra melegítettük, majd visszahűtöttük 20°C-ra. A hőmérsékleti profil változásával jól követhető az egyes fehérjék térszerkezetének módosulása.

Vizsgáltuk a fehérjék olajjal alkotott emulzióit is, hiszen számos étel emulzió formájában tartalmazza a fehérjéket, emellett sok fehérjét kifejezetten emulziók stabilizálására használ az élelmiszeripar.

Az ételallergia kialakulásának feltétele, hogy a kérdéses fehérje eljusson a vékonybélen keresztül a véráramba megfelelően intakt formában vagy elég nagy fragmentként, ellenállva az ételkészítés során alkalmazott hőkezelésnek, majd az emésztőrendszer felületaktív anyagai (pl. foszfolipidek, epesók) és proteázai támadásának. Ahhoz, hogy a fehérje bejusson a véráramba és ott szenzitizálni tudja a nyálkahártyához asszociált immunrendszert, át kell jutnia a bélnyálkahártyán. Ehhez szükséges, hogy kapcsolódni tudjon a bélnyálkahártya-sejtek membránjainak lipidjeihez, tehát e szempontból előnyös, ha rendelkezik hidrofób felülettel.

*In vitro* modellezett gasztro-intesztinális modellben imitáltuk a gyomor-bél–rendszer körülményeit, pl. a kémhatást, az emésztőenzimeket, ionokat, epesókatm perisztaltikát. Vizsgáltuk, hogy milyen hatással van a fehérjék emészthetőségére a lipidekkel kialakított kölcsönhatás.

Az emulziók vizsgálatakor egyedül az SFA8-at találtuk jó emulgeátornak, ezért e fehérjét emulgeált formában is emésztettük az *in vitro* modellben.

### 6.1. Molekulaszerkezeti vizsgálatok

Távoli UV-CD spektrofotometriával bizonyítottuk, hogy az összes, e munka során vizsgált fehérje szerkezetében jelentős arányban volt α-hélix, amely összecseng a prolamin szupercsaládra jellemző magas α-hélix-aránnyal (Shewry és mtsai., 1995). Az A frakció (amely nagyrészben Alb2 fehérjét tartalmazott) másodlagos szerkezete 45%-ban α-hélixet tartalmazott, amely hasonlít a brazil dió alacsony kéntartalmú 2S albuminjára (Moreno és mtsai., 2004). A B és a C frakciók másodlagos szerkezetében azonban csupán 27% α-hélixet találtunk, amely inkább a brazil dió és a szezám magas metionin-tartalmú 2S albuminjaira hasonlít (Moreno és mtsai., 2004; Moreno és mtsai., 2005). Az SFA8 másodlagos térszerketében az α-hélix arányát 35%-nak találtuk, amely megegyezik korábbi mérések eredményeivel (Pandya és mtsai., 1999). Mind az Alb1 és az Alb2 fehérjét tartalmazó frakciókat, valamint az SFA8-at hőkezeléssel szemben rezisztensnek találtuk: csupán csekély változások álltak be konfirmációjukban a hőkezelés hatására. Ezek az eredmények egybevágnak az SFA8 (Pandya és mtsai., 1999) és a napin (Pandya és mtsai., 1999) korábbi hőstabilitás-vizsgálatainak eredményeivel. A napin egy repcéből (*Brassica napus*) izolált 2S albumin, amely az SFA8-cal közeli rokonságban áll, így a 3D szerkezete is nagyon hasonlít az SFA8 fehérjéére (Pantoja-Uceda és mtsai., 2002).

Az LTP szintén stabil volt hőkezelés mellett is, viszont amikor 20°C-ra visszahűtöttük, akkor szerkezetében változások álltak be. Ez arra utal, hogy az LTP térbeli konformációja megváltozott a hőkezelés hatására, annak ellenére, hogy a natív állapothoz hasonló α-hélix és β-redő szerkezet nagyobb része valószínűleg megmaradt. A bekövetkező változások mértéke függ a hőhatás időtartamától és mértékétől egyaránt. Ezt támasztja alá Sancho és munkatársainak (2005) kísérlete is, melyben almából (*Malus domestica*) LTP fehérjét melegítettek *in situ* (a jelen tanulmányban alkalmazott módszerrel és műszerrel) és azt tapasztalták, hogy az LTP fehérje kis mértékben kihajtogatódik magasabb hőmérsékleten, hűtéskor azonban visszanyeri eredeti konformációját. Árpából származó LTP1 esetében sem találtak fontosabb szerkezeti változásokat a 20 és 90°C közötti hőmérséklet-tartományban (Lindorff-Larsen és Winther, 2001). Hosszantartó (>1 óra) hőkezelés viszont megváltoztatta a fehérje konformációját (Sancho és mtsai., 2005; Perrocheau és mtsai., 2006). Ezzel szemben az őszibarackból izolált LTP elvesztette stabilitását 95°C-os hőkezelés hatására pH 3-as közegben.

A napraforgóból izolált LTP tulajdonságai az igen stabil búza és alma LTP és a labilisabb szőlő LTP közötti átmenetet képezik. A hőkezelés ciklusa egy másik tényező, amelyet szintén figyelembe kell vennünk, amikor látszólag különböző hőstabilitású LTP fehérjéket hasonlítunk össze. A jelen munkában alkalmazott, viszonylag hosszú hűtési ciklus nagyobb változásokat okoz a másodlagos szerkezetben, amint azt az UV-CD kísérletek eredményei mutatják. Ezek az eredmények konzisztensek a prolamin fehérjeszupercsalád számos más tagján végzett megfigyelésekkel, ahol az intermolekuláris diszulfid-hidak jelenlétének tulajdonították a fehérjék magas stabilitását (Monsalve és mtsai., 2004; Sancho és mtsai., 2005; Lindorff-Larsen és Winther, 2001).

Differenciális pásztázó kalorimetriás vizsgálatok során bizonyítottuk, hogy még 120°C-ra történő melegítés hatására sem denaturálódik sem az LTP, sem az SFA8 fehérje. Párhuzamosan a ribonukleáz A fehérjét is vizsgáltuk, amelynek ismert a tranzíciós hőmérséklete (ld. Függelék) (Stelea és mtsai., 2001), hogy lehetővé váljon a különböző pufferek esetleges hatásainak összehasonlítása. Semmilyen változást nem detektáltunk sem az LTP, sem az SFA8 fehérje esetében, tehát denaturáció a vizsgált 10-120°C-os hőmérséklet-tartományban nem történt. Nem meglepő e nagymértékű stabilitás, hiszen az SFA8-éhoz nagyon hasonló szerkezetű, vele rokonságot mutató napinnak, a repce 2S albuminjának tranzíciós hőmérséklete is 100°C fölött van pH 6 kémhatás mellett (Barciszewski és mtsai., 2000).

### 6.2. Határfelületi vizsgálatok

Az e munka során alkalmazott hőkezeléseket gyakorta alkalmazzák fehérjék határfelületi és emulgeáló tulajdonságainak módosítása érdekében. Hasonló változások várhatóak az ételkészítési folyamatok során bekövetkező hőhatások következményeként. Ezért tanulmányoztuk a hőkezelés hatását a napraforgó tartalékfehérjék öt frakciójára. Bár számos faktor játszik szerepet egy fehérje határfelületi tulajdonságainak kialakításában, mégis e tulajdonságok nagymértékben függenek attól, képes-e a fehérje adszorbeálódni a fázisok között létrejövő határfelülethez és ennélfogva csökkenteni az ott kialakuló felületi feszültséget. Az adszorpcióra való képességet leginkább a felületi hidrofobicitás és molekuláris flexibilitás kombinációja határozza meg. Tehát egy olyan fehérje, amely nagyobb felületi hidrofobicitással rendelkezik, valószínű, hogy nagyobb felületaktivitást is mutat. Megjegyzendő azonban, hogy a felületaktivitásnak és az aggregációnak egyensúlyban kell

lennie. Aggregáció akkor következik be a fehérjék között, amikor a fehérjemolekulák felszíne túlságosan hidrofób. Ekkor hidrofób kölcsönhatás révén vonzzák egymást és aggregátumok alakulnak ki. A fázisközi nyomás és reológia igen érzékeny a fehérjemolekulák szerkezetében bekövetkező apró változásokra (Gao és mtsai., 2008), ezt tapasztaltuk mi is a vizsgálatok során.

Az LTP fehérjének volt a legrövidebb retenciós ideje az RP-HPLC elválasztás során, amely indikálja a vizsgált fehérjék közötti legalacsonyabb felületi hidrofobicitást, és ez a fehérje mutatta a legalacsonyabb felületaktivitási értékeket. Ugyancsak az LTP alkotta a legkevésbé elasztikus filmet és ennek eredményeképpen e fehérje mutatta a leggyengébb emulgeáló képességet. Az LTP fehérje másodlagos szerkezetében a melegítés-hűtés hatására csökkent az α-hélix aránya, míg a β-redő és a β-kanyar elemek aránya növekedett és a fehérje csupán részlegesen nyerte vissza eredeti, natív konformációját, amikor visszahűtöttük 20°C-ra. E másodlagos szerkezetbeli változásokat tükrözi az LTP megnövekedett felületi aktivitása, amelyet a fázishatári feszültségméresek eredményei és a fázishatáron létrejött film a natív fehérjénél mértnél is alacsonyabb elasztikus modulusa jeleznek. Luckett és mtsai. 2001-ben szintén bizonyították az LTP-ben az α-hélix arányának hőkezelés hatására bekövetkező csökkenését.

A fentiekkel egybecsengően az SFA8 – mint a kromatográfiás elválasztás során leghosszabb retenciós idővel jellemezhető fehérje – bizonyult a leginkább felületaktívnak a vizsgáltak közül. Az SFA8 képezte a legmagasabb elasztikus modulussal (ε) jellemezhető felületi filmet a vizsgált fehérjék közül, amely jelzi azt is, hogy ennek a fehérjének volt a legmagasabb a felületi denzitás értéke. Szintén az SFA8 emulgeálásával sikerült létrehozni a legstabilabb és egyben a legkisebb cseppméretű emulziókat. A hőkezelés hatására bekövetkező igen csekély szerkezeti változások – amelyeket távoli UV-CD spektrofotometriával egyértelműen bizonyítottunk – konzisztensek a kismértékű felületaktivitás-növekedéssel, valamint azzal, hogy a hőkezelt fehérje és a natív fehérje által alkotott fehérjefilmek elasztikus modulusai szinte megegyeznek.

Az A, B és C frakciók – melyek főként az Alb1 és Alb2 fehérjéket tartalmazzák más polipeptidek mellett – felületi aktivitása az LTP és az SFA8 fehérjék értékei között mozogtak. A hőkezelés csökkentette mindhárom frakció felületi aktivitását. A B frakció viselkedése eltért a többi frakcióétól. A B frakció elasztikus modulusának értéke állandó maradt, függetlenül a felületi feszültség értékétől, akárcsak az LTP esetében. Ebből arra következtethetünk, hogy a molekula rigiditása nem tette lehetővé intra- és intermolekuláris

kölcsönhatások kialakulását, még akkor sem, amikor a felületi koncentráció magas volt. Mindhárom frakció (A, B és C) esetén megnőtt az elasztikus modulus értéke, ahogy a fázisközi nyomás értéke emelkedett. Egy bizonyos küszöbérték fölött azonban az elasztikus modulus csökkent – ez az érték egyenlő a fázishatári koncentráció maximumával –, amely jelzi, hogy a fázishatáron kialakult film nem képes tovább elviselni az összenyomást, e koncentráció mellett már összeomlik.

### 6.3. Emulzióképzés

Az LTP a fentiek – és korábbi irodalmi adatok (Burnett[a] és mtsai., 2001) – alapján mérsékelten felületaktív fehérje, noha nem képes emulziót stabilizálni a koaleszcencia megelőzésével olyan mértékben, mint az SFA8. Ennek oka az SFA8 fehérjéhez képest gyenge viszkoelasztikus film képzésében rejlik. Míg az SFA8 adszorbeálódik a fázishatárhoz, az LTP kizáródik a fázishatárról, ahogyan azt Guéguen és mtsai. (1996) bizonyították. Tapasztalataikkal egybevágnak az itt bemutatott eredmények is. Az SFA8 fehérje felépítésében rendkívül magas arányban vesznek részt hidrofób aminosavak, sokkal nagyobb arányban, mint az LTP-ében, melynek következménye az erősebb elasztikus film kialakulása a határfelületen. Az SFA8 aminosavainak eloszlása és klaszterbe rendeződése magyarázatot ad a kiemelkedően magas felületaktivitásra, beleértve a kiváló emulgeáló képességet is (Pantoja-Uceda és mtsai., 2004). A hidrofób aminosavak az SFA8 molekula felszínén ugyanis négy hidrofób foltot eredményezve csoportosulnak, amelyek közül a legnagyobb, a negyedik tartalmazza a fehérje egyetlen triptofánját, a Trp76-ot (Pantoja-Uceda és mtsai., 2004). A Trp76 vizes közegben az olajfelülethez történő adszorpció miatt bekövetkező újratekeredés (refolding) során a fehérjemolekula felszínére kerül és az olajfázisba merül, elősegítve ezzel az SFA8 fehérje adszorpcióját az olajcsepphez és erősítve a kölcsönhatást a fázishatáron (Burnett[a] és mtsai., 2002). A Trp76 indolcsoportját hidrofób aminosavak veszik körül – beleértve négy metionint is –, koronát alkotva a Trp76 körül (Pantoja-Uceda és mtsai., 2004) (**5. ábra**).

A három vizsgált albumin frakció közül egyik sem volt képes emulzió stabilizálására. Mind az A, a B és a C frakció gyenge felületaktivitási értékeket mutatott és alacsony elasztikus modulussal jellemezhető filmet hozott létre a határfelületen. Meglepő azonban, hogy a frakciók (A, B és C) esetén gyengébb emulgeáló tulajdonságokat találtunk, mint az LTP esetén. Valószínűleg az állhat a jelenség hátterében, hogy a frakciók aggregációs szintje

enyhén megemelkedett az emulgeálás hatására a magas koncentráció mellett (2 mg $cm^{-3}$ az emulzióban). A frakciók felületaktivitása majdnem elérte az LTP értékeit a legmagasabb alkalmazott koncentráció mellett (0,1 mg $cm^{-3}$). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az LTP jó, az SFA8 pedig kiváló emulgeátor, míg a három frakció elegyei nem tartalmaznak elegendő felületaktív fehérjét ahhoz, hogy stabil emulziókat alkossanak azonos körülmények között. Korábban Burnett[a] és mtsai. (2002) azt találták, hogy az LTP nem képes emulziókat stabilizálni, az ún. „teljes 2S albumin frakció" (amely magába foglalja az albuminok mellett az LTP-t is) esetében viszont mérsékelt felületaktivitást tapasztaltak. A különbség Burnett[a] és mtsai. (2002) tanulmányának és a jelen munka eredményei között a különböző napraforgófajták eltérő SFA8-tartalmában kereshető. Az említett munkában Alphasol hibrid fajtából tisztították a teljes albumin frakciót, amely nagyobb arányban tartalmaz SFA8-at (Burnett[a] és mtsai., 2002), mint a PR A381 hibrid fajta, amelyből a jelen kísérletek során tisztítottuk az SFA8-at – az RP-HPLC kromatogrammok alapján összehasonlítva, **10. ábra** és Burnett[a] és mtsai. (2002) cikkében közölt kromatogrammal. Noha a napraforgó 2S albuminokat magas polimorfizmus jellemzi (Anisimova és mtsai., 2002), Guéguen és mtsai. (1996) bizonyították, hogy nincs eltérés a különböző fehérje-összetételű vonalak emulgeáló tulajdonságai között.

### 6.4. *In vitro* gasztrointesztinális emészthetőség

A proteolízissel szembeni rezisztencia jellemző számos ételallergén fehérjére, amelyek szisztemikus reakciót váltanak ki. Az allergenicitás elengedhetetlen feltétele, hogy az allergén fehérje elérje a bél nyálkahártyáját megfelelő szerkezeti épségben vagy elég nagy fragment formájában. Az ételallergéneknek tehát képesnek kell lenniük átvészelni a főzés során előálló magas hőmérsékletet, a gyomorban kialakuló igen alacsony kémhatást, a gyomor és a középbél proteázainak hidrolízisét, valamint a FK-hoz és az epesókhoz történő kötődést.

Kísérleteink során bizonyítottuk, hogy az emésztőenzimek lebontották a napraforgó LTP-t, a három 2S albumin frakciót és az SFA8-at, különböző mértékben. Az LTP esetében magas rezisztenciát tapasztaltunk mind a gasztrális, mind a intesztinális enzimekkel szemben, amelyet a FK hozzáadása tovább fokozott. A fő polipeptidláncot és az emésztett fragmenteket továbbra is diszulfid-kötések tartották össze. Ez egy igen stabil komplexet eredményezett, amelynek mérete az emésztetlen, natív fehérje méretéhez igen közel áll.

A különböző fajokból izolált LTP fehérjék mind nagy stabilitást mutattak (a teljesség igénye nélkül), pl. az őszibarack LTP-je (Wijesinha-Bettoni és mtsai., 2010), a mustárból származó LTP (Sirvent és mtsai., 2012), az almából izolált LTP (Sancho és mtsai., 2005), az árpában (Lindorff-Larsen és Winther, 2001; Wijesinha-Bettoni és mtsai., 2010), valamint a szőlőben található LTP (Vassilopoulou és mtsai., 2006) csakúgy, mint a kiviben lévő LTP (Bernardi és mtsai., 2011). A napraforgó LTP esetén szintén nagy stabilitást találtunk a szimulált gasztrális emésztéssel szemben e munka során, noha kisebbet, mint Vassilopoulou és mtsai. tapasztaltak (2006) szőlőből izolált LTP esetén. Az LTP rezisztens a hőkezeléssel, proteolízissel, extrém pH-változásokkal szemben is (van Ree, 2002). E magas stabilitás egybecseng azzal a ténnyel, hogy sok különböző fajból izolált LTP vált ki allergiás reakciót (Asero és mtsai., 2000; Sancho és mtsai., 2005). Néhány LTP még az egész emésztőrendszer viszontagságait is túléli teljes IgE-reaktív formában, amely képes hízósejteket triggerelni az epitéliális sejtréteg szomszédságában (Asero és mtsai., 2000). Ilyenek például a Rosaceae család gyümölcseiben található LTP-k (Sánchez-Monge és mtsai., 1999). A szerkezeti stabilitáson kívül az LTP fehérjékben megtalálható közös szekvenciamotívum és számos szerkezeti hasonlóság, amelyek szintén klinikai keresztreakciókat eredményeznek (Pastorello[a] és mtsai., 2001).

A FK az LTP-k természetes liganduma, amely csekély védőhatást mutatott a fehérjék proteolízise során vizsgálatainkban. Ez valószínűsíthetően a FK fehérjéhez történő kötésének s ezáltal a molekuláris flexibilitás csökkenésének következménye lehet (Wijesinha-Bettoni és mtsai., 2010), amely képes a fehérje allergén tulajdonságainak megváltoztatására (Breitender és Mills, 2005). Vassilopoulou és mtsai. (2006) szintén tapasztalták a FK szőlőből kivont LTP-re gyakorolt védőhatását, valamint amikor a búza LTP-je lipidet köt, extrém nagy rezisztencia tapasztalható (Marion és mtsai., 2004).

A három 2S albumin frakció különbözött emészthetőségük tekintetében. Az A frakciót gyorsan megemésztette a pepszin. A FK nem gyakorolt észlelhető hatást az A frakció emészthetőségére, bár a fennmaradó fragmentek emészthetőségét csökkentette az intesztinális fázisban. A B frakció esetén viszont egyértelmű védelmet nyújtott a FK az első fázisban és csökkentette az emésztés sebességét a második fázisban. A C frakció esetében a FK erőteljes védőhatást gyakorolt a gasztrális fázisban, viszont az intesztinális fázisban nem tapasztaltuk ezt.

Ezen öt fehérjefrakció közül egyedül az SFA8 bizonyult kiváló emulgeátornak, ezért az SFA8 emészthetőségét mind natív, mind emulgeált formában vizsgáltuk. A pepszin natív

formában 90 perc alatt megemésztette az SFA8-at, mely után nem találtunk fragmentet az SDS-gélen. Emulgeált formában azonban az SFA8 sokkal nagyobb rezisztenciát mutatott a pepszinolízissel szemben. Az intesztinális fázisban az emésztés túlnyomó része lezajlott az első két percben, amely után már csak csekély mértékű változást tapasztaltunk. A FK védőhatást fejtett ki mind a natív, mind az emulgeált SFA8 esetében, mindkét emésztési fázisban.

A pepszin hidrolízisével szembeni rezisztenciát már több fajból izolált 2S albuminok esetén is leírták, többek között pl. földimogyoró (Vissers és mtsai., 2011), mustár (Sirvent és mtsai., 2012), brazil dió (Murtagh és mtsai., 2003; Moreno és mtsai., 2005), szezám (Orruno és Morgan, 2011; Pastorello[b] és mtsai., 2001) és napraforgó (Murtagh és mtsai., 2003) esetén. Sem a rekombináns SFA8, sem a brazil dió domináns 2S albuminja nem denaturálódott még 95°C-on sem, valamint mindkét fehérje nagyrészt visszanyerte eredeti szerkezetét hűtés után (Murtagh és mtsai., 2002).

Ahogyan az LTP-ket, a 2S albuminokat is nagyfokú proteolízissel szembeni rezisztencia jellemzi (Murtagh és mtsai., 2003). E fehérjék diszulfid-kötésekkel stabilizált, kompakt 3D szerkezetüknek köszönhetően magas hőhatás mellett sem denaturálódnak (Pantoja és mtsai., 2002; Vissers és mtsai., 2011). Az emulgeálás is okozhat változásokat a másodlagos fehérjeszerkezetben (Burnett[a] és mtsai., 2002). Ez magyarázhatja, miért találhattunk magasabb fokú proteolízissel szembeni rezisztenciát az SFA8 emulgeált formája esetében, mint a natív forma esetében. Megjegyzendő azonban, hogy a β-laktoglubulin és a β-kazein esetében a határfelülethez történő adszorpció e fehérjéket fokozottabban fogékonnyá tette a pepszin-emésztésre (Macierzanka és mtsai., 2009).

A vékonybél környezetének imitálásához megnöveltük a pH-t 2,5-ről 6,5-re, valamint hasnyálmirigy-keveréket (amely lipázt, kolipázt és epesókat tartalmaz) adtunk az emésztési elegyhez, ennek eredményeképpen megváltozott a fehérjék enzimek (tripszin és kimotripszin) általi hozzáférhetősége. Ezen felül az epesók hozzáadása az adszorbeált fehérjék 90%-át eltávolította az SFA8 emulziójából, reszolubilizálva ezzel a fehérjéket a vizes fázisba (Burnett[b] és mtsai., 2002). A reszolubilizáció megszünteti a határfelülethez kötődés nyújtotta védelmet, kitéve ezzel a fehérjéket a proteázok támadásának. Valószínűleg a deszorbeált fehérjék denaturálódnak és a vékonybélben található felületaktív anyagokhoz kötődnek, e folyamatok további változásokat idéznek elő az emészthetőségükben.

Korábban már bizonyították, hogy az SFA8 kötődik az IgE-hez *in vitro* (Kelly és Hefle, 2000; Kean és mtsai., 2006), noha a napraforgó 2S albuminjai által kiváltott allergia viszonylag ritka a többi ételallergiához viszonyítva. Ennek hátterében valószínűleg az áll, hogy a napraforgómag sokkal kevésbé elterjedt étel, mint a többi ételallergén. A napraforgó-allergia viszonylagos ritkasága arra is enged következtetni, hogy az allergén stabilitása csupán egyetlen tényező a számos közül, amely szerepet játszik egy bizonyos fehérje és az egyén között kialakuló reakcióban, amely végül allergiához vezethet (Murtagh és mtsai., 2003).

Más ételallergén fehérjék, pl. a gabona inhibítor család és a gyümölcs LTP-k szintén képesek lipidekkel asszociálódni (Asero és mtsai., 2000). A gabona inhibítor fehérjecsalád tagjait általában légzőszervi allergiával hozzák kapcsolatba – pl. a pékasztma vagy más néven lisztasztma –, ám e fehérjecsalád tagjait azonosították már orálisan szenzitizáló allergénként is, pl. a búzaallergia esetén (James és mtsai., 1997). A búza α-amiláz inhibítor alegysége, a CM3 szintén képes lipidekkel kölcsönhatásba lépni (Gilbert és mtsai., 2003). A lipidekkel összekapcsolódott fehérjék talán védettséget élvezhetnek a vékonybél proteolitikus környezetében, ezen felül azt is kimutatták, hogy azok a fehérjék, amelyek lipidkettősrétegekkel (bilayerekkel) összekapcsolódtak, stabilabbak maradtak hőkezelés mellett is (Taneva és mtsai., 2000). A lipidekhez történő kötődés elősegítheti egy allergén bélfalon keresztüli adszorpcióját is, vagy azáltal, hogy asszociál a sejtmembránokkal, ahogy a 2S albuminok esetén feltételezték (Onaderra és mtsai., 1994), vagy lipidcseppekhez történő ko-adszorpció révén. Mindezek mellett megemlítendő, hogy a szubsztrát bizonyos mértékű felxibilitása is szükséges ahhoz, hogy a pepszin képes legyen megemészteni, tehát az SFA8 négy diszulfidkötése által kialakított nagyfokú szerkezeti stabilitás is hozzájárul ahhoz, hogy e fehérje gyenge szubsztrátja csupán a pepszinnek (Breitender és Mills, 2005).

Az emulgeálás hatása és a FK jelenléte a fentiek miatt tehát feltétlenül figyelembe veendő, amikor modellezzük a gasztro-intesztinális traktusban folyó emésztését, hiszen a FK a gyomorban és a vékonybélben *in vivo* megtalálható, valamint a fehérjék emulgeált formában is jelen lehetnek az ételekben.

Korábban Astwood és mtsai. (1996) felvetették, hogy a fehérjék pepszin általi emésztés elleni rezisztenciája lehetne potenciális markere a fehérje allergenicitásának. A fehérje emészthetősége – nem csupán a pepszin elleni rezisztenciában mérve, hanem számításba véve a tripszin és a kimotripszin hatását is – alkalmazható kritérium lehetne új fehérjék allergenicitásának becslésénél. Noha a kutatásaink során használt *in vitro* emésztőrendszer-modell nélkülözi az *in vivo* rendszer komplexitását, eredményeink tisztán

mutatják a gasztro-intesztinális környezet többfázisos jellegének fontosságát a fehérjék allergenicitásának becslése során.

Összefoglalva, bár a napraforgó „teljes 2S albumin frakciója”, amely magába foglalja az LTP-t is, használható lehet emulgeátorként jó felületaktív tulajdonságai miatt. Feltétlenül számba kell venni azonban a frakciót alkotó fehérjék allergenicitását, amennyiben ételemulziók stabilizálására szánják e fehérjéket.

### 6.5. Az eredmények összefoglalása

1. A kísérletek során azt találtuk, hogy a napraforgó vizsgált tartalékfehérjéi közül a 2S albuminok molekulaszerkezetében hőkezelés hatására csupán csekély változások következtek be, szerkezetük stabil maradt. Az LTP szerkezete szintén stabil volt, igen kevéssé változott meg hőhatásra, ám a hőkezelés után nem nyerte vissza tökéletesen eredeti konformációját.

2. A napraforgó tartalékfehérjék öt vizsgált frakciójának olaj/víz fázishatáron mért felületaktivitását befolyásolta az alkalmazott hőkezelés, amely az LTP esetében nagymértékben, a kevert frakciók (A, B és C, amelyek az Alb1 és Alb2 fehérjét tartalmazták) és az SFA8 esetében pedig kisebb mértékben növelte a fehérjék felületaktivitását. Kísérleteink alapján elmondható, hogy egyedül az SFA8 mutatott kimagasló felületaktivitást, az LTP és a három kevert frakció (A, B és C) esetén gyengébb határfelületi tulajdonságokat találtunk.

3. A kevert 2S albumin frakciók egyáltalán nem, míg az LTP mérsékelten képes volt emulzió stabilizálására. Stabil emulzió képzésére a vizsgált fehérjék közül egyedül az SFA8 volt képes, ez viszont kimagaslóan jó tulajdonságokkal (kis cseppméret, hosszú idejű stabilitás) jellemezhető emulziót hozott létre.

4. Vizsgáltuk a fehérjék proteolízissel szembeni rezisztenciáját *in vitro* emésztési modellben. A fiziológiás emésztés két fázisát imitáltuk: a gyomorban végbemenő gasztrális fázist (1. fázis) és az ezt követő, bélben folyó intesztinális fázist (2. fázis). Az *in vitro* emésztés során azt találtuk,

4.1. hogy a napraforgó itt vizsgált összes fehérjéje (az LTP és a 2S albuminok egyaránt) emésztődik a mesterséges gyomor-bél–modellben;

4.2. hogy az LTP és a 2S albuminok egyaránt megtartják szerkezeti integritásukat, akkor is, miután proteázok hasították őket, mert a hasított

fragmenteket diszulfid-kötések tartják egyben a gasztro-intesztinális emésztés folyamán. A fragmentek feltételezhetően képesek eljutni a vékonybélbe, átjutnak annak falán és a vérbe kerülve allergiás reakciót válthatnak ki.

5. A foszfatidil-kolin (FK) védőhatást gyakorolt mind a gasztrális, mind az intesztinális emésztéssel szemben a napraforgó LTP-jére és 2S albuminjaira egyaránt: a kevert Alb1 és Alb2 frakciókra, valamint a tiszta SFA8-ra.

6. Az emulgeálás további, fokozottabb védelmet nyújtott az SFA8 számára a proteolízissel szemben. (A vizsgált fehérjék közül egyedül az SFA8 fehérje képes emulziókat stabilizálni megfelelő mértékben.)

7. A védelem akkor volt a leghatékonyabb, amikor a fehérje emulgeált formában volt jelen és ehhez az elegyhez adtuk a FK-t. Ebből következtethetünk arra, hogy a lipid-fehérje kölcsönhatás és az emulgeálás egyaránt képes megváltoztatni egy fehérje allergenicitását.

Eredményeink alapján elmondható, hogy feltétlenül figyelembe kell venni új fehérjék allergenicitásának becslésekor a pepszin mellett a tripszin és a kimotripszin hatását is; valamint a gyomor-bél–rendszer többfázisos jellegét és a lipid-fehérje kölcsönhatásokat.

**i-ii) A négy vizsgált fehérje, amely a napraforgó tartalékfehérjék ún. „teljes 2S albumin frakcióját” alkotja, valóban jó felületaktivitással rendelkezik, amelyet a hőkezelés tovább javít.**

**iii) Allergén jellegük miatt azonban felhasználásukat ételemulziók stabilizálására fontolóra kell venni.**

# 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A napraforgó magva nagy mennyiségben tartalmaz olajakat és fehérjéket, amelyek között néhány kiváló emulgeáló tulajdonságai miatt alkalmas ételemulziók stabilizálására. A napraforgó tartalékfehérjéi közül néhány azonban allergénnek bizonyult. Az ételkészítés és az emésztés alatt bekövetkező hőhatás illetve emulgeálás során módosulhatnak a fehérjék egyes tulajdonságai s ezen keresztül allergenicitásuk is. A fehérje-emulziók gasztro-intesztinális (gyomor-bél–rendszeri) feldolgozásának, lebontásának jobb megértése hozzásegíthet kevésbé allergén ételkészítmények előállításához.

Munkánk során vizsgálatuk a napraforgó tartalékfehérjék közül az LTP és az SFA8, valamint az Alb1 és Alb2 fehérjék három kevert frakciójának szerkezeti stabilitását, felületaktivitását és ezek változását hőkezelés hatására, emulgeáló képességüket, továbbá proteolízissel szembeni rezisztenciájukat *in vitro* emésztési modellben.

Melegítés hatására a vizsgált fehérjék közül a 2S albuminok szerkezete alig változott, hűtés után visszanyerték eredeti konformációjukat, szemben az LTP-vel, amely szintén stabil volt ugyan, de teljes mértékben nem tudta felvenni eredeti konformációját. A hőkezelés minden vizsgált fehérje felületaktivitását növelte. Kimagaslóan jó határfelületi tulajdonságokat és emulgeáló képességet azonban csak az SFA8 esetében mértünk. Az *in vitro* emésztés során azt tapasztaltuk, hogy az összes vizsgált fehérje emésztődik a mesterséges gyomor-bél rendszerben, bár a lebontott fehérjék megtartják szerkezeti integritásukat, mert a hasított fragmenteket diszulfid-hidak tartják egyben az emésztés folyamán. A fragmentek feltételezhetően képesek eljutni a vékonybélbe, átjutnak annak falán és a vérbe kerülve allergiás reakciót válthatnak ki. A foszfatidil-kolin védőhatást fejtett ki az összes fehérjére az emésztés mindkét fázisában. Az emulgeálás további, fokozottabb védelmet nyújtott az SFA8 számára a proteolízissel szemben. A védelem akkor volt a leghatékonyabb, amikor a fehérje emulgeált formában volt jelen és ehhez az elegyhez adtuk a foszfatidil-kolint. Ebből következtethetünk arra, hogy a lipid-fehérje kölcsönhatás és az emulgeálás egyaránt képes megváltoztatni egy fehérje allergenicitását.

Eredményeink alapján elmondható, hogy feltétlenül figyelembe kell venni új fehérjék allergenicitásának becslésekor a pepszin mellett a tripszin és a kimotripszin hatását is; valamint a gyomor-bél–rendszer többfázisos jellegét és a lipid-fehérje kölcsönhatásokat. A

négy vizsgált fehérje valóban jó határfelületi tulajdonságokkal rendelkezik – főként az SFA8 –, allergén jellegük miatt azonban felhasználásukat ételemulziók stabilizálására fontolóra kell venni.

# 8. SUMMARY

Sunflower's seed contains oils and proteins in a great quantity. Some of these storage proteins might be used to stabilise food emulsions. On the other hand, two of these proteins have been proved to elicit allergic reactions. Some properties of these proteins might be modified by the heat treatment and emulsification occurring during food processing and digestion; therefore their allergenicity might be altered as well. Better understanding of the gastro-intestinal processing, the digestion of protein emulsions is necessary for developing less allergenic food products.

We investigated the structural stability, surface activity and its change on heat treatment, emulsifying properties and resistance to proteolysis in an *in vitro* digestion model of LTP and SFA8, and three mixed fractions of Alb1 and Alb2 proteins (called fraction A, B and C).

The structure of the 2S albumins (Alb1, Alb2 and SFA8) changed only slightly upon heat treatment, after cooling they refolded to their original state. LTP was stable as well but did not refold to its original conformations after cooling. We found excellent surface and emulsifying properties only in case of SFA8. All studied proteins were digested in the *in vitro* gastro-intestinal model. The cleaved proteins kept their structural integrity because disulphide bridges held the digested fragments together during the digestion. Presumably, the fragments can get to the small intestine, pass through its mucosa eliciting an allergic reaction. Phosphatidylcholine had a protective effect on all the proteins in both phases of the digestion. Emulsification protected SFA8 against proteolysis as well. Best protection was achieved when phosphatidylcholine and emulsification were applied together on SFA8. It indicates that both the lipid-protein interactions and the emulsification can modify a protein's allergenicity.

As a conclusion, it is not enough to test only the pepsin digestion when assessing novel proteins allergenicity; the proteolysis of trypsin and chymotrypsin also has to be taken into consideration as well as the multiphase nature of the gastro-intestinal tract and the lipid-protein interactions. Although the four studied proteins, especially SFA8, possess good surface properties and could be used as stabilisers, their use in food emulsions should be thoroughly considered because of their allergenicity.

# 9. FÜGGELÉK

***$D_{3,2}$:*** Sauter átmérő vagy térfogat/felület középátmérő; annak a gömbnek az átmérője, amely ugyanazzal a térfogat/felület aránnyal rendelkezik, mint a vizsgált részecske.

Az ***elasztikus modulus*** annak mutatója, mennyire képes egy anyag nyomás hatására átmenetileg deformálódni.

***Gasztrális vagy első emésztési fázis:*** a gyomorban, illetve az *in vitro* modellezett rendszerben a gyomor körülményeit szimuláló elegyben végbemenő emésztési fázis.

***Intesztinális (duodenális) vagy második emésztési fázis:*** a vékonybélben, illetve az *in vitro* modellezett rendszerben a vékonybél körülményeit szimuláló elegyben végbemenő emésztési fázis**.**

***Koaleszcencia***: emulzió cseppjeinek egymásba olvadása; tehát több kisméretű csepp egy nagyobb méretű cseppé áll össze, amely más fizikai tulajdonságokkal bír.

***Felületi feszültség:*** egy folyadék felületének azon képessége, amely által ellenáll a külső erőknek.

***Felületi nyomás:*** a felületi feszültség megváltozása az egyes molekulák számára elérhető vizes felület függvényében.

***Felületi stressz***: az a visszanyerhető munka, amely egységnyi, már létező felület elasztikus nyújtásához szükséges.

***Tranzíciós hőmérséklet:*** az a hőmérséklet, amelyen egy anyag kristályos állapotból más halmazállapotba kerül.

**Allergiás tünetek klinikai megnyilvánulásai** (Fernández-Rivas és Miles, 2004):

***a. Anafilaxia***

Az ételallergia legsúlyosabb megnyilvánulása az anafilaxia, amely egy általános, több szervet érintő reakció. Általában az ételallergén lenyelését követő néhány percen belül bekövetkezik az allergiás egyéneknél. A beteg viszketést tapasztal, csalánkiütések jelennek meg, angiödéma, garatödéma, hörgőgörcs, alhasi görcsök, hányás, hasmenés, aritmia, alacsony vérnyomás, sokk áll be. Az ún. terhelés-indukálta allergia esetén akkor következik

be anafilaxia, ha az allergiát okozó étel (igen ritkán bármely étel) elfogyasztása után 2-4 órával fizikai terhelésnek van kitéve a beteg. Az ételallergiák okozzák az összes anafilaxiás eset egyharmadát. A leggyakoribb ételek, amelyek anafilaxiát indukálnak, a mogyoró, a csonthéjasok, a friss gyümölcsök, a zeller, magvak, hüvelyesek, tenger gyümölcsei, tojás és tej. Egy anafilaxiás reakció kimenetele akár halálos is lehet.

***b. Bőrreakciók***

Csalánkiütés, angiödéma megjelenése.

***c. Gasztrointesztinális reakciók***

Orális allergia tünetek (Oral Allergy Syndrome, továbbiakban OAS): csalánkiütések, duzzadt ajkak és garat, az érintett orális területek viszketése, angiödéma. Viszonylag gyorsan, 5-15 perccel az étel elfogyasztása után jelentkezik. Egyes betegeknél ezt követően emésztési zavarok léphetnek fel, pl. hasfájás, hasmenés, hányás, émelygés.

***d. Légzőszervi reakciók***

Garati ödéma, asztma, légzőszervek ödémás duzzanata fordul elő. Általában más tünetekkel együtt jelenik meg. Az asztma-roham, amely az anafilaxiás sokkot kísérheti, a leggyakoribb halálok az ételallergia következtében elhunyt páciensek között.

Néhány halra, rákra és hüvelyesre allergiás beteg esetében már az allergiát kiváltó ételek főzésekor felszálló gőzök belélegzése is kiválthatja a légzőszervi reakciókat.

***e. Ételallergén belélegzése okozta munkahelyi rhinitis és asztma***

Több ételallergén esetén az IgE-szenzitizáció inhalációval is megtörténhet, akár munkahelyi körülmények között. Ilyen ételek például a teljesség igénye nélkül a rákok, puhatestűek, halak, tojás, szárnyasok, gabonalisztek, ricinus, kávé, friss zöldségek, napraforgó, valamint növényi enzimek, pl. bromelain, az ananász, és papain, a papaya proteáza. A nagy molekulatömegű allergének por (pl. gabonalisztek a pékasztmások esetén), aeroszolok (friss zöldségek esetén akár háziasszonyok is veszélyeztettek lehetnek) vagy gőzök (rákokat, puhatestűeket feldolgozó üzemben) formájában kerülnek a levegőbe.

***f. Ételallergén érintése okozta bőrreakció***

Kontakt csalánkiütés vagy kontakt dermatitisz (bőrgyulladás) formájában jelenhet meg. A kontakt csalánkiütés az allergénnel való érintkezés után azonnal megjelenő vörös

foltokat jelenti. A kontakt dermatitisz krónikus, általában az ételfeldolgozó üzemekben dolgozók kezén megjelenő dermatitiszt jelenti, amely azonnali reakciót mutat, amint az allergén a bőrfelülettel érintkezik. A leggyakoribb kiváltók között találjuk a nyers halakat, a kagylókat, zöldségeket és gyümölcsöket. Az érintett páciensek közül sokaknál légzőszervi tünetek is megjelennek. A legtöbb olyan étel, amely belélegezve vagy bőrrel való érintkezés során tüneteket okoz, lenyelve is allergiát vált ki.

# IRODALOMJEGYZÉK


Alcocer, M. J., Murtagh, G. J., Wilson, P. B., Progias, P., Lin, J., Archer, D.B. **(**2004): The Major Human Structural IgE Epitope of the Brazil Nut Allergen Ber e 1: A Chimaeric and Protein Microarray Approach. *J. Mol. Biol.*, 343, 759-769.

Allen R. D., Cohen, E. A., Von der Haar, R. A., Adams, C. C., Ma, D. P., Nessler, C. L., Thomas, T. L. (1987): Sequence and expression of a gene encoding an albumin storage protein in sunflower. *Mol. Gen. Genet*., 210, 211-218.

Ambwani, D. S., Fort Jr., T. (1979): Pendant drop technique for measuring liquid boundary tensions. In Surface Colloid Science. Good, R. J., Strowberg, R. R. Eds.; Plenum Press, New York, Vol. II, p. 93-119.

Amigo-Benavent, M., Clemente, A., Ferranti, P., Caira, S., Dolores del Castillo, M. (2011): Digestibility and immunoreactivity of soybean beta-conglycinin and its deglycosylated form. *Food Chemistry*, *129*,1598-1605.

Anisimova, I. N., Fido, R. J., Tatham, A. S., Shewry, P. R. Genotypic variation polymorphism of 2S albumins of sunflower. (1995): *Euphytica*, 83, 15-23.

Arondel, V., Vergnolle, C., Tchang, F. and Kader, J. C. (1990): Bifunctional lipid-transfer: fatty acid-binding proteins in plants. *Mol. Cell Biochem*., 98, 49-56.

Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Amato, S. (2004): Airborne allergy to sunflower seed. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 14, 244-246.

Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., de Vries, S. C., Gautier, M. F., Ciurana, L. F., Verbeek, E., Mohammadi T., Knul-Brettlova, V., Akkerdaas, J. A., Bulder, I., Aalberse, R. C., van Ree, R. (2000): Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int. Arch. of Allergy and Immunol.*, *122*, 20-32.

Astwood, J. D., Leach, J. N., Fuchs, R. L. (1996): Stability of food allergens to digestion *in vitro*. *Nature Biotechnology*, 14, 1269-1273.

Atis, S., Tutluoglu, B., Sahin, K., Yaman, M., Kücükusta, A.R., Oktay, I. (2002): Sensitization to sunflower pollen and lung functions in sunflower processing workers. *Allergy*, 57, 35-39.

Axelsson, I. G. K., Ihre, E., Zetterstrom, O. (1994): Anaphylactic reactions to sunflower seed. *Allergy*, 49, 517-520.

Barciszewski, J., Szymanski, M., Haertlé, T. (2000): Analysis of Rape Seed Napin Structure and Potential Roles of the Storage Protein. *J. Prot. Chem*., 19, 249-254.

Bashir, M. E., Hubatsch, I., Leinenbach, H. P., Zeppezauer, M., Panzani, R. C., Hussein, I. H. (1998): Ric c 1 and Ric c 3, the allergenic 2S albumin storage proteins of *Ricinus communis*: complete primary structures and phylogenetic relationships. *Int. Arch. Allergy and Immunol.*, 115, 73-82.

Beccari, J. B. (1745): De Frumento. De Bononiensi Scientarium et Artium. Instituto atque Academia Commentarii: Bologna. II, Part I., 122-127.

Bernardi, M. L., Giangrieco, I., Camardella, L., Ferrara, R., Palazzo, P., Panico, M. R., Crescenzo, R., Carratore, V., Zennaro, D., Liso, M., Santoro, M., Zuzzi, S.,

Tamburrini, M., Ciardiello, M. A., Mari, A. (2011): Allergenic Lipid Transfer Proteins from Plant-Derived Foods Do Not Immunologically Clinically Behave Homogeneously: The Kiwifruit LTP as a Model. *Plos One*, 6, 1-22.

Binrbaum, J., Tafforeau, M., Vervloet, D., Charpin, J., Charpin, D. (1989): Allergy to sunflower honey associated with allergy to celery. *Clinical Experimental Allergy*, 19, 229-230.

Borges, J. P., Barre, A., Culerrier, R., Granier, C., Didier, A., Rouge, P. (2008): Lipid transfer proteins from Rosaceae fruits share consensus epitopes responsible for their IgE-binding cross-reactivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 365, 685-690.

Bousquet, J. B., Dhivert, H., Clauzel, A.-M., Hewitt, B., Michel, F. B. (1985): Occupational allergy to sunflower pollen. *J. Allergy and Clin. Immunol.*, 75, 70-74.

Breiteneder, H. Mills, E. N. C. Molecular properties of food allergens. (2005): *J. Allergy and Clin. Immunol*., 115, 14-24.

Burks, A.W., Williams, L. W., Helm, R. M., Connaughton, C., Cockrell, G., O'Brian, T. J. (1991): Identification of a major peanut allergen, Ara h 1, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges. *J. Allergy and Clin. Immunol*., 88, 172-179.

Burnett[a], G. R., Rigby, N. M., Mills, C. E. N., Belton, P. S., Fido, R. J., Tatham, A. S., Shewry, P. R. (2002): Characterisation of the Emulsification Properties of 2S Albumins from Sunflower Seed. *J. Colloid Interface Sci*., 24, 177-185.

Burnett[b], G. R., Wickham, M., Fillery-Travis, A., Robertson, J. A., Belton, P. S:, Gilbert, S. M., Tatham, A. S., Shwery, P. R., Mills, E. N. C. (2002): Interactions Between Protein Allergerns Model Gastric Emulsions. *Biochem. Soc. Trans*., 30, 916-918.

Caubet, J.-C., Hofer, M. F., Eigenmann, P. A., Wassenberg, J. (2010): Snack seeds allergy in children. *Allergy*, 65, 130-139.

Chavrolin, D., Duliez, J. P., Cohen-Addad, C., Marion, D., Pebay-Peyroula, E. (1999): The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (nsLTP) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 A resolution. *Eur. J. Biochem*., 264, 562-568.

Conti, A. (2001): The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. *Journal of Chromatography B*, 756, 85–93.

Díaz-Perales, A., Blanco, C., Sánchez-Monge, R., Varela, J., Carrillo, T., Salcedo, G. (2003): Analysis of avocado allergen (Prs a 1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *J. Allergy and Clin. Immunol.*, 112, 1002-1007**.**

Díaz-Perales, A., Lombardero, M., Sanchez-Monge, R., Garcia-Selles, F. J., Pernas, M., Fernandez-Rivas, M., Barber, D., Salcedo, G**.** (2000): Lipid-transfer proteins as potential plant panallergens: cross- reactivity among proteins of Artemisia pollen, Castanea nut and Rosaceae fruits, with different IgE-binding capacities. *Clin. Exp. Allergy*, 30, 1403-1410.

Douliez, J.-P., Michon, T., Elmorjani, K., Marion, D. (2000): Structure, Biological Technological Functions of Lipid Transfer Proteins Indolines, the Major Lipid Binding Proteins from Cereal Kernels. *J. Cereal Sci*., 32, 1-20.

Dreyer, G. (1906): Eine neue Planzendermatitis. *Dermatol. Centralblatt.*, 9, 135-137.

Duliez, J. P., Michon, T., Elmorjani, K., Marion, D. (2000): Mini review: structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J. Cereal Sci.*, 32, 1-20.

Egorov, T. A., Odintsova, T., I., Musolyamov, A. K., Fido, R., Tatham, A.S., Shewry, P. R. (1996): Disulphide structure of a sunflower seed albumin: conserved and variant disulphide bonds in the cereal prolamin superfamily, *FEBS Lett.*, 369, 285-288.

Erb, K. J. (2007): Helminths, allergic disorders and IgE-mediated immune responses: where do we stand? *Eur. J. Immunol.*, 37, 1170–1173.

Fernández-Rivas, M., Miles, S. (2004): Food Allergies: Clinical and Psychosocial Perspectives. In Plant Food Allergens, 1st Edition; Mills, E. N. C., Shewry, P. R. Eds.; Blackwell Publishing, Oxford, U.K., pp. 1-23.

Galau, G. A., Wang, H. Y.-C., Hughes, D. W., Cotton (1992): Mat5-A (C164) gene and Mat5-D cDNAs encoding methionine rich 2S albumin storage proteins. *Plant Physiol*. 99, 779-782.

Gao, C., Wijesinha-Bettoni, R., Wilde, P. J., Mills, E. N. C., Smith, L. J., Mackie, A. R. (2008): Surface Properties Are Highly Sensitive to Small pH Induced Changes in the 3-D Structure of α-Lactalbumin. *Biochemistry*, 47, 1659-1666.

Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M. (1995): The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol*., 3, 72-74.

Garcia-Olmedo, G., Crespo, J. F., Rodrigez, J., Salcedo, G. (2001): Isolation and characterization of barley lipid transfer protein and protein Z as beer allergens. J. *Allergy Clin. Immuol.*, 108, 647-649.

Gilbert, S. M., Burnett, G. R., Mills, E. N. C., Belton, P. S., Shewry, P. R., Tatham, A. S. (2003): Identification of the wheat seed protein CM3 as a highly active emulsifier using a novel functional screen. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2019-2025.

Gomar, J., Petit, M-C., Sdano, P., Sy, D., Marion, D., Kader, J-C., Vovelle, F., Ptak, M. (1996): Solution structure lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds. *Protein Sci.*, 5, 565-577.

Gonzalez-Perez, S., Vereijken, J. M., Van Koningsveld, G. A., Gruppen, H., Voragen, A. G. J. (2005): Physicochemical Properties of 2S Albumins the Corresponding Protein Isolate from Sunflower (*Helianthus annuus*). *J. Food Sci.*, 70, 98-103.

Guéguen, J., Popineau, Y., Anisimova, I. N., Fido, R. J., Shewry, P. R., Tatham, A. S. (1996): Functionality of the 2S Albumin Seed Storage Proteins from Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J. Agric. Food Chem*., 44, 1184-1189.

Halsey, A. B., Martin, M. E., Jakobs, F. O. (1986): Sunflower oil is not allergenic to sunflower sensitive patients. *J. Allergy and Clin. Immunol*., 78: 408-410.

Heinemann, B., Andersen, K., Nielsen, P., Bech, L., Poulsen, F. (1996): Structure in solution of a four helix lipid binding protein. *Protein Sci*., 5, 13-23.

Husband, F. A., Garrood, M. J., Mackie, A. R., Burnett, G. R., Wilde, P. J. (2001): Adsorbed Protein Secondary Tertiary Structures by Circular Dichroism and Infrared Spectroscopy with Refractive Index Matched Emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 859-866.

Irwin, S. D., Keen, J. N., Findlay, J. B., Lord, J. M. (1990): The *Ricnus communis* 2S albumin precursor: a single preproprotein may be processed into two different heterodimeric storge proteins. *Molecular and General Genetics*, 222, 400-408.

James, J. M., Sixbey, J. P., Helm, R. M., Bannon, G. A., Burks, A.W. (1997): Wheat alpha-amylase inhibitor: a second route of allergic sensitization. *J. Allergy and Clin. Immunol*., *99*, 239-244.

Jankiewicz,, A., Baltes, W., Bögl, K. W., Dehne, L. I., Jamin, A., Hoffmann' A., Haustein, D., Vieths, S. (1997): Influence of food processing on the immunochemical stability of celery allergens. *J. Sci. Food Agr.*, 75, 359–370.

Jimenez, A., Moreno, C., Martinez, J., Martínez, A., Bartolomé, B., Guerra, F., Palacios, R. (1994): Sensitization to sunflower pollen: only an occupational allergy? *Int. Arch. Allergy and Immunol.*, 105, 297-307.

Kader, J. C. (1996): Lipid Transfer Proteins in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*., 47, 627–654.

Kanny, G., Fremont, S., Nicolas, J. R., Moneret-Vautrln, D. A. (1994): Food allergy to sunflower oil in a patient sensitized to mugwort pollen. *Allergy*, 49, 561-564.

Kean, D. E., Goodridge, H. S., McGuinness, S., Harnett, M. M., Alcocer, M. J. C., Harnett, W. (2006): Differential polarization of immune responses by plant 2S seed albumins, Ber e 1, SFA8. *J. Immunol.*, 177, 1561-1566.

Kelly, J. D. Hefle, S. L. (2000): 2S methionine-rich protein (SSA) from sunflower seed is an IgE- binding protein. *Allergy*, 55, 556–559.

Kopf-Bolanz, K. A., Schwander, F., Gijs. M., Vergères, G., Portmann, R., Egger, L. (2012): Validation of an In Vitro Digestive System for Studying Macronutrient Decomposition in *Humans. J. Nutrition*, 142, 245-250.

Kortt, A. A., Caldwell, J. B. (1990): Low Molecular Weight Albumins from Sunflower Seed: Identification of a Methionine-Rich Albumin. *Phytochemistry*, 29, 2805-2810.

Kreis, M., Forde, B. G., Rahman, S., Miflin, B. J., Shewry, P. R. (1985): Molecular Evolution of the Seed Storage Proteins of Barley, Rye Wheat. *Mol. Biol*., 183, 499-502.

Lindorff-Larsen, K., Winther, J. R. (2001): Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat proteases. *FEBS Lett*., 48, 145-148.

Luckett, S., Sessions, R. B., Michaelson, L., Clarke, A. R., Fido, R.J., Tatham, A. S., Shewry, P. R. (2001): Amino acid sequence molecular modelling of a lipid transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed. *Protein Pept. Lett*., 8, 241-248.

Machado, O. L., Silva Jr., J. G. (1992): An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seed which is a part of the 2S albumin precursor predicted by c-DNA data. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 25, 567-582.

Macierzanka, A., Sancho, A. I., Mills, E. N. C., Rigby, N. M., Mackie, A. R. (2009): Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of β -casein and β-lactoglobulin. *Soft Matter*, 5, 538-550.

Maldonado-Valderrama, J., Woodward, N. C., Gunning, A. P., Ridout, M. J., Husb, F. A., Mackie, A. R., Morris, V. J., Wilde, P. J. (2008): Interfacial Characterization of β-Lactoglobulin Networks: Displacement by Bile Salts. *Langmuir*, 24, 6759-6767.

Marion, D., Douliez, J.-P., Gautier, M.-F., Elmorjani, K. (2004): Plant Lipid Transfer Proteins: Relationships between Allergenicity and Structural, Biological and Technological Properties. 1st Edition; Mills, E. N. C., Shewry, P. R. Eds.; Blackwell Publishing, Oxford, U.K., pp. 42-56.

Menéndez-Arias, L., Monsalve, R. I., Gavllanes, J. G., Rodríguez, R. (1987): Molecular and spectroscopic characterization of a low molecular weight seed storage protein from yellow mustard (*Sinapis alba* L.). *Int. J. Biochem.*, 19, 899-907.

Mills, E. N. C., Sancho, A. I., Rigby, N. M., Jenkins, J. A., Mackie, A. R. (2009): Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.*, 53, 963-969.

Mills, E.N.C., Madsen, C., Shewry, P. R., Wichers, H. J. (2003): Food allergens of plant origin - their molecular and evolutionary relationships. *Trends in Food Science Technology*, 14, 145–156.

Molina, A., Segura, A., Garcia-Olmedo, F. (1993): Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.*, 316, 119-122.

Molvig, L., Tabe, M. L., Eggum, B. O., Moore, A. E., Craig, S., Spencer, D., Higgins, T. J. V. (1997): Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8393–8398.

Monsalve, R. I., Villalba, M., Rico, M., Shewry, P. R., Rodrígez, R. (2004): The 2S Albumin Proteins. In Plant Food Allergens, 1st Edition; Mills, E. N. C., Shewry, P. R. Eds.; Blackwell Publishing, Oxford, U.K., pp. 42-56.

Monsalve, R. I., Gonzales de la Pena, M. A., Menéndez-Arias, L., López-Otín, C., Villalba, M., Rodrígez, R. (1993): Characterization of a new oriental mustard (*Brassica juncea*) allergen, (Bra j IE: detection of an allergenic epitope. *Biochem.*, 293, 625-632.

Monsalve, R. I., Gonzales de la Pena, M. A., López-Otín, C., Fiandor, A., Fernández, C., Villalba, M., Rodríguez, R. (1997): Detection, isolation and complete amino acid sequence of an aeroallergenic protein from rapeseed flour. *Clin. Exp. Allergy*, 27, 833-841.

Monsalve, R. I., López-Otín, C., Villalba, M., Rodríguez, R. (1991): A new distinct group of 2S albumins from rapeseed. Amino acid sequence of two low molecular weight napins. *FEBS Lett.*, 295, 207-210.

Moreno, F. J., Jenkins, J. A., Mellon, F. A., Rigby, N. M., Robertson, J. A., Wellner, N., Mills, E. N. C. (2004): Mass spectrometry structural characterisation of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1698, 175-186.

Moreno, F. J., Mellon, F. A., Wickham, M. S. J., Bottrill, A. R, Mills, E. N. C. (2005): Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant *in vitro* gastrointestinal digestion. *The FEBS Journal*, 272, 341-352.

Murray, B. S. (2002): Interfacial rheology of food emulsifiers and proteins. *Current Opin. Colloid Interface Sci.*, 7, 426-431.

Murtagh, G. J., Archer, D. B., Dumoulin, M., Ridout, S., Matthews, S., Arshad, S. H., Alcocer, M. J. C. (2003): *In vitro* stability and immunoreactivity of the native and recombinant plant food 2S almumins Ber e 1 and SFA-8. *Clinical and Experimental Allergy*, *33*, 1147-1152.

Murtagh, G. J., Dumoulin, M., Archer, D. B., Alcocer, M. J. C. (2002): Stability of recombinant 2S albumin allergens *in vitro*. *Plant Food Allergens*, 30, 913-915.

Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T., Chothia C. (1995): SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.*, 247, 536-540.

Nordlee, J. A., Taylor, S. L., Townsend, J. A., Thomsas, L. A., Bush, R. K. (1996): Identification of Brazil nut allergen in transgenic soybeans. *N. Engl. J. Med.*, 334, 688-692.

Noyes, J. H., Boyd, G. K., Settipane, G. A. (1979): Anaphylaxis to sunflower seed. *J. Allergy and Clin. Immun.*, 63, 242-244.

Onaderra, M., Monsalve, R. I., Mancheno, J. M., Villalba, M., Martinez del Pozo, A., Gavilanes, J. G., Rodriguez, R. (1994): Food mustard allergen interaction with phospholipid vesicles. *European Journal of Biochemistry, 225*, 609-615.

Orruno, E., Morgan, M. R. A. (2011): Resistance of purified seed storage proteins from sesame (*Sesamum indicum* L.) to proteolytic digestive enzymes. *Food Chemistry*, 128, 923-929.

Osborn, R. W., Broekaert, W. F. (1999): Antifungal Proteins. In Seed Proteins, Shewry, P.R., Casey, R. Eds.; Kluwer Academic Publishers, The Netherls., pp. 727-751.

Pandya, M. J., Sessions, R. B., Williams, P. B., Dempsey, C. E., Tatham, A. S., Shewry, P. R., Clarke, A. R. (2000): Structural Characterisation of a Methionine-Rich, Emulsifying Protein from Sunflower Seed. *Proteins*, 38, 341-349.

Pandya, M. J., Williams, P. B., Depsey, C. E., Shewry, P. R., Clarke, A. R. (1999): Direct Kinetic Evidence for Folding via Highly Compact, Misfolded State. *J. Biol. Chem.*, 274, 6828-6837.

Pantoja-Uceda, D., Bruix, M., Gimenez-Gallego, G., Rico, M., Santoro, J. (2003): Solution Structure of RicC3, a 2S Albumin Storage Protein from *Ricinus communis. Biochemistry*, 42, 13839-13847.

Pantoja-Uceda, D., Bruix, M., Santoro, J., Rico, M., Monsalve, R., Villalba, M. (2002): Solution structure of allergenic 2S albumins. *Biochem. Soc. Trans*., 30, 919-924.

Pantoja-Uceda, D., Shewry, P. R., Bruix, M., Tatham, A. C., Santoro, J., Rico, M. (2004): Solution Structure of a Methinonine-Rich 2S Albumin from Sunflower Seeds: Relationship to Its Allergenic Emulsifying Properties. *Biochemistry*, 43, 6976-6986.

Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Scibola, E., Trambaioli, C., Giuffrida, M. G., Ansaloni, R., Godovac-Zimmermann, J., Conti, A., Fortunato, D., Ortolani, C. (2000): The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *J. Allergy and Clin. Immunol*., 106, 744-751.

Pastorello[a], E. A., Pompei, C., Pravettoni, V., Brenna, O., Farioli, L., Trambaioli, C., Conti, A. (2001): Lipid transfer proteins and 2S albumins as allergens. *Allergy*, 67, 45-47.

Pastorello[b], E. A., Varin, E., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Trambaioli, C., Fortunato, D., Giuffrida, M.G., Rivolta, F., Robino, A., Calamari, A. M., Lacava, L., Conti, A. (2001): The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. *Journal of Chromatography B*, 756, 85–93.

Perrocheau, L., Bakan, B., Boivin, P., Didier, M. (2006): Stability of Barley Malt Lipid Transfer Protein 1 (LTP1) toward Heating Reducing Agents: Relationships with the Brewing Process. *J. Agric. Food Chem*., 54, 3108-3113.

Provencher, S.W., Glöckner, J. (1981): Estimation of Globular Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Biochemistry*, 20, 33-37.

Regente, M.C., de la Canal, L. (2000): Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiol. Plant.*, 110, 158-163.

Regente, M., de la Canal, L. (2001): Do sunflower 2S albumins play a role in resistance to fungi? *Plant Physiol. Biochem.*, 39, 407−413.

Regente, M., de la Canal, L. (2003): A cDNA encoding a putative lipid transfer protein expressed in sunflower seeds. *J. Plant Physiol.*, 160, 201-203.

Rico, M., Bruix, M., Gonzalez, C., Monsalve, R. I. Rodrıguez, R. (1996): 1H NMR Assignment Global Fold of Napin BnIb, a Representative 2S Albumin Seed Protein. *Biochemistry*, 36, 15672-15682.

Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Sellés, F. J., Barber, D., Salcedo, G. (1999): Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *J. Allergy and Clin. Immunol*., 103, 514-519.

Sancho, A. I., Rigby, N. M., Zuidmeer, L., Asero, R., Mistrello, G., Amato, S., Gonzalez-Mancebo, E., Fernez-Rivas, M., van Ree, R., Mills, E. N. C. (2005): The effect of thermal processing on the IgE reactivity of the non-specific lipid transfer protein from apple, Mal d 3. *Allergy*, 60, 1262-1268.

Scheurer, S., Lauer, I., Fötisch, K., Moncin, M. S., Retzek, M., Hartz, C., Enrique, E., Lidholm, J., Cistero-Bahima, A., Vieths, S. (2004): Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J. Allergy and Clin. Immunol.*, 114, 900-907.

Shewry, P. R., Jenkins, J. A., Beaudoin, F., Mills, E. N. C. (2004:) The Classification, Functions and Evolutionary Relationships of Plant Proteins in Relation to Food Allergies, In Plant Food Allergens, 1st Edition; Mills, E. N. C., Shewry, P. R. Eds.; Blackwell Publishing, Oxford, U.K., pp. 24-41.

Shewry, P. R., Napier, J. A., Tatham, A. S. (1995): Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *Plant Cell*, 7, 945-956.

Shewry, P. R., Pandya, M. J. (1999): The 2S albumins storage proteins. In Seed Proteins, Shewry, P.R., Casey, R. Eds; Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 619-643.

Sing, H., Sarkar, A. (2011): Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165, 47-57.

Sirvent, S., Palomares, O., Cuesta-Herranz, J., Villalba, M., Rodriguez, R. (2012): Analysis of the Structural Immunological Stability of 2S Albumin, Nonspecific Lipid Transfer Protein, Profilin Allergens from Mustard Seeds. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 6011-6018.

Sorensen, S. B., Bech, L. M., Muldbjerg, T. B., Breddam, K. (1993): Barley lipid transfer protein 1 is involved in beer foam formation. *MBBA Technical Quaterly*, 30, 136-145.

Stelea, S. D., Pancoska, P., Benight, A. S., Keiderling, T. A. (2001): Thermal unfolding of ribonuclease A in phosphate at neutral pH: Deviations from the two-state model. *Protein Science*, 10, 970–978.

Tabe, L., Hagan, N., T. J. V. (2002): Higgins Plasticity of seed protein composition in response to nitrogen and sulfur availability. *Current Opinion in Plant Biology,* 5, 212-217.

Taneva, S. G., Donchev, A. A., Dimitrov, M. I., Muga, A. (2000): Redox- and pH-dependent association of plastocyanin with lipid bilayers: effect on protein and thermal stability. *Biochim. Biophys. Acta,* 1463, 429-438.

Tassin-Moindrot, S., Caille, A., Sy, D., De Person, G., Vovelle, F., Marion, D., Ptak, M. (2000): 1H NMR and fluorescence studies of complexation of DMPG by wheat lipid transfer protein, Global fold of the complex. *FEBS Lett.,* 416, 130-134.

Terras, F. R. G., Schoofs, H. M. E., Thevissen, K., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. A., Brokaert, W. F. (1993): Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. *Plant Physiology,* 103, 1311–1319.

Thoyts, P. E., Napier, J. A., Millichip, M., Stobart, A. K., Griffiths, W. T., Tatham, A. S., Shewry, P. R. (1996): Characterisation of a sunflower seed albumin which associates with oil bodies. *Plant Sci*., 118, 119-125.

van Loon, L. C., van Strien, E. (1999): A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, andcomparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology,* 55, 85-97.

van Ree, R. (2002): Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem. Soc. Trans*., 30, 910-913.

Vandenplas, O., van der Borght, T., Delwichie, J. (1998): Occupational asthma caused by sunflower-seed dust. *Allergy,* 53, 907-908.

Vassilopoulou, E., Rigby, N., Moreno, F.J., Zuidmeer, L., Akkerdaas, J., Tassios, I., Papadopoulos, N. G., Saxoni-Papageorgiou, P., van Ree, R., Mills, E. N. C. (2006): Effect of *in vitro* gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein. *J. Allergy and Clin. Immunol*., 118, 473-480.

Vissers, Y. M., Blanc, F., Skov, P. S., Johnson, P. E., Rigby, N. M., Przybylski-Nicaise, L., Bernard, H., Wal, J.-M., Ballmer-Weber, B., Zuidmeer-Jongejan, L., Szepfalusi, Z., Ruinemans-Koerts, J., Jansen, A. P. H., Savelkoul, H. F. J., Wichers, H. J., Mackie, A. R., Mills, C. E. N., Adel-Patient, K. (2011): Effect of Heating and Glycation on the Allergenicity of 2S Albumins (Ara h 2/6) from Peanut. *Plos One,* 6, 1-9.

Wijesinha-Bettoni, R., Alexeev, Y., Johnson, P., Marsh, J., Sancho, A. I., Abdullah, S. U., Mackie, A. R., Shewry, P. R., Smith, L. J., Mills, E. N. C. (2010): The structural characteristics of nonspecific lipid transfer proteins explain their resistance to gastroduodenal proteolysis. *Biochemistry,* 4, 2130-2139.

Yagami, A. (2010): Anaphylaxis to lipid transfer protein from sunflower seeds. *Allergy,* 65, 1340-1341.

Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G., van Ree, R. (2002): Allergy, Parasites, and the Hygiene Hypothesis. *Science,* 296, 490-494.

Youle, R. J., Huang, A. H. C. (1981): Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. *Am. J. Bot*., 68, 44-48.

Zitouni, N., Errahali, Y., Metche, M., Kanny, G., Moneret-Vautrin, D. A., Nicolas, J. P., Fremont, S. (2000): Influence of refining steps on trace allergenic protein content in sunflower oil. *J. Allergy and Clin. Immunol*., 106, 962-967.

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm

**Prof. Dr. Szigeti Zoltán, D.Sc.**, korábbi tanszékvezető egyetemi tanárnak és

**Dr. habil. Fodor Ferenc, Ph.D.** jelenlegi tanszékvezető egyetemi docensnek

hogy lehetővé tették,

valamint témavezetőmnek,

**Prof. emer. Láng Ferenc, D.Sc.** egyetemi tanárnak

és konzulensemnek,

**Dr. habil. Tamás László, Ph.D.**, egyetemi docensnek,

hogy tanácsaikkal segítették munkám elvégzését

az **ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszékén.**

Köszönettel tartozom **Prof. Peter Shewry**-nak, **Dr. Alan Mackie**-nak, **Prof. Clare Mills**-nek, **Prof. Johnathan Napiernek** és **Dr. Frederic Beaudoinnak** az angliai kísérletek tervezésében, kivitelezésében és kiértékelésében nyújtott segítségükért.

Köszönöm **Dr. Boross Péternek**, hogy kigyomlálta dolgozatom immunológiai részeit.

Köszönöm **Beke Kornéliának, Pardi Sándornénak**, **Dömötör Bélánénak** és **Kremmerné Palczer Katának** a laboratóriumi mindennapokban nyújtott segítségét.

Köszönöm a **családom**nak, köztük **Dr. Parádi Ferenc**nek, hogy mindvégig támogatott.

Köszönöm **Dr. Parádi István**nak, hogy segített.

Köszönöm **Berci**nek és **Rolká**nak a türelmüket.

Kutatásaimat támogatta a **Magyar Ösztöndíj Bizottság** az **Állami Eötvös Ösztöndíj** által**,** valamint a **Marie Curie Training Site Fellowship** (QLK1- CT-2000-60030).