

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Marija B. Peruško

**Struktura i funkcija proteina mleka
modifikovanih u Majarovoj reakciji**

doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Marija B. Peruško

**Structure and function of milk proteins
modified in Maillard reaction**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

KOMISIJA ZA ODBRANU

Mentori:

Prof. dr Tanja Ćirković Veličković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Dragana Stanić-Vučinić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Članovi Komisije:

Prof. dr Zorana Ferjančić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Jelena Radosavljević, docent

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Marijana Stojanović, naučni savetnik

Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena na departmanu za biohemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta pod rukovodstvom prof. dr Tanje Ćirković Veličković, u okviru projekta „Molekularna karakterizacija i modifikacije nekih respiratornih i nutritivnih alergena“ (Broj 172024, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije). Deo eksperimenata je urađen u laboratoriji prof. dr Rejmonda Pitera u Institutu za nauke o proceni rizika Univerziteta u Utrehtu u Holandiji.

*Ogromnu zahvalnost dugujem **prof. dr Tanji Ćirković Veličković** na nesebično pružanoj pomoći i podršci tokom dugogodišnje saradnje.*

*Posebnu zahvalnost dugujem **dr Dragani Stanić-Vučinić**, na prenetom znanju i iskustvu, bezrezervnoj podršci i uvek prijateljskoj atmosferi.*

Hvala,

***prof. dr Zorani Ferjančić**, na stručnim sugestijama i savetima tokom konačnog formulisanja ove teze.*

***dr Marijani Stojanović**, na ukazanom vremenu, ažurnosti i konstruktivnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove disertacije.*

***doc. dr Jeleni Radosavljević**, na pomoći, savetima i prenetom znanju od samih početaka mog studiranja.*

***dr Jostu Smitu**, na vođenju i pomoći tokom izrade dela rezultata ove disertacije.*

Mojim kolegama iz laboratorije 403, na savetima i drugarskoj atmosferi.

Mojim prijateljima na beskrajnoj podršci i razumevanju.

Mom najdražem Prašantu na ljubavi i neprocenjivoj podršci.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici i njima posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

IZVOD

Struktura i funkcija proteina mleka modifikovanih u Majarovoj reakciji

Majarova reakcija (MR) je spontana reakcija između karbonilne i amino grupe i od velikog je značaja u hemiji hrane. Proteini modifikovani u MR imaju poboljšane tehno-funkcionalne osobine i nalaze primenu u prehrambenoj industriji. Takođe, strukture Majarovih proizvoda modifikovanih proteina imaju brojne efekte na alergenost proteina hrane.

Predmet rada ove disertacije bilo je ispitivanje efekata MR indukovane ultrazvukom ili sušenjem raspršivanjem na fizičko-hemijske i tehno-funkcionalne osobine kravlje surutke i kamiljeg mleka, kao i efekata intenzivnog glikovanja u MR na imunološke osobine glavnog alergena kravljeg mleka, β -laktoglobulina (BLG).

Kombinovana primena ultrazvuka i makromolekulskog nagomilavanja je značajnije ubrzala MR i glikovanje proteina nego sam ultrazvučni tretman. Makromolekulsko nagomilavanje, preko ubrzavanja MR, povećava oksidativne promene na proteinima i formiranje struktura sličnih amiloidima. Visoko glikovani proteini surutke su pokazali poboljšanu rastvorljivost u širokom pH i temperaturnom opsegu, kao i povećanu antioksidativnu moć.

U kamiljem mleku u prahu sušenom raspršivanjem više temperature (230 °C – 250 °C) su rezultirale većim stepenom MR u odnosu na niže temperature sušenja (190 °C – 210 °C). Poboljšanje tehno-funkcionalnih osobina proteina kamiljeg mleka u prahu, kao što su antioksidativna moć i rastvorljivost, je pozitivno koreliralo sa stepenom MR.

Glikovanje BLG u MR, dovelo je do njegovog smanjenog transporta kroz model sistem intestinalne barijere, povećanog preuzimanja od strane dendritskih ćelija, smanjenog lučenja citokina u mešovitoj kulturi dendritskih ćelija sa CD4⁺ T-ćelijama, i do smanjene aktivacije bazofila, ukazujući da modifikovanje BLG u MR značajno menja njegovu sudbinu u procesima koji određuju alergenost proteina mleka.

Ključne reči: Proteini mleka, alergeni mleka, kravlje mleko, kamilje mleko, Majarova reakcija, ultrazvučni tretman, uslovi makromolekulskog nagomilavanja, tretman sušenja raspršivanjem

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

ABSTRACT

Structure and function of milk proteins modified in Maillard reaction

Maillard reaction (MR) is a spontaneous reaction between carbonil and amino group, and it is of high importance in food chemistry. Proteins modified in MR possess improved techno-functional properties and they have application in food industry. MR products of food proteins exert numerous effects on food proteins allergenicity.

The subject of this doctoral dissertation was to examine the effects of MR induced by ultrasound or spray-drying on physico-chemical and techno-functional properties of cow whey proteins and camel milk proteins, as well as the effects of MR on immunologic properties of major cow milk allergen, β -lactoglobulin (BLG).

Combined application of ultrasound and macromolecular crowding enhanced MR to a greater extent than ultrasound treatment alone. Macromolecular crowding indirectly, by enhancing MR, intensified oxidative modifications of whey proteins and formation of amyloid-like structures. Highly glycated proteins exhibited improved solubility in wide pH range, thermal stability and antioxidative power.

Upon spray-drying treatment of camel milk, higher temperatures (230 °C – 250 °C) induced higher degree of MR compared to lower drying temperatures (190 °C – 210 °C). Improvement of techno-functional properties of camel milk proteins, such as antioxidative power and solubility, strongly correlated with the degree of MR.

Intensive glycation of BLG in MR reduced its transport through the model system of intestinal barrier, increased uptake by dendritic cells and decreased cytokine production in dendritic cells/CD4⁺ T-cells coculture, as well as reduced basophil activation, indicating that modification of BLG in MR alters its fate in processes crucially involved in allergenicity of milk proteins.

Key words: Milk proteins, milk allergens, cow milk, camel milk, Maillard reaction, sonification, macromolecular crowding, spray-drying

Scientific field: Chemistry

Scientific discipline: Biochemistry

LISTA SKRAĆENICA

- ABTS – 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
- AGE – kasni proizvodi glikovanja (*engl.* Advanced Glycation Endproducts)
- ALA – α -laktalbumin
- ALS – strukture slične amiloidu (*engl.* Amyloid-like Structures)
- ANOVA – analiza varijanse (*engl.* Analysis of Variance)
- ANS – 1-anilinonaftalen-8-sulfonat
- Ara – arabinoza
- BCA – bicinhoninska kiselina (*engl.* Bicinchoninic Acid)
- BHT – dibutilhidroksitoluen (*engl.* Butylated Hydroxytoluene)
- BLG – β -laktoglobulin
- BSA – goveđi serum albumin (*engl.* Bovine Serum Albumin)
- CD – cirkularni dihroizam
- CBB – komasi brilijant plavo (*engl.* Commassie Brilliant Blue)
- CEL – N- ϵ -(karboksietil)lizin
- CML – N- ϵ -(karboksimetil)lizin
- CSA – kamilji serum albumin (*engl.* Camel Serum Albumin)
- CTL – lektini C-tipa (*engl.* C-type lectins)
- DMEM – Dulbecco modifikovan Eagle-ov medijumu
- DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazin
- DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
- DTNB – 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina)
- ELISA – imunoadsorpcijski enzimski test (*engl.* Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
- FD – sušenje smržavanjem (*engl.* Freeze Drying)
- FITC – fluorescein izotiocijanat
- FOX – oksidacija gvožđa – ksilenol narandžasto (*engl.* Ferrous Oxidation – Xylenol Orange)
- GLYCAM – ćelijski adhezioni molekul zavisen od glikozilacije (*engl.* Glycosylation-Dependent Cell Adhesion Molecule)
- GM-CSF – faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (*engl.* Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)

GOLD – glioksal-lizin dimer
HMF – 5-(hidroksimetil)furfural
IFN- γ – interferon γ
Ig – imunoglobulin
LF – laktoferin
MFI – srednji intenzitet fluorescencije (*engl.* Mean Fluorescence Intensity)
MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti (*engl.* Major Histocompatibility Complex)
MOLD – metilglioksal-lizin dimer
NFAT – nuklearni faktor aktiviranih T-ćelija
PAO – fenilarsin-oksidi
PBS – fosfatom puferisani fiziološki rastvor (*engl.* Phosphate Buffered Saline)
PEG-6000 – polietilenglikol molekulske mase 6000 Da
PRR – receptori za prepoznavanje obrazaca (*engl.* Pattern Recognition Receptors)
RAGE – receptori za kasne proizvode glikovanja (*engl.* Receptors for Advanced Glycation Endproducts)
ROS – reaktivne kiseonične vrste (*engl.* Reactive Oxygen Species)
RPMI – *engl.* Roswell Park Memorial Institute
SD190 – sušenje raspršivanjem (*engl.* Spray-Drying) na 190 °C
SD200 – sušenje raspršivanjem na 200 °C
SD210 – sušenje raspršivanjem na 210 °C
SD230 – sušenje raspršivanjem na 230 °C
SD240 – sušenje raspršivanjem na 240 °C
SD250 – sušenje raspršivanjem na 250 °C
SDS – natrijum-dodecil sulfat (*engl.* Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE – natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (*engl.* Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SR – receptori čistači (*engl.* Scavenger Receptors)
sWP – sonifikovani proteini surutke (*engl.* Sonicated Whey Proteins)
sWP/Ara – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze
sWP/Ara/PEG – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze i polietilen glikola molekulske mase 6000 Da
TBA – tiobarbiturna kiselina

TCA – trihlorsirćetna kiselina

TEER – transepitelijalni električni otpor (*engl.* Transepithelial Electrical Resistance)

TLR – Tol proteinu slični receptori (*engl.* Toll-like Receptors)

UHPLC – tečna hromatografija ultra-visokih performansi (*engl.* Ultra-High Performance Liquid Chromatography)

UV – ultraljubičasta (*engl.* UltraViolet)

VIS – vidljiva (*engl.* Visible)

WP – proteini surutke (*engl.* Whey Proteins)

WP/Ara – proteini surutke sa arabinozom

XO – ksantin oksidaza (*engl.* Xanthine Oxidase)

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Opšti deo.....	3
2.1. Majarova reakcija.....	3
2.1.1. Faktori koji utiču na Majarovu reakciju	4
2.2. Primena Majarove reakcije za poboljšanje tehnološko-funkcionalnih osobina proteina hrane.....	7
2.3. Alergije na hranu.....	8
2.3.1. Alergeni hrane	9
2.3.2. Alergeni kravljeg mleka	9
2.3.3. Zamene za kravlje mleko u humanoj ishrani	12
2.3.4. Kamilje mleko	12
2.4. Efekti Majarove reakcije na imunološke osobine alergena hrane	13
2.5. Industrijska prerada mleka.....	15
2.5.2. Sušenje raspršivanjem	15
2.5.3. Ultrazvučni tretman visokog intenziteta (Sonifikacija)	16
2.5.4. Makromolekulsko nagomilavanje	18
3. Ciljevi	20
4. Materijal i metode.....	22
4.1. Reagensi i rastvori.....	22
4.2. Modifikacija proteina kravlje surutke u Majarovoj reakciji tokom ultrazvučnog tretmana u uslovima makromolekulskog nagomilavanja	22
4.2.1. Priprema surutke kravljeg mleka.....	22
4.2.2. Ultrazvučni tretman visokog intenziteta	23
4.2.3. Praćenje formiranja Majarovih proizvoda - spektrofotometrijska i spektrofluorimetrijska merenja	23
4.2.4. Određivanje sadržaja slobodnih amino grupa	24

4.2.5. Određivanje sulfhidrilnih grupa	224
4.2.6. Elektroforetske analize	24
4.2.6.1. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)24	
4.2.6.2. Nativna elektroforeza	25
4.2.7. Spektroskopija cirkularnog dihroizma (CD)	25
4.2.8. Određivanje površinske hidrofobnosti	26
4.2.9. Vezivanje kongo crvenog i tioflavina T za proteine kravlje surutke	26
4.2.10. Određivanje proteinskih karbonila	26
4.2.11. Određivanje proteinskih hidroperoksida i ukupnih hidroperoksida	27
4.2.12. Temperaturna i pH stabilnost proteina kravlje surutke	27
4.2.13. Antioksidativni testovi	28
4.2.13.1. Moć uklanjanja DPPH radikala	28
4.2.13.2. Ukupna redukujuća moć	28
4.2.13.3. Test inhibicije lipidne peroksidacije	28
4.2.14. Statistička obrada podataka	29
4.3. Modifikacije alergena kamiljeg mleka u Majarovoj reakciji tokom tretmana sušenja raspršivanjem	29
4.3.1. Sušenje raspršivanjem kamiljeg mleka	29
4.3.2. Rekonstituisanje kamiljeg mleka u prahu	29
4.3.3. Elektroforetske analize	30
4.3.4. Gel-filtraciona analiza solubilne frakcije kamiljeg mleka u prahu	30
4.3.5. Praćenje ranih, intermedijernih i kasnih faza Majarove reakcije	31
4.3.6. Određivanje sadržaja slobodnih amino grupa	32
4.3.7. Spektroskopija cirkularnog dihroizma	32
4.3.8. Određivanje površinske hidrofobnosti	33
4.3.9. Rastvorljivost proteina kamiljeg mleka u prahu	33

4.3.10. Antioksidativna moć kamiljeg mleka u prahu.....	33
4.3.10.1 Ukupna redukujuća moć.....	33
4.3.10.2. Sposobnost uklanjanja ABTS radikala.....	34
4.3.11. Statistička obrada podataka.....	34
4.4. Modifikacije glavnog alergena kravljeg mleka, BLG-a, u Majarovoj reakciji tokom tretmana zagrevanja u rastvoru (<i>engl.</i> wet-heating).....	34
4.4.1. Prečišćavanje i priprema kravljeg BLG-a.....	34
4.4.2. Modifikacija kravljeg BLG-a u Majarovoj reakciji tretmanom zagrevanja u rastvoru.....	35
4.4.3. Karakterizacija BLG-a glikovanog u Majarovoj reakciji.....	35
4.4.4. Transport alergena kroz Caco-2 ćelijski monosloj.....	36
4.4.5. Dobijanje dendritskih ćelija iz kostne srži.....	37
4.4.6. Preuzimanje alergena od strane dendritskih ćelija.....	38
4.4.7. Inhibicija endocitoze.....	38
4.4.8. Konfokalna mikroskopija.....	39
4.4.9. Praćenje endolizozomalne degradacije.....	39
4.4.10. Mešovita kultura dendritskih ćelija i BLG-specifičnih CD4 ⁺ T-ćelija.....	40
4.4.11. Umrežavanje FcεRI receptora nativnim i glikovanim BLG-om u prisustvu himernih anti-BLG IgE antitela.....	42
4.4.12. Statistička obrada podataka.....	42
5. Rezultati i diskusija.....	43
5.1. Modifikacije proteina kravljeg mleka u Majarovoj reakciji tokom tretmana ultrazvukom u uslovima makromolekulskog nagomilavanja: karakterizacija i funkcionalne osobine.....	43
5.1.1. Praćenje formiranja Majarovih proizvoda tokom ultrazvučnog tretmana	43
5.1.2. Karakterizacija glikokonjugata proteina kravlje surutke elektroforetskim analizama.....	47

5.1.3. Promene u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina kravlje surutke	49
5.1.4. Oksidativne modifikacije proteina kravlje surutke	51
5.1.5. Formiranje struktura sličnih amiloidu	54
5.1.6. Temperaturna stabilnost i stabilnost na različitim pH vrednostima.....	56
5.1.7. Antioksidativne osobine	57
5.2. Modifikacije alergena kamiljeg mleka u Majarovoj reakciji tokom tretmana sušenja raspršivanjem: karakterizacija i funkcionalne osobine	59
5.2.1. Elektroforetska karakterizacija proteina kamiljeg mleka u prahu dobijenog tretmanom sušenja raspršivanjem	60
5.2.2. Karakterizacija proteina rastvorne frakcije kamiljeg mleka u prahu	62
5.2.2.1. Analiza proteina rastvorne frakcije kamiljeg mleka u prahu razdvojenih gel-filtracijom	62
5.2.2.2. Praćenje stepena Majarove reakcije u rastvornoj frakciji kamiljeg mleka u prahu	64
5.2.2.3. Analiza sekundarnih struktura i površinske hidrofobnosti proteina rastvorne frakcije kamiljeg mleka u prahu	67
5.2.2.4. Ispitivanje rastvorljivosti proteina kamiljeg mleka u prahu dobijenog tretmanom sušenja raspršivanjem i liofilizacijom	69
5.2.3 Antioksidativna aktivnost kamiljeg mleka u prahu i njegovih rastvornih frakcija.....	71
5.3. Modifikacije glavnog alergena kravljeg mleka, β -laktoglobulina, u Majarovoj reakciji tokom tretmana zagrevanja u rastvoru: karakterizacija i imunološke osobine	72
5.3.1. Karakterizacija glikovanog BLG-a SDS-PAGE analizom i cirkularnim dihroizmom	73
5.3.2. Step en glikovanja BLG-a	75
5.3.3. Glikovanje BLG-a smanjuje transport kroz Caco-2 ćelijski monosloj	76

5.3.4. Glikovanje BLG-a povećava preuzimanje alergena od strane dendritskih ćelija	77
5.3.5. Dendritske ćelije internalizuju BLG putem receptorom-posredovane endocitoze, preko SR-a	78
5.3.6. Glikovani BLG je podložniji endolizozomalnoj degradaciji unutar dendritskih ćelija	81
5.3.7. Glikovani BLG izaziva slabije lučenje citokina od strane CD4 ⁺ T-ćelija.....	82
5.3.8. Glikovanje BLG-a smanjuje aktivaciju bazofila	84
6. Zaključci	88
7. Literatura	91

1. Uvod

Majarova reakcija je neenzimska reakcija između redukujućih šećera i jedinjenja sa slobodnom amino grupom, kao što su proteini, i realizuje se tokom termičke obrade i skladištenja hrane. Hemija ove reakcije je veoma kompleksna. Kao proizvodi se dobijaju modifikovani proteini (mogu biti glikovani, oksidovani, umreženi) i širok spektar malih molekula. Proizvodi Majarove reakcije odgovorni su za miris, ukus i boju termički obrađene hrane.

Proteini kravlje surutke nalaze široku primenu kao sastojci u brojnim prehrambenim proizvodima, gde se dodaju radi poboljšanja nutritivne vrednosti i zbog svojih funkcionalnih osobina kao što su zgušnjavanje, geliranje, emulgovanje i penjenje. Funkcionalne osobine proteina surutke mogu biti dodatno poboljšane kovalentnim vezivanjem šećera u Majarovoj reakciji. Ovakve modifikacije proteina se smatraju prirodnim, jer za realizaciju reakcije nije potrebno uvođenje dodatnih hemijskih reagenasa. Da bi se ovakvi konjugati proizvodili kao funkcionalni sastojci hrane, potrebno je razvijanje i optimizacija tehnoloških procesa za njihovu pripremu. Primena ultrazvuka visokog intenziteta (sonifikacija) je nova, netermička, metoda za obradu hrane koja pod blagim reakcionim uslovima ubrzava Majarovu reakciju. Makromolekulsko nagomilavanje podrazumeva prisustvo visokih koncentracija rastvorenih makromolekula. U saglasnosti sa teorijom iskludovane zapremine, uslovi makromolekulskog nagomilavanja nespecifično ubrzavaju hemijske reakcije. Kombinovana primena ultrazvuka i makromolekulskog nagomilavanja radi ubrzavanja Majarove reakcije i poboljšanja funkcionalnih osobina proteina surutke je ispitana u ovoj tezi.

Ishrana čoveka u razvijenim delovima sveta podrazumeva konzumaciju velike količine termički visoko procesovane hrane u kojoj dolazi do nekontrolisane Majarove reakcije. Procenjuje se da je dnevni unos kasnih Majarovih proizvoda putem ishrane oko 25 – 75 mg. Strukture kasnih Majarovih proizvoda glikovanih proteina, a posebno alergena hrane, interaguju sa ćelijama imunskog sistema i utiču na imunogenost i alergnost proteina, koje mogu biti bilo povećane, bilo smanjene, u zavisnosti od alergena i tretmana kojim je izazvano glikovanje. Efekti Majarove reakcije na

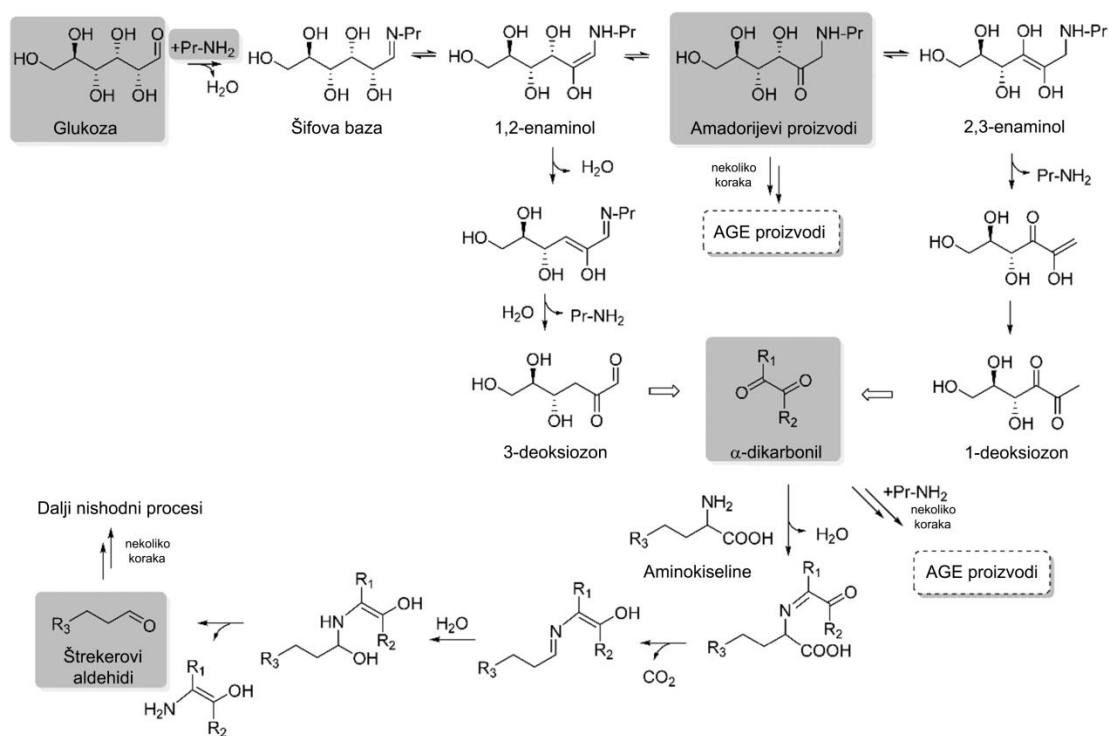
alergenost proteina hrane nisu potpuno razjašnjeni do danas. Deo ove disertacije je posvećen interakcijama visoko glikovanog glavnog alergena kravljeg mleka, β -laktoglobulina (BLG), sa ćelijama imunskog sistema.

Alergije na kravlje mleko spadaju među najčešće alergije na hranu kod beba i dece i pogađaju 2-6% dečije populacije. Kamilje mleko predstavlja jedinstvenu zamenu za kravlje mleko. Iako je kazeinska frakcija kravljeg i kamiljeg mleka slična, frakcija surutke se značajno razlikuje po tome što ne sadrži potentni alergen mleka, BLG. Odsustvo BLG-a karakteristično je i za humano mleko. Jedan od načina pogodnih za procesovanje kamiljeg mleka, jeste primena konvencionalne metode, sušenja raspršivanjem (*engl.* spray-drying), kojom se može dobiti kamilje mleko u prahu, ali i formule za odojčad na bazi kamiljeg mleka. U ovoj disertaciji su ispitani efekti sušenja raspršivanjem, naročito u zavisnosti od ulazne temperature, kao jednog od važnih parametara sušenja, na Majarovu reakciju, kvalitet proizvoda i fizičko-hemijske osobine proteina kamiljeg mleka.

2. Opšti deo

2.1. Majarova reakcija

Majarova reakcija je reakcija koja se spontano odvija u prirodi, a započinje kondenzacijom između amino i karbonilne grupe nakon čega sledi kompleksna reakciona kaskada (Shema 1). Nazvana je po francuskom naučniku Lui Kamiju Majaru (Louis Camille Maillard) koji je opisao reakciju 1912. godine [1]. U biološkim sistemima, amino grupa najčešće potiče iz proteina ili peptida (bočni aminoiselinski ostaci lizina i arginina ili N-terminalna amino grupa). Karbonilna grupa najčešće potiče od redukujućih šećera. Nakon inicijalne reakcije kondenzacije nastaju imini (stariji naziv: Šifove baze) koji se premeštanjem prevode u Amadorijeve (Amadori) (u slučaju aldoza) ili Hejnsove (Heyns) (u slučaju ketoza) proizvode [2]. Amadorijevi i Hejnsovi proizvodi podležu keto-enolnoj tautomeriji i reakcijama dehidracije, deaminacije i fragmentacije, nakon čega se prevode u reaktivne α -dikarbonile, vrste koje lako stupaju u reakciju sa drugim nukleofilima kao što su amini, guanidini i tioli. Ovi intermedijeri mogu podleći Štrekerovoj (Strecker) degradaciji kondenzacijom sa slobodnim amino grupama, formirajući imine, koji se dalje fragmentišu u Štrekerove aldehide. Dalje nishodne reakcije uključuju formiranje kasnih proizvoda glikovanja (*engl.* Advanced Glycation Endproducts – AGE), kao što su N- ϵ -(karboksimetil)lizin (CML), N- ϵ -(karboksietil)lizin (CEL), piralin, metilglioksal-lizin dimer (MOLD), glioksal-lizin dimer (GOLD) i pentozidin, koji su svi modifikacije lizina. MOLD, GOLD i pentozidin su umrežena jedinjenja preko dva lizilska ostatka (MOLD i GOLD), ili jednog lizil i jednog arginil ostatka (pentozidin). Arginin takođe može biti modifikovan do izomera hidroimidazolinona. Drugi reaktivni intermedijarni proizvodi Majarove reakcije uključuju furfural, 5-(hidroksimetil)furfural (HMF), reduktone i akril-amid. Na kraju se formiraju velika polimerna jedinjenja, melanoidini, koja apsorbuju u vidljivom (*engl.* Visible – VIS) delu elektromagnetnog spektra i uzrokuju tamnjenje [2, 3]. Majarova reakcija se dešava tokom procesovanja i skladištenja hrane i u naukama o hrani poznata je kao neenzimsko tamnjenje. Takođe, ova reakcija se dešava i *in vivo*, posebno u slučaju dijabetesa i tokom starenja organizma, i u medicini je poznata kao glikovanje proteina ili glikooksidacija [4].



Shema 1. Pojednostavljena shema Majarove reakcije. Redukujući šećer (glukoza) i amino grupa proteina formiraju Šifovu bazu koja se premeštanjem prevodi u Amadorijev proizvod. Amadorijev proizvod može podleći enolizaciji do 1,2-enaminola ili 2,3-enaminola koji formiraju deoksiozone (α-dikarbonilna jedinjenja), koji brzo reaguju sa dodatnim nukleofilima i daju Štrekerove aldehide. Brojni intermedijeri Majarove reakcije mogu nagraditi AGE proizvode, kao što je naznačeno na shemi. Preuzeto i prilagođeno iz [4].

Majarova reakcija predstavlja glavni izvor jedinjenja koja formiraju ukus, miris i boju termički obrađene hrane. U kasnim fazama reakcije, kada intermedijerni proizvodi reaguju sa drugim reaktivnim jedinjenjima, kao što su amini, aldehidi ili sulfhidrili, nastaju važne klase jedinjenja koje daju karakterističan ukus ili aromu (furani, pirazini, pirol, oksazoli, tiofeni, tiazoli i druga heterociklična jedinjenja) [5]. Veoma širok spektar isparljivih jedinjenja koja nastaju u ovoj reakciji uslovljen je velikim brojem različitih intermedijarnih proizvoda.

2.1.1. Faktori koji utiču na Majarovu reakciju

Brojni faktori utiču na Majarovu reakciju od kojih su najbitniji: tip šećera, tip aminokiselinskog ostatka, temperatura, pH vrednost, aktivitet vode, prisustvo puferskih supstanci, prisustvo kiseonika i prisustvo jona metala [6]. Kako su u Majarovoj reakciji

mogući brojni paralelni reakcioni putevi, svi oni mogu biti favorizovani u odnosu na ostale, pod određenim reakcionim uslovima.

Aldoze i ketoze reaguju različito u Majarovoj reakciji. Aldoze, kao što su glukoza, manoza, galaktoza i riboza, daju Amadorijeve intermedijere, dok ketoze, kao što su fruktoza, ribuloza, tagatoza, daju Hejnsove intermedijere [7]. Takođe, kinetika reakcije je specifična za svaki individualni šećer, pri čemu monosaharidi generalno reaguju brže od disaharida [8], a pentoze reaguju brže od heksoza [9].

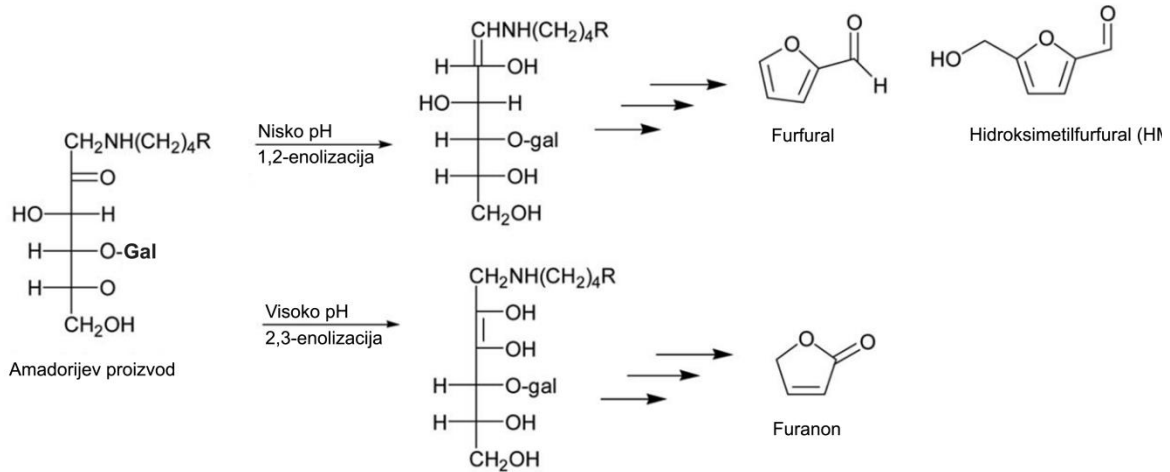
Amini koji učestvuju u Majarovoj reakciji u biološkim sistemima su nukleotidi, aminofosfolipidi i proteini [10]. Bočni ostaci lizina i arginina iz polipeptidnih nizova se najčešće modifikuju. Histidin, prolin i triptofan takođe učestvuju u reakciji ali sporijom kinetikom.

U zavisnosti od tipa jedinjenja iz kojeg potiče amino grupa mogu nastati različiti proizvodi. Različite amino kiseline zagrevane sa glukozom daju proizvode koji doprinose čitavom spektru različitih ukusa. Tako na primer, proizvodi alanina će dati voćno-slatki, glicina karamel-slatki, a histidina kiseli ukus [11]. U reakcijama proteina sa šećerima, jedinjenja koja daju ukus uglavnom nastaju degradacijom Amadorijevih proizvoda [8].

pH vrednost rastvora je veoma važan faktor na početku reakcije. Sa povećanjem pH vrednosti, pomera se ravnoteža saharida od ciklične, zatvorene, prema otvorenoj formi koja stupa u reakciju kondenzacije. Takođe, sa povećanjem pH vrednosti se povećava i reaktivnost amino grupe, koja u deprotonovanoj formi lakše podleže kondenzaciji [7]. Nakon formiranja Amadorijevih proizvoda, pH vrednost ima važan uticaj na reakcioni tok; u kiselim uslovima favorizovan je put prema 1,2-enolizaciji, a u baznim uslovima prema 2,3-enolizaciji (Shema 2). Različiti putevi vode do formiranja različitih proizvoda. Tako 2,3-enolizacijom nastaje furanon, a 1,2-enolizacijom nastaju furfural i HMF [6].

Tokom same Majarove reakcije nastaju organske kiseline, koje snižavaju pH vrednost. Ova promena u pH vrednosti može biti puferisana slobodnim amino grupama proteina prisutnih u hrani. U odsustvu puferskih supstanci, u slučaju kasnih faza

reakcije, kada su amino grupe već glikovane, pad pH vrednosti može biti značajan i tada se povećava brzina alternativnih reakcija čiji je mehanizam katalizovan kiselinama.



Shema 2. Mogući putevi enolizacije u zavisnost od pH vrednosti. Legenda: Gal – galaktoza, R – proteinski polipeptidni niz. Preuzeto i prilagođeno iz [6].

Temperatura je ključan faktor koji ubrzava reakciju nakon inicijalne kondenzacije, posebno iznad 100 °C i značajno utiče na stepen realizacije Majarove reakcije. Relativne brzine različitih reakcionih puteva takođe zavise od temperature [7]. Poznato je da termički obrađena hrana, tretirana na višim temperaturama, sadrži više isparljivih jedinjenja koja određuju njen miris [12, 13].

Aktivitet vode (a_w) u reakcionom sistemu je parametar koji opisuje koliko vode je dostupno za učestvovanje u reakcijama. Definiše se jednačinom:

$$a_w = P/P_0$$

gde je P parcijalni pritisak vode u sistemu, a P_0 parcijalni pritisak čiste vode [14]. Optimalni a_w za Majarovu reakciju je između 0.5 i 0.8. Aktivitet vode se u prehrambenim proizvodima kreće u veoma širokom opsegu. Primera radi, u mleku je ova vrednost visoka ($a_w > 0.95$), a u mleku u prahu niska ($a_w < 0.2$). Tokom Majarove reakcije dolazi do brojnih reakcija dehidracije koje stvaraju dodatne molekule vode i u razblaženom rastvoru sa visokim aktivitetom vode i niskim koncentracijama reaktanata, Majarova reakcija će biti usporena. U sistemu sa niskim aktivitetom vode, koncentracije reaktanata su visoke, ali su koeficijenti difuzije smanjeni, što takođe dovodi do

usporavanja Majarove reakcije [15]. Kod mleka u prahu je niska vrednost a_w važna za očuvanje ukusa i kvaliteta tokom produženog skladištenja [16].

Joni metala takođe mogu uticati na tok Majarove reakcije formiranjem kompleksa sa aminokiselinama. Reakcija može biti katalizovana jonima bakra i gvožđa, ili inhibirana jonima mangana i cinka. Joni kalcijuma takođe mogu usporiti reakciju formiranjem kompleksa sa određenim šećerima, što je od značaja za realizaciju Majarove reakcije u mlečnim proizvodima koji su bogati jonima kalcijuma [17].

2.2. Primena Majarove reakcije za poboljšanje tehnološko-funkcionalnih osobina proteina hrane

Funkcionalne osobine nativnih proteina se mogu značajno poboljšati konjugovanjem sa šećerima u Majarovoj reakciji. Kako je Majarova reakcija spontana, ona, za razliku od drugih strategija za unapređenje funkcionalnih osobina proteina, ne zahteva dodavanje eksternih hemijskih jedinjenja, što je od naročitog značaja u prehrambenoj industriji. Brojne studije su pokazale da proteini modifikovani u Majarovoj reakciji poseduju poboljšane sposobnosti za emulgovanje i penjenje, povećanu rastvorljivost i temperaturnu stabilnost, kao i povećanu antioksidativnu moć [18-20].

Proizvodi Majarove reakcije između proteina i saharida poseduju funkcionalne osobine i proteina i saharida. Tako glikokonjugati imaju emulziona svojstva proteina i stabilizujući efekat saharida. Hidrofobni ostaci denaturisanih proteina se mogu ukotviti u lipidnu fazu dok se hidrofilni saharidni ostaci orijentišu prema okolnoj vodi. Na ovaj način se smanjuje interakcija među kapima emulzije i sprečava se sjedinjavanje kapi. Tako Majarovi proizvodi proteina, u poređenju sa nativnim proteinima, poseduju izuzetne emulzione sposobnosti. Oni daju emulzije povećane stabilnosti, čak i pri povišenim temperaturama, i karakterišu se kapima manjeg dijametra u poređenju sa emulzijama sa nativnim proteinima [20-22].

Kada se globularni proteini (npr. lizozim, goveđi serum albumin (*engl.* Bovine Serum Albumin – BSA), proteini soje ili BLG) zagrevaju u prisustvu šećera malih molekulskih masa, dolazi do formiranja gelova koji su otporniji na pucanje u poređenju

sa gelovima dobijenim u odsustvu šećera. Takođe, što je šećer reaktivniji u Majarovoj reakciji (i što je stepen realizacije Majarove reakcije viši), dobijeni gel je snažniji i tamnije boje [18, 23]. Povećana otpornost i čvrstina gela se objašnjavaju formiranjem kovalentnih veza i umrežavanjem proteina tokom Majarove reakcije [18].

Pokazana je antioksidativna aktivnost mnogih jedinjenja koja se formiraju tokom Majarove reakcije, od Amadorijevih proizvoda do melanoidina [24]. Mehanizmi antioksidativne aktivnosti Majarovih proizvoda obuhvataju sposobnost heliranja jona metala, prekidanje lančanih slobodno-radikalnih reakcija, razgradnju vodonik peroksida, uklanjanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (*engl.* Reactive Oxygen Species – ROS) [25]. Antioksidativna aktivnost je najviše proučavana u model sistemima aminokiselina - šećer ili protein - šećer, pri čemu je zapažena jača antioksidativna moć Majarovih proizvoda nastalih u model sistemu aminokiselina - šećer nego u sistemu protein - šećer [26, 27]. Takođe, Majarovi proizvodi sa antioksidativnom aktivnošću su izolovani i iz termički tretirane hrane, kao što su različita peciva, hleb ili testenine [28-30].

2.3. Alergije na hranu

Alergije na hranu predstavljaju značajan zdravstveni problem u razvijenim zemljama sveta gde pogađaju 5–8% dečije populacije i 2–4% odrasle populacije, uz konstantan porast u poslednjim decenijama [31-33]. U ovim zemljama dolazi i do značajnih promena u obrascima senzitivizacije, sve većeg broja alergene hrane i sve ozbiljnijih alergijskih reakcija [34]. Interesantno je da je nedavno nađen značajan porast učestalosti alergija na hranu u regionima sa brzim ekonomskim rastom i urbanizacijom, kao što je Kina [35].

Mehanizam alergija na hranu posredovanih imunoglobulinom (Ig) E (tip I alergija) se sastoji iz dve faze: faze senzitivizacije i faze reakcije preosetljivosti. Do faze senzitivizacije dolazi kada se imunski sistem izloži alergenu hrane, inače bezopasnom antigenu i umesto indukcije oralne tolerancije, aktiviraju se naivne B-ćelije koje postanu plazma ćelije koje sekretuju IgE. Alergen-specifična IgE antitela se zatim vežu za FcεRI, receptor visokog afiniteta za IgE, na površini tkivnih mastocita ili bazofila iz cirkulacije. Prilikom sledećeg izlaganja alergenu dolazi do umrežavanja IgE antitela

vezanih za FcεRI, što vodi do degranulacije bazofila ili mastocita i oslobađanja medijatora alergijske reakcije [36, 37]. Simptomi koji se javljaju mogu biti umereni ili ozbiljni, a zahvataju kožu, gastrointestinalni trakt, kardiovaskularni i/ili respiratorni sistem. Najozbiljniji simptom je anafilaktička reakcija, koja zahvata celo telo, otežava disanje, uzrokuje dramatičan pad krvnog pritiska i može imati fatalni ishod [38].

2.3.1. Alergeni hrane

Uprkos velikom broju identifikovanih alergena i poznavanju njihove strukture i aminokiselinske sekvence, nađen je samo mali broj biohemijskih karakteristika koje mogu biti pripisane alergenima hrane, a to su otpornost na ekstremne uslove tokom obrade hrane, otpornost na enzime humanog gastrointestinalnog trakta i mogućnost interagovanja sa ćelijama imunskog sistema [39, 40].

Alergeni hrane potiču iz približno 90 različitih izvora, od kojih je oko 70% biljnog, a oko 30% životinjskog porekla. Najveći broj biljnih i životinjskih alergena hrane može se svrstati u samo nekoliko proteinskih familija i to su familije prolamina, tropomiozina, kupina, profilina, kazeina, oleozina i lipokalina [41]. Međutim, pripadanje proteina jednoj od ovih proteinskih familija ne može biti dovoljno da se protein svrsta u alergene. Različiti faktori mogu olakšati prikazivanje proteina hrane imunskom sistemu, primarno preko gastrointestinalnog trakta, kao što su: povećana stabilnost vezivanjem različitih liganada, veliki broj disulfidnih veza, oligomerizacija ili agregacija, glikozilacija, glikovanje i potencijalne interakcije sa ćelijskim membranama ili lipidnim strukturama. Neke biohemijske karakteristike, kao što su prisustvo brojnih linearnih IgE epitopa i otpornost proteina na digestiju i obradu, se veoma često javljaju kao zajedničke osobine alergena hrane, češće nego neke strukturne sličnosti [42].

Iako je humana ishrana veoma raznovrsna, samo osam vrsta namernica predstavlja izvor gotovo polovine identifikovanih alergena i to su: mleko, jaja, kikiriki, orašasto voće, školjke, riba, pšenica i soja – takozvanih velikih 8 (*engl.* Big 8) [43].

2.3.2. Alergeni kravljeg mleka

Alergija na kravlje mleko je jedna od najčešćih alergija na hranu. Tipično se razvija u ranom detinjstvu i često se prevazilazi nakon treće godine starosti [44]. Može

se javiti i u odraslom dobu, ali su tada simptomi ozbiljniji i najčešće je trajnog karaktera [45, 46]. Kao jedini efikasan tretman preporučuje se potpuna eliminacija proteina mleka iz ishrane. Alergeni mleka su prisutni u velikom broju proizvoda kao što su sir, jogurt, peciva, konditorski proizvodi, ali i u brojnim drugim proizvodima jer se proteini mleka koriste kao aditivi hrani, što čini njihovo izbegavanje zahtevnim u svakodnevnom životu [47].

Kravlje mleko sadrži oko 3 g proteina u 100 ml. Proteinsku frakciju mleka čini najmanje 25 različitih proteina, od kojih svi mogu biti alergeni [48]. Proteini kravljeg mleka dele se u dve frakcije koje se mogu razdvojiti na osnovu njihove rastvorljivosti na pH=4.6 na 20 °C [49]. U frakciji koja pod navedenim uslovima precipitira, tzv. kazeinska frakcija, nalaze se: α_{s1} -kazein, α_{s2} -kazein, β -kazein, i κ -kazein. Frakcija koja ostaje rastvorna, poznata kao proteini surutke, sadrži BLG, α -laktalbumin (ALA), laktoferin (LF), BSA, i Ig. Kazeini čine oko 80%, a proteini surutke oko 20% proteina mleka. Kazeini, BLG i ALA predstavljaju glavne alergene mleka, dok su LF, BSA i Ig prisutni u nižim koncentracijama u mleku, ali takođe imaju važnu ulogu u indukovanju alergijske reakcije [50]. Pregled alergena kravljeg mleka je dat u tabeli 1.

Kazeini imaju fleksibilnu i nekompaktnu tercijarnu strukturu, sa visokom površinskom hidrofobnošću i veoma su podložni degradaciji proteolitičkim enzimima. Kao takvi predstavljaju slabe imunogene. Gastrointestinalnu barijeru ne prelaze transcitozom kroz enterocite, već bivaju preuzeti kroz Pejerove ploče i zbog toga ne izazivaju anafilaktičku reakciju prilikom oralne administracije [51]. Ipak, kazeini čine značajnu frakciju (80%) proteina kravljeg mleka i veliki procenat pacijenata ima IgE antitela na kazeine. Približno 55% pacijenata prepoznaje α_{s1} -kazein, 90% α_{s2} -kazein, 15% β -kazein i 50% κ -kazein [52].

Glavni alergeni surutke su globularni BLG (Bos d 5) i ALA (Bos d 4), koji čine 50% i 25% proteina surutke, redom, dok su manje zastupljeni, ali takođe važni alergeni, BSA (Bos d 6) i Ig (Bos d 7) [53]. Za razliku od kazeina, proteini surutke imaju uređene sekundarne, tercijarne, i, u slučaju BLG-a, kvaternarne strukture i sadrže intramolekulske disulfidne mostove koji stabilizuju njihove strukture [49]. Njihova trodimenzionalna struktura ima važnu ulogu u održavanju konformacionih epitopa čime doprinosi alergenom potencijalu ovih proteina [53].

Tabela 1. Pregled alergena kravljeg mleka. Legenda: ak – aminokiselinski ostatak. Preuzeto i prilagodeno iz [47].

Frakcija	Proteinska superfamilija	Biohemijska klasifikacija	Alergen	Mm (kDa)
Kazeini	Kazeini	Kazeini svi	Bos d 8	20 – 30
		α_{s1} -kazein	Bos d 9	23.6 (199 ak)
		α_{s2} -kazein	Bos d 10	25.2 (207 ak)
		β -kazein	Bos d 11	24 (209 ak)
		κ -kazein	Bos d 12	19 (169 ak)
Proteini surutke	Lizozim	α -laktalbumin	Bos d 4	14.2 (123 ak)
	Lipokalin	β -laktoglobulin	Bos d 5	18.3 (162 ak)
	Serum albumin	Govedi serum albumin	Bos d 6	66.3 (582 ak)
	Imunoglobulin	Imunoglobulini	Bos d 7	160

ALA je monomerni globularni Ca-vezujući metaloprotein koji pripada familiji glikozil-hidrolaza. Ima 4 disulfidna mosta, stabilan je na tretman visokim temperaturama i poseduje sposobnost ponovnog uvijanja [54]. Učestalost ALA-specifičnog IgE u populaciji pacijenata alergičnih na kravlje mleko je između 27.6% - 62.8% [55].

BLG je retinol-vezujući protein koji pripada lipokalinskoj superfamiliji. Vezuje različite molekule kao što su holesterol, vitamin D2, zasićene i nezasićene masne kiseline, Cu^{2+} i Fe^{2+} jone, hidrofobne ligande poput retinola i poseduje antioksidativnu aktivnost. Nalazi se u formi dimera od 36 kDa sa dve glavne izoforme, A i B, koje se razlikuju u dve tačkaste mutacije. Pored dva disulfidna mosta ima i jednu slobodnu sulfhidrilnu grupu koja je odgovorna za sulfhidril-disulfid interakcije sa κ -kazeinom tokom termičkog tretmana preko 75 °C. BLG je relativno otporan na kiselu hidrolizu i dejstvo proteaza. Ove karakteristike mu omogućavaju delimično očuvanu strukturu nakon digestije, apsorpciju kroz intestinalnu mukozu i prezentovanje ćelijama imunskog sistema, što ovom proteinu daje visok alergeni potencijal [50, 56-58]. Poseduje veliki broj konformacionih i linearnih epitopa i čak do 76% alergičnih pacijenata prepoznaje BLG [59].

2.3.3. Zamene za kravlje mleko u humanoj ishrani

U humanoj ishrani se pored kravljeg mleka koriste i mleka mnogih drugih domaćih životinja (ovčije, kozje, kamilje, kobilje i magareće). Kod pacijenata alergičnih na kravlje mleko, usled konzumiranja mleka drugih vrsta, može doći do ukrštene reaktivnosti usled visoke homologije među njihovim proteinima. Neke studije su pokazale da je kozje mleko slabije alergeno od kravljeg. Iako sadrži iste proteine kao i kravlje, genetski polimorfizmi u nekoliko proteina odgovorni su za slabiji alergeni potencijal [60]. Međutim, kozje mleko nosi visoki rizik od ukrštene reaktivnosti između kazeinskih frakcija. S toga su internacionalne preporuke da se ne koristi kozje mleko u slučaju alergijskih reakcija na kravlje [61]. Slične preporuke postoje i za ovčije mleko usled rizika od ukrštene reaktivnosti [62]. Takođe, mnogi od ovih alternativnih izvora mleka ne zadovoljavaju nutritivne potrebe dece mlađe od tri godine.

2.3.4. Kamilje mleko

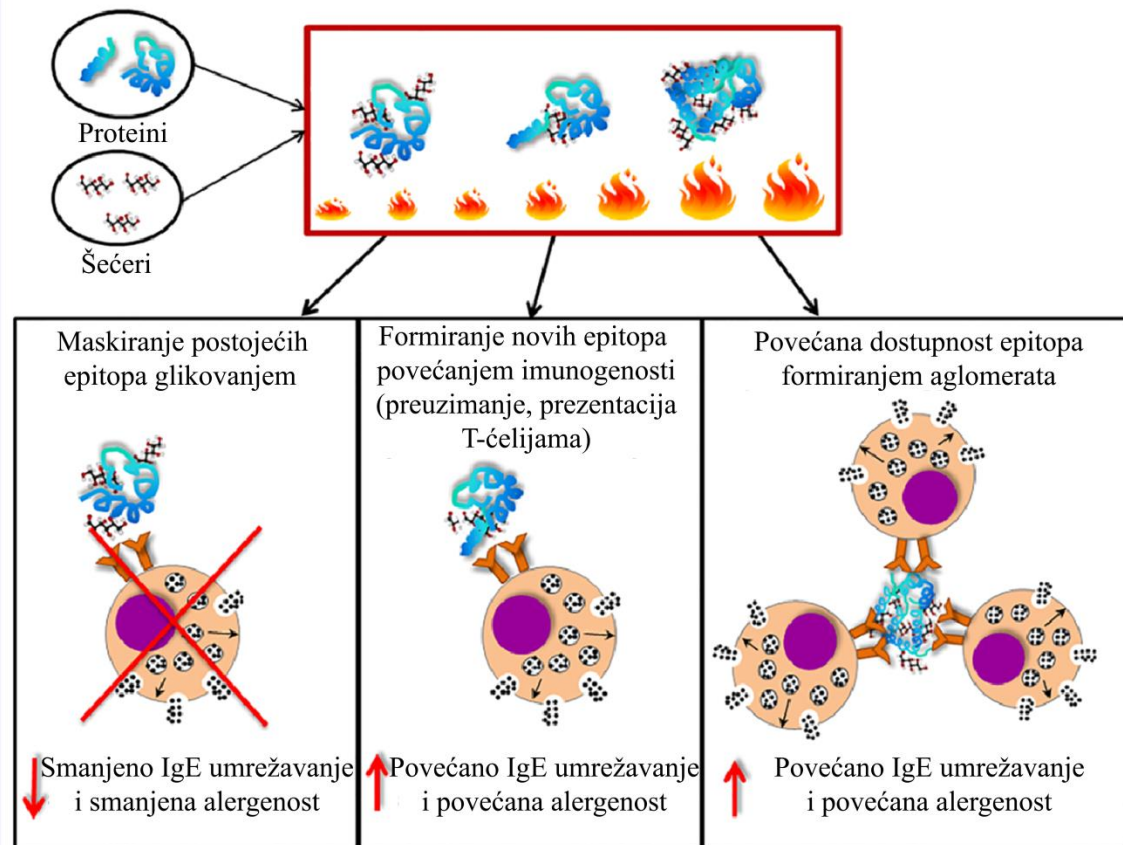
Kamilje mleko ima važnu nutritivnu ulogu u sušnim i polusušnim oblastima. Sličnog je sastava kao kravlje mleko, sa sličnom količinom laktoze, nešto višim sadržajem lipida (1-2 g α -linoleinske i linoleinske kiseline u 100 g totalnih lipida) i nižim sadržajem zasićenih masnih kiselina. Najznačajnija karakteristika kamiljeg mleka tiče se njegovog proteinskog sastava koji je najbliži humanom mleku. Naime, za razliku od kravljeg mleka, a slično humanom mleku, u kamiljem mleku se ne zapaža prisustvo BLG-a, glavni protein surutke je ALA, najzastupljeniji kazein je β -kazein, a nivo α -kazeina je nizak. Ove karakteristike omogućavaju lakše varenje kamiljeg mleka i nižu incidencu alergija u poređenju sa kravljim mlekom. Takođe, kamilje mleko je bogato u sadržaju bioaktivnih i antimikrobnih supstanci (lizozim, LF, Ig) i vitamina C (čak do 18.4 mg/100 g) [63, 64].

Danas, kamilje mleko predstavlja najbolju alternativu kravljem mleku jer pokazuje najniži stepen sličnosti sa proteinima kravljeg mleka koji iznosi oko 60%. Brojne studije su pokazale hipoalergeni potencijal kamiljeg mleka [65, 66].

2.4. Efekti Majarove reakcije na imunološke osobine alergena hrane

Majarova reakcija, pored poboljšanja tehnološko-funkcionalnih osobina, ostvaruje efekte na biološke i imunološke osobine proteina hrane. Pokazano je da glikovanje alergena hrane dovodi do promena u prepoznavanju alergena od strane IgE antitela. Maskiranje linearnih i konformacionih epitopa dovodi do smanjenja alergenosti [67, 68], dok formiranje novih antigena ili otkrivanje epitopa, povećava preoznavanje IgE antitelima [69-71] (Shema 3).

Novija istraživanja pokazuju da su efekti glikovanja na imunogenost i alergenost proteina hrane značajniji od jednostavnog IgE prepoznavanja. Antigen-prezentujuće ćelije imunskog sistema, dendritske ćelije i makrofagi, preko receptora za prepoznavanje obrazaca (*engl.* Pattern Recognition Receptors – PRR), koje eksprimiraju na svojoj površini, prepoznaju proizvode Majarove reakcije, posebno AGE strukture. PRR imaju ulogu senzora koji detektuju molekule tipične za patogene, ali mogu prepoznati i komponente hrane. PRR koji prepoznaju AGE strukture su receptori čistači (Scavenger Receptors – SR) klase A, B, E i H, galektin-3, Tol proteinu slični receptori (*engl.* Toll-like Receptors - TLRs) i receptori za kasne proizvode glikovanja (*engl.* Receptors for Advanced Glycation Endproducts – RAGE) [72-74]. SR posreduju u endocitozi i efikasno transportuju ligande do ćelijskih odeljaka gde se oni obrađuju i vezuju za molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (*engl.* Major Histocompatibility Complex – MHC) klase II, nakon čega se antigeni peptidi prikazuju CD4⁺ T-ćelijama. Glikovanje ovalbumina, glavnog alergena jaja, u Majarovoj reakciji poboljšava preuzimanje alergena od strane dendritskih ćelija vezivanjem za SR klase A, što dalje vodi do povećane aktivacije ovalbumin-specifičnih CD4⁺ T-ćelija i povećane produkcije ovalbumin-specifičnih IgE antitela [75, 76]. Glikovani alergeni hrane mogu biti obrađeni od strane ćelija imunskog sistema tako da povećavaju T-ćelijsku imunogenost i smanjuju dozu alergena koja izaziva senzitivaciju u poređenju sa nativnim alergenima.



Schema 3. Promene alergnosti proteina hrane modifikovanih u Majarovoj reakciji. Tokom obrade hrane redukujući šećeri reaguju sa primarnim amino grupama proteina i/ili alergena i grade proizvode Majarove reakcije. Na ovaj način se mogu maskirati postojeći IgE epitopi i sprečiti vezivanje alergena za IgE antitela i njihovo umrežavanje, čime se smanjuje alergenoost modifikovanih alergena. Alternativno, proizvodi Majarove reakcije mogu uzrokovati formiranje novih epitopa, što povećava preuzimanje alergena od strane antigen-prezentujućih ćelija i povećano prezentovanje T-ćelijama. Na taj način se povećava mogućnost umrežavanja IgE antitela na površini bazofila i povećava alergenoost. Na kraju, proizvodi Majarove reakcije mogu formirati aglomerate molekula alergena, podstičući umrežavanje IgE antitela, a time i alergenoost. Relativan odnos među nabrojanim mogućnostima određuje krajnji efekat na alergenoost. Preuzeto i modifikovano iz [77].

Važno pitanje u alergologiji jeste i da li AGE strukture imaju kapacitet da izazovu T-ćelijsku diferencijaciju u Th2 fenotip koji bi dalje vodio razvoju alergijske preosetljivosti tipa I. U mešanoj kulturi sa zrelim humanim dendritskim ćelijama pokazano je da AGE strukture β 2-glikoproteina I pokreću sazrevanje humanih dendritskih ćelija i polarizuju alogene naivne $CD4^+$ T-ćelije u Th2 ćelije [78]. RAGE receptori su intenzivno izučavani u kontekstu interakcija sa endogenim AGE strukturama (*in vivo* proizvodima Majarove reakcije) i poznati su kao inflamatorni

receptori uključeni u započinjanje inflamatornih signalnih puteva preko nuklearnog faktora κ B. Na mišjem modelu alergijske astme je pokazano da je ekspresija RAGE receptora na T-ćelijama ključna za razvoj Th1 odgovora i da deficijencija u RAGE receptoru vodi nastanku Th2 odgovora [79]. Ipak, do danas je malo poznato o interakcijama AGE struktura poreklom iz hrane sa RAGE receptorima i efektima na aktivaciju i funkciju antigen-prezentujućih ćelija i alergen-specifičnih T-ćelija [80].

2.5. Industrijska prerada mleka

Mleko i proteini mleka stižu do krajnjih potrošača u velikom broju različitih finalnih proizvoda pri čemu prolaze kroz različite vrste prerade. Mleko i mlečni proizvodi se najčešće prerađuju pasterizacijom, sterilizacijom ili tretmanom ultravisokim temperaturama kako bi se eliminisali patogeni iz tečnog mleka, fermentacija se koristi za proizvodnju jogurta, a evaporacija ili sušenje raspršivanjem za dobijanje kondenzata ili mleka u prahu [81]. Svaka prerada koja podrazumeva primenu visokih temperatura može dovesti do različitih promena u strukturi proteina kao što su parcijalno razvijanje, denaturacija, agregacija, ali i do hemijskih modifikacija kao što je glikovanje u Majarovoj reakciji. Kazeini su generalno temperaturno stabilni, ali dužina tretmana kao i prisustvo druge hrane tokom procesovanja mogu uticati na njihove fizičko-hemijske osobine [47]. Sa druge strane, proteini surutke su termolabilni. Visoke temperature uzrokuju sulfhidril-disulfid izmene glavnog proteina kravlje surutke, BLG-a, što dovodi do značajnih strukturnih promena i promena u njegovom alergenom potencijalu [47].

2.5.2. Sušenje raspršivanjem

Dehidracija mleka i mlečnih proizvoda se uobičajeno koristi kako bi se stabilizovali sastojci mleka tokom skladištenja i olakšalo transportovanje. Kravlje mleko u prahu nalazi široku primenu u prehrambenoj industriji kao sastojak brojnih mlečnih i drugih proizvoda koji poboljšava boju, ukus, teksturu i nutritivnu vrednost, ali i emulgujuća svojstva, geliranje i penjenje prehrambenih proizvoda. Najčešće primenjena tehnika za proizvodnju mleka u prahu je sušenje raspršivanjem. Ono podrazumeva da se prethodno upareno mleko rasprši u fine kapi koje ulaze u komoru sa strujom vrelog vazduha gde dolazi do brzog isparavanja vode [82]. Parametri sušenja raspršivanjem

koji su od značaja za fizičko-hemijske karakteristike mleka u prahu su: stepen uparenosti pred sušenje, ulazna i izlazna temperatura u komori i pritisak vazduha u mlaznicama. Primećeno je da se na višim ulaznim temperaturama formiraju čestice većeg dijametra sa manje slobodnih masti na površini čestica, smanjujući lipidnu peroksidaciju u mleku u prahu tokom skladištenja i ima pozitivne efekte na kvalitet ukusa [83-85]. Visoka ulazna temperatura (178 °C) je takođe pokazana da poboljšava rastvorljivost koncentrata proteina mleka dobijenog sušenjem raspršivanjem [86].

Tokom sušenja, temperatura čestica mleka dostiže vrednosti koje su značajno niže od ulaznih temperatura jer se toplotna energija troši na isparavanje vode [87]. Ipak, proces sušenja raspršivanjem formira uslove pod kojima Majarova reakcija može biti ubrzana: nizak aktivitet vode usled uparavanja, visoke temperature i visoka koncentracija laktoze i proteina bogatih lizinskim ostacima. Laktozilacija proteina kravljeg mleka tokom sušenja je poznata u literaturi [88]. Visok stepen laktozilacije je nađen na proteinima obranog mleka u prahu koji su sušeni između 185 °C i 90 °C (ulazna i izlazna temperatura) [89]. Izlazna temperatura sušenja ima značajan efekat na stepen tamnjenja sira u prahu usled Majarove reakcije [90]. Pri ispitivanju efekata sušenja raspršivanjem na fizičke osobine kamiljeg mleka u prahu nađeno je da je ono svetlije boje i nižeg aktiviteta vode u odnosu na kravlje mleko u prahu [91].

2.5.3. Ultrazvučni tretman visokog intenziteta (Sonifikacija)

Ultrazvuk niske frekvencije (20 – 100 kHz) i visokog intenziteta je nova tehnologija velikog potencijala za primenu u procesovanju hrane [92, 93]. Danas se ultrazvučni tretman razvija ili kao zamena za tradicionalne metode ili kao udruženi (pred)tretman uz tradicionalne metode [94].

Ultrazvuk obuhvata zvučne talase čija je frekvenca iznad opsega radio talasa (>20 kHz). Prilikom prolaska ultrazvuka kroz tečnu sredinu dolazi do interakcija između ultrazvučnih talasa, tečnosti i rastvorenih gasova koje vode fenomenu poznatom kao akustična kavitacija. Pod uticajem akustičnog polja osciluju nukleusi rastvorenih gasova zbog fluktuirajućeg pritiska oko njih. Tokom oscilacija, rastvoreni gasovi i pare rastvarača difunduju u i van oscilujućeg mehura. Količina gasa ili pare koja difunduje u mehur tokom ekspanzione faze je veća od količine koja difunduje iz njega tokom

kompresione faze oscilacije mehura. To dovodi do rasta mehura do veličine rezonacionog opsega. Kada mehur dostigne veličinu rezonacionog opsega dolazi do njegovog naglog kolapsa, što generiše lokalna mesta veoma visoke temperature sa pritiskom od nekoliko hiljada bara [95]. Eksperimentalno određene temperature kreću se u opsegu 2 000 – 10 000 K, dok su teorijska predviđanja do 100 000 K [92]. Ultrazvuk u tečnoj sredini generiše brojne fizičke sile. U odsustvu akustične kavitacije javljaju se vibracije, zagrevanje i dinamično mešanje, dok akustična kavitacija dodatno generiše mikromlaznice, sile smicanja, turbulenciju, ali vodi i formiranju visoko reaktivnih radikala [92].

Fizičke sile koje generiše akustična kavitacija, kao što su mehaničko mešanje, sile smicanja i mikromlaznice, našle su primenu u prehrambenoj industriji za pravljenje stabilnih emulzija i za efikasno ekstrahovanje [96]. Slobodno-radikalske reakcije indukovane akustičnom kavitacijom su našle primenu u sintezi nanomaterijala i u degradaciji organskih polutanata iz vodenih rastvora [97, 98]. Kombinovani fizički i hemijski efekti sonifikacije našli su specifičnu primenu za polimerizaciju emulzije [99], gde fizičke sile generišu kapi monomera u vodenoj fazi, a zatim slobodni radikali indukuju polimerizaciju monomera. Primena sonifikacije za procesovanje mleka i mlečnih proizvoda je veoma široka i koristi se za filtraciju, degaziranje, smanjenje viskoznosti, ekstrakciju proteina, inaktivaciju enzima i mikroorganizama i homogenizaciju [100-104]. Takođe je pokazano da poboljšava fizičke i funkcionalne osobine proteina surutke [105]. Sonifikacija visokog intenziteta može modifikovati sekundarne strukture proteina i dovesti do povećanja površinske hidrofobnosti, što povećava sklonosti proteina surutke ka agregiranju [93].

Nekoliko studija je takođe pokazalo da sonifikacija može pospešiti Majarovu reakciju ubrzavanjem ranih [106], kao i intermedijernih i kasnih faza reakcije [9, 107]. Efekti sonifikacije na Majarovu reakciju su uglavnom izučavani na jednostavnim model sistemima aminokiselina i šećera ili proteina i šećera [9, 108, 109]. Glikovanje BLG-a u Majarovoj reakciji ubrzano sonifikacijom dovelo je do formiranja glikokonjugata sa povećanim antioksidativnim sposobnostima uz minorne efekte na sekundarnu i tercijarnu strukturu [9]. Proteini surutke, modifikovani polisaharidima ultrazvučnim tretmanom, pokazali su poboljšane tehnološko-funkcionalne osobine u poređenju sa

proteinima modifikovanim klasičnim zagrevanjem [110]. Prednost ultrazvučnog tretmana u cilju glikovanja proteina je što jake sile smicanja obezbeđuju efikasno mešanje rastvora i efikasan prenos toplote, čime doprinose povećanju brzine Majarove reakcije, posebno ranih faza [106]. Glikovanje se odvija pod blagim uslovima, na niskim temperaturama, a vreme procesovanja je značajno smanjeno u odnosu na klasično zagrevanje [9]. Zbog blagih reakcionih uslova ne nastaju drastične promene u sekundarnoj i terciarnoj strukturi. Za razliku od tretmana ultrazvukom, tokom konvencionalne termičke prerade nema uniformnog zagrevanja uzorka zbog ograničenja u prenosu toplote, pa se javljaju mesta pregrevanja. Zbog toga je efikasno glikovanje proteina konvencionalnim termičkim metodama praćeno razvojem kasnih Majarovih produkata, kao i denaturacijom i agregacijom proteina [111-114].

2.5.4. Makromolekulsko nagomilavanje

Makromolekulsko nagomilavanje nespecifično ubrzava hemijske reakcije tako što smanjuje totalnu ekskludovanu zapreminu i time povećava koeficijent aktiviteta reaktanata [115, 116]. Generalno se očekuje da makromolekulsko nagomilavanje poveća brzinu sporih (brzina determinisana prelaznim stanjem) i asocijacionih reakcija, a da uspori brze (brzina determinisana difuzijom) i disocijacione reakcije. U uslovima nagomilavanja je visoka viskoznost, a transfer mase i koeficijenti difuzije su smanjeni. To je posebno izraženo pri nagomilavanju agenasa visokih molekulskih masa [117]. Sonifikacija u uslovima makromolekulskog nagomilavanja se očekuje da poveća brzine hemijskih reakcija. Ultrazvučni tretman usled implozivnih kolapsa kavitacionih mehura stvara dovoljno kinetičke energije da ubrza reakcije i oslobađa kratko-živeće hemijske vrste visokog sadržaja slobodne energije. Takođe, očekuje se da jake sile smicanja, mikromlazevi, i brzo zagrevanje i hlađenje ($\sim 10^6 \text{ K s}^{-1}$) koje stvara kavitacija prevaziđu smanjenu difuziju i efekat kaveza u uslovima nagomilavanja i obezbede efikasno mešanje, poboljšaju transfer mase i smanje viskoznost. Pored toga, temperaturna stabilnost proteina u uslovima makromolekulskog nagomilavanja je povećana usled smanjene entropije razvijanja proteina i denaturacije [118]. Stoga, očekivano je da su stepen denaturacije proteina, agregacije i polimerizacije minimalni čak i kada se primene intenzivniji uslovi prerade. Međutim, u slučaju proteina slabe strukturne stabilnosti, kao što su proteini odgovorni za nastanak neurodegenerativnih bolesti,

makromolekulsko nagomilavanje, umesto stabilizacije native forme potpomaže njihovu agregaciju u amiloidne fibrile, [119]. Zuo sa saradnicima [120] i Zang sa saradnicima [121] su modifikovali proteine izolata soje i β -konglicinina sa dekstranom u Majarovoj reakciji ubrzanoj zagrevanjem u rastvoru u uslovima makromolekulskog nagomilavanja. Obe studije su pokazale da makromolekulsko nagomilavanje značajno skraćuje vreme reakcije i sprečava denaturaciju i agregaciju proteina.

3. Ciljevi

Glikovanje proteina u Majarovoj reakciji je spontan process koji se, u zavisnosti od uslova sredine, odvija manjom ili većom brzinom. U prehrambenoj industriji glikovanje se ciljano primenjuje radi poboljšanja tehnološko-funkcionalnih osobina proteina i dobijanja unapređenih aditiva hrani. Takođe, termički obrađena hrana, koja je sve zastupljenija u novije vreme, sadrži velike količine kasnih Majarovih proizvoda, koji mogu imati brojne efekte na zdravlje čoveka. Imajući u vidu značaj Majarove reakcije za savremenog čoveka, postavljen je osnovni cilj, a to je da se **ispitaju efekti ultrazvučnog tretmana (jedne nove industrijske metode za preradu hrane) i sušenja raspršivanjem (jedne konvencionalne industrijske metode za preradu hrane) na ubrzanje Majarove reakcije, kao i efekti visokog stepena glikovanja na imunološke osobine potentnog alergena hrane, β -laktoglobulina.**

Na osnovu glavnog cilja, postavljeni su specifični podciljevi:

- a) glikovanje proteina surutke kravljeg mleka ultrazvučnim tretmanom i uvođenjem makromolekulskog nagomilavanja
- b) određivanje stepena realizacije Majarove reakcije surutke kravljeg mleka dejstvom ultrazvuka u prisustvu nagomilavajućeg agensa
- c) ispitivanje fizičko-hemijskih osobina nastalih proizvoda Majarove reakcije surutke kravljeg mleka dejstvom ultrazvuka u prisustvu nagomilavajućeg agensa
- d) određivanje stepena realizacije Majarove reakcije kamiljeg mleka tokom tretmana sušenja raspršivanjem i liofilizacije
- e) ispitivanje strukturnih osobina proteina kamiljeg mleka u prahu modifikovanih u Majarovoj reakciji tokom tretmana sušenja raspršivanjem i liofilizacije
- f) ispitivanje funkcionalnih osobina proteina kamiljeg mleka u prahu modifikovanih u Majarovoj reakciji tokom tretmana sušenja raspršivanjem i liofilizacije
- g) dobijanje i karakterizacija BLG-a modifikovanog u Majarovoj reakciji zagrevanjem u rastvoru

- h) ispitivanje intestinalnog transporta BLG-a, modifikovanog u Majarovoj reakciji zagrevanjem u rastvoru, u *in vitro* model sistemu
- i) ispitivanje preuzimanja i obrade BLG-a, modifikovanog u Majarovoj reakciji zagrevanjem u rastvoru, od strane dendritskih ćelija
- j) ispitivanje sposobnosti BLG-a, modifikovanog u Majarovoj reakciji zagrevanjem u rastvoru, da izazove degranulaciju bazofila uz upotrebu oligoklonskih humanizovanih IgE antitela

4. Materijal i metode

4.1. Reagensi i rastvori

1-anilinonaftalen-8-sulfonat (ANS), 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS), amilorid, arabinoza (Ara), β -merkptoetanol, bicinhoninska kiselina (BCA), dekstran-sulfat, dibutilhidroksitoluen (BHT) 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), fenilarsin-oksidi (PAO), fluorescein-izotiocijanati (FITC), FPS-ZM1, BSA, jasplakinolid, kongo crveno, ksilenol narandžasto, latrunkulin B, natrijum-dodecilsulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate - SDS), o-ftalaldehid (OPA), polietilenglikol molekulske mase 6000 Da (PEG-6000), poliinozin, tiobarbiturna kiselina (TBA), tioflavin T, trihlorsirćetna kiselina (TCA) su nabavljeni od proizvođača Sigma–Aldrich (Traufunken, Nemačka). U radu sa ćelijskim kulturama korišćeni su Dullbeco modifikovan Eagle-ov medijum (DMEM), fetalni goveđi serum inaktiviran toplotom, natrijum-piruvat, neesencijalne aminokiseline, penicilin, RPMI 1640 GlutaMAX medijum, streptomycin svi nabavljeni od Gibco, Invitrogen (Karlsbad, Sjedinjene Američke Države) i faktor stimulacije kolonija granulocita i makrofaga (*engl.* Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor – GM-CSF) (R&D, Okson, Ujedinjeno Kraljevstvo). Ostale korišćene hemikalije bile su analitičkog stepena čistoće. U svim eksperimentima je korišćena ultračista voda dobijena iz Smart2Pure sistema (Millipore, Francuska).

4.2. Modifikacija proteina kravlje surutke u Majarovoj reakciji tokom ultrazvučnog tretmana u uslovima makromolekulskog nagomilavanja

4.2.1. Priprema surutke kravljeg mleka

Proteini surutke su izolovani iz sirovog, termički netretiranog kravljeg mleka. Kravlje mleko je odmašćeno centrifugiranjem 10 min na 4000 g na +4 °C, a zatim su kazeini potaloženi ukapavanjem 1 M HCl do pH=4,6 i odvojeni cetrifugiranjem (10 min na 12000 g). Dobijena surutka je dodatno odmašćena ekstrakcijom sa tetrahloretilenom (3 puta sa po 0,4 zapremine tetrahloretilena) i dijalizovana naspram 10 mM natrijum-

fosfatnog pufera, pH=8,0. Surutka je na kraju koncentrovana ultrafiltracijom do približne koncentracije proteina od 100 mg/ml.

Koncentracija proteina je određena merenjem apsorbance na 280 nm, uz primenu teorijski izračunatog, prosečnog ekstinkcionog koeficijenta za proteine surutke, $\epsilon = 1,274 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.2.2. Ultrazvučni tretman visokog intenziteta

Za ubrzanje Majarove reakcije ultrazvučnim tretmanom, pripremljen je rastvor surutke (finalna koncentracija proteina 50 mg/ml) sa arabinozom (finalna koncentracija arabinoze 150 mg/ml) (uzorak sWP/Ara), a za ubrzanje Majarove reakcije ultrazvučnim tretmanom u uslovima makromolekulskog nagomilavanja, pripremljen je rastvor surutke (finalna koncentracija proteina 50 mg/ml) sa arabinozom (finalna koncentracija arabinoze 150 mg/ml) i PEG-6000 (finalne koncentracije 120 mg/ml) (uzorak sWP/Ara/PEG). Netretirana surutka (uzorak WP), netretirana surutka sa arabinozom (uzorak WP/Ara) i ultrazvukom tretirana surutka (uzorak sWP) su služili kao kontrole. Svi uzorci su pripremljeni u 10 mM natrijum-fosfatnom puferu pH=8 i nakon rastvaranja pH vrednost je dodatno podešena 1 M rastvorom NaOH.

Ultrazvučni tretman frekvencije 20 kHz je izveden u trajanju od 60 minuta sa ultrazvučnom sondom Branson Sonifier 150 (Branson Ultrasonic, Danberi, Sjedinjene Američke Države). Tokom tretmana sonda je bila uronjena u tubu sa 2,5 ml uzorka, na dubini od 2 cm, a tuba je bila u ledenom kupatilu čija je temperatura držana na 5 – 10 °C. Izlazna snaga sonde je bila 9,5 W (135 W/cm²).

Alikvot svakog uzorka je dijalizovan tokom 36 h naspram 10 mM natrijum-fosfatnog pufera pH=6,5. Svi uzorci su čuvani na -20 °C do dalje analize.

4.2.3. Praćenje formiranja Majarovih proizvoda - spektrofotometrijska i spektrofluorimetrijska merenja

Neposredno nakon ultrazvučnog tretmana merena je pH vrednost u nerazblaženim uzorcima. Fluorescentni spektri proteina surutke su snimljeni na Horiba Scientific Fluoromax-4 spektrofluorimetru (Horiba, Kyoto, Japan) u kvarcnoj kiveri sa dužinom puta od 10 x 10 mm. Uzorci su razblaženi do koncentracije 0,5 mg/ml u 10

mM natrijum-fosfatnom puferu i ekscitovani svetlošću talasne dužine od 350 nm, pri čemu su emisijski spektri snimani u opsegu 360-600 nm. Apsorbanca na 294 nm (pokazatelj formiranja intermedijernih Majarovih proizvoda) je merena u 50 x razblaženim uzorcima, a apsorbanca na 420 nm (pokazatelj formiranja kasnih proizvoda Majarove reakcije) je merena u nerazblaženim uzorcima na NanoDrop 2000c spektrofotometru (Thermo Scientific, Valtam, Sjedinjene Američke Države) u kiveti sa dužinom puta 10 mm.

4.2.4. Određivanje sadržaja slobodnih amino grupa

Sadržaj slobodnih amino grupa je određen OPA metodom prema protokolu koji su objavili Nielsen i saradnici [122] uz manje modifikacije. OPA reagens je pripremljen na sledeći način: 8 mg OPA je rastvoreno u 200 µl metanola i zatim je dodato 5 ml 0.1 M natrijum-tetraborata, 0,5 ml 20% SDS-a i 20 µl β-merkaptoetanol, i na kraju je smeša dopunjena destilovanom vodom do 10 ml. Dijalizovani uzorci kravlje surutke (50 µl, 1,00 mg/ml) su inkubirani sa 200 µl OPA reagensa tokom 5 minuta i zatim je očitana apsorbanca na 340 nm. Sadržaj slobodnih amino grupa izražen je procentualno u odnosu na netretirane proteine surutke.

4.2.5. Određivanje sulfhidrilnih grupa

Sadržaj ukupnih slobodnih sulfhidrilnih grupa je određen derivatizacijom sa Elmanovim reagensom prema protokolu koji su objavili Morgan i saradnici (1999) [113]. Uzorci surutke su razblaženi do koncentracije 1,00 mg/ml u 10 mM natrijum-fosfatnom puferu pH=7,0 sa 8 M ureom i u mikrotitar pločici je mešano 200 µl uzorka sa 20 µl Elmanovog reagensa (2,5 mM DTNB u vodi). Nakon 15 minuta reakcije na sobnoj temperaturi očitana je apsorbanca na 412 nm. Rezultat je predstavljen kao procenat slobodnih sulfhidrilnih grupa u odnosu na netretirane proteine surutke.

4.2.6. Elektroforetske analize

4.2.6.1. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Elektroforeza je rađena na Hoefer SE600 elektroforetskoj jedinici (Amersham Biosciences). Proteini kravlje surutke (po 20 µg svakog uzorka) su razdvojeni na 4% koncentrujućem i 14% razdvajajućem poliakrilamidnom gelu. Uzorci su pripremljeni u

redukujućim (u prisustvu β -merkaptoetanolu) i neredukujućim uslovima. Proteini su elektroforetski razdvojeni pri konstantnom naponu od 80 V kroz koncentrujući gel i 220 V kroz razdvajajući gel. Proteinske trake su bojene komasi brilijant plavim R-250 (*engl.* Commassie Brilliant Blue - CBB) bojom.

4.2.6.2. Nativna elektroforeza

Nativna elektroforeza je urađena pod nenedenaturišućim uslovima na 4% koncentrujućem i 14% razdvajajućem poliakrilamidnom gelu. Količina proteina i uslovi elektroforeze i bojenje gela su bili kao što je opisano kod SDS-PAGE.

4.2.7. Spektroskopija cirkularnog dihroizma (CD)

CD spektri su snimani na JASCO J-815 spektropolarimetru (JASCO, Tokyo, Japan) koji je prethodno kalibrisan rastvorom amonijum-D-10-kamforsulfonata koncentracije 0,6 g/l, poznatog elipticiteta od +190,4 mdeg na 290,5 nm. Snimanja su rađena u dve spektralne oblasti, u dalekoj UV oblasti od 180-260 nm, u kvarcnoj kiveti sa putem od 0,1 mm, i u bliskoj UV oblasti od 260-320 nm, u kvarcnoj kiveti sa dužinom puta od 1 cm, u oba slučaja na konstantnoj temperaturi od 25 °C i u dijalizovanim uzorcima proteina surutke koncentracije 3,00 mg/ml u 10 mM fosfatnom puferu pH=6,5. Interval snimanja je bio 0,1 nm, pri brzini 50 nm/min, sa četiri akumulacije. Referentni spektar pufera je oduzet od dobijenih spektara. Rezultati su prikazani kao molarni elipticitet po aminokiselinskom ostatku. Molekulska masa proteina surutke je izračunata kao prosečna molekulska masa glavnih proteina surutke koji ulaze u njen sastav, uzimajući u obzir njihovu zastupljenost:

$$M_{W_{\text{proteina surutke}}} = M_{W_{\text{BLG}}}(0,536 \times 0,941) + M_{W_{\text{ALA}}}(0,25 \times 14,2) + M_{W_{\text{BSA}}}(0,063 \times 66,0) \\ M_{W_{\text{Ig}}}(0,125 \times 150) = 36,76 \text{ kDa.}$$

Kao prosečna molekulska masa aminokiselinskog ostatka uzeta je vrednost od 114 Da.

Spektri daleke UV oblasti su analizirani u CONTIN programu da bi se procenio udeo sekundarnih struktura uz primenu CDPro softverskog paketa (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>) i referentne proteinske baze SP29 (29 solubilnih proteina).

4.2.8. Određivanje površinske hidrofobnosti

Površinska hidrofobnost određivana je u fluorimetrijskom eseju, na osnovu vezivanja hidrofobne probe, ANS, za protein. Dijalizovanim uzorcima surutke koncentracije 0,4 mg/ml (10 μ M) u 10 mM fosfatnom puferu pH=7,4 dodat je rastvor ANS-a u zasićujućoj koncentraciji (80 μ M) i smeša je inkubirana 30 minuta u mraku. Fluorescentni spektri su snimani u opsegu od 400 – 600 nm pri ekscitaciji na 350 nm. Od dobijenih spektara je oduzet spektar ANS-a u istom puferu.

4.2.9. Vezivanje kongo crvenog i tioflavina T za proteine kravljje surutke

Štok rastvor kongo crvenog je pripremljen 100 x koncentrovan u 10 mM fosfatnom puferu pH=7,4 koji sadrži 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl i 10% etanol. Dijalizovani proteini kravljje surutke razblaženi do koncentracije 0,6 mg/ml su inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi sa reagensom kongo crvenog finalne koncentracije 10 μ M i zatim su snimani apsorpcioni spektri u vidljivoj oblasti, od 400 – 700 nm. Rezultati su prikazani kao spektri kongo crvenog u prisustvu proteina surutke ili kao diferencijalni spektri koji su dobijeni oduzimanjem spektra netretiranog uzorka od spektara sonifikovanih uzoraka.

Tioflavin T (20 μ M) je inkubiran sa dijalizovanim proteinima kravljje surutke (0,5 mg/ml) u 50 mM fosfatnom puferu pH=7,4 tokom jednog minuta. Meren je intenzitet fluorescencije na 485 nm pri ekscitaciji na 435 nm. Intenzitet fluorescencije tioflavina T oduzet je od svih uzoraka.

4.2.10. Određivanje proteinskih karbonila

Proteinski karbonili su određeni u testu sa DNPH reagensom. Dijalizovani proteini kravljje surutke (1,00 mg) su precipitirani sa 10% TCA i tretirani sa 1,5 ml DNPH reagensa (10 mM DNPH u 2 M HCl) u toku 1 h uz mešanje. Sledila je deproteinizacija sa 1,5 ml 20% TCA. Proteinski talog je ispran sa smešom metanol/etil-acetat (1:1), nakon čega je rastvoren u 7 M urei uz tretman na ultrazvučnom kupatilu. Merena je apsorbanacija na 370 nm i koncentracija karbonila je izračunata na osnovu ekstinkcionog koeficijenta $\epsilon_{370} = 22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.2.11. Određivanje proteinskih hidroperoksida i ukupnih hidroperoksida

Proteinski hidroperoksidi i ukupni hidroperoksidi su određeni u testu oksidacija gvožđa-ksilenol narandžasto (*engl.* ferrous oxidation-xylenol orange – FOX). Za određivanje proteinskih hidroperoksida, 5 mg proteina dijalizovanih uzoraka kravlje surutke je precipitirano pomoću 10% TCA i dobijeni talog je ispran acetonom pa rastvoren u 8 M guanidin hidrohloridu. Proteinima kravlje surutke je zatim dodato 50 µl FOX reagensa (2,5 mM ksilenol narandžasto, 2,5 mM amonijum-gvožđe(II) sulfat i 1 M sorbitol u 1,1 M HClO₄) i smeša je inkubirana 60 minuta na sobnoj temperaturi. Merena je apsorbancija supernatanta nakon centrifugiranja (12000 x g, 20 min) na 560 nm.

Za određivanje ukupnih peroksida 50 µl FOX reagensa je direktno dodato u 450 µl uzoraka kravlje surutke (5,5 mg/ml). Koncentracija peroksida je određena na osnovu kalibracione krive vodonik peroksida.

4.2.12. Temperaturna i pH stabilnost proteina kravlje surutke

Temperaturna stabilnost proteina surutke je ispitivana u dijalizovanim uzorcima koncentracije proteina 1,00 mg/ml u 50 mM Tris puferu pH=7,0. Uzorci su inkubirani na termošejkeru u trajanju od 15 min na povišenim temperaturama u opsegu od 60 - 100 °C. Nakon hlađenja do sobne temperature, uzorci su centrifugirani tokom 15 min na 10000 g kako bi se potaložili i odvojili nerastvorni agregati. Koncentracija preostalih rastvornih proteina na svakoj temperaturi je određena merenjem apsorbancije na 280 nm, kao što je prethodno opisano i poređena je sa koncentracijom odgovarajućeg nezagrevanog uzorka.

pH stabilnost proteina kravlje surutke određivana je razblaživanjem dijalizovanih uzoraka do koncentracije proteina 1,00 mg/ml u 200 mM puferima pH vrednosti 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 i 10,0. Nakon konstantnog mešanja na sobnoj temperaturi u toku 30 minuta, uzorci su centrifugirani 15 minuta na 10000 g. Rastvorljivost je određena merenjem apsorbancije na 280 nm u supernatantu i izražena relativno u odnosu na koncentraciju proteina na polaznoj pH vrednosti (pH=8,0).

4.2.13. Antioksidativni testovi

4.2.13.1. Moć uklanjanja DPPH radikala

Sposobnost uklanjanja DPPH radikala je određivana kao što je opisao Jiang sa saradnicima (2012) [123]. Na 200 μ l uzorka proteina surutke koncentracije 0,3 mg/ml dodato je 200 μ l DPPH reagensa (200 μ M DPPH u etanolu) i inkubirano 20 min na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon centrifugiranja 10 min na 10000 g merena je apsorbanacija na 517 nm. U testu je kao standard korišćen BHT koncentracije 50 μ g/ml. Moć uklanjanja DPPH radikala je izračunata prema sledećoj formuli:

$$[1 - (A_{517} \text{ uzorka} / A_{517} \text{ kontrole})] \times 100.$$

4.2.13.2. Ukupna redukujuća moć

Ukupna redukujuća moć je određena prema protokolu koji je objavio Čavla sa saradnicima [124], uz male izmene. Na 200 μ l uzorka surutke koncentracije 2 mg/ml je dodato 200 μ l 0,2 M fosfatnog pufera pH=6,6 i 200 μ l 1% kalijum-fericijanida. Smeša je inkubirana 20 min na 50 °C. Proteini su potaloženi sa 200 μ l 10% TCA. Nakon centrifugiranja na 10000 g tokom 10 min, odvojeno je 700 μ l supernatanta u koji je dodato 150 μ l 0,1% gvožđe(III)-hlorida. Merena je apsorbanacija na 700 nm, čiji porast ukazuje na povećanu ukupnu redukujuću moć.

4.2.13.3. Test inhibicije lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija je praćena u testu sa TBA reagensom i homogenizatom žumanceta jajeta kao izvorom lipida [125]. Sveže žumance (150 μ l, 20% dH₂O, v/v) je pomešano sa FeSO₄ (60 μ l, 10 mM) i surutkom (390 μ l, 7,5 mg/ml). Smeša je inkubirana na 37 °C tokom 1 h, a zatim je dodato 300 μ l zasićene TCA i 200 μ l TBA reagensa (14,4 mg/ml TBA u 100 mM NaOH). Reakciona smeša je inkubirana 20 minuta na 80 °C, a zatim centrifugirana 10 minuta na 10000 g. Merena je apsorbanacija na 532 nm. Inhibicija lipidne peroksidacije je izračunata na osnovu sledeće formule:

$$[(A_{532} \text{ kontrole} - A_{532} \text{ uzorka}) / A_{532} \text{ kontrole}] \times 100.$$

4.2.14. Statistička obrada podataka

Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost \pm standardna greška za tri nezavisna eksperimenta ultrazvučnog tretmana alergena surutke od kojih je svaki urađen najmanje u duplikatu. Za analizu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti je korišćena jednosmerna analiza varijanse (*engl.* Analysis of Variance – ANOVA) praćena sa Takijevim testom. Testovi su urađeni pomoću softverskog paketa Origin Pro 8.5.1. (OriginLab, Masačusets, Sjedinjene Američke Države). Vrednost parametara p manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom.

4.3. Modifikacije alergena kamiljeg mleka u Majarovoj reakciji tokom tretmana sušenja raspršivanjem

4.3.1. Sušenje raspršivanjem kamiljeg mleka

Sirovo, termički netretirano kamilje (*Camelus dromedarius*) mleko je nabavljeno sa lokalne farme u Al-Ainu (Ujedinjeni Arapski Emirati) i transportovano je i čuvano na +4 °C. Sveže mleko je koncentrovano na pilot modelu vakum uparivača (Model FT22, Armfield Ltd, UK) do koncentracije od 28%. Koncentrovano kamilje mleko je sušeno na pilot modelu komore za sušenje (Model FT80, Armfield Ltd, UK). Maksimalna brzina isparavanja je bila 3 l/h. Ulazna temperatura vazduha u komori za sušenje je podešena na šest nivoa 190 °C, 200 °C, 210 °C, 230 °C, 240 °C i 250 °C, dok su odgovarajuće izlazne temperature bile 71 °C, 74 °C, 78 °C, 84 °C, 88 °C i 92 °C, redom. Za dobijanje liofilizovanog kamiljeg mleka, koncentrovano mleko je zamrznuto na –15 °C tokom 24 h pre liofilizacije. U komori liofilizatora temperatura je održavana na –80 °C, a pritisak na 0,05 mbar. Liofilizacija je trajala 4 nedelje. Svi dobijeni uzorci mleka u prahu su čuvani u frižideru na + 4 °C do dalje analize.

4.3.2. Rekonstituisanje kamiljeg mleka u prahu

Kamilje mleko u prahu je rekonstituisano u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH=6,8 pri koncentraciji 50 mg/ml uz blago mešanje na sobnoj temperaturi u toku 1 h. Nerastvorna frakcija je uklonjena iz uzoraka centrifugiranjem na 10000 g tokom 10 min. Supernatanti su označeni kao rastvorna frakcija kamiljeg mleka u prahu i korišćeni su u daljim analizama. Rastvorne frakcije su odmašćene ekstrakcijom tetrahloretilenom

(2:1 v/v). Alikvoti su dodatno dijalizovani naspram 20 mM natrijum-fosfatnog pufera pH=6,8 u crevu za dijalizu sa veličinom pora do 3 kDa. Koncentracija proteina je određena upotrebom komercijalno dostupnog seta za test sa BCA reagensom (Pierce, Amsterdam, Holandija), prema uputstvima proizvođača za rad sa malim zapreminama u mikrotitar pločicama. Za konstruisanje standardne krive korišćen je BSA.

Opciono, kako bi se elektroforetski okarakterisali ukupni proteini kamiljeg mleka u prahu (zajedno sa frakcijom nerastvornom u fosfatnom puferu na pH=6,8), mleko u prahu je rastvoreno u denaturišućem puferu (8 M urea, 2 M tiourea, 2% SDS, 20 mM natrijum-fosfatni pufer pH=6,8) pri koncentraciji 20 mg/ml. Nakon rastvaranja, uzorci su razblaženi do 5 mg/ml u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH=6,8 i zatim pripremljeni za elektroforetsko razdvajanje.

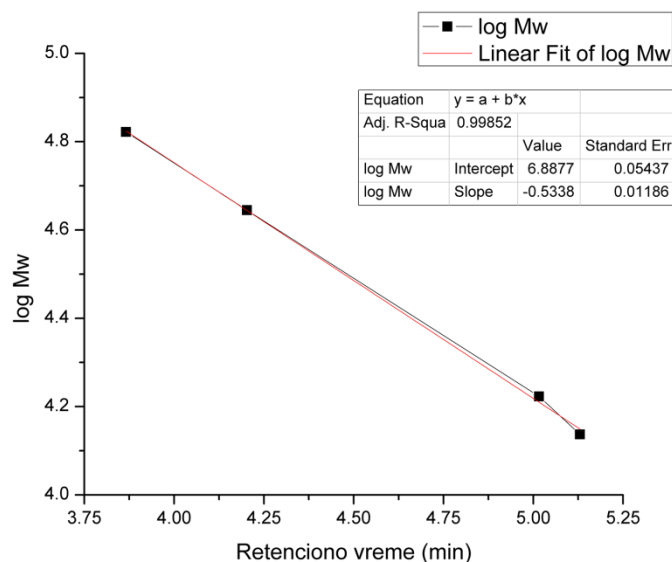
4.3.3. Elektroforetske analize

Ukupni proteini kamiljeg mleka u prahu rastvoreni u denaturišućem puferu su razdvojeni na 14% SDS-PAGE gelu pod redukujućim uslovima uz konstantno hlađenje na Hoefer SE6000 elektroforetskom sistemu (Amersham Biosciences) na konstantnoj voltaži od 200 mV. Nanošeno je 100 µg praha svakog uzorka po bunaru. Proteini rastvorni u 20 mM fosfatnom puferu pH=6,8 (20 µg proteina) su elektroforetski razdvojeni u redukujućoj i neredukujućoj sredini pod istim uslovima. Nativna elektroforeza je rađena sa solubilnom frakcijom kamiljeg mleka u prahu pod nativnim uslovima (odsustvo SDS-a i β-merkaptotetanolu u gelu i puferima za elektroforezu). Svi gelovi su bojeni CBB bojom.

4.3.4. Gel-filtraciona analiza solubilne frakcije kamiljeg mleka u prahu

Gel-filtraciona hromatografija je rađena na sistemu za tečnu hromatografiju ultra-visokih performansi (*engl.* Ultra-High Performance Liquid Chromatography – UHPLC) Nexera XR (Shimadzu, Kjoto, Japan) na koloni ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 125Å (Waters, Milford, Sjedinjene Američke Države). Na kolonu je nanošeno 3 µl uzoraka rastvornih frakcija rastvornih u fosfatnom puferu koncentracije proteina 0,35 mg/ml. Elucija je praćena na talasnoj dužini od 220 nm. Za vođenje hromatografija i analizu dobijenih podataka korišćen je LabSolutions CS program (Shimadzu, Kjoto, Japan). Za kalibraciju kolone korišćena je BEH125 SEC standardna

proteinska smeša (Waters, Milford, Sjedinjene Američke Države), koja se sastoji od sledećih proteina: BSA (66,4 kDa), ovalbumina (44,2 kDa), mioglobina (16,7 kDa) i ribonukleaze A (13,7 kDa). Na osnovu retencionih vremena proteina poznatih molekulskih masa konstruisana je kalibraciona kriva (Grafik 2.1) za određivanje molekulskih masa proteina kamiljeg mleka.



Grafik 2.1. Kalibraciona kriva za određivanje molekulske mase proteina na osnovu retencionih vremena standarda.

4.3.5. Praćenje ranih, intermedijernih i kasnih faza Majarove reakcije

Fluorescentni spektri solubilnih proteina kamiljeg mleka u prahu (dijalizovani uzorci koncentracije 0,5 mg/ml) su snimani na Horiba Scientific Fluoromax-4 spektrofluorimetru (Horiba, Kjoto, Japan) u kvarnoj kiveri sa dužinom puta od 10 x 10 mm. Temperatura je održavana na 25 °C upotrebom Peltijeovog elementa. Proizvodi rane Majarove reakcije su ekscitovani svetlošću talasne dužine od 340 nm, a emisijski spektri su snimani u opsegu od 350 – 600 nm sa slitom širine 5 nm. Apsorbancije intermedijernih (A_{294} nm) i kasnih Majarovih proizvoda (A_{420} nm) su merene na NanoDrop 2000c spektrofotometru (Thermo Scientific, Sjedinjene Američke Države) u uzorcima frakcija kamiljeg mleka u prahu rastvornih u fosfatnom puferu, koncentracije proteina 3 mg/ml.

Za procenu napredovanja Majarove reakcije u različitim uzorcima određen je odnos ranih/intermedijarnih proizvoda na sledeći način: relativna razlika ranih proizvoda (intenzitet fluorescencije na 425 nm uzoraka sušenih raspršivanjem / intenzitet fluorescencije na 425 nm liofilizovanog uzorka) / relativna razlika apsorbancije na 294 nm (apsorbancija na 294 nm uzoraka sušenih raspršivanjem / apsorbancija na 294 nm liofilizovanog uzorka).

4.3.6. Određivanje sadržaja slobodnih amino grupa

Slobodne amino grupe su određene kao što je prethodno opisano u poglavlju 4.2.4. Dijalizovane solubilne frakcije kamiljeg mleka u prahu (50 μ l, koncentracije proteina 0,5 mg/ml) su inkubirane sa 200 μ l OPA reagensa i nakon 5 min je očitana apsorbancija na 340 nm. Sadržaj slobodnih amino grupa je izražen procentualno u odnosu na liofilizovani uzorak.

4.3.7. Spektroskopija cirkularnog dihroizma

Sekundarne strukture proteina solubilne frakcije su praćene snimanjem CD spektara u dalekoj UV oblasti, u dijalizovanim uzorcima koncentracije proteina 1 mg/ml. Uslovi snimanja su bili kao što je opisano u odeljku 4.2.7. Spektri su prikazani kao zavisnost molarog elipticiteta (mdeg) od talasne dužine. Zbog nepoznate srednje molekulske mase smeše proteina, a koja je neophodna za izračunavanje sadržaja sekundarnih struktura programom CDPro, udeo sekundarnih struktura je procenjen na osnovu matematičkog modela koji je predstavio Rausens sa saradnicima [126]. Ovaj model podrazumeva dva koraka. U prvom koraku se spektri normalizuju na osnovu talasne dužine na 207 nm (elipticiteti na svim talasnim dužinama se pomnože sa brojem koji će na talasnoj dužini 207 dati vrednost 1), za koju je pokazano da daje najmanju standardnu devijaciju pri određivanju sekundarnih struktura model proteina. U drugom koraku se za svaku sekundarnu strukturu primenjuje kvadratni model na osnovu intenziteta normalizovanog elipticiteta na jednoj ili dve talasne dužine kao što je dato u tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Kvadratni modeli za predviđanje sadržaja sekundarnih struktura.

	Kvadratni model ^a	SD
α -heliks	$27.58 - 14.46 * E_{193} - 5.66 * E_{193}^2 + 1.86 * E_{211} - 14.72 * E_{211}^2$	11.9
β -pločice	$8.66 + 11.97 * E_{196} + 7.36 * E_{196}^2 - 0.80 * E_{211} + 15.38 * E_{211}^2$	11.1
β -zavoji	$12.49 + 0.28 * E_{234} - 0.49 * E_{234}^2$	4.15
Neuređene strukture	$38.9 + 3.14 * E_{193} - 0.56 * E_{193}^2$	10.3

^aSvi spektri su normalizovani na 207 nm pre primene kvadratnog modela. E predstavlja elipticitet na datim talasnim dužinama.

4.3.8. Određivanje površinske hidrofobnosti

Površinska hidrofobnost proteina solubilne frakcije kamiljeg mleka u prahu je praćena na osnovu vezivanja fluorescentne probe, osetljive na polarnost sredine, na način koji je opisan u odeljku 4.2.8.

4.3.9. Rastvorljivost proteina kamiljeg mleka u prahu

Za poređenje rastvorljivosti proteina kamiljeg mleka u prahu dobijenog sušenjem raspršivanjem na različitim ulaznim temperaturama, merena je apsorbancija na 280 nm u 5 puta razblaženim rastvornim frakcijama.

4.3.10. Antioksidativna moć kamiljeg mleka u prahu

4.3.10.1 Ukupna redukujuća moć

Ukupna redukujuća moć kamiljeg mleka sušenog raspršivanjem određena je u suspenziji celog mleka u prahu, ili u njegovoj frakciji rastvornoj u 20 mM fosfatnom puferu pH=6,8, prema protokolu koji je objavio Čavla sa saradnicima [124], uz male modifikacije, kao što je prethodno opisano u odeljku 4.2.13.2. Suspenzija celog mleka u prahu je bila pripremljena pri koncentraciji 5 mg/ml (oko 1,25 mg/ml proteina), a rastvorna frakcija pri koncentraciji proteina 2 mg/ml.

4.3.10.2. Sposobnost uklanjanja ABTS radikala

Katjon radikal ABTS^{•+} je generisan u reakciji 14 mM ABTS-a sa 5 mM kalijum-persulfatom u toku 24 h, na sobnoj temperaturi, u mraku. Radni reagens ABTS^{•+} radikala je pripremljen razblaživanjem tako da apsorbancija na 670 nm bude približno 0.9. Uzorci rastvorne frakcije kamiljeg mleka (30 µl, koncentracije proteina 2 mg/ml) su pomešani sa 120 µl ABTS^{•+} reagensa u mikrotitar pločici malih zapremina i ostavljeni da reaguju tokom 6 minuta. Očitana je apsorbancija uzoraka na ELISA čitaču sa filterom na 670 nm.

4.3.11. Statistička obrada podataka

Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (S.D.) i analizirani u programu Origin Pro 8.5.1. (OriginLab, Masačusets, Sjedinjene Američke Države). Za analizu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti je korišćena jednosmerna ANOVA sa Takijevim testom. Vrednost parametara p manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom.

4.4. Modifikacije glavnog alogena kravljeg mleka, BLG-a, u Majarovoj reakciji tokom tretmana zagrevanja u rastvoru (*engl. wet-heating*)

4.4.1. Prečišćavanje i priprema kravljeg BLG-a

BLG je izolovan iz svežeg, termički netretiranog kravljeg mleka prema protokolu koji je objavila Stojadinović sa saradnicima (2012) [127]. Sirovo kravlje mleko je centrifugirano na 4000 g tokom 30 min na +4 °C kako bi se dobilo obrano mleko. Kazeini su potaloženi podešavanjem pH vrednosti na 4,6 pomoću 1 M HCl i odvojeni centrifugiranjem na 4000 g tokom 30 minuta. Dobijena surutka je odmašćena ekstrakcijom sa tetrahloretilenom (2:1 v/v) i dijalizovana naspram 20 mM Tris pufera pH=7,5. Kolona za sobnu jonoizmenjivačku hromatografiju, dimenzija 2,5 cm x 20 cm, je napakovana slabim anjonskim izmenjivačem, DEAE Sephadex A-50 (GE Healthcare, Upsala, Švedska) i ekvilibrisana 20 mM Tris puferom pH=7,5. Proteini surutke su nanošeni pri protoku od 1 ml/min. Nevezani proteini surutke su isprani sa kolone ekvilibracionim puferom. Vezani proteini su eluirani step-gradijentom NaCl-a u ekvilibracionom puferu, u opsegu od 40 – 280 mM NaCl. U svakom koraku step-elucije

je po 100 ml eluenta prošlo kroz kolonu, a koncentracija soli je bila povećavana za po 40 mM. Sakupljane su frakcije od po 15 ml i analizirane elektroforetski na prisustvo čistog BLG-a. Frakcije sa prečišćenim BLG-om su sakupljene, dijalizovane naspram 50 mM natrijum-fosfatnog pufera pH=8,0 i skoncentrovane ultrafiltracijom. Čistoća BLG-a je SDS-PAGE analizom procenjena na > 95%. Koncentracija proteina je određena BCA metodom, kao što je opisano u odeljku 4.3.2.

Preparat BLG-a je prečišćen od endotoksina prekonoćnom inkubacijom sa smolom visokog kapaciteta za uklanjanje endoksina (celulozna zrnca za koja je vezan ϵ -poli-L-lizin) na +4 °C uz blago mešanje (Thermo Scientific, Rokford, Sjedinjene Američke Države). Preostala količina endotoksina je određena na osnovu komercijalnog hromogenog paketa za kvantifikaciju endotoksina (LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (Thermo Scientific, Rokford, Sjedinjene Američke Države)). Koncentracija endotoksina u finalnom preparatu BLG-a je 0,4 EU/mg proteina (EU – jedinica endotoksina, *engl.* endotoxin units).

4.4.2. Modifikacija kravljeg BLG-a u Majarovoj reakciji tretmanom zagrevanja u rastvoru

BLG je glikovan u Majarovoj reakciji inkubacijom rastvora BLG-a koncentracije 10 mg/ml u 50 mM fosfatnom puferu, pH=8,0 u prisustvu glukoze koncentracije 180 mg/ml na +60 °C tokom 10 dana u zatvorenim mini tubama dodatno zaštićenim od isparavanja parafilmom. Termički tretirani uzorak BLG-a, kao kontrola termičkog tretmana, je pripremljen pod istim uslovima ali u odsustvu glukoze. Nretirani, nativni BLG je takođe služio kao kontrola i za vreme tretmana je čuvan na -20 °C. Nakon tretmana svi uzorci su dijalizovani naspram 50 mM natrijum-fosfatnog pufera pH=8,0.

4.4.3. Karakterizacija BLG-a glikovanog u Majarovoj reakciji

Stepen glikovanja BLG-a nakon tretmana zagrevanja u rastvoru u prisustvu glukoze je određen na osnovu smanjenja sadržaja slobodnih amino grupa, kao što je opisano u odeljku 4.2.4. U reakciji sa OPA reagensom su učestvovali dijalizovani uzorci BLG-a koncentracije 1 mg/ml. Sadržaj slobodnih amino grupa je izražen procentualno u odnosu na nativni BLG.

SDS-PAGE analiza je izvedena na 14% gelu u redukujućim i neredukujućim uslovima, kao što je opisano u odeljku 4.2.6.1. Nanošeno je po 5 µg proteina po bunaru.

Strukturne promene BLG-a su praćene snimanjem CD spektara u dalekoj UV oblasti, kao što je opisano u odeljku 4.2.7. ove disertacije. Uzorci nativnog, zagrevanog i glikovanog BLG-a su pripremljeni za snimanje u 50 mM natrijum-fosfatnom puferu pH=8,0 pri koncentraciji 0,85 mg/ml. Da bi se izračunao procentualni udeo sekundarnih struktura, dobijeni spektri su analizirani u CONTIN programu uz primenu CDPro softverskog paketa (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>) i referentne proteinske baze SP29.

4.4.4. Transport alergena kroz Caco-2 ćelijski monosloj

Kao model sistem enterocita je korišćena Caco-2 ćelijska linija (ćelijska linija humanog kancera kolona) kupljena od American Type Culture Collection (Rokvil, Sjedinjene Američke Države). Ćelije su gajene u kompletnom DMEM medijumu koji je sadržao 1% neesencijalnih aminokiselina, 20% fetalnog govedeg seruma inaktiviranog toplotom i 1% smeše penicilina i streptomcina (10000 jedinica i 10 mg/ml, redom) na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Ćelije su pasažirane jednom nedeljno, nakon što dostignu približno 80% konfluentnosti u T-75 flasku. Medijum je u ćelijskoj kulturi menjan tri puta nedeljno.

Za eksperiment transepitelijalnog transporta alergena kroz Caco-2 monosloj, Caco-2 ćelije su posejane na membranske polikarbonatne inserte veličine pora 0.1 µm u pločicama sa 24 bunara (Transwell, Corning Costar, Kembridž, Masačusets, Sjedinjene Američke Države). Ćelije su sejane pri gustini od $1,6 \times 10^4$ ćelija po insertu. Korišćene su ćelije od 17. do 25. pasaža. Tri puta nedeljno je menjan medijum u insertima. Transepitelijalni električni otpor (*engl.* transepithelial electrical resistance – TEER) je meren uređajem Millicell-ERS VoltOhmmeter (Millipore, Amsterdam, Holandija). U eksperimentu su korišćeni samo ćelijski monoslojevi sa TEER > 500 Ω. Uzorci nativnog i glikovanog BLG-a su razblaženi u kompletnom DMEM medijumu do koncentracije 1,5 mg/ml i po 100 µl pripremljenih uzoraka je naneto na apikalnu stranu Caco-2 ćelijskog monosloja, dok je na bazolateralnu stranu naneto po 600 µl kompletnog DMEM medijuma. Alikvoti od 30 µl su uzimani iz bazolateralnog odeljka

nakon 15, 30, 60, 120, 240 i 300 minuta, i bazolateralni odeljak je bio dopunjen sa po 30 μ l medijuma svaki put. Nativni i glikovani BLG, transportovani na bazolateralnu stranu su bili kvantifikovani komercijalno dostupnim paketom za ELISA-u za kvantifikaciju BLG-a (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomeri, Sjedinjene Američke Države) prema uputstvima proizvođača.

4.4.5. Dobijanje dendritskih ćelija iz kostne srži

U ovoj doktorskoj disertaciji su korišćene ženke miševa genetički visoko srodnog soja C3H/HeOuj (Charles River, Francuska), starosti pet nedelja. Miševi su čuvani u vivarijumu Univerziteta u Utrehtu, u Holandiji, pod specifičnim ulovima bez prisustva patogena. Eksperimenti su odobreni od strane Komiteta za eksperimentalni rad sa životinjama Univerziteta u Utrethu (licenca broj 2013.III.01.004).

Za izolovanje dendritskih ćelija iz kostne srži dugih kostiju miševa, praćen je protokol koji je objavio Lutz sa saradnicima (1999) [128]. Miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom, a zatim su izolovane kosti zadnjih nogu (femuri i tibije). Kostni su stavljeni u sterilan, hladan fiziološki rastvor puferisan fosfatom (*engl.* phosphate buffer saline – PBS), očišćene od mišićnog tkiva, i presečene sa krajeva. Kostna srž je istisnuta u Petri šolju ispiranjem PBS-om kroz centralni kanal kosti uz korišćenje šprica sa tankom iglom (25G). Kost je ispirana dok se ne izgubi crvena boja, a zatim je kostna srž resuspendovana u Petri šolji upotrebom šprica bez igle i profiltrirana kroz filter sa veličinom pora 40 μ m. Ćelije kostne srži su prebačene u tubu i centrifugirane na 400 g tokom 6 minuta. Supernatant je odbačen a eritrociti su lizirani dodatkom 1 ml hladnog puferu za liziranje (154 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 100 μ M EDTA). Liziranje je zaustavljeno dodatkom 10 ml RPMI 1640 glutaMAX medijuma i suspenzija je ponovo centrifugirana (400 g, 6 min). Ćelije su resuspendovane i brojane u Birker-Tirkovoj komori obojene tripan plavim, a zatim su razblažene u kompletnom medijumu za dendritske ćelije (RPMI 1640 glutaMAX medijum, sa 10% fetalnog goveđeg seruma seruma inaktiviranog toplotom, 1 mM natrijum-piruvat, penicilinom (100 U/ml), streptomycinom (100 μ g/ml), 1% neesencijalnim aminokiselinama i 0,1 mM β -merkaptoetanolom) do koncentracije 3×10^5 ćelija/ml. Po 10 ml suspenzije je razliveno u Petri šolje. Na kraju je dodat GM-CSF u finalnoj koncentraciji 10 ng/ml. Ćelije su inkubirane na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO_2 . Medijum je osvežen trećeg dana

dodatkom 10 ml kompletnog medijuma sa 20 ng/ml GM-CSF-a. Dendritske ćelije dobijene iz kostne srži miša su spremne za eksperimente nakon šest dana kultivacije. Šestog dana su pokupljene ćelije u suspenziji i ćelije koje slabo adheriraju (blagim lupanjem šakom o Petri šolju).

4.4.6. Preuzimanje alergena od strane dendritskih ćelija

Nativni i glikovani BLG su obeleženi fluorescentnom bojom, FITC-om prema uputstvima proizvođača. FITC-nativni BLG i FITC-glikovani BLG su odvojeni od nevezane FITC boje rasoljavanjem kroz PD-10 kolonu (GE Healthcare, Upsala, Švedska). Efikasnost obeležavanja nativnog i glikovanog BLG je određena merenjem apsorbancija na 480 nm i 280 nm. Odnos A_{480}/A_{280} za ova dva preparata bio je bez statistički značajnih razlika. Koncentracija proteina u uzorku je određena BCA metodom (kao što je opisano u odeljku 4.3.2.) i uzorci su do upotrebe čuvani na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, zaštićeni od svetlosti.

FITC-nativni i FITC-glikovani BLG koncentracije $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ su inkubirani sa dendritskim ćelijama koncentracije 1×10^6 ćelija/ml u kompletnom RPMI medijumu u toku 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 i 120 minuta na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u vodenom kupatilu. Nakon naznačenih vremena uzimani su alikvoti od $100\text{ }\mu\text{l}$ i dodavani u mini tube koje su sadržale $500\text{ }\mu\text{l}$ hladnog PBS-a kako bi se zaustavio proces internalizacije alergena od strane dendritskih ćelija. Ćelije su isprane PBS-om i na kraju prebačene u mikrotitar pločicu u finalnoj zapremini od $200\text{ }\mu\text{l}$. Internalizacija je praćena protočnom citometrijom na uređaju BD Accuri C6 Cytometer (BD Biosciences, San Hoze, Sjedinjene Američke Države). Praćen je intenzitet fluorescencije u populaciji dendritskih ćelija i rezultati su prikazani kao srednji intenzitet fluorescencije (*engl.* mean fluorescence intensity – MFI) ili kao procenat FITC-pozitivnih dendritskih ćelija. Za obradu podataka korišćen je BD Accuri C6 softverski program.

4.4.7. Inhibicija endocitoze

U cilju ispitivanja mehanizma kojim su BLG alergeni preuzeti od strane dendritskih ćelija, dendritske ćelije su tretirane inhibitorima različitih puteva endocitoze. Kao inhibitori su korišćeni latrunkulin B ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) ili jasplakinolid ($1\text{ }\mu\text{M}$), za inhibiciju fagocitoze, amilorid (2 mM), za inhibiciju makropinocitoze, i PAO

(2 μM), za inhibiciju receptorom-posredovane endocitoze. Za inhibiciju specifičnih receptora, dendritske ćelije su bile tretirane dekstran-sulfatom (100 $\mu\text{g/ml}$) ili poliinozinom (200 $\mu\text{g/ml}$) za inhibiciju SR, i FPS-ZM 1 (0.3 μM), za inhibiciju RAGE receptora. Nakon inkubacije dendritskih ćelija sa navedenim inhibitorima tokom 30 minuta na 37 °C, ćelije su stimulirane sa 10 $\mu\text{g/ml}$ FITC-nativnog ili FITC-glikovanog BLG-a. Intenzitet FITC fluorescencije je sniman u dendritskim ćelijama nakon 30 minuta internalizacije, na način koji je opisan u odeljku 4.4.6.

4.4.8. Konfokalna mikroskopija

Dendritske ćelije (1×10^5 ćelija) u odsustvu ili prisustvu gore navedenih inhibitora, pod istovetnim uslovima, nakon 30 minuta inkubacije sa FITC-obeženim uzorcima BLG-a su isprane u PBS-u i citospinom (Shandon Cytospin 2 centrifuga, Thermo Fisher Scientific Inc, Valtham, Sjedinjene Američke Države) transferovane na predmetna mikroskopska stakla. Ćelije su snimane na Leica TCS SPE-2 konfokalnom mikroskopu (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Nemačka) i analizirane u Leica Application Suite-Advanced Fluorescence programu (LAS AF, Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Nemačka).

4.4.9. Praćenje endolizozomalne degradacije

U cilju praćenja alergena tokom endolizozomalne degradacije, nativni i glikovani BLG su kovalentno vezani za polistirenska zrnca (Polysciences, Inc., Varington, Sjedinjene Američke Države), prema uputstvima proizvođača. Približno 1.7×10^8 polistirenskih zrnaca je aktivirano sa 8% (v/v) glutaraldehydom u PBS-u, tokom 4 sata uz konstantno mešanje na sobnoj temperaturi, a zatim je glutaraldehyd ispran PBS-om. Na aktivirana zrnca su dodati nativni ili glikovani BLG (0,5 mg/ml, 0,5 ml) i smeše su ostavljene preko noći na +4 °C uz konstantno mešanje. Neizreagovala mesta su blokirana inkubacijom sa 0,5 M glicinom tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su zrnca bila spremna za ispitivanje endolizozomalne degradacije.

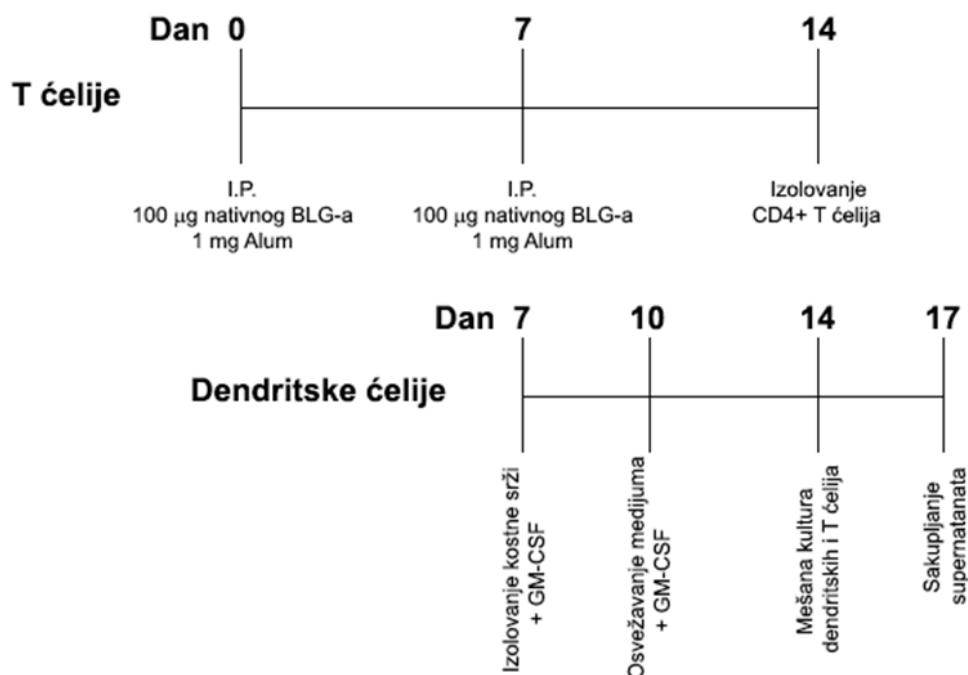
Endolizozomalna degradacija je praćena na osnovu protokola koji je publikovao Hofman sa saradnicima [129], uz male modifikacije. Ukupno $12,5 \times 10^6$ dendritskih ćelija, izolovanih iz naivnog C3H/HeO_uJ miša, kao što je opisano u poglavlju 4.4.5, je inkubirano sa 50×10^6 zrnaca prekrivenih nativnim ili glikovanim BLG-om na 37 °C

kako bi se omogućila fagocitoza. Fagocitoza je zaustavljena nakon 15 minuta dodatkom PBS čija je temperatura iznosila +4 °C. Neinternalizovana zrnca su tri puta isprana flotacijom pomoću fetalnog goveđeg seruma na +4 °C. Dendritske ćelije su resuspendovane u 2,5 ml kompletnog RPMI medijuma i inkubirane na 37 °C kako bi otpočelo sazrevanje fagozoma. Uzimani su alikvoti od 480 µl nakon 0, 30, 120, 240 i 720 minuta, u kojima je zaustavljano sazrevanje fagozoma dodatkom 1 ml hladnog PBS-a. Alikvoti su zatim centrifugirani na 400 g tokom 5 minuta na +4 °C. Potaložene dendritske ćelije su lizirane u puferu za liziranje (50 mM tris, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X, 1 mM DTT, 10 µg/ml Dnaza I, pH=7,4, uz dodatak kompletnog koktela inhibitora proteaza (Roche, Ujedinjeno Kraljevstvo)), preko noći na +4 °C. Nedegradovani nativni ili glikovani BLG na površini polistirenskih zrnaca su obeleženi zečijim poliklonskim anti-BLG antitelom 1:1000 (Fitzgerald, 70R-LR011) i zatim anti-zečijim Alexa-488 antitelom (Invitrogen A11034). Intenzitet Alexa-488 signala, direktno proporcionalan količini nerazgrađenog BLG-a, je određivan protočnom citometrijom.

4.4.10. Mešovita kultura dendritskih ćelija i BLG-specifičnih CD4⁺ T-ćelija

Eksperiment mešovite kulture dendritskih i CD4⁺ T-ćelija je urađen prema ranije objavljenom protokolu [130]. Shema imunizacije i postavljanja mešovite kulture su prikazane na shemi 3.1. Za dobijanje BLG-specifičnih CD4⁺ T-ćelija korišćeni su miševi C3H/HeOuJ soja, imunizovani nativnim BLG-om. Tri miša su nultog i sedmog dana intraperitonealno (i.p.) injektovana sa 200 µl smeše koja je sadržala 100 µg nativnog BLG-a i 1 mg aluminijum-hidroksida (Imject Alum, Pierce, Holandija). Četrnaestog dana su miševi žrtvovani i izolovane su slezine. Slezine su homogenizovane u hladnom RPMI medijumu i profiltrirane kroz filter sa porama veličine 70 µm. Suspenzija je zatim centrifugirana na 400 g tokom 6 minuta na +4 °C. Supernatant je odbačen, a ćelije (talog) su prečišćene od eritrocita na način koji je opisan u odeljku 4.4.5.). Od dobijenih ćelija slezine, CD4⁺ T-ćelije su izolovane na osnovu komercijalno dostupnog seta Dynal Mouse CD4 Negative Isolation Kit (Life Technologies, Karlsbad, Sjedinjene Američke Države), prema uputstvima proizvođača. Ovaj set se zasniva na osnovu negativne izolacije, što znači da antitelima, koja su

vezana za magnetne kuglice, bivaju prepoznate sve ćelije mišje slezine osim CD4⁺ T-ćelija, i samo ove ćelije bivaju nevezane za magnetne kuglice.



Shema 3.1. Postavka eksperimenta mešovite kulture dendritskih ćelija sa CD4⁺ T ćelijama. **Legenda:** Alum - aluminijum-hidroksid (Imject Alum, Pierce); I.P. – intraperitonealno.

Sedmog dana su izolovane ćelije kostne srži iz neimunizovanog, naivnog C3H/HeOuJ miša (kako je opisano u odeljku 4.4.5.), koje su do 14. dana bile izdiferencirane u dendritske ćelije. Četnaestog dana dendritske ćelije su bile stimulisane sa 50 µg/ml nativnog ili glikovanog BLG-a tokom 2 sata, nakon čega su isprane od neinternalizovanih alergena i bile spremne za mešovitu kulturu. Mešovita kultura je postavljena u pločici sa 48 bunara i sastojala se od 125 µl dendritskih ćelija (8×10^5 ćelija/ml) i 125 µl CD4⁺ T-ćelija (8×10^6 ćelija/ml). Nakon 72 sata inkubacije na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂, sakupljeni su supernatanti u kojima je određen nivo citokina (IFN-γ, IL-5, IL-10 i IL-13) na osnovu komercijalno dostupnih setova koji se zasnivaju na metodi ELISA (e-Bioscience, Austrija).

4.4.11. Umrežavanje FcεRI receptora nativnim i glikovanim BLG-om u prisustvu himernih anti-BLG IgE antitela

Humanizovana ćelijska linija leukemije bazofila pacova RS-ATL8 je dobijena ljubaznošću profesora Nakamure sa Nacionalnog instituta za nauke o zdravlju iz Tokija, iz Japana. Ova ćelijska linija je uspostavljena uvođenjem gena za luciferazu u RBL-SX38 ćelije (ćelije leukemije bazofila pacova koje eksprimiraju α , β , γ lanac humanog FcεRI receptora), koji se eksprimira kada se pokrene signalni put nuklearnog faktora aktiviranih T-ćelija (NFAT) [131]. RS-ATL8 linija je u ovoj disertaciji upotrebljena za poređenje sposobnosti nativnog i glikovanog BLG-a da umreže FcεRI receptore na osnovu merenja ekspresije luciferaze. Eksperiment je izveden kao što je prethodno opisano [132], uz male modifikacije. RS-ATL8 ćelije su posejane (5×10^4 ćelija u 50 μ l po bunaru) u pločicu sa 96 bunara sa ravnim dnom i senzitisane preko noći sa smešom šest himernih anti-BLG IgE monoklonskih antitela (1 μ g/ml svakog humanizovanog IgE antitela) [133]. Ćelije su isprane sa sterilnim PBS-om i zatim stimulisane u toku 1 sata na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ sa 50 μ l/bunaru nativnog ili glikovanog BLG-a razblaženog u MEM medijumu sa 10% fetalnog goveđeg seruma u četiri različite koncentracije (1, 10, 100 and 1000 ng/ml) ili sa 1 μ g/ml kozjeg anti-humanog IgE antitela (DakoCytomation, Glostrup, Danska). Nakon stimulacije, ćelijama je dodato 50 μ l rastvora supstrata za luciferazu, koji sadrži i reagens za liziranje ćelija (ONE-Glo, promega Corp., Tokio, Japan). Zatim je u bunarima merena hemiluminiscencija na EnVision čitaču (PerkinElmer, Inc, Masačusets, Sjedinjene Američke Države). Nivoi ekspresije luciferaze su predstavljeni kao povećanje u intenzitetu svetlosti u poređenju sa nivoom pozadinske ekspresije.

4.4.12. Statistička obrada podataka

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (S.D.) ili standardna greška srednje vrednosti (S.E.M.) i analizirani u GraphPad Prism programu (La Jolla, San Diego, Sjedinjene Američke Države). Za analizu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti je korišćen Studentov t-test. Vrednost parametara p manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom.

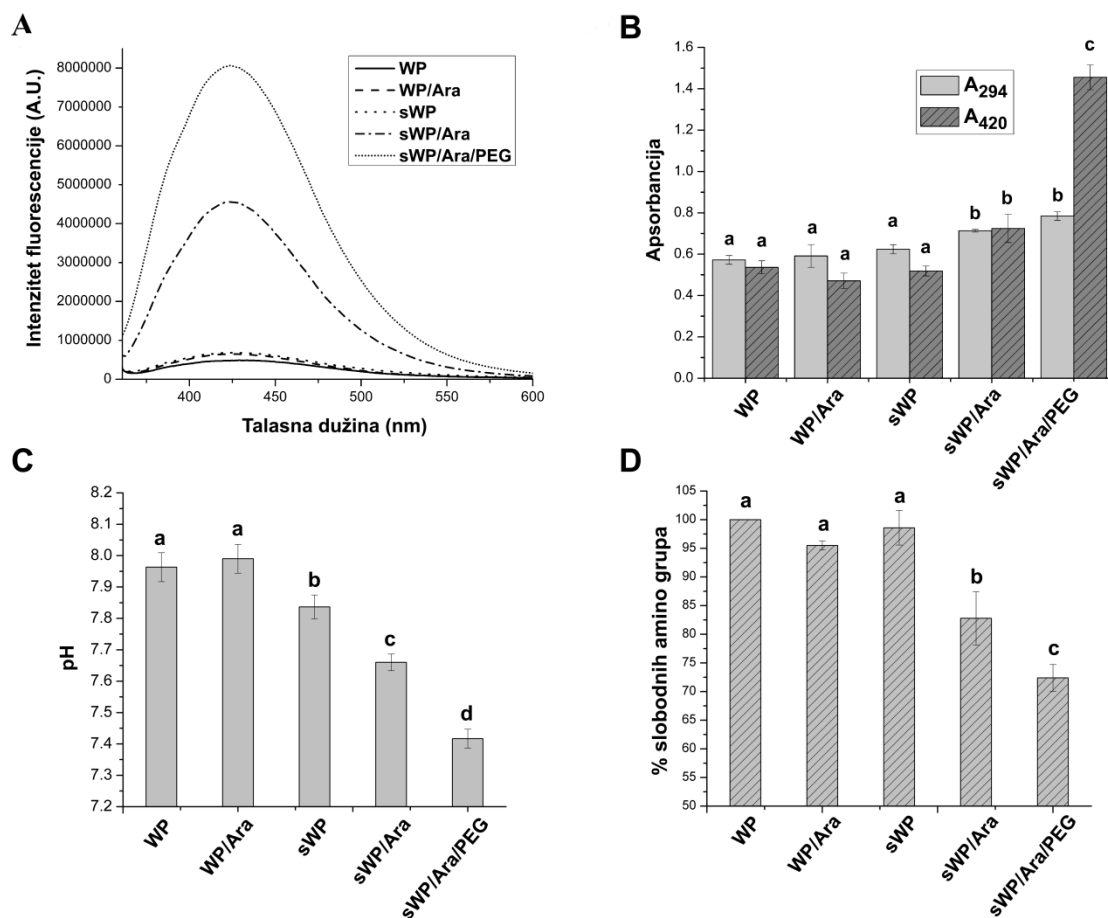
5. Rezultati i diskusija

5.1. Modifikacije proteina kravljeg mleka u Majarovoj reakciji tokom tretmana ultrazvukom u uslovima makromolekulskog nagomilavanja: karakterizacija i funkcionalne osobine

Kravlja surutka se dobija iz kravljeg mleka kao sporedni proizvod u proizvodnji sira. Nalazi široku primenu u prehrambenoj industriji gde se koristi kao aditiv u brojnim prehrambenim proizvodima. Proteini surutke su jako cenjeni, kako zbog visoke nutritivne vrednosti, tako i zbog odličnih tehnološko-funkcionalnih osobina. U ovom delu doktorske disertacije, proteini surutke su u cilju dodatnog poboljšanja tehnološko-funkcionalnih osobina modifikovani u Majarovoj reakciji ubrzanoj ultrazvučnim tretmanom visokog intenziteta (sonifikacijom), kao novom tehnologijom za procesovanje hrane. Sonifikacija omogućava realizaciju Majarove reakcije u vodenoj sredini, u kratkom vremenskom periodu i na niskim temperaturama čime se reakcija limitira uglavnom na početne faze. Takođe, sonifikacija je izvedena i u uslovima makromolekulskog nagomilavanja, koje dodatno ubrzava Majarovu reakciju i doprinosi očuvanju strukture i stabilnosti proteina. Modifikovani proteini surutke su detaljno okarakterisani. Ispitane su njihove fizičko-hemijske osobine, strukturne i oksidativne promene, stabilnost u ekstremnim uslovima i antioksidativna moć.

5.1.1. Praćenje formiranja Majarovih proizvoda tokom ultrazvučnog tretmana

Rane faze Majarove reakcije se karakterišu formiranjem fluorofora sa emisionim maksimumom na približno 425 nm kada se ekscituju na 350 nm [26]. Sonifikacija proteina kravlje surutke u prisustvu šećera, u sWP/Ara uzorku, značajno je povećala intenzitet fluorescencije, ukazujući na formiranje ranih Majarovih proizvoda (Grafik 1.1.A). Uslovi makromolekulskog nagomilavanja, u sWP/Ara/PEG uzorku doveli su do daljeg povećanja fluorescencije (Grafik 1.1.A). Nesonifikovani uzorak sa arabinozom, WP/Ara, i sonifikovan uzorak u odsustvu šećera, sWP, nisu pokazali značajan porast u intenzitetu fluorescencije u poređenju sa nativnom surutkom, WP (Grafik 1.1.A).



Grafik 1.1. Efekti ultrazvučnog tretmana visokog intenziteta na A) fluorescenciju, B) apsorbanciju na 294 nm i 420 nm, C) promene u pH vrednosti i D) preostali sadržaj slobodnih amino grupa proteina surutke sa ili bez prisustva arabinoze i nagomilavajućeg agensa (PEG-6000). Legenda: WP – proteini surutke, WP/Ara – proteini surutke u smeši sa arabinozom, sWP – sonifikovani proteini surutke, sWP/Ara – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze, sWP/Ara/PEG – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze i PEG-6000. Za analizu statističke značajnosti korišćena je jednosmerna ANOVA praćena Takijevim testom. a, b, c i d predstavljaju statistički značajnu razliku sa parametrom $p < 0.05$.

Kasnije faze Majarove reakcije se karakterišu formiranjem UV-apsorbujućih intermedijernih produkata i nastankom kasnih tamnih (braon) pigmenta [26]. Statistički značajno povećanje ($p < 0.05$) UV apsorbcije na 294 nm pokazalo je formiranje intermedijernih proizvoda Majarove reakcije u sWP/Ara i sWP/Ara/PEG uzorcima (Grafik 1.1.B). Takođe, došlo je do statistički značajnog povećanja ($p < 0.05$) apsorbcije na 420 nm koja svedoči o formiranju tamnih, braon pigmenta u sWP/Ara uzorku u poređenju sa netretiranim WP/Ara uzorkom. Prisustvo nagomilavajućeg agensa dramatično povećava tamnjenje sWP/Ara/PEG uzorka, usled intenzivnijeg formiranja hromofora (Grafik 1.1.B). Iako su se braon pigmenti (A_{420}) formirali

paralelno sa intermedijernim proizvodima (A_{294}), u uslovima makromolekulskog nagomilavanja je odnos A_{294}/A_{420} niži (Tabela 1.1), što ukazuje da uslovi makromolekulskog nagomilavanja ubrzavaju napredovanje Majarove reakcije prema kasnijim fazama. Formiranje UV apsorbujućih jedinjenja i braon pigmentata tokom ultrazvučnog tretmana u sistemima šećer/BLG ili šećer/aminokiselina u rastvoru je takođe nedavno opisano [9, 107, 134].

Promene u pH vrednosti se mogu koristiti kao indikacija stepena realizacije Majarove reakcije, jer se u toku reakcije formiraju organske kiseline, što rezultira padom pH vrednosti sistema [135]. Prisustvo nagomilavajućeg agensa je uzrokovalo statistički značajnije smanjenje pH vrednosti ($p < 0.05$) u poređenju sa sistemom bez PEG-6000 (Grafik 1.1.C), zbog intenzivnije realizacije Majarove reakcije.

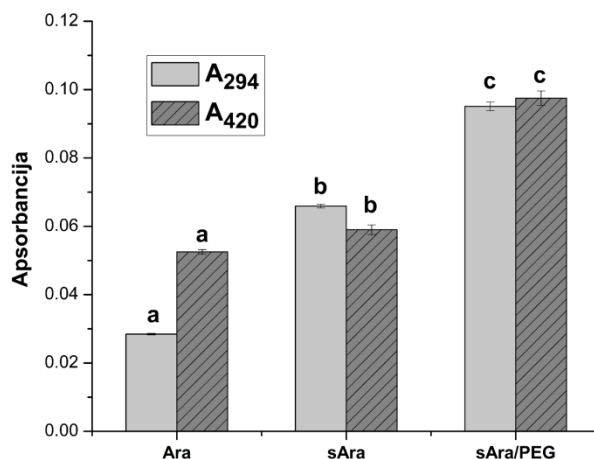
Majarova reakcija je takođe praćena određivanjem sadržaja slobodnih amino grupa nakon sonifikacije (Grafik 1.1.D). Sonifikacija u prisustvu arabinoze je dovela do značajnog ($p < 0.05$) smanjenja u sadržaju slobodnih amino grupa proteina surutke, dok je u uslovima makromolekulskog nagomilavanja ovo smanjenje bilo još izraženije ($p < 0.05$), ukazujući na povećan stepen realizacije Majarove reakcije. Svi ovi rezultati pokazuju da makromolekulsko nagomilavanje, tj. prisustvo PEG-6000, dovodi do ubrzanja Majarove reakcije indukovane sonifikacijom.

Tabela 1.1. Odnos intermedijernih i kasnih proizvoda Majarove reakcije izražen kao odnos apsorbancija na 294 i 420 nm. Legenda: WP – proteini surutke, WP/Ara – proteini surutke u smeši sa arabinozom, sWP – sonifikovani proteini surutke, sWP/Ara – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze, sWP/Ara/PEG – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze i PEG-6000.

	WA	WA/Ara	sWA	sWA/Ara	sWA/Ara/PEG
A_{294}/A_{420}	1.067	1.256	1.202	0.985	0.539

Tokom tamnjenja uzrokovanog Majarovom reakcijom paralelno može doći i do karamelizacije, naročito u prisustvu visokih koncentracija šećera. Reakcije karamelizacije doprinose ukupnom neenzimskom tamnjenju, naročito u alkalnim pH opsezima, i pri visokim temperaturama i pritiscima, dajući obojene polimere [136]. Kada je arabinoza sa ili bez PEG-a sonifikovana pod istim uslovima kao i smeša proteina surutke i arabinoze, došlo je do neenzimskog tamnjenja reakcijama

karamelizacije (Grafik 1.2). Međutim, u uzorcima sa ili bez nagomilavajućeg agensa, ukupan doprinos karamelizacije apsorbanciji na 294 nm bio je manji od 1%, a apsorbanciji na 420 nm manji od 5%. Ultrazvučni tretman je rezultovao u karamelizaciji niskog stepena, verovatno zbog brzog zagrevanja i hlađenja sistema.



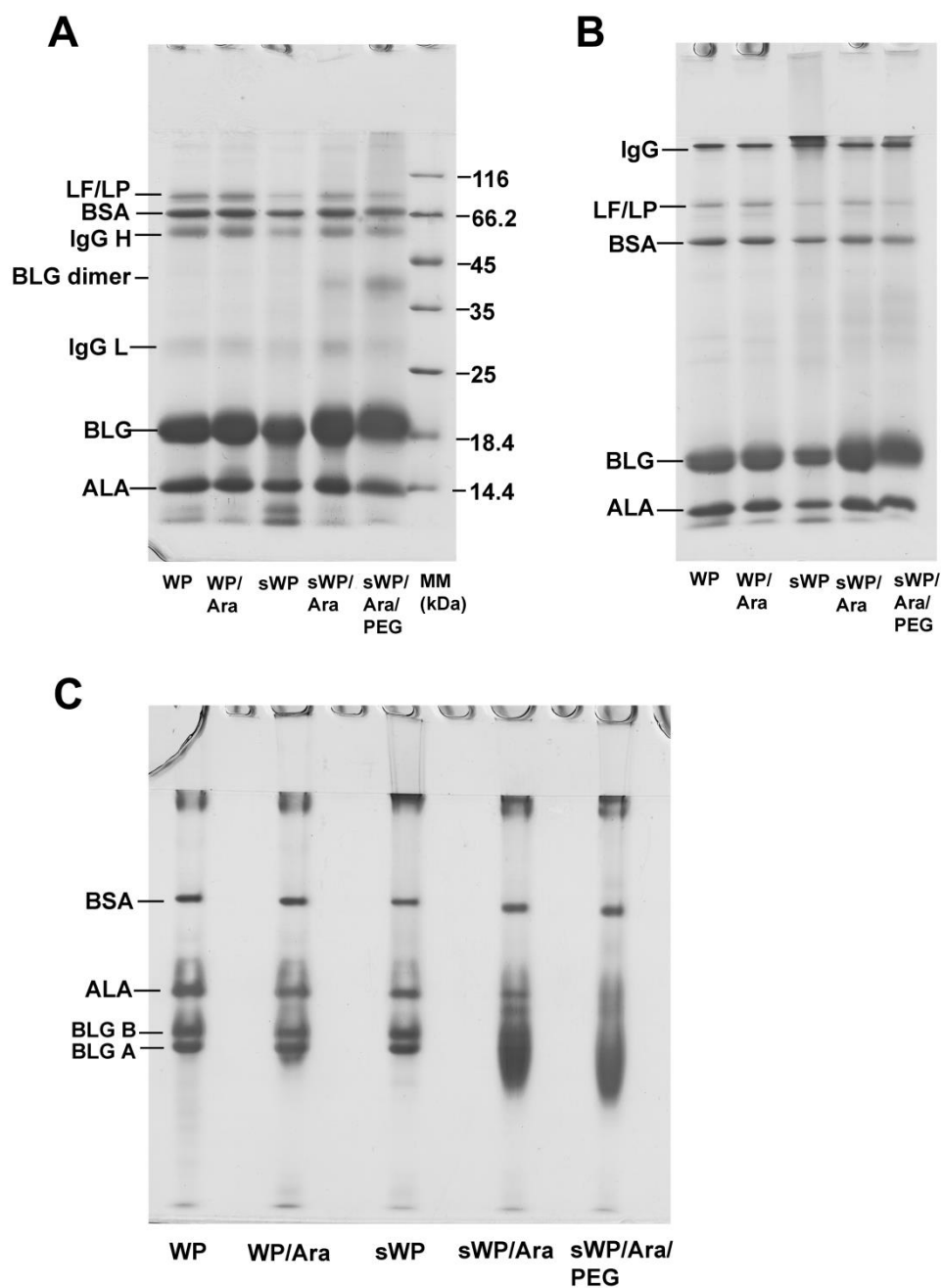
Grafik 1.2. Efekti ultrazvučnog tretmana visokog intenziteta na apsorbanciju na 294 i 420 nm rastvora arabinoze u prisustvu ili odsustvu PEG-6000. Ara – arabinoza, sAra – sonifikovana arabinoza, sAra/PEG – sonifikovana arabinoza u prisustvu PEG-6000. Statistička značajnost razlika srednjih vrednosti je poređena jednosmernom ANOVA-om praćenom Takijevim testom. a, b i c označavaju statistički značajne razlike ($p < 0.05$).

Za razliku od klasičnog zagrevanja, u sonifikovanim sistemima nastaju lokalna mesta sa visokim temperaturama i visokim pritiscima (oko 5000 K i 1000 atm unutar vazдушnih mehurova) [95], koja dovode do povećane reaktivnosti hemijskih vrsta na dodirnoj površini gas-tečnost i u blizini kolabirajućih vazдушnih mehurova. Uslovi makromolekulskog nagomilavanja dodatno povećavaju brzine reakcija, povećanjem hemijskog potencijala, odnosno efektivne koncentracije molekula proteina, zbog efekta ekskluzije zapremine. Iako uslovi ekskludovane zapremine smanjuju koeficijent difuzije reaktanata, vodeni mlazovi velikih brzina (400 km/h), uzrokovanih sonifikacijom, stvaraju visoko turbulentan protok i jake sile smicanja, koje značajno povećavaju transfer mase i učestalost efikasnih sudara, čak i u uslovima makromolekulskog nagomilavanja.

5.1.2. Karakterizacija glikokonjugata proteina kravlje surutke elektroforetskim analizama

Rezultati SDS-PAGE analize pod redukujućim i neredukujućim uslovima su prikazani na Slikama 1.1.A i 1.1.B. Proteinske trake koje odgovaraju ALA, i posebno BLG-u, nakon sonifikacije u prisustvu arabinoze pokazuju razmaz prema većim molekulskim masama, do kojeg dolazi zbog vezivanja različitog broja molekula šećera za proteine surutke. U uslovima makromolekulskog nagomilavanja razmaz je izraženiji, ukazujući na efikasnije glikovanje. SDS-PAGE pod redukujućim uslovima (Slika 1.1.A) pokazuje formiranje dimera BLG-a, ukazujući na to da su povezani nedisulfidnim kovalentnim vezama, a koji nastaju kao posledica Majarove reakcije. Udeo dimera BLG-a je povećan u prisustvu PEG-a, usled intenzivnije reakcije neenzimskog glikovanja. SDS-PAGE pod neredukujućim uslovima (Slika 1.1.B) pokazuje da ultrazvučni tretman proteina surutke ili smeše proteina surutke sa arabinozom i PEG-6000 dovodi do formiranja proteinskih polimera visokih molekulskih masa, koji se uočavaju na gelu za koncentrovanje i blizu granice sa razdvajajućim gelom. Međutim, ovi polimeri nisu prisutni pod redukujućim uslovima (Slika 1.1.A), što jasno pokazuje da su proteinske vrste visokih molekulskih masa formirane disulfidnim vezama. Ovi rezultati ukazuju da sonifikacija samih proteina surutke dovodi do formiranja disulfidnih polimera, a da prisustvo arabinoze smanjuje ovaj efekat, verovatno zbog stabilizujućeg efekta saharida. Međutim, sa napredovanjem Majarove reakcije u uslovima makromolekulskog nagomilavanja, ovaj stabilizujući efekat saharida je delimično prevaziđen i disulfidni polimeri se formiraju kao posledica intenzivne Majarove reakcije.

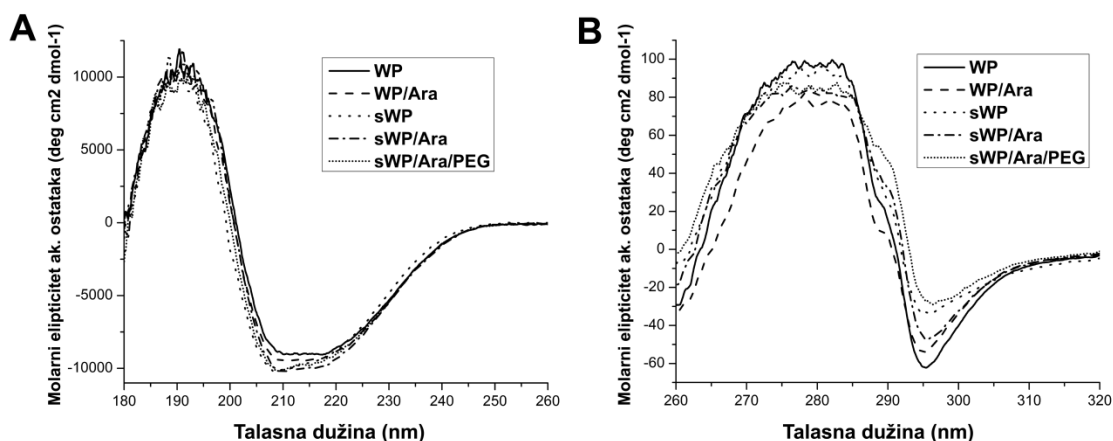
U nativnoj elektroforezi se još jasnije uočava da su tri glavna proteina surutke, ALA, BLG i BSA, glikovana sonifikacijom u prisustvu arabinoze i da je glikovanje intenzivnije u uslovima makromolekulskog nagomilavanja. Glikovanje je najizraženije u slučaju BLG-a, i to njegove obe izoforme, A i B. Duži predjeni put glikovanih proteina u nativnoj elektroforezi, uprkos povećanju masa, ukazuje na smanjenje njihove pI vrednosti usled modifikacije baznih aminokiselinskih ostataka u Majarovoj reakciji.



Slika 1.1. Procena molekulskih masa proteina surutke tretiranih ultrazvukom visokog intenziteta, sa ili bez arabinoze i sa ili bez PEG-6000. SDS-PAGE pod A) redukujućim uslovima, B) neredukujućim uslovima, i C) nativna elektroforeza. Legenda: ALA – α -laktalbumin; BLG – β -laktoglobulin; BSA – govedji serum albumin; IgG L – laki lanac imunoglobulina; IgG H – teški lanac imunoglobulina; LF – laktoferin; LP – laktoperoksidaza, WP – proteini surutke, WP/Ara – proteini surutke u smeši sa arabinozom, sWP – sonifikovani proteini surutke, sWP/Ara – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze, sWP/Ara/PEG – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze i PEG-6000; MM – proteinski markeri molekulske mase.

5.1.3. Promene u sekundarnoj i tercijsnoj strukturi proteina kravljje surutke

CD spektri u dalekoj UV oblasti sonifikovanih i glikovanih uzoraka, se neznatno razlikuju od spektra netretiranih proteina kravljje surutke (Grafik 1.3.A). Razlike u procentima sekundarnih struktura nisu statistički značajne (Tabela 1.2), izuzev blago povećanih neuređenih struktura u sWP uzorku i blago povećanom sadržaju α -heliksa u sWP/Ara uzorku. Ovi rezultati pokazuju da sonifikacija, kao i glikovanje arabinozom ne narušavaju sekundarne strukture proteina surutke pod primenjenim uslovima, čak ni u slučaju intenzivnog glikovanja u prisustvu nagomilavajućeg agensa. Ovo je u saglasnosti sa prethodnom studijom koja je pokazala da ultrazvukom indukovano glikovanje BLG-a rezultuje u neznatnim promenama u sekundarnim strukturama [9].



Grafik 1.3. CD spektri proteina kravljje surutke sonifikovanih u prisustvu ili odsustvu arabinoze i PEG-6000. CD spektri su snimljeni u dalekoj UV oblasti (A) i u bliskoj UV oblasti (B). WP – proteini surutke, WP/Ara – proteini surutke u smeši sa arabinozom, sWP – sonifikovani proteini surutke, sWP/Ara – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze, sWP/Ara/PEG – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze i PEG-6000.

CD spektri u bliskoj UV oblasti netretiranih proteina surutke sa ili bez arabinoze, pokazuju pik na 295 nm, karakterističan za BLG (Grafik 1.3.B). Nakon sonifikacije ovaj pik se smanjuje, ukazujući da je tercijsna struktura delimično narušena tretmanom. Prisustvo arabinoze tokom tretmana ostvarilo je stabilizujući efekat na tercijsnu strukturu, međutim, u uslovima makromolekulskog nagomilavanja, gde je stepen realizacije Majarove reakcije značajno povećan, tercijsna struktura je takođe delimično narušena, zbog intenzivnog glikovanja proteina. Uprkos činjenici da uslovi makromolekulskog nagomilavanja povećavaju stepen realizacije Majarove

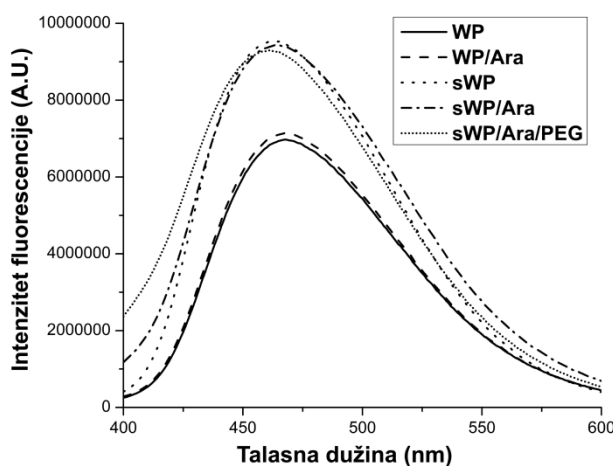
reakcije, kao i stepen glikovanja, tercijarna struktura nije dramatično promenjena zbog stabilizujućih efekata arabinoze i PEG-6000, koji sprečavaju denaturaciju i posledičnu agregaciju proteina.

Tabela 1.2. Sadržaj sekundarnih struktura proteina surutke izračunat je primenom CONTIN algoritma, dostupnog u okviru CDPro paketa, na osnovu referentnog seta proteina SP29. Procentualni sadržaj sekundarnih struktura poreden je jednosmernom ANOVA-om praćenom Takijevim testom. *a* i *b* označavaju statistički značajne razlike ($p < 0.05$). Legenda: WP – proteini surutke, WP/Ara – proteini surutke u smeši sa arabinozom, sWP – sonifikovani proteini surutke, sWP/Ara – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze, sWP/Ara/PEG – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze i PEG-6000.

	α -heliks	β -pločica	β -zavojnica	Neuređene strukture
WP	24.97 ± 2.19^a	25.25 ± 2.49^a	22 ± 0.41^a	27.82 ± 0.13^a
WP/Ara	24.7 ± 0.14^a	25.4 ± 0.14^a	21.9 ± 0^a	28.0 ± 0^a
sWP	24.0 ± 0.57^a	25.2 ± 0.42^a	22.0 ± 0.28^a	$28.85 \pm 0.07^{a,b}$
sWP/Ara	$27.53 \pm 1.95^{a,b}$	22.67 ± 1.80^a	22.6 ± 0.61^a	27.2 ± 0.62^a
sWP/Ara/PEG	22.47 ± 2.22^a	27.22 ± 2.13^a	22.1 ± 0.14^a	28.2 ± 0.24^a

Promene u površinskoj hidrofobnosti proteina surutke su praćene na osnovu vezivanja hidrofobne fluorescentne probe, ANS-a, čiji intenzitet fluorescencije zavisi od polarosti sredine u kojoj se nalazi. Kada se nekovalentno veže za hidrofobne delove na površini proteina, njen fluorescentni intenzitet se povećava, a talasna dužina emisionog maksimuma se smanjuje. Sonifikovani proteini surutke u prisustvu ili odsustvu saharida su povećali kvantni prinos ANS-a u poređenju sa netretiranim, nativnim proteinima (Grafik 1.4). Sonifikacija u uslovima makromolekulskog nagomilavanja, dovela je kako do povećanja intenziteta fluorescencije, tako i do pomeranja emisionog maksimuma prema nižim talasnim dužinama, sa 468 na 461 nm, ukazujući da intenzivno glikovani proteini surutke poseduju novo-izložene hidrofobne regione na površini proteina. Ranija studija je pokazala da ultrazvukom indukovano glikovanje glavnog alergena kravlje surutke, BLG-a, dovodi do povećane površinske hidrofobnosti zbog izlaganja hidrofobnih regiona na površinu proteina [9].

Za razliku od klasičnog tretmana zagrevanjem, kod sonifikacije su brzine zagrevanja i hlađenja ekstremno velike, i tako omogućavaju proteinima da ostanu u svojoj nativnoj konformaciji, čak i kada su tretirani snagom od $> 100 \text{ W/cm}^2$. Lokalizovana vrela mesta nastala brzim kolapsom akustičnih šupljina su kratkoživeća ($< 1 \mu\text{s}$) [95]. To kratko vreme je verovatno dovoljno dugačko da izloži reaktivne grupe proteina, kroz reverzibilno delimično razvijanje proteina i omogući odigravanje reakcija, ali je previše kratko da bi indukovalo značajne promene u konformaciji proteina. Uslovi makromolekulskog nagomilavanja dodatno stabilizuju strukturu proteina i tako zajedno sa sonifikacijom obezbeđuju blage reakcione uslove.

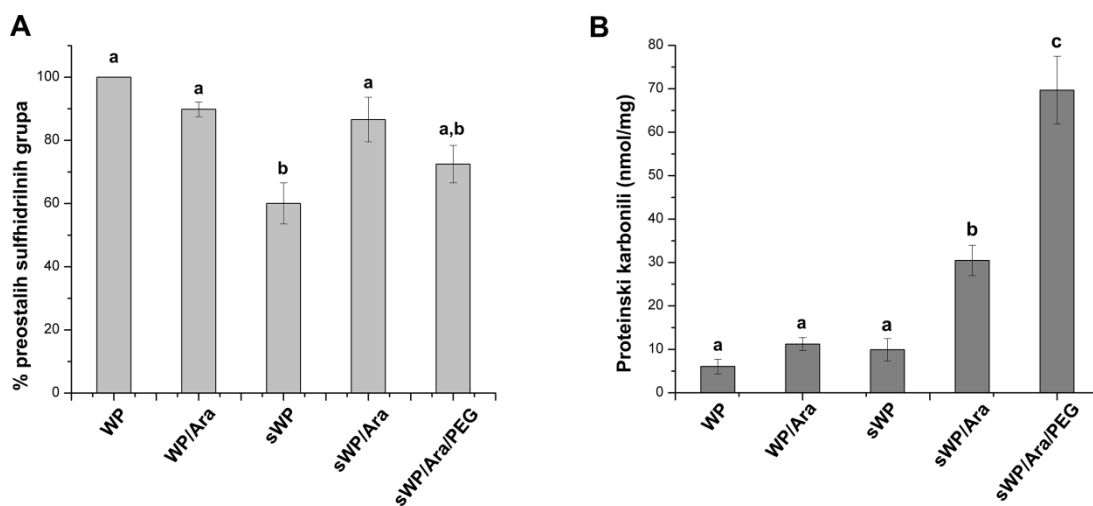


Grafik 1.4. Vezivanje fluorescentne hidrofobne probe, ANS-a, za sonifikovane alergene surutke u prisustvu ili odsustvu arabinoze i nagomilavajućeg agensa. Legenda: WP – proteini surutke, WP/Ara – proteini surutke u smeši sa arabinozom, sWP – sonifikovani proteini surutke, sWP/Ara – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze, sWP/Ara/PEG – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze i PEG-6000.

5.1.4. Oksidativne modifikacije proteina kravlje surutke

Sonifikacija dovodi do sonolize vode i generisanja slobodno-radikalskih vrsta, uključujući i hidroksil radikal [137]. Nekoliko studija je pokazalo da neenzimsko glikovanje model proteina takođe dovodi do formiranja slobodnih radikala [138]. S toga je u ovoj studiji ispitano da li Majarova reakcija indukovana sonifikacijom rezultuje u oksidativnim modifikacijama proteina kravlje surutke i da li makromolekulsko nagomilavanje utiče na ove oksidativne procese.

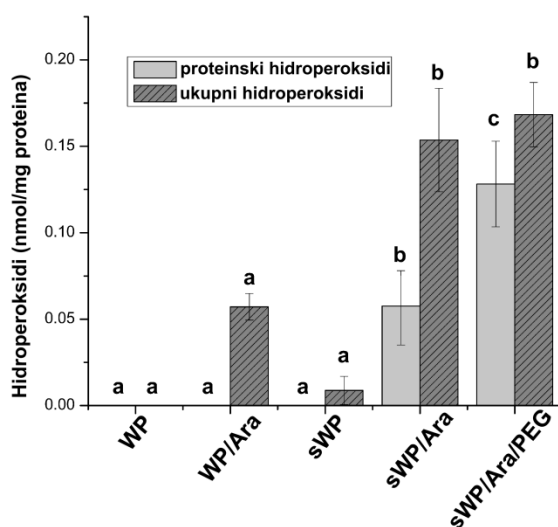
Sonifikacija proteina surutke dramatično je smanjila sadržaj slobodnih sulfhidrilnih grupa (Grafik 1.5.A). Međutim, stepen oksidacije sulfhidrilnih grupa pri sonifikaciji u prisustvu arabinoze je statistički značajno manji ($p < 0.05$), verovatno zbog zaštitnog efekta saharida. U uslovima makromolekulskog nagomilavanja, visok stepen realizacije Majarove reakcije je doveo do oksidacije –SH grupa i formiranja disulfidnih polimera. Sadržaj sulfhidrilnih grupa je u saglasnosti sa SDS-PAGE analizom (Slika 1.1.B) gde se uočava da je najveća količina disulfidnih polimera prisutna u sWP uzorku, manje ih je formirano u sWP/Ara/PEG uzorku, a neznatna količina se zapaža u sWP/Ara uzorku. Ovi rezultati ukazuju na zaštitni efekat saharida i PEG-6000.



Grafik 1.5. Sadržaj preostalih sulfhidrilnih grupa (A) i proteinskih karbonila (B) proteina surutke nakon tretmana sonifikacije u prisustvu ili odsustvu arabinoze i PEG-6000. Legenda: WP – proteini surutke, WP/Ara – proteini surutke u smeši sa arabinozom, sWP – sonifikovani proteini surutke, sWP/Ara – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze, sWP/Ara/PEG – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze i PEG-6000. Razlike srednjih vrednosti su analizirane jednosmernom ANOVA-om praćenom Takijevim testom. *a*, *b* i *c* označavaju statistički značajne razlike ($p < 0.05$).

Poznato je da hidrosil radikali mogu doprineti formiranju proteinskih karbonila. Pored toga, poznato je i da tokom Majarove reakcije nastaju reaktivni α -dikarbonili, koji uzrokuju oksidativnu deaminaciju baznih aminokiselinskih ostataka [139]. U sistemu gde je Majarova reakcija pospešena sonifikacijom, proteinski karbonili mogu nastati dejstvom hidrosil radikala poreklom iz sonolize vode i/ili dejstvom α -dikarbonila nastalih u Majarovoj reakciji. Grafik 1.5.B pokazuje da je sadržaj proteinskih karbonila

u sWP/Ara uzorku značajno povećan ($p < 0.05$) u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Znatno veći sadržaj proteinskih karbonila je detektovan u uzorku tretiranom u prisustvu PEG-6000, ukazujući da je formiranje karbonila u direktoj vezi sa stepenom realizacije Majarove reakcije. Odsustvo statistički značajnog sadržaja karbonila u sWP uzorku ukazuje da su proteinski karbonili nastali kao posledica efekata α -dikarbonila formiranih tokom Majarove reakcije. Meltreter je sa saradnicima pokazao da dolazi do oksidativnih modifikacija proteina surutke kada se zagrevaju u prisustvu laktoze, posebno oksidacije lizina do aminoadipat-semialdehida [140].



Grafik 1.6. Sadržaj ukupnih i proteinskih hidroperoksida proteina surutke nakon tretmana sonifikacije u prisustvu ili odsustvu arabinoze i PEG-6000. Legenda: WP – proteini surutke, WP/Ara – proteini surutke u smeši sa arabinozom, sWP – sonifikovani proteini surutke, sWP/Ara – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze, sWP/Ara/PEG – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze i PEG-6000. Razlike srednjih vrednosti su analizirane jednosmernom ANOVA-om praćenom Takijevim testom. *a, b i c* označavaju statistički značajne razlike ($p < 0.05$).

Veoma reaktivni OH \cdot radikali, indukovani kavitacijom, mogu podleći različitim reakcijama formirajući druge ROS, koji dalje mogu reagovati sa različitim hemijskim strukturama na proteinima, stvarajući proteinske radikale. Proteinski radikali reaguju sa O $_2$ pri čemu nastaje peroksil radikal koji može apstrahovati vodonikov atom, nakon čega se dobija proteinski hidroperoksid [141]. Tokom Majarove reakcije takođe može nastati H $_2$ O $_2$. On nastaje ili razgradnjom Amadorijevih produkata putem 1,2- ili 1,3-enolizacije i oksidacijom enolatnog anjona, ili auotooksidacijom saharida [142]. Formirani H $_2$ O $_2$ lako reaguje sa metalnim jonima, prisutnim u tragovima i daje hidroksil radikal. S toga, u sistemu gde je Majarova reakcija pospešena sonifikacijom, proteinski

hidroperoksidi mogu nastati kako kao posledica same sonifikacije, tako i kao posledica Majarove reakcije. U sonifikovanim uzorcima surutke sa arabinozom detektovana je mala količina proteinskih hidroperoksida u poređenju sa kontrolnim uzorcima (Grafik 1.6). Sadržaj proteinskih hidroperoksida u uzorku sonifikovanih proteina surutke u odsustvu saharida je bio ispod limita detekcije, što ukazuje da su proteinski hidroperoksidi nastali kao posledica realizacije Majarove reakcije, a ne kao posledica sonokatalize. U prisustvu PEG-6000 nastala je značajno veća ($p < 0.05$) količina proteinskih hidroperoksida, ukazujući da je veći stepen realizacije Majarove reakcije u direktnoj vezi sa povećanim oksidativnim promenama na proteinima.

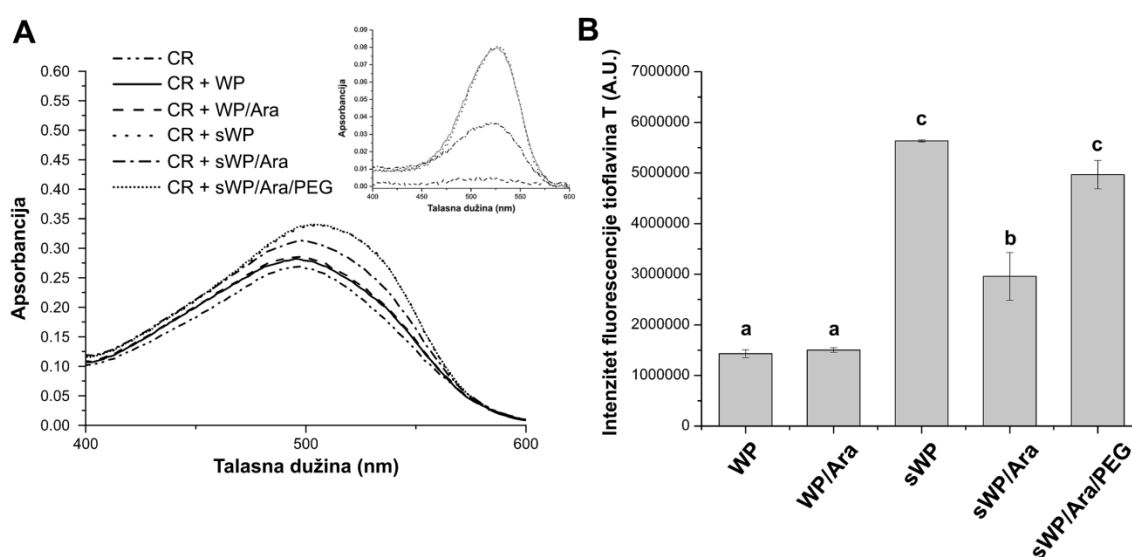
Određivanje ukupnih hidroperoksida pokazalo je da su hidroperoksidi prisutni u svim uzorcima koji sadrže arabinozu, ali da je njihov sadržaj značajno veći nakon tretmana sonifikacije (Grafik 1.6). U prisustvu nagomilavajućeg agensa nije primećen statistički značajan porast u sadržaju ukupnih hidroperoksida, ukazujući da uslovi makromolekulskog nagomilavanja pojačavaju oksidaciju proteina ali ne i autooksidaciju arabinoze.

Oksidativne promene na proteinima detektovane u vidu oksidacije sulfhidrilnih grupa, formiranja proteinskih karbonila i proteinskih hidroperoksida su od značaja za kvalitet hrane koja sadrži visoke količine proteina i saharida, a posebno u slučaju hrane obogaćene gvožđem, gde se očekuje da oksidacija proteina bude još izraženija.

5.1.5. Formiranje struktura sličnih amiloidu

Statopulos je sa saradnicima (2004), pokazao da sonifikacija mnogih proteina, čak strukturno veoma različitih, dovodi do formiranja struktura sličnih amiloidu (*engl.* Amyloid-like Structures - ALS) [143]. Formiranje ALS-a u sistemu sonifikovanih proteina surutke u prisustvu ili odsustvu arabinoze i PEG-6000 je ispitivano vezivanjem kongo crveno boje [144] i tioflavina T [145], dve boje koje se uobičajeno koriste za detekciju ALS-a. Kada se kongo crveno veže za fibrilarne strukture dolazi do promena u njegovom VIS-spektru, kao što su porast apsorpcije i pomeraj maksimuma apsorpcije prema većim talasnim dužinama. Vezivanjem kongo crvenog za sonifikovane proteine surutke došlo je porasta u njegovoj apsorpciji i do spektralnog pomeranja maksimuma na 530 nm (Grafik 1.7.A i insert grafika 1.7.A), ukazujući na formiranje ALS-a.

Prisustvo saharida tokom tretmana sonifikacije je smanjilo količinu formiranih ALS-a, zbog zaštitnog efekta koji arabinoza ostvaruje na promene u strukturi proteina surutke. Međutim, u prisustvu PEG-6000, zaštitni efekat arabinoze je prevaziđen i količina ALS-a je povećana. Slično rezultatima vezivanja kongo crvenog, fluorescencija tioflavina T je značajno povećana u interakciji sa sonifikovanim proteinima surutke (Grafik 1.7.B), ukazujući na prisustvo ALS-a u tom uzorku. Iako tokom sonifikacije arabinoza smanjuje formiranje ALS-a (smanjen intenzitet fluorescencije), visok stepen realizacije Majarove reakcije u uslovima makromolekulskog nagomilavanja dovodi do jednakog nivoa formiranja ALS-a kao u uzorku sonifikovanih proteina.



Grafik 1.7. Spektralni pomeraji u spektru kongo crvenog (A) i promene u intenzitetu fluorescencije tioflavina T (B) u prisustvu proteina surutke sonifikovanih u prisustvu ili odsustvu arbinioze i PEG-6000. Insert grafika A prikazuje diferencijalni spektar dobijen oduzimanjem spektra netretiranih proteina u prisustvu kongo crvenog od spektara sonifikovanih uzoraka, takođe u prisustvu kongo crvenog. Legenda: WP – proteini surutke, WP/Ara – proteini surutke u smeši sa arabinozom, sWP – sonifikovani proteini surutke, sWP/Ara – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze, sWP/Ara/PEG – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze i PEG-6000. Razlike srednjih vrednosti su analizirane jednosmernom ANOVA-om praćenom Takijevim testom. a, b i c označavaju statistički značajne razlike ($p < 0.05$).

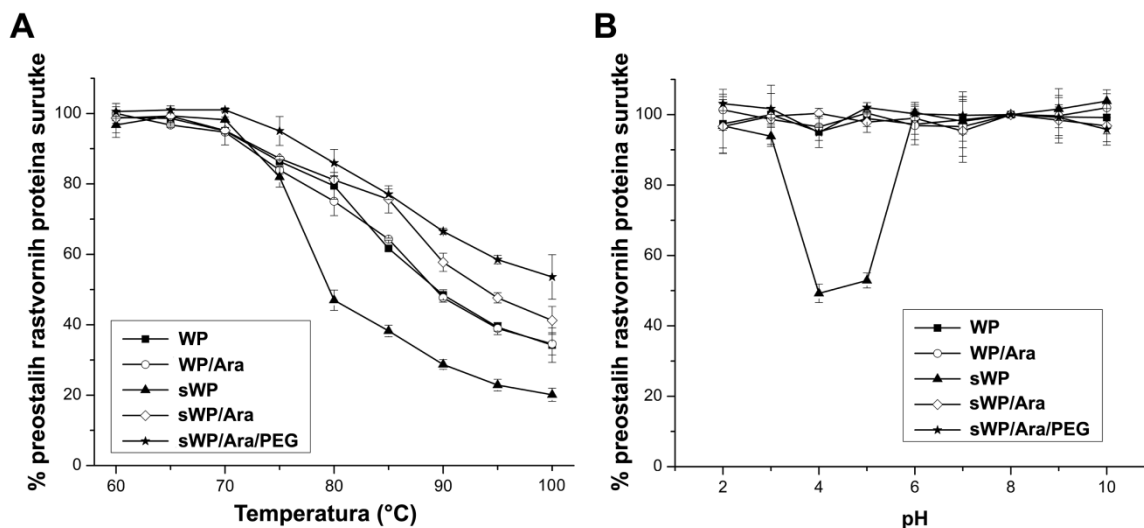
Formiranje ALS-a je u saglasnosti sa promenama u tercijarnim strukturama (Grafik 1.3.B), kao i sa prinosom disulfidnih polimera primećanih u SDS-PAGE analizi (Slika 1.1.B). U literaturi je takođe pokazano da uslovi makromolekulskog nagomilavanja povećavaju brzinu formiranja amiloidnih fibrila, i da oni povećavaju količinu polimera [146]. Zanimljivo je i da glikovanje BSA D-ribozom dovodi do

pogrešno uvijene forme BSA od koje nastaju globularni agregati slični amiloidu [147]. Prisustvo arabinoze tokom sonifikacije sprečava formiranje disulfidnih polimera i nenativnih disulfidnih veza koje su od posebnog značaja za formiranje ALS-a [19], dok sa druge strane, intenzivno neenzimsko glikovanje i uslovi makromolekulskog nagomilavanja pogoduju njihovom formiranju. Ovi rezultati pokazuju da je glikovanje proteina u Majarovoj reakciji u uslovima makromolekulskog nagomilavanja važan faktor koji pogoduje nastanku ALS-a.

5.1.6. Temperaturna stabilnost i stabilnost na različitim pH vrednostima

Temperaturna stabilnost netretiranih i sonifikovanih proteina surutke pri koncentraciji od 1 mg/ml je prikazana na grafiku 1.8.A. Temperaturna stabilnost nesonifikovanih uzoraka, WP i WP/Ara, je približno jednaka. Sonifikovani proteini surutke pokazuju značajno smanjenje rastvorljivosti na temperaturama preko 75 °C do čega najverovatnije dolazi zbog promena u tercijarnim strukturama i povećanoj površinskoj hidrofobnosti koje je izazvao tretman sonifikacije. Međutim, glikovani proteini pokazuju povećanje temperaturna stabilnosti, koje je izraženije u uzorku u kom je stepen realizacije Majarove reakcije veći. Ovakvo ponašanje se može objasniti vezanim saharidnim jedinicama koje sprečavaju agregaciju zbog steričnih smetnji [148]. Nekoliko studija je pokazalo smanjenu temperaturnu stabilnost zagrevanih proteina surutke i povećanu temperaturnu stabilnost proteina surutke glikovanih u Majarovoj reakciji indukovanoj zagrevanjem [148-150]. Povećan stepen glikovanja u uzorku tretiranom pod uslovima makromolekulskog nagomilavanja, značajno je poboljšao temperaturnu stabilnost, posebno na višim temperaturama.

Korzo-Martinez je sa saradnicima pokazala povećanu rastvorljivost proteina surutke na pH=5 koji su glikovani u Majarovoj reakciji indukovanoj tretmanom zagrevanja, dok su zagrevani proteini surutke u odsustvu šećera pokazali smanjenu rastvorljivost [151]. Ševalije je sa saradnicima našao da se rastvorljivost BLG-a smanjuje nakon tretmana zagrevanjem u pH opsegu 4,5 – 5,5, dok modifikovani BLG sa različitim saharidima pokazuje povećanu temperaturnu stabilnost u kiselom pH opsegu [149].



Grafik 1.8. Temperaturna stabilnost na pH 7 (A) i rastvorljivost na sobnoj temperaturi u funkciji od pH (B) netretiranih i sonifikovanih proteina surutke u prisustvu ili odsustvu arabinoze i PEG-6000. Legenda: WP – proteini surutke, WP/Ara – proteini surutke u smeši sa arabinozom, sWP – sonifikovani proteini surutke, sWP/Ara – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze, sWP/Ara/PEG – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze i PEG-6000.

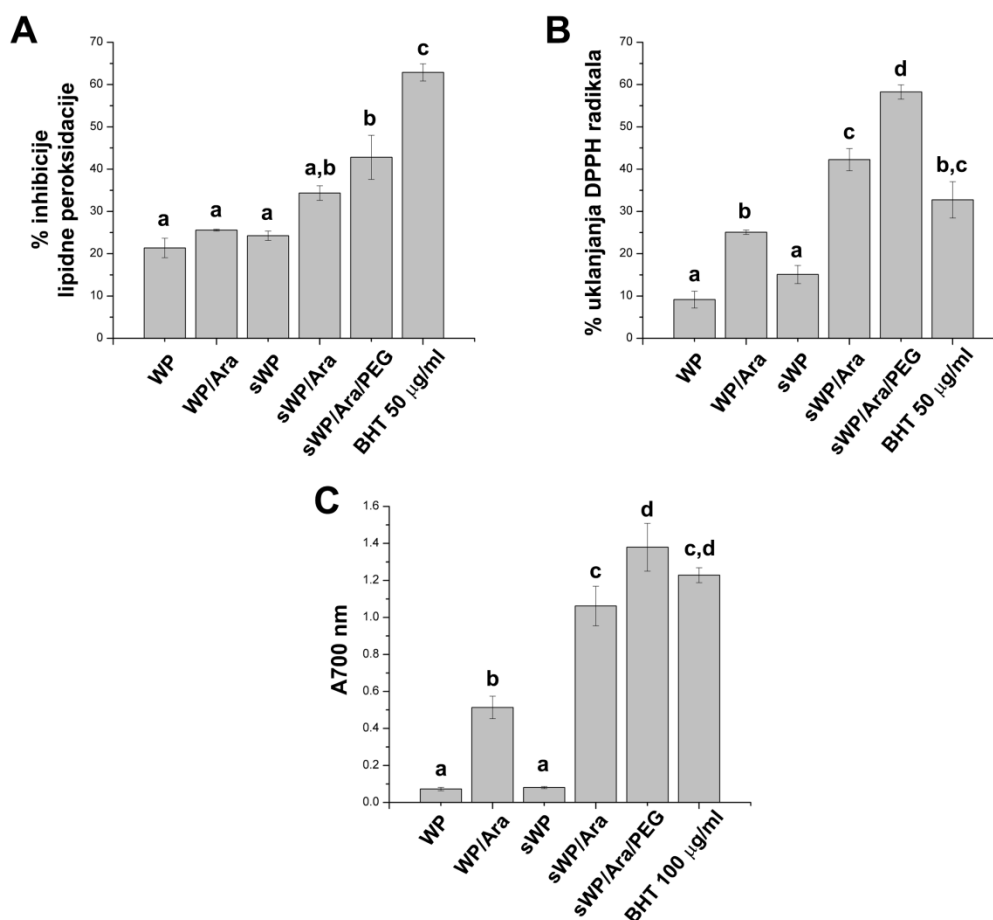
Rastvorljivost netretiranih i sonifikovani proteina surutke je takođe ispitivana u zavisnosti od pH vrednosti (Grafik 1.8.B). Netretirani proteini surutke su pokazali dobru rastvorljivost u širokom pH opsegu (2 – 10). Sonifikacija je smanjila rastvorljivost proteina u pH opsegu koji je blizak njihovoj pI vrednosti (3 – 5), dok je sonifikacija u prisustvu arabinoze (sa ili bez PEG-a) rezultovala u očuvanoj dobroj rastvorljivosti u širokom pH opsegu, ukazujući na zaštitni efekat glikovanja prema smanjenoj rastvorljivosti uzrokovanoj sonifikacijom.

5.1.7. Antioksidativne osobine

Nekoliko studija je našlo da proizvodi Majarove reakcije pospešene tretmanom sonifikacije pokazuju antioksidativnu moć [9, 152]. Stoga su ispitane antioksidativne osobine netretiranih i sonifikovanih proteina surutke.

Nativni, netretirani alergeni surutke imaju sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (Grafik 1.9.A). Međutim, nakon sonifikacije u prisustvu arabinoze, gde su se formirali Majarovi proizvodi, primećuje se povećanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije, koje je još značajnije nakon tretmana u uslovima makromolekulskog nagomilavanja. Sposobnost uklanjanja slobodnih radikala (Grafik 1.9.B), kao i ukupna

redukujuća moć, pokazale su sličan obrazac (Grafik 1.9.C). Porast antioksidativne aktivnosti u sWP/Ara uzorku, a posebno u sWP/Ara/PEG uzorku, prati trend stepena realizacije Majarove reakcije i formiranja Majarovih proizvoda. Vang je sa saradnicima povećao antioksidativnu moć izolata proteina surutke glikovanjem u Majarovoj reakciji indukovanoj tretmanom zagrevanja u rastvoru [153].



Grafik 1.9. Antioksidativna aktivnost proteina surutke sonifikovanih u prisustvu ili odsustvu arabinoze i nagomilavajućeg agensa, merena kao A) sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije, B) sposobnost uklanjanja DPPH radikala i C) ukupna redukujuća moć. Legenda: WP – proteini surutke, WP/Ara – proteini surutke u smeši sa arabinozom, sWP – sonifikovani proteini surutke, sWP/Ara – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze, sWP/Ara/PEG – sonifikovani proteini surutke u prisustvu arabinoze i PEG-6000. Razlike srednjih vrednosti su analizirane jednosmernom ANOVA-om praćenom Takijevim testom. *a, b, c* i *d* označavaju statistički značajne razlike ($p < 0.05$).

Tokom Majarove reakcije nastaju slobodno-radikaliski intermedijeri. Iako su proteinski hidroperoksidi dugoživeći, oni mogu biti katalitički degradovani (jonima gvožđa ili bakra) i dati visoko reaktivne i štetne slobodne radikale. Takođe, saharidi

moгу biti autooksidovani tokom Majarove reakcije jonima metala prisutnim u tragovima i dati H₂O₂ [154]. S toga, antioksidativna aktivnost proizvoda Majarove reakcije mođe neutralisati efekte slobodnih radikala nastalih od oksidativno modifikovanih proteina i saharida

5.2. Modifikacije alergena kamiljeg mleka u Majarovoj reakciji tokom tretmana sušenja raspršivanjem: karakterizacija i funkcionalne osobine

Popularnost kamiljeg mleka je zbog njegovih nutritivnih vrednosti, terapijskih efekata i hipoalergeni svojstava značajno porasla u novije vreme. Proizvodnja kamiljeg mleka u prahu produžava rok trajanja mleka i omogućava njegovu distribuciju širom sveta. Uobičajena tehnologija kojom se proizvodi mleko u prahu u industriji je sušenje raspršivanjem. Cilj ove studije bio je poređenje efekata dve različite metode za dobijanje mleka u prahu na proteine kamiljeg mleka i Majarovu reakciju: metode sušenja raspršivanjem, pri kojoj dolazi do izlaganja visokim temperaturama, i liofilizacije, kao metode bez učešća visokih temperatura koje bi favorizovale Majarovu reakciju. U ovom delu doktorske disertacije, punomasno kamilje mleko u prahu je dobijeno tretmanom sušenja raspršivanjem na pilot skali na šest različitih ulaznih temperatura (u opsegu 190 °C – 250 °C) i sušenjem smrzanjem (liofilizacijom, *engl.* freeze drying). Uzorci dobijeni sušenjem raspršivanjem pri ulaznim temperaturama 190 °C, 200 °C, 210 °C, 230 °C, 240 °C i 250 °C, su označeni kao SD190, SD200, SD210, SD230, SD240 and SD250, redom, dok je uzorak dobijen liofilizacijom označen kao FD. Proteinski profili, struktura proteina i realizacija Majarove reakcije uzoraka kamiljeg mleka u prahu dobijenog sušenjem raspršivanjem su upoređeni sa uzorcima kamiljeg mleka dobijenim liofilizacijom. Pored toga ispitane su i funkcionalne osobine proteina kamiljeg mleka u prahu, kao što su rastvorljivost i antioksidativna aktivnost.

Punomasno kamilje mleko u prahu, dobijeno sušenjem raspršivanjem i liofilizacijom, je rekonstituisano mešanjem 50 mg praha sa 1 ml 20 mM natrijum-fosfatnog pufera pH=6,8, tokom 1 h na sobnoj temperaturi uz blago mešanje. Nakon centrifugiranja zaostao je talog koji, slično ponašanju kravljeg mleka, nastaje usled gubitka sposobnosti kazeinskih micela da disosuju prilikom rehidracije [155].

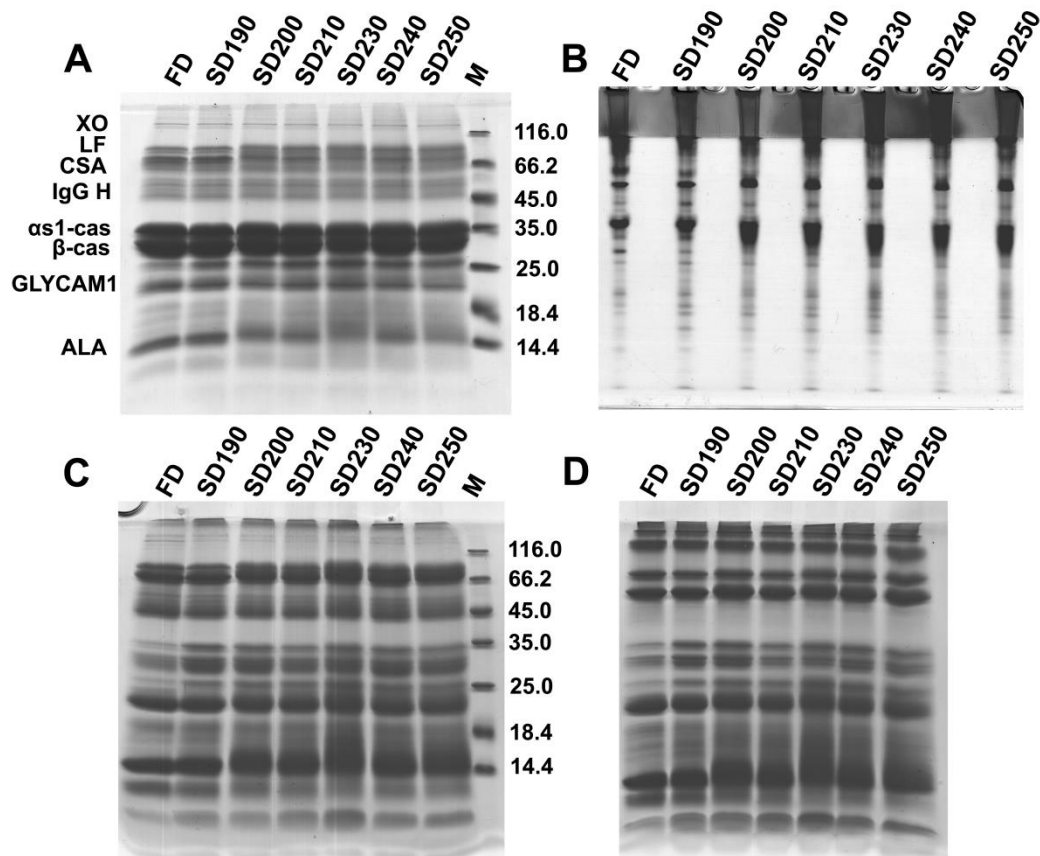
Solubilna frakcija je odmašćena i korišćena u svim eksperimentima. Koncentracija proteina u ovoj frakciji bila je oko 3 mg/ml. Imajući u vidu da punomasno kamilje mleko u prahu ima oko 25-26% proteina [156], može se izračunati da se u ovoj frakciji nalazi oko 25% ukupnih proteina mleka u prahu. Pored toga, u cilju dobijanja ukupnog proteinskog profila kamiljeg mleka, uzorci mleka u prahu su potpuno rastvoreni u denaturišućem puferu da (8 M urea, 2 M tiourea, 2% SDS, 20 mM natrijum fosfatni pufer pH=6,8) za SDS-PAGE.

5.2.1. Elektroforetska karakterizacija proteina kamiljeg mleka u prahu dobijenog tretmanom sušenja raspršivanjem

Uzorci kamiljeg mleka u prahu, rastvoreni u denaturišućem puferu, analizirani su SDS-PAGE elektroforezom u redukujućim uslovima (Slika 2.1.A), dok je proteinska frakcija ratvorna u fosfatnom puferu analizirana SDS-PAGE elektroforezom pod redukujućim (Slika 2.1.C) i neredukujućim (Slika 2.1.D) uslovima, kao i nativnom elektroforezom (slika 2.1.B).

Glavne proteinske trake ukupnog proteinskog profila kamiljeg mleka su pripisane ksantin oksidazi (*engl.* xanthine oxidase - XO), LF, kamiljem serum albuminu (*engl.* camel serum albumin - CSA), Ig, α_{s1} -kazeinu, β -kazeinu, ćelijskom adhezionom molekulu zavisnom od glikozilacije 1 (*engl.* glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1 - GLYCAM 1) i ALA na osnovu prethodno objavljenih rezultata masene spektrometrije [157-159].

U svim uzorcima ukupnog kamiljeg mleka u prahu najzastupljeniji proteini bili su α_{s1} -kazein i β -kazein (Slika 2.1.A). U elektroforetskim profilima proteinskih frakcija rastvornih u fosfatnom puferu zastupljenost α_{s1} -kazeina i β -kazeina je dramatično smanjena (Slike 2.1.C i 2.1.D), ukazujući na to da se u pomenutoj frakciji nalaze mahom proteini kamilje surutke. Kako je količina kazeina smanjena i u liofilizovanom i u uzorcima sušenim raspršivanjem, izgleda da je sam proces isparavanja, pre nego temperatura sušenja, odgovoran za smanjenu rastvorljivost kazeina. Štaviše, može se zapaziti da nakon liofilizacije kazeini jače agregiraju nego nakon sušenja raspršivanjem, što se reflektuje u manjoj solubilnosti kazeina u fosfatnom puferu i njegovom manjem udelu u rastvornoj proteinskoj frakciji.



Slika 2.1. Elektroforetska analiza kamiljeg mleka u prahu dobijenog sušenjem raspršivanjem i liofilizacijom. Ukupni proteini kamiljeg mleka u prahu rastvoreni u denaturišućem puferu i razdvojeni redukujućom SDS-PAGE analizom (A). Proteini frakcije kamiljeg mleka u prahu rastvorne u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH=6,8 razdvojeni u nativnoj PAGE analizi (B), u redukujućoj SDS-PAGE (C) i neredujućoj SDS-PAGE (D). Legenda: XO – ksantin oksidaza; LF - laktoferin; CSA – kamilji serum albumin; IgG H – teški lanac imunoglobulina G; α_{s1} -cas – α_{s1} -kazein; β -cas – β -kazein; GLYCAM 1 – ćelijski adhezioni molekul zavisao od glikozilacije 1; ALA – α -laktalbumin; FD – uzorak kamiljeg mleka u prahu dobijen liofilizacijom; SD190, SD200, SD210, SD230, SD240, SD250 - uzorci kamiljeg mleka u prahu dobijeni sušenjem raspršivanjem na ulaznim temperaturama od 190 °C, 200 °C, 210 °C, 230 °C, 240 °C i 250 °C, redom; M – proteinski molekularni markeri u kDa.

Poznato je da dehidracija kravljeg mleka, uključujući tretman sušenja raspršivanjem, dovodi do formiranja guste čestične strukture koja se sastoji od čvrsto asosovanih kazeinskih micela. Kazeini nemaju dobro definisanu sekundarnu i tercijarnu strukturu i tokom isparavanja vode molekuli kazeina iz susednih micela dolaze u blizak kontakt. Oni međusobno interaguju nekovalentnim, mahom hidrofobnim, interakcijama i tako formiraju klastere kazeinskih micela (agregate). U sveže dehidriranom stanju mleko u prahu se lako rastvara pod standardnim rehidratacionim uslovima, dok tokom

starenja mleka u prahu (tokom skladištenja) interakcije između kazeinskih micela postaju sve jače smanjujući rastvorljivost [86, 155, 160].

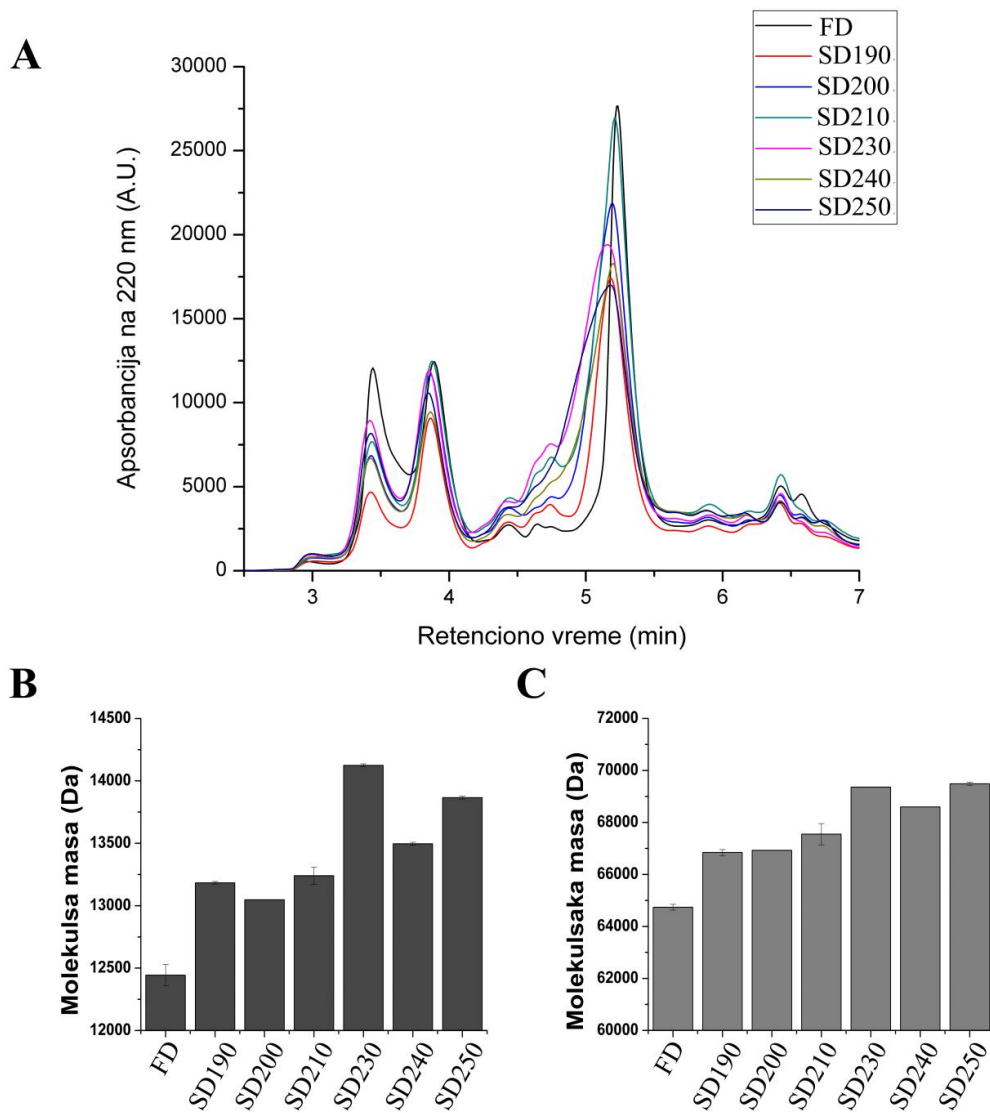
Proteinski profil uzoraka sušenih raspršivanjem u opsegu temperatura 190 °C – 250 °C odgovara profilu liofilizovanog uzorka u redukujućim i neredukujućim uslovima (Slika 2.1.A, 2.1.C i 2.1.D). Međutim, sušenje raspršivanjem na ulaznoj temperaturi 200 °C i višim dovodi do razmazivanja glavnih proteinskih traka, ALA, GLYCAM 1 i CSA, ka većim molekulskim masama (Slike 2.1.A, 2.1.C i 2.1.D). U nativnoj elektroforezi (Slika 2.1.B) u svim uzorcima dobijenim sušenjem raspršivanjem, razmazivanje proteinskih traka ka kiselijim pozicijama je još uočljivije, usled smanjenih pI vrednosti pored povećanih molekulskih masa. Nativna elektroforeza (Slika 2.1.B) takođe pokazuje prisustvo proteinskih agregata velikih molekulskih masa koje formiraju razmaz u gelu za koncentrovanje i koji su formirani u većem stepenu na višim ulaznim temperaturama sušenja. Ti agregati su rastvorni u fosfatnom puferu i nekovalentne su prirode, jer u denaturišućim uslovima (prisustvo SDS-a) oni nisu zapaženi. Elektroforetske analize svedoče o neujednačenom povećanju molekulske mase proteina i o neujednačenom smanjenju pI vrednosti proteina, što zajedno ukazuje na kovalentne modifikacije proteina kamiljeg mleka u neenzimskoj, spontanoj Majarovoj reakciji, koja je pospešena na visokim temperaturama.

5.2.2. Karakterizacija proteina rastvorne frakcije kamiljeg mleka u prahu

5.2.2.1. Analiza proteina rastvorne frakcije kamiljeg mleka u prahu razdvojenih gel-filtracijom

Proteini rastvorne frakcije su analizirani gel-filtracijom i njihovi preklopljeni spektri su prikazani na grafiku 2.2.A. U svim uzorcima se uočavaju tri glavna pika, koja po svojim retencionim vremenima odgovaraju ALA, CSA i IgG/XO. Pikovi koji odgovaraju ALA i CSA jasno pokazuju trend da sa porastom ulazne temperature tretmana dolazi do pomeranja maksimuma pika prema većim molekulskim masama (prema kraćim retencionim vremenima). Procene prosečnih molekulskih masa CSA i ALA izračunatih na osnovu hromatograma za svaku temperaturu tretmana su date na graficima 2.2.B i 2.2.C. Pored pomeranja maksimuma pika, takođe dolazi i do širenja pika, što ukazuje da su ALA i CSA prisutni u više formi različitih molekulskih masa, a

što bi mogla biti posledica vezivanja različitog broja molekula laktoze za amino grupe ovih proteina. Rezultati gel-filtracije su u saglasnosti sa elektroforetskim analizama (Slike 2.1.A, 2.1.C i 2.1.D).



Grafik 2.2. Preklapljeni hromatogrami gel-filtracije rastvornih frakcija kamiljeg mleka u prahu dobijenog sušenjem raspršivanjem na šest različitih ulaznih temperatura (190 °C – 250 °C) ili liofilizacijom (A). Prosečna molekulska masa odrađena za ALA (B) ili CSA (C) nakon tretmana sušenja raspršivanjem. Legenda: FD – uzorak kamiljeg mleka u prahu dobijen liofilizacijom; SD190, SD200, SD210, SD230, SD240, SD250 - uzorci kamiljeg mleka u prahu dobijeni sušenjem raspršivanjem na ulaznim temperaturama od 190 °C, 200 °C, 210 °C, 230 °C, 240 °C i 250 °C, redom.

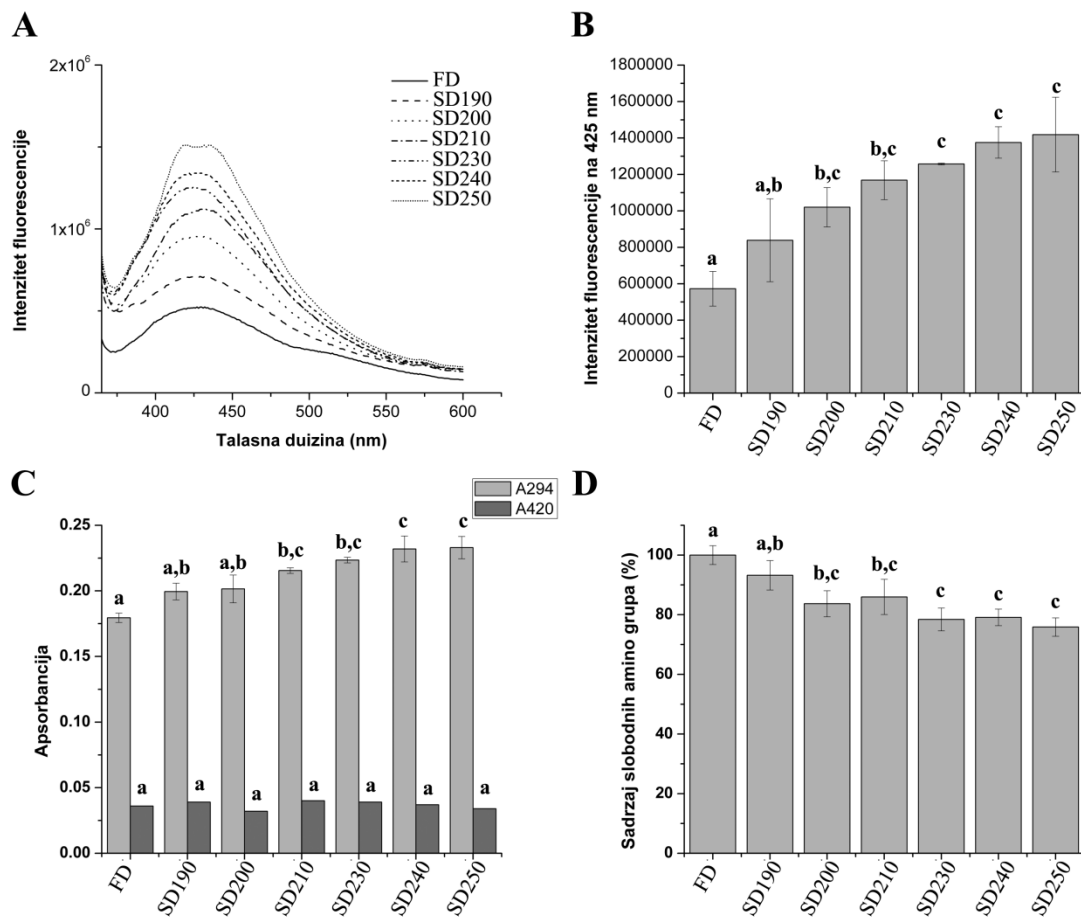
Interesantno je da je prosečna molekulska masa modifikovanog ALA (pa i CSA) najveća u uzorku SD230, što se može zapaziti i na SDS-PAGE u vidu najjačeg razmaza

ka većim molekulskim masama, u odnosu na ostale tretmane (Slike 2.1.C i 2.1.D). Ovo je verovatno posledica nešto smanjene dostupnosti slobodnih amino grupa na temperaturama 240 °C i 250 °C usled njihovog sternog zaklanjanja zbog većeg stepena agregacije i polimerizacije proteina, uključujući i molekule kazeina.

5.2.2.2. Praćenje stepena Majarove reakcije u rastvornoj frakciji kamiljeg mleka u prahu

Da bi se ispitao i uporedio stepen realizacije Majarove reakcije među uzorcima praćeno je prisustvo ranih, intermedijernih i kasnih proizvoda Majarove reakcije. Za detekciju ranih proizvoda snimani su fluorescentni spektri proteina rastvorne frakcije kamiljeg mleka u prahu (Grafik 2.3.A). Formiranje fluorofora sa emisionim maksimumom na oko 425 nm kada su ekscitovane na 350 nm dešava se u ranim fazama Majarove reakcije [26]. Zapaža se statistički značajno ($p < 0.05$) veći intenzitet fluorescencije na 425 nm u uzorcima mleka koje je dobijeno sušenjem raspršivanjem na temperaturama od 200 °C – 250 °C u odnosu na mleko dobijeno liofilizacijom (Grafik 2.3.A). Takođe se uočava i trend porasta u intenzitetu fluorescencije sa povišenjem temperature tretmana (Grafik 2.3.B). Intenzitet fluorescencije uzorka SD190 ne razlikuje se statistički značajno ($p < 0.05$) od intenziteta fluorescencije liofilizovanog uzorka, za razliku od uzoraka dobijenim pri višim temperaturama (200 °C – 250 °C), kod kojih je intenzitet fluorescencije statistički značajno ($p < 0.05$) viši od onog u liofilizovanom uzorku. Pored toga intenzitet fluorescencije na 425 nm uzorka SD190 statistički značajno ($p < 0.05$) je niži od intenziteta uzoraka dobijenim pri visokim temperaturama (230°C – 250 °C). Radi praćenja napredovanja Majarove reakcije kroz intermedijerne faze merena je UV-apsorbancija na 294 nm [136]. Koncentracija UV-apsorbirajućih intermedijernih proizvoda Majarove reakcije pokazuje trend postepenog porasta sa povišenjem ulazne temperature tretmana, međutim tek temperature od 210 °C ili više pokazuju statistički značajnu ($p < 0.05$) razliku u poređenju sa liofilizovanim uzorkom (Grafik 2.3.C). Takođe, pri visokim temperaturama (SD240 i SD250) A_{294} je statistički značajno ($p < 0.05$) veća nego nakon tretmana na nižim temperaturama (SD190 i SD200). Kasni proizvodi Majarove reakcije su mereni kao intenzitet tamnjenja, odnosno kao povećanje koncentracije VIS-apsorbirajućih jedinjenja (A_{420}) [161]. Formiranje tamnih pigmenata nije detektovano ni u jednom uzorku kamiljeg

mleka u prahu, u odnosu na liofilizovan uzorak, bez obzira na visoke ulazne temperature sušenja raspršivanjem (Grafik 2.3.C). Slično, kasne faze Majarove reakcije nisu detektovane ni kod sušenja raspršivanjem belanceta na ulaznoj temperaturi od 180 °C [162].



Grafik 2.3. Efekti tretmana sušenja raspršivanjem sa ulaznim temperaturama u opsegu 190 °C – 250 °C na (A) fluorescentne spektre, (B) intenzitet fluorescencije na 425 nm, (C) apsorbanciju na 294 nm i 420 nm i (D) sadržaj slobodnih amino grupa proteina solubilne frakcije kamiljeg mleka u prahu. Legenda: FD – uzorak kamiljeg mleka u prahu dobijen liofilizacijom; SD190, SD200, SD210, SD230, SD240, SD250 – uzorci kamiljeg mleka u prahu dobijeni sušenjem raspršivanjem na ulaznim temperaturama od 190 °C, 200 °C, 210 °C, 230 °C, 240 °C i 250 °C, redom. Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3) i analizirani jednosmernom ANOVA-om uz Takijev test. a, b, c i d označavaju statistički značajne razlike (p < 0.05).

Stepen realizacije Majarove reakcije je takođe praćen određivanjem sadržaja slobodnih amino grupa (Grafik 2.3.D). Kako amino grupe proteina direktno učestvuju u reakciji sa karbonilnom grupom saharida, stepen njihovog blokiranja glikovanjem ili/i ostalim modifikacijama direktno je proporcionalan stepenu Majarove reakcije. Tretman

sušenja raspršivanjem sa povećanjem ulazne temperature pokazuje trend postepenog smanjenja sadržaja slobodnih amino grupa. Ulazne temperature od 200 °C ili više, su rezultovale u statistički značajno ($p < 0.05$) manjem sadržaju slobodnih amino grupa u odnosu na tretman liofilizacije. Nakon tretmana na 250 °C nađeno je oko 25% manje slobodnih amino grupa u odnosu na liofilizovani uzorak. Uzorak SD190 nije pokazao statistički značajnu ($p < 0.05$) razliku u odnosu na liofilizovani uzorak, ali je u njemu je nađeno statistički značajno ($p < 0.05$) viši sadržaj amino grupa nego u uzorcima dobijenim pri visokim temperaturama (230 °C – 250 °C).

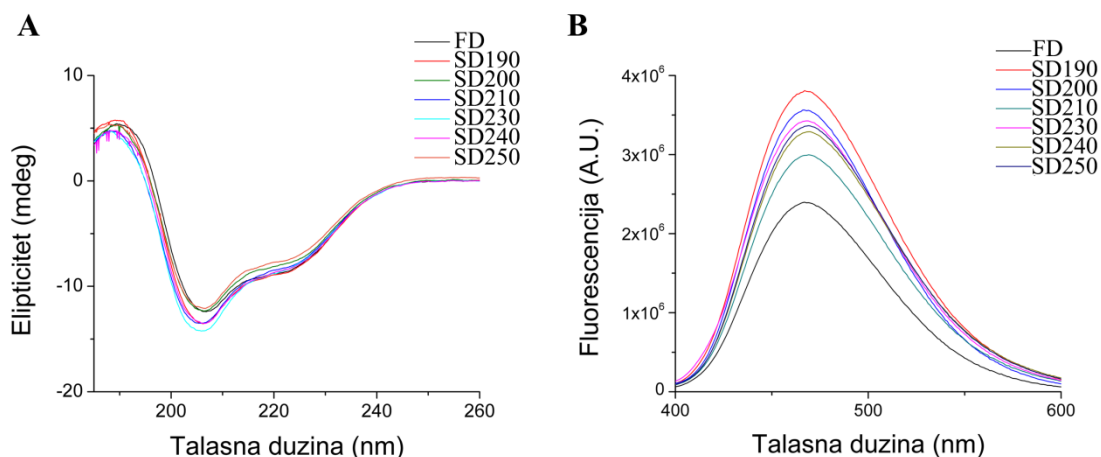
Spektrofluorimetrijska i spektrofotometrijska analiza i određivanje sadržaja slobodnih amino grupa su međusobno u saglasnosti i pokazuju intenzivniju realizaciju Majarove reakcije na višim ulaznim temperaturama tretmana (230 °C – 250 °C) u odnosu na niže ulazne temperature (190 °C – 210 °C). Iako je reakcija u ovim uzorcima ubrzana u poređenju sa liofilizovanim uzorkom, ona se dominantno realizuje u ranim fazama. Tamni pigmenti nisu detektovani ni u jednom uzorku, a poređenje formiranja ranih i intermedijernih proizvoda pokazuje da sa povišenjem ulazne temperature ovaj odnos ide u korist ranih proizvoda (Tabela 2.2). Razlog za to je veoma kratko vreme koje kapi mleka provedu u komori za sušenje raspršivanjem i koje se meri u sekundama [163]. Interesantno, ove analize takođe pokazuju da se u uzorku SD190 proizvodi Majarove reakcije ne razlikuju statistički značajno od onih u liofilizovanom uzorku, što ukazuje da ova temperatura u kratkom vremenu nije dovoljna da značajnije ubrza Majarovu reakciju na proteinima kamiljeg mleka u odnosu na tretman liofilizacijom.

Tabela 2.2. Relativni odnos ranih i intermedijernih proizvoda Majarove reakcije u zavisnosti od ulaznih temperatura sušenja raspršivanjem. Odnos ranih i intermedijernih proizvoda izračunat je na sledeći način: relativna razlika ranih proizvoda (intenzitet fluorescencije na 425 nm uzoraka sušenih raspršivanjem / intenzitet fluorescencije na 425 nm liofilizovanog uzorka) / relativna razlika apsorbancije na 294 nm (apsorbancija na 294 nm uzoraka sušenih raspršivanjem / apsorbancija na 294 nm liofilizovanog uzorka).

	FD	SD190	SD200	SD210	SD230	SD240	SD250
Rani/intermedijern i proizvodi	1	1.32	1.59	1.70	1.76	1.86	1.91

5.2.2.3. Analiza sekundarnih struktura i površinske hidrofobnosti proteina rastvorne frakcije kamiljeg mleka u prahu

Za ispitivanje sekundarnih struktura proteina rastvorne frakcije kamiljeg mleka u prahu snimljeni su CD spektri u dalekoj UV oblasti (Grafik 2.4.A). Svi uzorci sušeni raspršivanjem i liofilizovani uzorak pokazuju veoma slične spektre sa minimumom na oko 205 nm, koji je karakterističan u spektru kamiljeg ALA [164]. Izračunavanje sekundarnih struktura primenom matematičkog modela koji je predložio Rausen sa saradnicima (2003) [126], pokazuje da nema statistički značajnih razlika u sadržaju sekundarnih struktura među proteinima koji su pretrpeli tretman sušenja raspršivanjem ili liofilizacijom (Tabela 2.3). Ovi rezultati ukazuju da ulazne temperature u opsegu 190 °C – 250 °C sa izlaznim temperaturama koje ih prate, u opsegu 71 °C – 92 °C, ne utiču na sekundarne strukture proteina kamiljeg mleka. Ovo je u skladu sa prethodno objavljenom literaturom u kojoj je pokazano da je malo verovatano da je ulazna temperatura uzrok denaturacije proteina kravljeg mleka ili drugih proteina [163, 165]. Sa druge strane, prisustvo saharida (laktoze) tokom tretmana, takođe ostvaruje termoprotektivne efekte na strukturu proteina [166].



Grafik 2.4. (A) CD spektri proteina rastvorne frakcije kamiljeg mleka nakon tretmana sušenja raspršivanjem ili liofilizacije, u dalekoj UV oblasti. **(B)** Vezivanje ANS-a, fluorescentne probe osetljive na polarnost sredine, za proteine rastvorne frakcije kamiljeg mleka nakon tretmana sušenja raspršivanjem ili liofilizacije. Legenda: FD – uzorak kamiljeg mleka u prahu dobijen liofilizacijom; SD190, SD200, SD210, SD230, SD240, SD250 – uzorci kamiljeg mleka u prahu dobijeni sušenjem raspršivanjem na ulaznim temperaturama od 190 °C, 200 °C, 210 °C, 230 °C, 240 °C i 250 °C, redom.

Tabela 2.3. Procentni udeo sekundarnih struktura proteina rastvorne frakcije kamiljeg mleka nakon tretmana sušenja raspršivanjem pri ulaznim temperaturama od 190 °C – 250 °C je određen na osnovu matematičkog modela predloženog od strane Rausena sa saradnicima (2003) [126]. Razlike u sadržaju sekundarnih struktura su analizirane jednosmerom ANOVA-om sa višestrukim poređenjem. *a* prikazuje odsustvo statistički značajnih razlika.

	α -heliksi	β -pločice	β -zavoji	Neuređene strukture
FD	22.46 ± 0.41 ^a	18.48 ± 0.64 ^a	12.53 ± 0.00 ^a	37.70 ± 0.06 ^a
SD190	22.59 ± 0.42 ^a	18.94 ± 0.55 ^a	12.53 ± 0.00 ^a	37.89 ± 0.09 ^a
SD200	22.04 ± 1.39 ^a	19.16 ± 0.76 ^a	12.53 ± 0.00 ^a	38.01 ± 0.43 ^a
SD210	21.28 ± 0.39 ^a	20.34 ± 0.09 ^a	12.53 ± 0.00 ^a	38.31 ± 0.1 ^a
SD230	21.13 ± 0.8 ^a	20.00 ± 0.83 ^a	12.53 ± 0.00 ^a	38.38 ± 0.13 ^a
SD240	21.68 ± 1.07 ^a	19.77 ± 0.78 ^a	12.53 ± 0.00 ^a	38.15 ± 0.28 ^a
SD250	22.50 ± 1.01 ^a	19.17 ± 1.13 ^a	12.53 ± 0.00 ^a	37.91 ± 0.36 ^a

Površinska hidrofobnost proteina kamiljeg mleka dobijenog liofilizacijom i sušenjem raspršivanjem upoređena je ispitivanjem vezivanja fluorescentne probe, ANS-a. Nekovalentno vezivanje ANS-a za hidrofobne regione na površini proteina dovodi do povećanja njegove fluorescencije. ANS u interakciji sa proteinima rastvorne frakcije kamiljeg mleka iz uzoraka sušenih raspršivanjem pokazuje veći kvantni prinos, u odnosu na kvantni prinos u interakcijama sa proteinima koji su pretrpeli tretman liofilizacije (Grafik 2.4.B), ukazujući da sušenje raspršivanjem rezultira u većoj površinskoj hidrofobnosti proteina nego tretman liofilizacije. Dejstvo temperaturom sušenja od 190 °C uzrokuje najveću hidrofobnost usled parcijalnog odvijanja proteina i izlaganja hidrofobnih regiona. Na temperaturama 200 °C i 210 °C hidrofobnost polako opada usled većeg kovalentnog vezivanja hidrofilnih molekula šećera za proteine u Majarovoj reakciji. Medjutim, pri visokim temperaturama (230 °C -250 °C) odvijanje proteina i izlaganje hidrofobnih regiona je zastupljenije u odnosu na hidrofilitnost vezanog saharida, što rezultira u većoj hidrofobnosti u odnosu na uzorak SD210. Stoga je površinska hidrofobnost proteina tokom Majarove reakcije rezultanta nivoa izlaganja

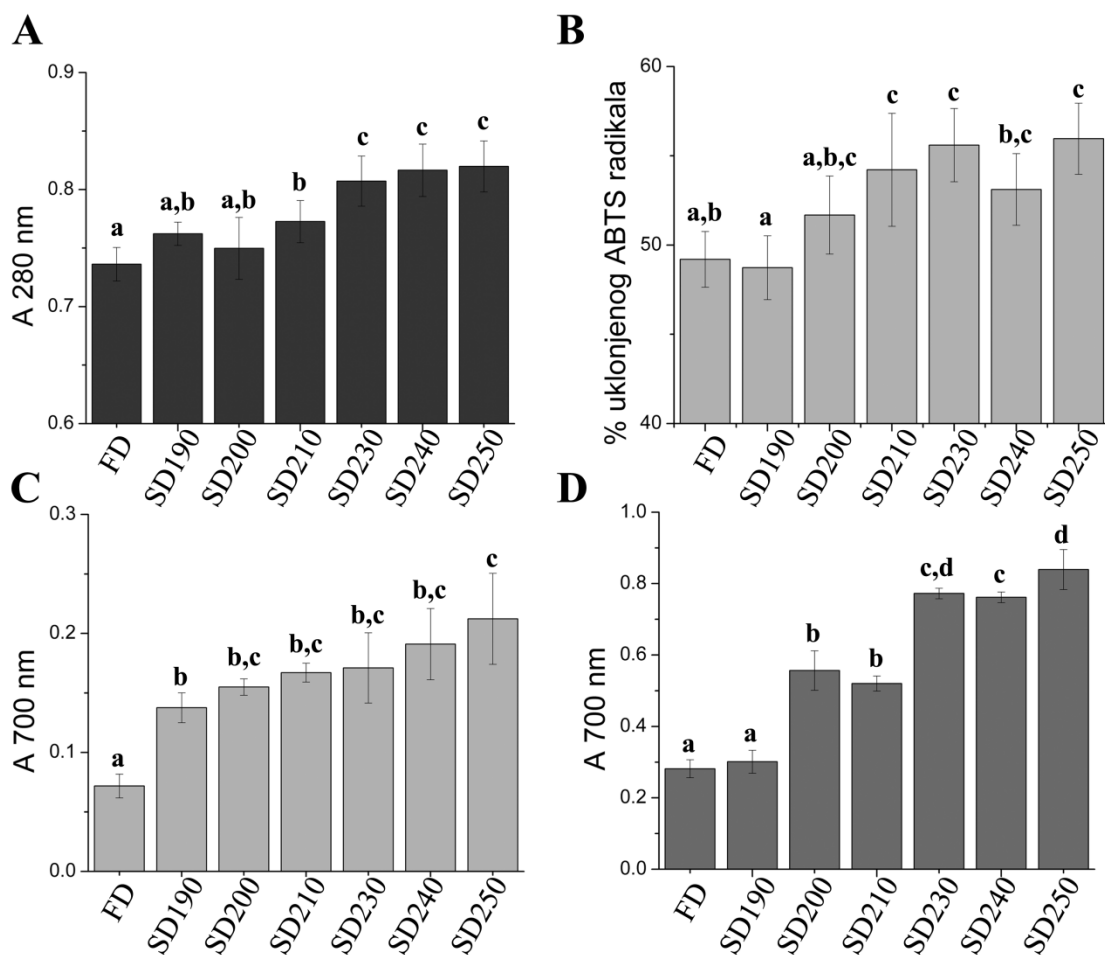
hidrofobnih regiona, koji zavisi od stepena odvijanja proteina, i nivoa modifikacije proteina hidrofilnim vrstama, koji pak zavisi od stepena napredovanja Majarove reakcije. Pored toga, treba imati na umu da se u testiranim proteinskim frakcijama nalazi mala količina kazeina, čija se površinska hidrofobnost zapravo najviše povećava usled visoke temperature, dovodeći do agregacije.

Kratko vreme koje proteini provedu u komori za sušenje pri visokim ulaznim temperaturama je dovoljno dugo da dovede do parcijalnog odvijanja i povećane površinske hidrofobnosti, ali nedovoljno da dovede do značajnijih promena u sekundarnim strukturama proteina kamiljeg mleka.

5.2.2.4. Ispitivanje rastvorljivosti proteina kamiljeg mleka u prahu dobijenog tretmanom sušenja raspršivanjem i liofilizacijom

Rastvorljivost kamiljeg mleka u prahu dobijenog sušenjem na različitim temperaturama ili liofilizacijom je upoređena merenjem apsorbancije na 280 nm neposredno nakon opisanog procesa rekonstitucije. Apsorbancija na 280 nm je direktno proporcionalna koncentraciji proteina u rastvornoj frakciji. Katehong je sa saradnicima (2017) pokazao da sušenje raspršivanjem belanceta na ulaznim temperaturama od 180 °C ili nižim, ne dovodi do statistički značajnih razlika u rastvorljivosti proteina [162]. Uzorci kamiljeg mleka sušeni pri visokim temperaturama (230 °C – 250 °C), pokazuju statistički značajno ($p < 0.05$) bolju rastvorljivost u odnosu na uzorke dobijene sušenjem na nižim temperaturama (190 °C – 210 °C) ili liofilizacijom (Grafik 2.5.A). Uzorci sušeni na nižim temperaturama (SD190 i SD200) ne pokazuju statistički značajnu ($p < 0.05$) razliku u rastvorljivosti u odnosu na liofilizovani uzorak. Ovi rezultati se mogu objasniti kovalentnim vezivanjem laktoze za proteine kamiljeg mleka u Majarovoj reakciji, što čini ove proteine hidrofilnijim i rastvornijim u vodenom rastvoru. Vezana laktoza takođe stvara sterne smetnje koje sprečavaju agregaciju. Tako je pozitivan efekat koje glikovanje ima na rastvorljivost proteina kompenzovalo negativan efekat Majarove reakcije na formiranje nerastvornih nekovalentnih agregata i kao krajnji rezultat doveo do neto povećane rastvorljivosti kako monomernih formi proteina, tako i agregata (koji su pokazani u nativnoj elektroforezi, slika 2.1.B). Pojava da glikovanje proteina kamiljeg mleka u Majarovoj reakciji dovodi do poboljšane rastvorljivosti i

temperатурне стабилности, показано је како у поглављу 5.1.6. ове докторске дисертације, тако и у литератури [148].



Grafik 2.5. (A) A280 nm u 5 puta razblaženoj rastvornoj frakciji rekonstituisanog kamiljeg mleka u prahu koncentracije 50 mg/ml u 20 mM fosfatnom puferu pH=6.8. (B) Sposobnost uklanjanja ABTS slobodnog radikala rastvorne frakcije kamiljeg mleka u prahu. (C) Redukujuća moć suspenzije ukupnog kamiljeg mleka u prahu. (D) Redukujuća moć solubilne frakcije kamiljeg mleka u prahu. Legenda: FD – uzorak kamiljeg mleka u prahu dobijen liofilizacijom; SD190, SD200, SD210, SD230, SD240, SD250 – uzorci kamiljeg mleka u prahu dobijeni sušenjem raspršivanjem na ulaznim temperaturama od 190 °C, 200 °C, 210 °C, 230 °C, 240 °C i 250 °C, redom. Podaci su analizirani jednosmernom ANOVA-om uz Takijev test. *a*, *b*, *c* i *d* označavaju statistički značajne razlike ($p < 0.05$).

5.2.3 Antioksidativna aktivnost kamiljeg mleka u prahu i njegovih rastvornih frakcija

Kamilje mleko je poznato po svojim izuzetnim antioksidativnim osobinama zbog visoke koncentracije vitamina C, čak do 6 puta više u poređenju sa kravljim mlekom [167, 168]. Takođe, proteini kamiljeg mleka kao što su β -kazein, ALA, LF imaju značajan doprinos antioksidativnoj aktivnosti kamiljeg mleka [169]. Efekti ulazne temperature tokom tretmana sušenja raspršivanjem na antioksidativnu aktivnost frakcije kamiljeg mleka u prahu rastvorne u fosfatnom puferu su ispitivani određivanjem ukupne redukujuće moći i sposobnosti uklanjanja ABTS^{•+} slobodnog radikala (Grafici 2.5.B, 2.5.C i 2.5.D). Rastvorne frakcije kamiljeg mleka pokazuju generalni trend kako postepenog porasta sposobnosti uklanjanja ABTS^{•+} radikala (Grafik 2.5.B), tako i redukujuće moći (Grafik 2.5.C), od liofilizovanog uzorka prema uzorku SD250. Uzorci sušeni na nižim temperaturama (SD190 i SD200) ne pokazuju statistički značajnu ($p < 0.05$) razliku u kapacitetu uklanjanja ABTS^{•+} radikala u odnosu na liofilizovani uzorak. Uzorci sušeni na temperaturama od 210 °C do 250 °C posedovali su statistički značajno ($p < 0.05$) veću moć uklanjanja ABTS^{•+} radikala, kako u odnosu na liofilizovani uzorak, tako i u odnosu na uzorak SD190. Uzorci sušeni raspršivanjem, u rasponu temperatura od 200 °C do 250 °C, pokazali su statistički značajno ($p < 0.05$) veću redukujuću moć u odnosu na uzorak SD190 i liofilizovani uzorak. U uzorcima tretiranim visokim temperaturama (230 °C – 250 °C) detektovana je statistički značajno ($p < 0.05$) veća redukujuća moć od one u uzorcima sušenim pri nižim temperaturama (SD200 i SD210), pri čemu je uzorak SD250 imao statistički značajno ($p < 0.05$) veću redukujuću moć od svih testiranih uzoraka. Ovi rezultati ispitivanja antioksidativne moći u potpunosti koreliraju sa stepenom realizacije Majarove reakcije, i takođe su u saglasnosti sa rezultatima iz odeljka 5.1.7. ove disertacije, gde je zapaženo povećanje antioksidativne aktivnosti proteina kravljeg mleka modifikovanih u visokom stepenu u Majarovoj reakciji. Kortés Janjes sa saradnicima je takođe pokazala da rani proizvodi Majarove reakcije proteina kravljeg mleka imaju izražena antioksidativna svojstva [170].

Rezultati ovog dela disertacije jasno pokazuju da tokom dobijanja kamiljeg mleka u prahu tretmanom sušenja raspršivanjem na visokim temperaturama, tj. temperaturama većim od 200 °C dolazi do intenzivnije Majarove reakcije u odnosu na

niže temperature sušenja, rezultujući u rastvorljivijem mleku u prahu, koje pritom ima i bolje antioksidativne osobine.

Antioksidativna aktivnost koja potiče od prisustva Majarovih proizvoda značajno doprinosi poboljšanoj stabilnosti prilikom skladištenja mlečnih proizvoda u prahu, jer kako je pokazano, usporava lipidnu peroksidaciju i formiranje isparljivih jedinjenja neprijatnog mirisa [171, 172]. Tako, povećanje antioksidativne aktivnosti tokom samog procesa sušenja na visokim temperaturama može doprineti stabilnosti i produženom roku trajanja kamiljeg mleka u prahu. Na kravljem mleku u prahu su Park i saradnici [173] pokazali da sa povišenjem ulaznih temperatura dolazi do smanjenja lipidne peroksidacije, što je objašnjeno formiranjem većih čestica koje enkapsuliraju više masti, ostavljajući tako manje slobodnih masti na površini čestica tj. izloženih kiseoniku. Rezultati ove disertacije ukazuju na to da bi veća antioksidativna aktivnost mleka u prahu dobijena na višim ulaznim temperaturama, usled intenzivnije Majarove reakcije, mogla takodje da doprinosi smanjenju lipidne peroksidacije.

Sa druge strane lipidna peroksidacija je glavni mehanizam razvoja nepoželjnih aroma u mleku u prahu. Pomenuta grupa autora je takodje pokazala na kravljem mleku da povećanje ulazne temperature (do 260 C) pojačava slatko-aromatične, a smanjuje kartonske arome (*engl.* cardboard flavour) zajedno sa pratećim isparljivim proizvodima lipidne peroksidacije, kao i da dolazi do opšteg poboljšanja kvaliteta aroma na povišenim ulaznim temperaturama [85]. Stoga, se može očekivati da jači intenzitet Majarove reakcije, kao rezultat dejstva visokih ulaznih temperatura pri sušenju kamiljeg mleka raspršivanjem, pored pokazane bolje rastvorljivosti i antioksidativne aktivnosti, može imati i pozitivne efekte na aromu mleka u prahu, a samim tim i bolju prihvatljivost od strane konzumenata.

5.3. Modifikacije glavnog alergena kravljeg mleka, β -laktoglobulina, u Majarovoj reakciji tokom tretmana zagrevanja u rastvoru: karakterizacija i imunološke osobine

U ishrani savremenog čoveka je jako zastupljena termički procesovana hrana koja je bogata u sadržaju AGE (10 do 100 puta više nego u termički netretiranoj hrani). U zapadnim zemljama je prosečan dnevni unos AGE proizvoda procenjen na 25 – 75

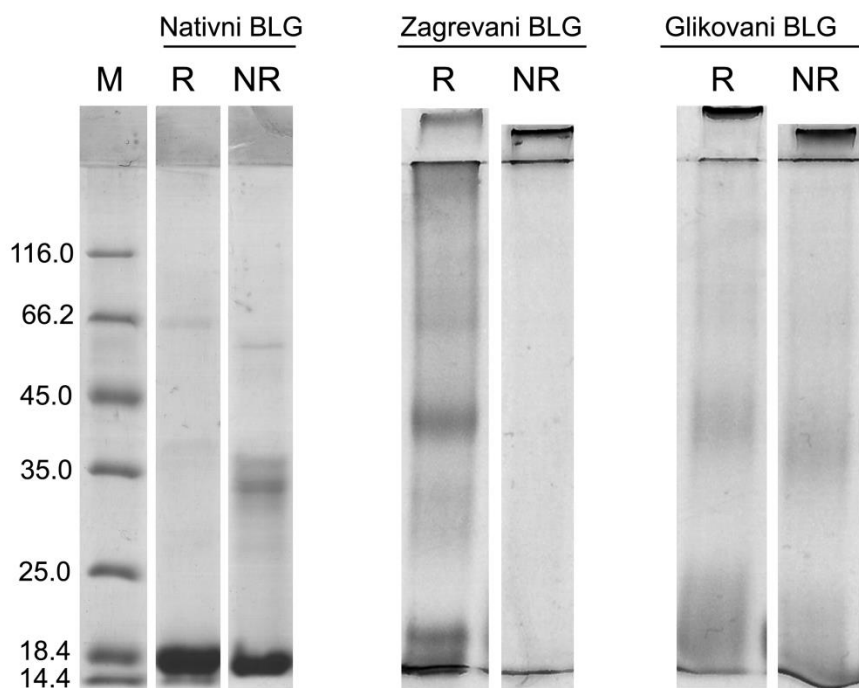
mg [174]. Poznato je da alergeni hrane modifikovani u Majarovoj reakciji pokazuju izmenjene imunološke osobine u odnosu na native alergene [77, 175-178]. U ovom delu disertacije su ispitani efekti intenzivne Majarove reakcije na neke imunološke osobine glavnog alergena kravljeg mleka, BLG-a.

5.3.1. Karakterizacija glikovanog BLG-a SDS-PAGE analizom i cirkularnim dihiroizmom

BLG glikovan glukozom tretmanom zagrevanja u rastvoru (10 mg/ml BLG, 50 mM natrijum-fosfatni pufer, pH=8,0, 60 °C tokom 10 dana) je analiziran elektroforetski i cirkularnim dihiroizmom i poređen sa netretiranim, nativnim BLG-om i BLG-om zagrevanim u rastvoru u odsustvu glukoze (Slika 3.1). Nativni BLG u redukujućim uslovima pokazuje traku na 18 kDa, što odgovara njegovoj molekularnoj masi, dok u neredukujućim uslovima dodatno pokazuje i bledu traku disulfidnog dimera, koji se u prisustvu β -merkaptotetanolu redukuje do monomerne forme. BLG zagrevan u rastvoru, pod neredukujućim uslovima prisutan je isključivo u formi polimera, monomerna forma se ne zapaža. Nakon redukcije disulfidnih mostova, on se javlja u formi monomera, dimera i trimera, dok se forma polimera značajno smanjuje, ukazujući da je najveći broj kovalentnih veza u zagrevanom uzorku disulfidne prirode. Glikovani BLG i u redukujućim i neredukujućim uslovima pokazuje traku na 18 kDa koja se širi prema većim molekularnim masama, što je karakteristično za proteine modifikovane u Majarovoj reakciji. U glikovanom uzorku formirani su i dimeri i polimeri BLG-a, kovalentnim vezama koje nisu disulfidne, jer redukujući uslovi nemaju efekte na njihovo prisustvo.

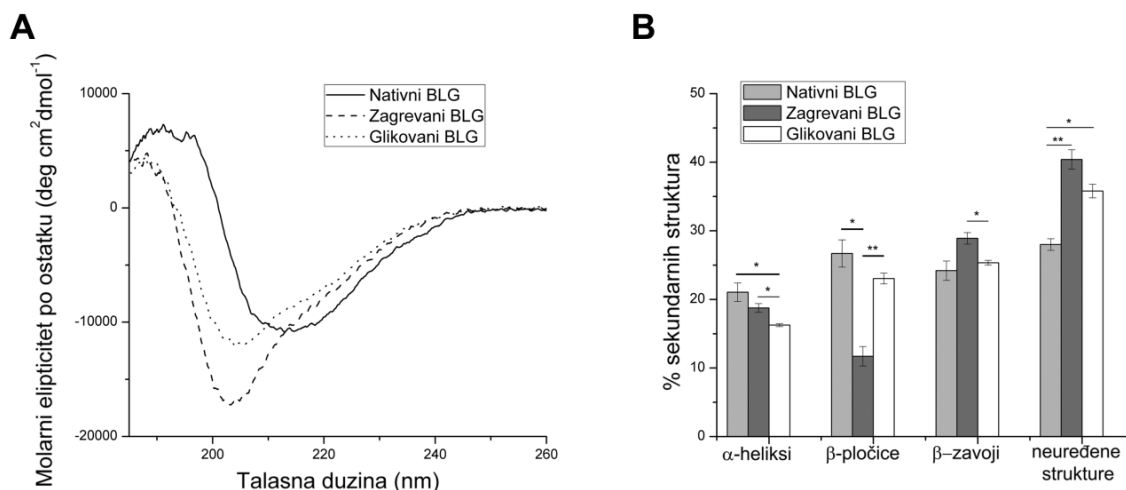
Promene u sekundarnim strukturama BLG-a tokom tretmana zagrevanja u rastvoru praćene su snimanjem CD spektara u dalekoj UV oblasti (Grafik 3.1). Karakteristični minimum pika nativnog BLG-a na 215 nm je pomeren prema nižim talasnim dužinama nakon tretmana zagrevanja, kako u prisustvu tako i u odsustvu glukoze, ukazujući na smanjenje sadržaja uređenih sekundarnih struktura. Međutim, zagrevanje u odsustvu glukoze dovodi i do značajnog produblivanja pika, što nije zapaženo u prisustvu glukoze, ukazujući na još drastičnije smanjenje uređenih struktura. Zaista, softverska analiza CD spektara (Grafik 3.1.B) je pokazala da glikovani BLG ima smanjen sadržaj α -heliksa i povećan sadržaj neuređenih struktura, ukazujući na direktnu

konverziju uređenih u neuređene strukture tokom Majarove reakcije potpomognute zagrevanjem u rastvoru. Sa druge strane, BLG zagrevan u rastvoru u poređenju sa nativnim BLG-om pokazuje smanjen sadržaj α -heliksa i β -pločica uz značajniji porast neuređenih struktura.



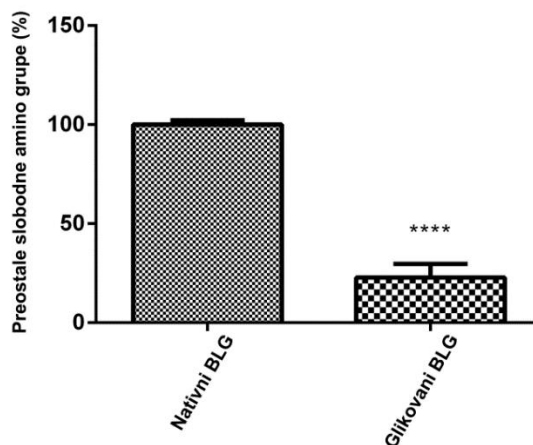
Slika 3.1. Proteinski profil nativnog, zagrevanog i glikovanog BLG-a na 12% SDS-PAGE gelu pod redukujućim i neredukujućim uslovima. Proteinske trake su bojene CBB bojom. Legenda: R – redukujući uslovi; NR – neredukujući uslovi; M – proteinski molekulski markeri u kDa.

BLG zagreavan u rastvoru pod istim uslovima kao i glikovan BLG, samo u odsustvu glukoze, pokazuje značajne razlike u strukturi proteina i u stepenu agregacije u poređenju sa glikovanim BLG-om. Fizičko-hemijske promene koje su pretrpeli glikovani i zagrevani BLG su kvalitativno različite. Prisustvo glukoze tokom termičkog tretmana ostvaruje zaštitne efekte na strukturu BLG-a. Zaštitni efekat saharida na denaturaciju i agregaciju BLG-a izazvanu termičkim tretmanom je dobro poznat u literaturi [148, 179, 180]. S toga, strukturne promene indukovane Majarovom reakcijom nisu jednostavna suma termički izazvanih promena i kovalentnog vezivanja saharida, već Majarova reakcija, kao kompleksan process sa nizom konsekvenci, rezultuje u jedinstvenim modifikacijama proteina.



Grafik 3.1. (A) CD spektri nativnog, zagrevanog i glikovanog BLG-a u dalekoj UV oblasti. (B) Procentni sadržaj sekundarnih struktura je procenjen primenom CONTIN algoritma dostupnog u CDPro paketu na osnovu referentnog seta proteina SP29. Razlike u sadržaj sekundarnih struktura su analizirane Studentovim t-testom. * i ** se odnose na statističku značajnost sa vrednošću parametra $p < 0.05$ i 0.01 , redom.

5.3.2. Stepen glikovanja BLG-a

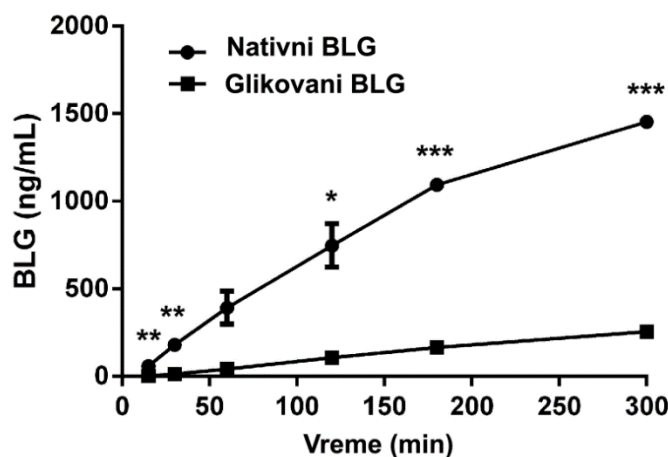


Grafik 3.2. Procena stepena realizacije Majarove reakcije određivanjem sadržaja slobodnih amino grupa OPA metodom. Sadržaj slobodnih amino grupa je statistički poređen Studentovim t-testom. ** označava nivo pouzdanosti od $p < 0.0001$.**

Stepen glikovanja BLG-a u Majarovoj reakciji tokom tretmana zagrevanja u rastvoru u prisustvu glukoze je određen na osnovu smanjenja sadržaja slobodnih amino grupa. Rezultati pokazuju da glikovani BLG sadrži samo 25% slobodnih amino grupa od ukupnih 100% u nativnom proteinu, ukazujući da je 75% amino grupa BLG-a

učestvovalo u reakciji sa karbonilnom grupom glukoze (Grafik 3.2). Ovako intenzivno glikovanje dovelo je do promena u sekundarnim strukturama i do formiranja kovalentnih dimera i polimera (Grafik 3.1 i Slika 3.1).

5.3.3. Glikovanje BLG-a smanjuje transport kroz Caco-2 ćelijski monosloj

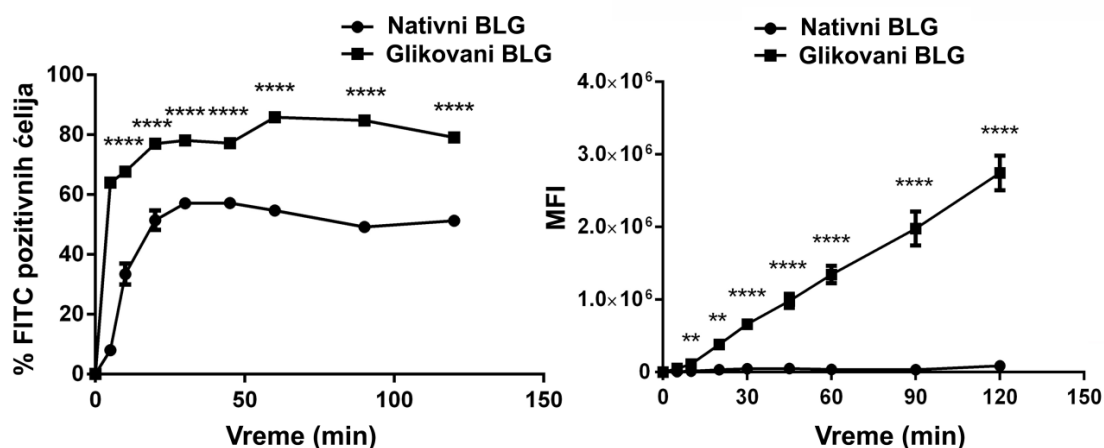


Grafik 3.3. Biodostupnost nativnog i glikovanog BLG-a u *in vitro* testu, merena kao transcitoza nativnog i glikovanog BLG-a kroz Caco-2 ćelijski monosloj. Transport je meren u različitim vremenima do 300 min. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm SD. Jedan reprezentativni eksperiment od tri nezavisna je prikazan. *, **, i *** predstavljaju značajnost na nivou $p < 0.05$, 0.01, i 0.001, redom.

Kako bi glikovani proteini ostvarili imunološke efekte, oni moraju biti u mogućnosti da prođu intestinalnu epitelijalnu barijeru i da dođu u kontakt sa ćelijama imunskog sistema. Transport alergena kroz epitelijalnu barijeru može da se dešava na dva načina, transcelularno ili paracelularno. Pokazano je da je glavni put apsorpcije nativnog BLG-a u *in vivo* uslovima transcelularni [51, 181]. Transport nativnog i glikovanog BLG-a je ispitan u *in vitro* sistemu, na Caco-2 ćelijskom monosloju, modelu funkcije intestinalne barijere. Nativni i glikovani BLG su nanošeni sa apikalne strane Caco-2 ćelija i praćen je njihov transepitelijalni transport u vremenu tako što je sa bazolateralne strane određivana koncentracija BLG-a nakon 15, 30, 60, 120, 180 i 300 minuta (Grafik 3.3). Glikovanje je dramatično smanjilo koncentraciju BLG-a u bazolateralnom odeljku u poređenju sa nativnim BLG-om. Transport obe forme BLG-a je bio kontinualan ukazujući na očuvane čvrste veze među ćelijama monosloja i isključujući mogućnost paracelularnog transporta. Smanjen transport glikovane forme je

uzrokovan fizičko-hemijskim promenama koje su se dogodile tokom Majarove reakcije, kao što je delimično razvijanje proteina i formiranje multimera visokih molekulskih masa, što otežava transcitozu. Smanjena intestinalna propustljivost alergena dovodi do smanjene njihove apsorpcije što dalje može voditi do smanjene aktivacije senzitisanih mast ćelija u *lamini propriae* [182]. Rot je sa saradnicima pokazao da BLG i ALA koji pretrpe tretman pasterizacije koji uzrokuje agregaciju alergena, imaju smanjeni potencijal da izazovu anafilaktičku reakciju usled smanjene intestinalne apsorpcije [51].

5.3.4. Glikovanje BLG-a povećava preuzimanje alergena od strane dendritskih ćelija

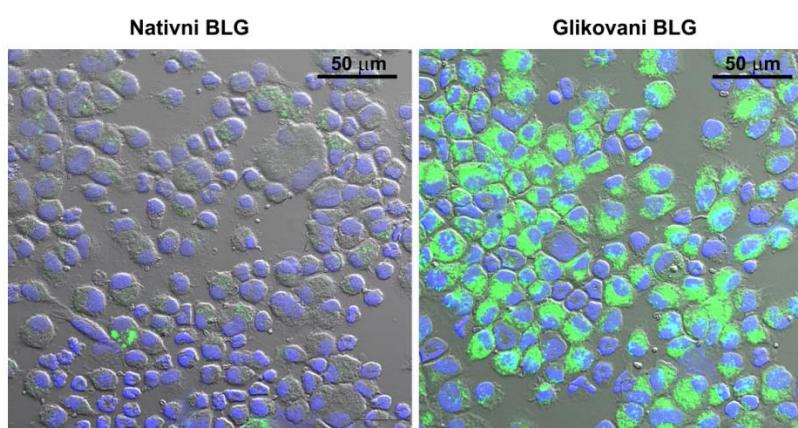


Grafik 3.4. Preuzimanje nativnog i glikovanog BLG-a obeleženih FITC-om od strane dendritskih ćelija, praćeno protočnom citometrijom u vremenskim tačkama do 120 min. Preuzimanje je predstavljeno kao A) procenat FITC-pozitivnih ćelija ili kao B) MFI. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti iz dva nezavisna eksperimenta \pm S.E.M. (n=5) i analizirani Studentovim t-testom. Razlike su statistički značajne ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.0001$ (****).

Nakon prolaska intestinalne barijere, alergeni se susreću sa brojnim ćelijama imunskog sistema. Ovde smo ispitali efekte glikovanja BLG-a u Majarovoj reakciji na njegovo preuzimanje od strane dendritskih ćelija koje su *in vitro* diferencirane i propagirane iz prekursora iz kostne srži miša. Nativni ili glikovani BLG, obeleženi fluorescentnom bojom - FITC-om, su inkubirani sa dendritskim ćelijama i njihovo preuzimanje je praćeno protočnom citometrijom nakon određenih vremenskih intervala. Preuzimanje obe BLG forme, mereno kao procenat FITC-pozitivnih ćelija (Grafik 3.4.A) bilo je zavisno od vremena i dostiglo je plato nakon 30 minuta, dok je MFI ćelija kontinuirano rastao u toku 120 minuta (Grafik 3.4.B). Glikovani BLG je preuziman

značajno efikasnije; u njegovom prisustvu 85 % ćelija je bilo FITC-pozitivno, u poređenju sa 55 % u prisustvu nativnog BLG-a (Grafik 3.4.A). Statistički značajano povećanje preuzimanja glikovanog BLG-a je zapaženo i merenjem MFI-a u svakoj vremenskoj tački (Grafik 3.4.B). Slični rezultati, povećanog preuzimanja glikovanog potentnog alergena hrane, ovalbumina, su dobijeni u eksperimentima sa mišjim dendritskim ćelijama iz kostne srži ili sa humanim mijeloidnim dendritskim ćelijama [75, 76, 183].

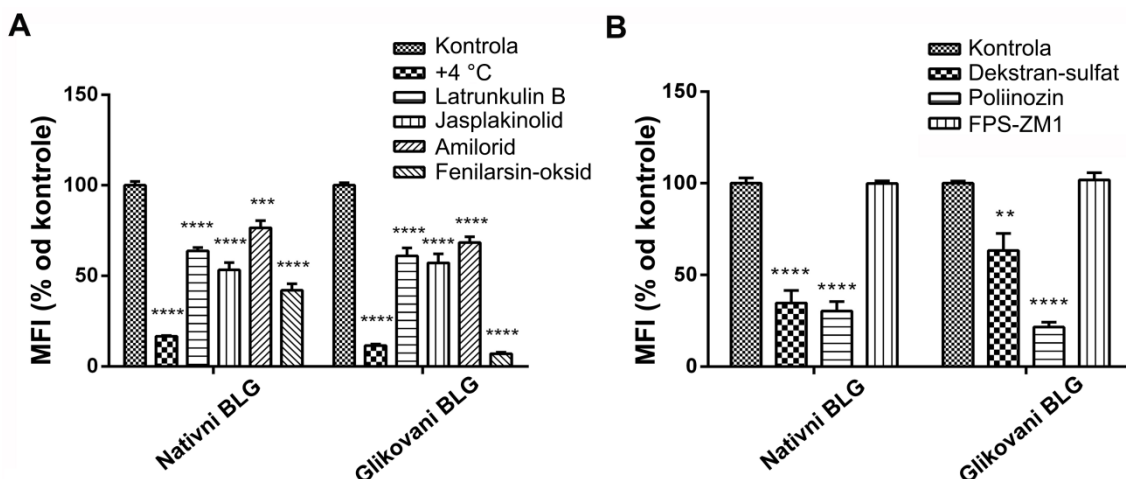
Dendritske ćelije inkubirane sa fluorescentno obeleženim nativnim ili glikovanim BLG-om su takođe posmatrane pod konfokalnim mikroskopom (Slika 3.2). Konfokalne mikrografije pokazuju značajno intenzivniji fluorescentni signal u prisustvu glikovanog BLG-a u poređenju sa nativnim BLG-om, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim protočnom citometrijom.



Slika 3.2. Konfokalne mikrografije dendritskih ćelija inkubiranih sa FITC-obeleženim nativnim ili glikovanim BLG-om u toku 30 minuta.

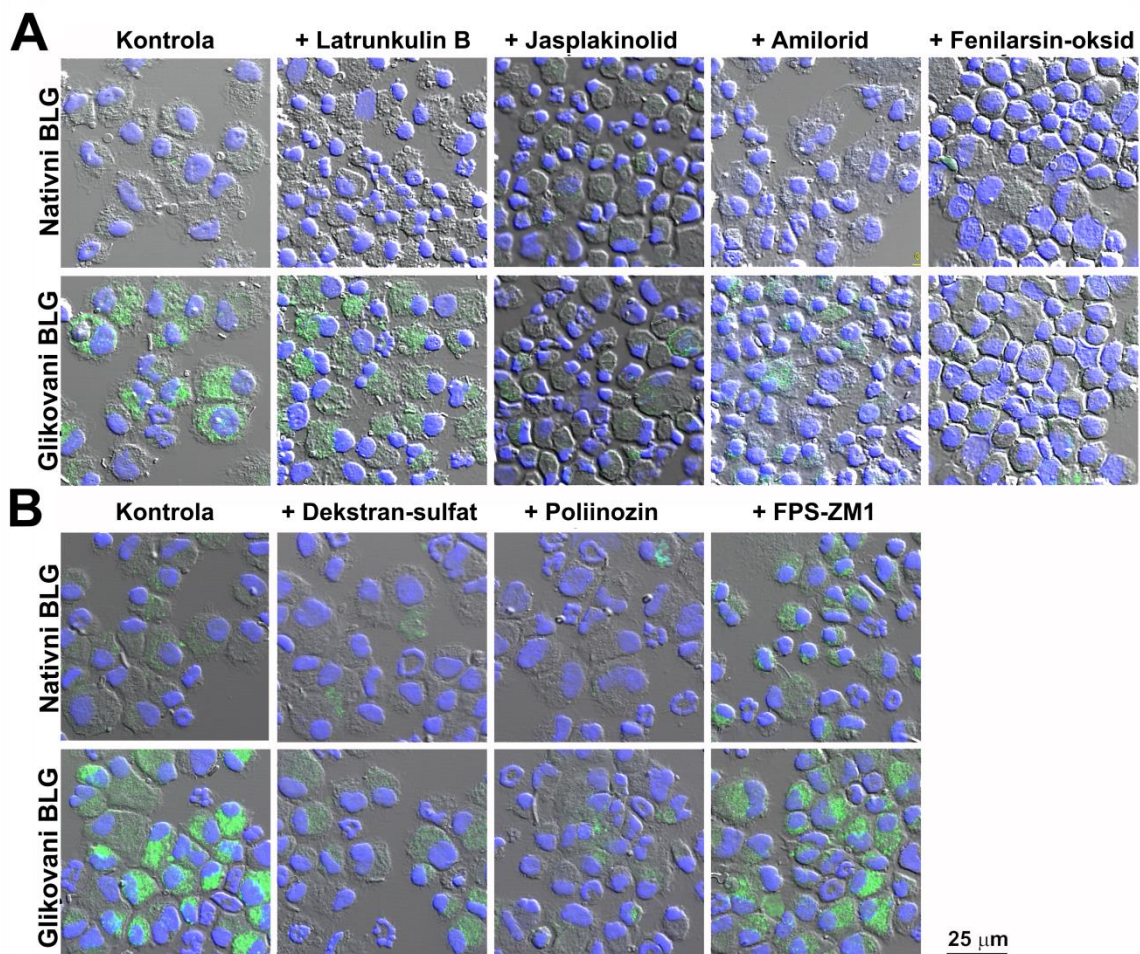
5.3.5. Dendritske ćelije internalizuju BLG putem receptorom-posredovane endocitoze, preko SR-a

Za bolje razumevanje procesa preuzimanja nativnog i glikovanog BLG-a od strane dendritskih ćelija, sprovedeni su eksperimenti sa farmakološkim inhibitorima različitih puteva internalizacije. Na početku, da bi se ispitalo da li je internalizacija BLG formi aktivan ćelijski proces, eksperiment preuzimanja alergena je izveden na +4 °C. To je dovelo do gotovo totalne inhibicije preuzimanja obe forme alergena (Grafik 3.5.A), ukazujući da je proces aktivan i energetska zavisan.



Grafik 3.5. Studije mehanizma preuzimanja nativnog i glikovanog BLG-a obeleženih FITC-om u prisustvu različitih inhibitora. Dendritske ćelije su pre inkubacije sa alergenima bile tretirane tokom 30 minuta sa A) inhibitorima različitih mehanizama preuzimanja: latrunkulin B – inhibitor polimerizacije aktina, jasplakinolidom – inhibitorom fagocitoze, amiloridom – inhibitorom makropinocitoze i fenilarsin-oksidiom – inhibitorom endocitoze posredovane receptorom, ili sa B) inhibitorima specifičnih receptora: dekstran-sulfatom i poliinozinom – inhibitorima SR, FPS-ZM1 – inhibitorom RAGE receptora. Preuzimanje alergena je analizirano protočnom citometrijom i rezultati su predstavljani kao MFI-relativno u odnosu na preuzimanje u odsustvu inhibitora \pm S.E.M. ($n = 6$). Rezultati su analizirani Studentovim t-testom i razlike srednjih vrednosti su smatrane statistički značajnim kada je $p < 0.01, 0.001$ i 0.0001 (, *** i ****, redom).**

Tretman ćelija sa latrunkulinom B ili jasplakinolidom, jedinjenjima koja su poznata da interferiraju sa polimerizacijom i funkcijom aktina i time inhibiraju fagocitozu [184, 185], smanjio je preuzimanje obe forme BLG-a (Grafik 3.5.A i Slika 3.3), što ukazuje da su aktin i fagocitoza uključeni u proces preuzimanja alergena. Amilorid, inhibitor makropinocitoze [186], takođe smanjuje preuzimanje obe BLG forme (Grafik 3.5.A i Slika 3.3). Na kraju je ispitivan efekat fenilarsinoksida, inhibitora internalizacije površinskih receptora [187], koji je rezultovao u snažnoj inhibiciji endocitoze nativnog BLG-a i gotovo potpuno inhibirao endocitozu glikovanog BLG-a (Grafik 3.5.A i Slika 3.3). Inhibitorne studije su pokazale da nativni i glikovani BLG bivaju internalizovani od strane dendritskih ćelija u procesima zavisnim od aktina, konstitutivnom makropinocitozom i endocitozom posredovanom receptorima. Izražena inhibicija preuzimanja glikovanog BLG-a fenilarsin-oksidiom ukazuje da je došlo do preusmeravanja glikovane forme prema mehanizmu endocitoze posredovane receptorima.



Slika 3.3. Studije mehanizma preuzimanja nativnog i glikovanog BLG-a u prisustvu A) inhibitora različitih mehanizama preuzimanja ili B) inhibitora specifičnih receptora praćene konfokalnom mikroskopijom. Dendritske ćelije su tokom 30 minuta bile tretirane odgovarajućim inhibitorima, a zatim inkubirane sa FITC-obeležnim nativnim ili glikovanim BLG-om.

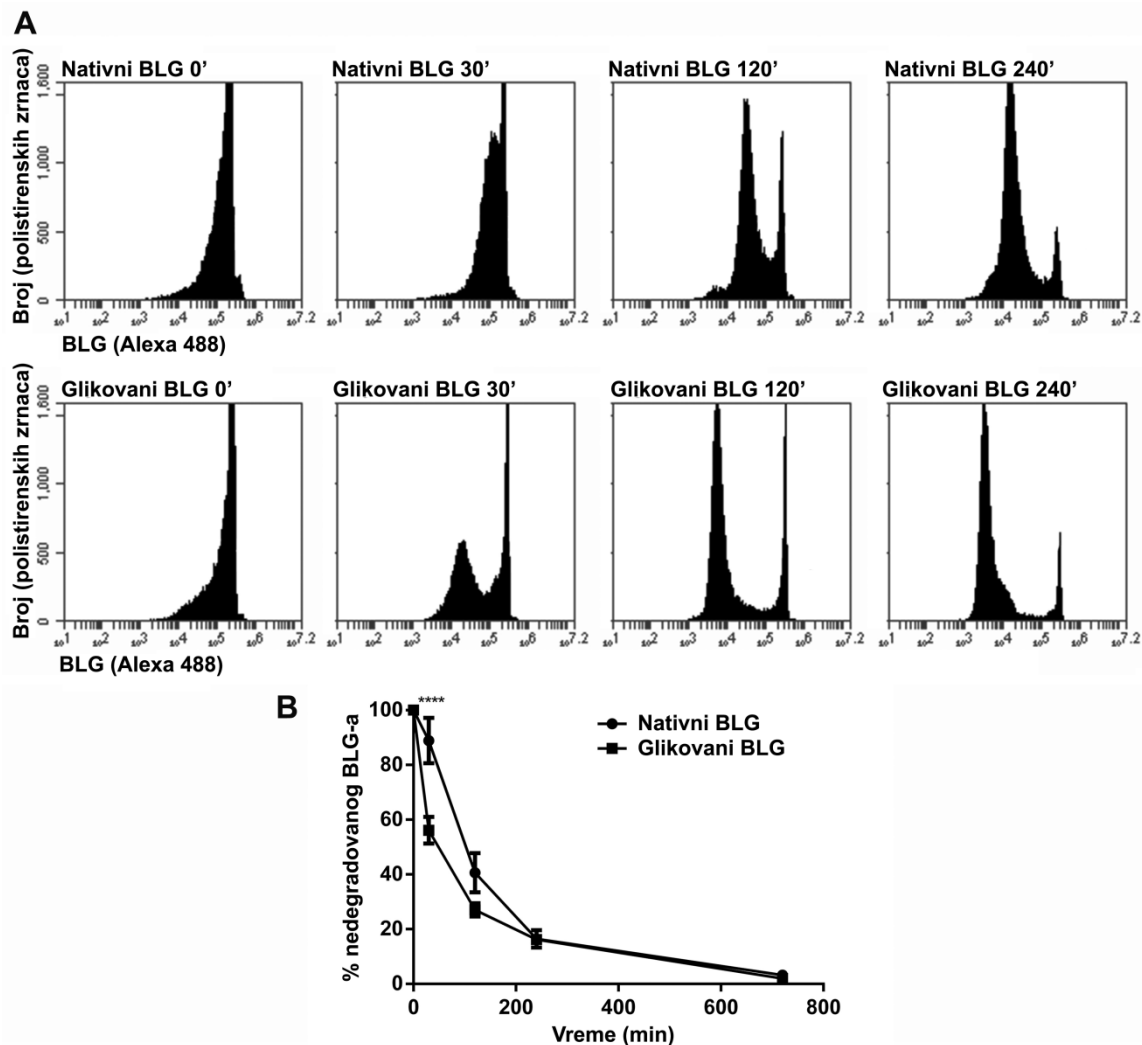
Dendritske ćelije, u skladu sa svojom biološkom funkcijom, imaju na površini veliki broj specijalizovanih receptora, kao što su PRR i među njima najpoznatiji TLRs, zatim lektini C-tipa (*engl.* C-type lectins - CTL), i SR. U literaturi je pokazano da je za neke alergene interakcija sa PRR ključna za stimulaciju urođenog i adaptivnog imunskog odgovora [188]. U ovoj studiji su selektivno blokirani SR i RAGE da bi se ispitala njihova uloga u preuzimanju glikovanog alergena. Dekstran sulfat i poliinozin, inhibitori SR, značajno su smanjili preuzimanje obe forme BLG-a (Grafik 3.5.B i Slika 3.3.B). Tretman dendritskih ćelija sa FPS-ZM1, inhibitorom RAGE receptora, nije doveo do statistički značajnih efekata na preuzimanje alergena. Ovi rezultati ukazuju da se i nativni i glikovani BLG vezuju za SR i preko njih bivaju internalizovani. Mehanizam ulaska BLG-a u dendritske ćelije preko SR je verovatno jedan od nekoliko

uključenih u ukupan proces. Interesantno je da su ligandi SR polianjonski molekuli [189], a da je BLG kiseo protein sa pI vrednošću 5,1, što može objasniti njegovo vezivanje za ove receptore. Blokiranje lizil ostataka glukozom u Majarovoj reakciji, u slučaju glikovanog BLG-a, dodatno snižava pI vrednost i čini glikovani BLG još kiselijim, što najverovatnije vodi do povećanog afiniteta prema SR i time povećanog preuzimanja glikovane forme. Drugi faktor koji utiče na povećano preuzimanje glikovane forme mogu biti promene u strukturi i povećano agregiranje koje prati Majarovu reakciju. Takođe, snažnije prepoznavanje glikovanog BLG-a od strane SR može objasniti preusmeravanje preuzimanja glikovanog BLG-a ka endocitozi posredovanoj receptorima (Grafik 3.5.A). Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim studijama koje su pokazale da se kasni proizvodi glikovanja, posebno piralin, vezuju za SR klase A [76, 190].

5.3.6. Glikovani BLG je podložniji endolizozomalnoj degradaciji unutar dendritskih ćelija

Efikasnost degradovanja i procesovanja antigena unutar antigen-prezentujućih ćelija je od izuzetnog značaja za njihovo prezentovanje T ćelijama. S toga je endolizozomalna proteoliza glikovanog BLG-a unutar dendritskih ćelija, upoređena sa endolizozomalnom proteolizom nativnog BLG-a. Dendritske ćelije su inkubirane sa nativnim ili glikovanim BLG-om vezanim za polistirenska zrnca kako bi došlo do njihove fagocitoze, a zatim je praćena degradacija alergena u vremenu, na osnovu vezivanja BLG-specifičnih antitela. Nakon prvih 30 minuta endolizozomalne degradacije glikovani BLG je bio značajno slabije prepoznat antitelima, dok nakon 2 h, pa sve do 12 h nije bilo statistički značajnih razlika u prepoznavanju ove dve BLG forme (Grafik 3.6 A i B).

Ovi rezultati ukazuju da je glikovanje ostvarilo efekte na kinetiku degradacije, čineći glikovani BLG podložnijim proteolizi, posebno u prvom vremenu nakon fagocitoze. Glikovanje BLG-a povećava sadržaj neuređenih struktura (kako je pokazano CD spektroskopijom, Grafici 3.1.A i 3.1.B), što smanjuje njegovu stabilnost i čini polipeptidni niz podložniji endolizozomalnim proteazama.

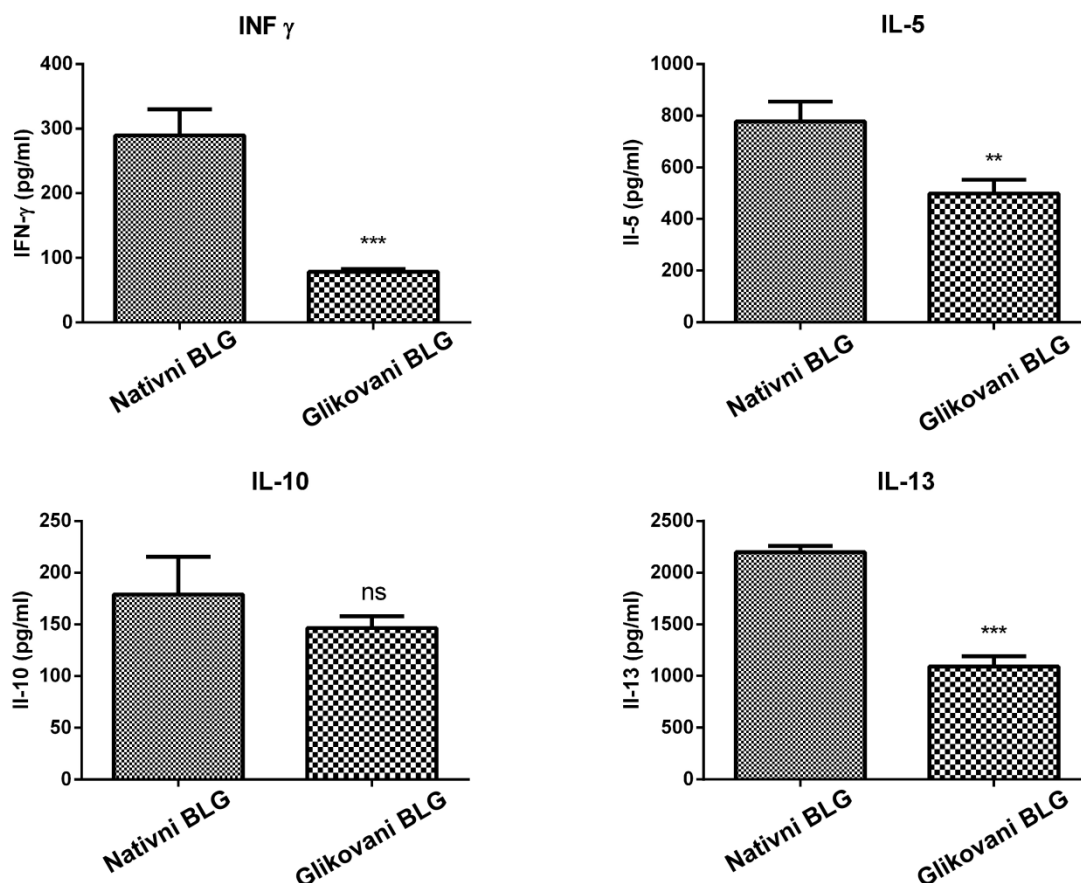


Grafik 3.6. Kinetika endolizozomalne degradacije nativnog i glikovanog BLG-a. Dendritske ćelije su internalizovale nativni ili glikovani BLG vezan za polistirenska zrnca i zatim su inkubirane na 37 °C kako bi se omogućila endolizozomalna degradacija. U određenim vremenskim tačkama ćelije su lizirane i zrnca koja su nosila nedegradovani BLG su bila bojena Alexa 488 BLG-specifičnim antitelima i zatim analizirana na protočnom citometru. A) Histogrami sa protočne citometrije jednog reprezentativnog eksperimenta. B) Procenat nedegradovanog nativnog ili glikovanog BLG-a tokom vremena je prikazan kao srednja vrednost ± SEM (n = 4). **** označava statističku značajnost sa vrednošću parametra $p < 0.0001$.

5.3.7. Glikovani BLG izaziva slabije lučenje citokina od strane CD4⁺ T-ćelija

Da bi se ispitaio specifični T-ćelijski odgovor na glikovani BLG, BLG-specifične CD4⁺ T-ćelije su izolovane iz miša imunizovanog nativnim BLG-om i zasejane u mešovitu kulturu sa dendritskim ćelijama aktiviranim nativnim ili glikovanim BLG-om. Nakon 72 sata, dendritske ćelije stimulisane glikovanim BLG-om su dovele do niže

produkcije Th1-tipa citokina (INF- γ) i Th2 tipa citokina (IL-5 i IL-13) od strane T-ćelija, u odnosu na dendritske ćelije stimulisane nativnim BLG-om (Grafik 3.7). Produkcija IL-10 se nije statistički razlikovala u zavisnosti od stimulacije nativnim ili glikovanim BLG-om.



Grafik 3.7. Stimulacija BLG-specifičnih CD4⁺ T-ćelija dendritskim ćelijama aktiviranih nativnim ili glikovanim BLG-om. CD4⁺ T-ćelije su izolovane iz C3H/HeOuJ miševa imunizovanih nativnim BLG-om i inkubirane u mešovitoj kulturi sa aktiviranim dendritskim ćelijama tokom 72 sata. Nivoi INF- γ , IL-5, IL-10 i IL-13 su određeni u ćelijskom medijumu komercijalno dostupnim ELISA esejima. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SD jednog reprezentativnog eksperimenta i analizirani Studentovim t-testom. Razlike su statistički značajne ukoliko je $p < 0.01$ (**) ili $p < 0.001$ (***), dok ns označava izostanak statističke značajnosti.

Uprkos značajno povećanom preuzimanju glikovanog BLG-a od strane dendritskih ćelija, kroz endocitozu posredovanu SR, on je ipak pokazao niži nivo stimulacije T-ćelija. Ovo ukazuje da se manje peptida prezentuje u kompleksu sa MHC klasom II kada se dendritske ćelije stimulišu glikovanom formom. Ranije objavljene

studije su pokazale da glikovani ovalbumin, koji dendritske ćelije takođe preuzimaju endocitozom posredovanom SR klase A tipa I ili II, dovode do snažnije stimulacije CD4⁺ T-ćelija i povećanog lučenja citokina [75]. Ovi rezultati su u suprotnosti sa našim rezultatima što može posledica razlike u soju i starosti miševa koji su bili izvor ćelija. Takođe, efekti glikovanja na T-ćelijski odgovor mogu biti zavisni i od samog alergena i saharida. Ovi rezultati takođe ukazuju na značaj događaja koji slede nakon internalizacije antigena, odnosno procesovanje antigena i aktivacija nizvodnih signalnih puteva. Slično ovim zapažanjima, Smole je sa saradnicima pokazao da nezrele dendritske ćelije internalizuju potentni alergen Bet v 1 i njegov strukturni homolog ali slab alergen, Api g 1, sa sličnom kinetikom i bez razlika u preuzimanju od strane dendritskih ćelija poreklom od zdravih ili alergičnih osoba [191].

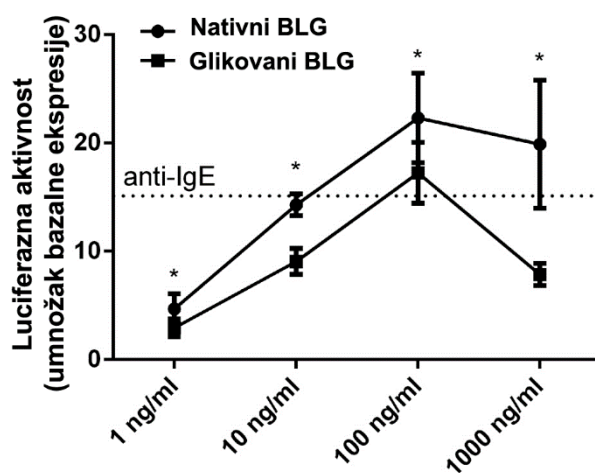
Unutarćelijska degradacija antigena u antigen prezentujućim ćelijama značajno određuje sudbinu antigena [192]. Antigeni koji su visoko podložni endolizozomalnim proteazama poseduju slab kapacitet da aktiviraju T-ćelije [193]. Tako povećana endolizozomalna degradacija glikovanog BLG-a može doprineti njegovom smanjenom kapacitetu da stimuliše T-ćelije.

5.3.8. Glikovanje BLG-a smanjuje aktivaciju bazofila

Na kraju su ispitani efekti glikovanja BLG-a na efektorski alergijski odgovor. Kao model sistem humanih bazofila, korišćena je RS-ATL8 linija, humanizovana ćelijska linija leukemije bazofila pacova koja eksprimira humani FcεRI receptor i koja eksprimira luciferazu nakon aktivacije usled umrežavanja FcεRI. RS-ATL8 su senzitisane oligoklonskim anti-BLG himernim humanizovanim IgE antitelima, a zatim izazvane nativnim ili glikovanim BLG-om. Glikovani BLG je doveo do značajno slabijeg umrežavanja FcεRI receptora i aktivacije bazofila u poređenju sa nativnim BLG-om pri svim testiranim koncentracijama alergena (Grafik 3.8).

Kod BLG-a koji je glikovan u visokom stepenu, svi aminokiselinski ostaci koji sadrže slobodnu amino grupu mogu biti glikovani (16 lizina, 2 arginina i N-terminalna amino grupa leucina 1) [194, 195]. Sa druge strane, sva BLG-specifična himerna IgE monoklonska antitela korišćena u ovom eksperimentu prepoznaju peptide sa najmanje 1 - 2 mesta mogućeg vezivanja saharida (Tabela 3.1) [133]. S toga je velika verovatnoća

da visok stepen glikovanja BLG-a smanjuje vezivanje IgE antitela zbog promena u strukturi i naelektrisanju epitopa, što dovodi do smanjene aktivacije bazofila. Pored toga, ranija istraživanja su pokazala efekat maskiranja IgE epitopa BLG-a glikovanjem različitim monosaharidima [67]. Ovaj efekat visokog stepena glikovanja na prepoznavanje alergena hrane IgE antitelima je dobro opisan u literaturi [71, 196].



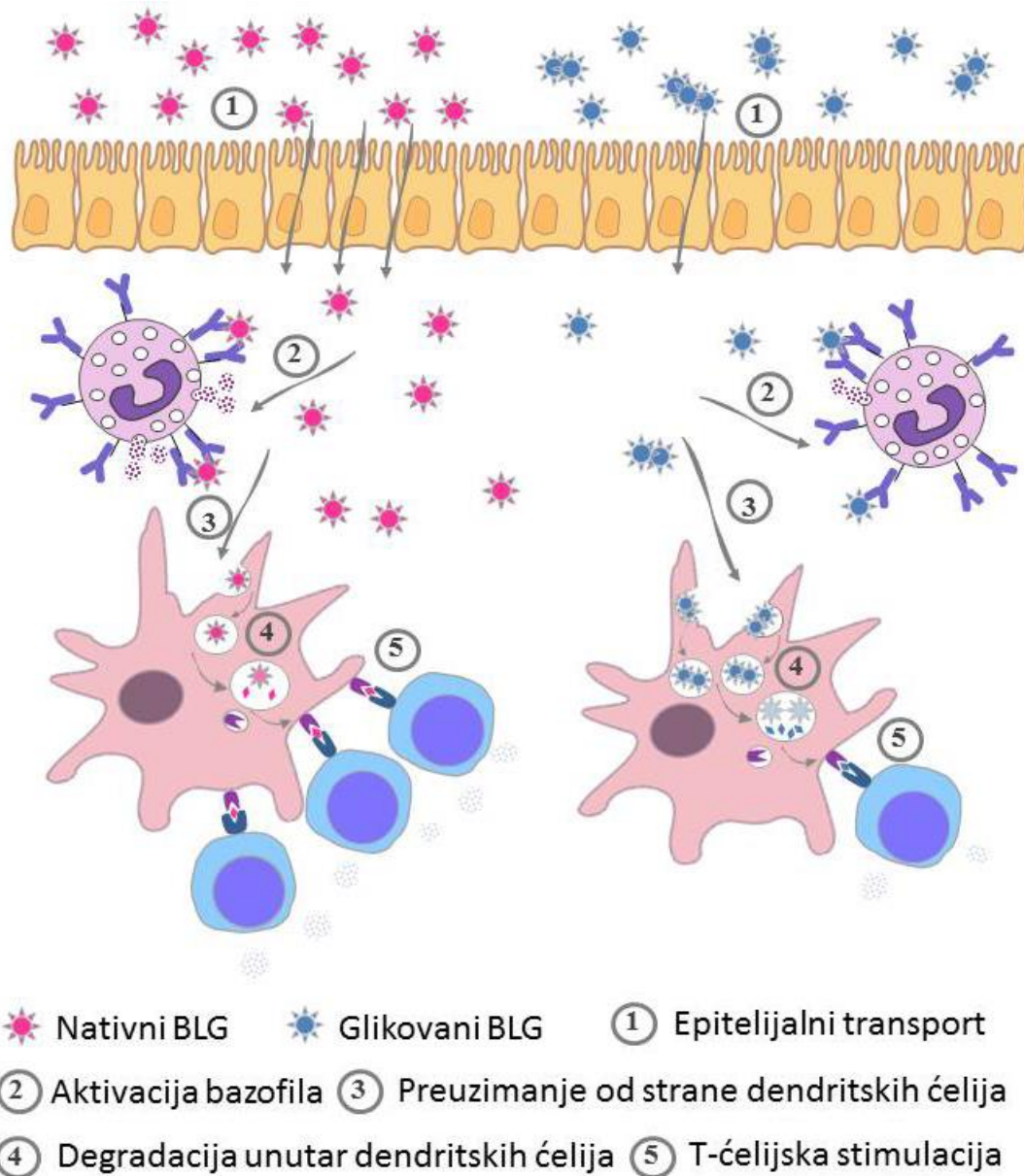
Grafik 3.8. Ekspresija luciferaze indukovana umrežavanjem FcεRI nativnim ili glikovanim BLG-om. RS-ATL8 ćelije su senzitivisane oligoklonskim BLG-specifičnim himernim humanizovanim IgE antitelima i zatim stimulisane sa 1, 10, 100 ili 1000 ng/ml nativnog ili glikovanog BLG-a. Prikazan je nivo ekspresije luciferaze nakon 1 sata stimulacije. Isprekidana linija pokazuje ekspresiju luciferaze nakon stimulacije sa 1 µg/ml anti-humanog IgE antitela. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD (n = 8) i analizirani su Studentovim t-testom. * označava statističku značajnost sa vrednošću parametra $p < 0.05$.

Slabiji efektorski alergijski odgovor, meren kao sposobnost glikovanog BLG-a da dovede do umrežavanja FcεRI receptora, zajedno sa značajno nižim transepitelijalnim transportom, meren kao transcitoza u Caco-2 model sistemu, ukazuju da glikovanje BLG-a smanjuje rizike od alergijskih reakcija, posebno u populaciji koja je primarno senzitivisana na nativni oblik BLG-a.

Tabela 3.1. Peptidi BLG-a koje prepoznaju himerna monoklonska BLG-specifična IgE antitela korišćena u eseju aktivacije bazofila[133]. Mesta mogućeg glikovanja su označena crvenom bojom.

Monoklonsko antitelo	Sekvenca peptida	Pozicija
5D6.1	TPEGDLEILLQKWENDEC	(AA 49–66)
	LLFCMENSAEPEQSLVCQ	(AA 103–120)
	NSAEPEQSLVCQCLVRTP	(AA 109–126)
7D5.1	LEKFDKALKALPMHIRLS	(AA 133–150)
8C3.3	TPEGDLEILLQKWENDEC	(AA 49–66)
	PAVFKIDALNENKVLVLD	(AA 79–96)
	LLFCMENSAEPEQSLVCQ	(AA 103–120)
	NSAEPEQSLVCQCLVRTP	(AA 109–126)
8F7.1	TPEGDLEILLQKWENDEC	(AA 49–66)
	LLFCMENSAEPEQSLVCQ	(AA 103–120)
	NSAEPEQSLVCQCLVRTP	(AA 109–126)
11B6.2	TPEGDLEILLQKWENDEC	(AA 49–66)
	LLFCMENSAEPEQSLVCQ	(AA 103–120)
	NSAEPEQSLVCQCLVRTP	(AA 109–126)
13A5.2	LEKFDKALKALPMHIRLS	(AA 133–150)

Efekti intenzivnog glikovanja BLG-a na interakcije sa ključnim ćelijama imunskog sistema sumarno su prikazani na Slici 3.4.



Slika 3.4. Visok stepen glikovanja BLG-a glukozom je doveo do smanjene epitelijalne transcitoze i smanjenog kapaciteta za aktivaciju bazofila. Takođe, preuzimanje glikovanog BLG-a od strane dendritskih ćelija je povećano, ali je njegova degradacija u endolizosomalnim kompartmentima ubrzana, što može biti uzrok primećene slabije T-ćelijske stimulacije.

6. Zaključci

U skladu sa postavljenim ciljevima mogu da se izvedu sledeći zaključci:

- 1) Kombinovana primena ultrazvučnog tretmana visokog intenziteta i uslova makromolekulskog nagomilavanja je efikasan metod za pospešivanje Majarove reakcije u model sistemu proteina kravlje surutke i arabinoze. Stepem glikovanja proteina surutke primenom ultrazvučnog tretmana je značajno veći u uslovima makromolekulskog nagomilavanja u poređenju sa stepenom glikovanja koji je postignut samo primenom ultrazvučnog tretmana. Ultrazvučni tretman i visok stepen realizacije Majarove reakcije dovode do oksidativnih promena na proteinima koji su detektovani u vidu oksidacije sulfhidrilnih grupa, formiranja proteinskih karbonila i proteinskih hidroperoksida. Visok stepen glikovanja u Majarovoj reakciji je doprineo poboljšanju funkcionalnih osobina kao što su antioksidativni kapacitet, kao i temperaturna i pH stabilnost. Tako je sonifikacija, u uslovima makromolekulskog nagomilavanja, na niskim temperaturama i u kratkom vremenu ubrzala Majarovu reakciju na proteinima kravlje surutke i unapredila njihove tehnološko-funkcionalne osobine, bez narušavanja proteinskih struktura.
- 2) Tretman sušenja raspršivanjem je ubrzao Majarovu reakciju u odnosu na tretman liofilizacije. Takođe, više ulazne temperature (230 °C – 250 °C) su značajnije promovisale Majarovu reakciju u odnosu na niže temperature sušenja (190 °C – 210 °C). Majarova reakcija je napredovala kroz rane i intermedijerne faze, dok su kasne faze ostale ispod limita detekcije. Iako su temperature sušenja veoma visoke, one nisu ostvarile negativan efekat na sekundarne strukture proteina kamiljeg mleka, jer se one ne razlikuju u odnosu na strukture proteina liofilizovanog mleka u prahu. Međutim, sušenje raspršivanjem je povećalo površinsku hidrofobnost proteina u odnosu na tretman liofilizacijom. Realizacija Majarove reakcije tokom sušenja raspršivanjem dovela je do unapređenih funkcionalnih osobina proteina kamiljeg mleka u prahu kao što su bolja rastvorljivost i veća antioksidativna moć.

3) Visok stepen glikovanja potentnog alergena hrane, BLG-a, u Majarovoj reakciji smanjuje njegov transepitelijalni transport, ali značajno povećava preuzimanje od strane dendritskih ćelija. I nativnu i glikovanu formu BLG-a dendritske ćelije prepoznaju i preuzimaju endocitozom posredovanom receptorima čistačima. Modifikacije nastale usled Majarove reakcije učinile su glikovanu formu boljim ligandom za SR, i dovele do njenog povećanog preuzimanja od strane dendritskih ćelija. Promene ovih funkcionalnih karakteristika glikovanog BLG-a u odnosu na neglikovani su, između ostalog, povezane sa snižavanjem pI vrednosti i formiranjem agregata. Glikovani BLG je podložniji endolizozomalnoj degradaciji i pokazao je slabiji potencijal da indukuje produkciju citokina u mešovitoj kulturi dendritskih ćelija i BLG-specifičnih CD4⁺ T-ćelija. Glikovanje BLG-a dovodi i do smanjenja potencijala za aktivaciju bazofila. Ovi rezultati pokazuju da glikovanje BLG-a utiče na njegove interakcije sa ključnim ćelijama imunskog (alergijskog) odgovora i da je glikovani BLG slabije potentan u indukovanju T-ćelijskog odgovora u mišjem model sistemu gde je senzitivizacija urađena nativnim BLG-om.

U ovoj doktorskoj disertaciji su ispitani efekti modifikacije proteina hrane u Majarovoj reakciji na njihove strukturne karakteristike, tehnološko-funkcionalne osobine i imunološke osobine. Promene u strukturi u mnogome zavise od uslova u kojima se realizuje Majarova reakcija. Sonifikacija u uslovima makromolekulskog nagomilavanja na niskim temperaturama, kao i tretman sušenja raspršivanjem od samo nekoliko sekundi nisu narušili strukturu proteina kravlje surutke i kamiljeg mleka. Sa druge strane, dugotrajno zagrevanje u rastvoru je doveo do značajnih strukturnih promena i agregacije potentnog alergena hrane BLG-a. Poboljšanje tehnološko-funkcionalnih osobina proteina kravlje surutke ili kamiljeg mleka modifikacijama u Majarovoj reakciji je bilo značajno i korelisalo je sa stepenom realizacije Majarove reakcije. U poređenju sa nemodifikovanim alergenom, intenzivno glikovani BLG je pokazao smanjen imunogeni potencijal u mišjem model sistemu gde je senzitivizacija urađena nativnim BLG-om i izmenjene interakcije sa ćelijama imunskog sistema koje imaju ključnu ulogu u alergijskim reakcijama.

Prikazani rezultati ukazuju da modifikacije proteina hrane u Majarovoj reakciji imaju brojne posledice na strukturne i funkcionalne osobine proteina. Odgovarajući

izbor same metode ubrzavanja Majarove reakcije, kao i pažljiva optimizacija reakcionih uslova, koji direktno određuju stepen Majarove reakcije, mogu omogućiti dobijanje proteina željenih tehnoloških i funkcionalnih osobina, kao i modifikovanih proteina sa smanjenim alergenim potencijalom.

7. Literatura

- [1] Maillard, L. C., Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie methodique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 1912, 154, 66-68.
- [2] Hellwig, M., Henle, T., Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. *Angewandte Chemie International Edition* 2014, 53, 10316-10329.
- [3] van Boekel, M., Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances* 2006, 24, 230-233.
- [4] Lund, N. M., Ray, A. C., Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2017, 65, 4537-4552.
- [5] Mottram, D. S., Flavor Compounds Formed during the Maillard Reaction, In: Thermally Generated Flavors, 1993, p. 104-126, *American Chemical Society*, Parliament, T. H., Morello, M. J., McGorin, R. J. (Eds.), eISBN: 9780841213999.
- [6] Newton, E. A., Fairbanks, J. A., Golding, M., Andrewesc, P., Gerrard, A. J., The role of the Maillard reaction in the formation of flavour compounds in dairy products – not only a deleterious reaction but also a rich source of flavour compounds. *Food and Function* 2012, 3, 1231-1241.
- [7] van Boekel, M., Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. *Food/Nahrung* 2001, 45, 150-159.
- [8] van Boekel, M., Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry* 1988, 62, 403-414.
- [9] Stanic-Vucinic, D., Prodic, I., Apostolovic, D., Nikolic, M., Velickovic, T. C., Structure and antioxidant activity of beta-lactoglobulin-glycoconjugates obtained by high-intensity-ultrasound-induced Maillard reaction in aqueous model systems under neutral conditions. *Food Chemistry* 2013, 138, 590-599.

- [10] Brownlee, M., Pharmacological modulation of the advanced glycosylation reaction. *Progress in Clinical and Biological Research* 1989, 304, 234-248.
- [11] Wong, K. H., Abdul Aziz, S., Mohamed, S., Sensory aroma from Maillard reaction of individual and combinations of amino acids with glucose in acidic conditions. *International Journal of Food Science & Technology* 2008, 43, 1512-1519.
- [12] Yaghmur, A., Aserin, A., Garti, N., Furfural–Cysteine Model Reaction in Food Grade Nonionic Oil/Water Microemulsions for Selective Flavor Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, 2878-2883.
- [13] Xu, Q., Liu, J., Song, H., Zou, T., *et al.*, Formation mechanism of volatile and non-volatile compounds in peptide–xylose Maillard reaction. *Food Research International* 2013, 54, 683-690.
- [14] Lutz, R., Aserin, A., Garti, N., Maillard Reaction between Leucine and Glucose in O/W Microemulsion Media in Comparison to Aqueous Solution. *Journal of Dispersion Science and Technology* 2005, 26, 535-547.
- [15] Cheison, S. C., Josten, E., Kulozik, U., Impact of milieu conditions on the α -lactalbumin glycosylation in the dry state. *Journal of Food Engineering* 2013, 116, 176-183.
- [16] Lloyd, M. A., A., D. M., Gerard, P. D., Flavor variability and flavor stability of U.S.-produced whole milk powder. *Journal of Food Science* 2009, 74, S334-S343.
- [17] Rizzi, G. P., Effects of cationic species on visual color formation in model Maillard reactions of pentose sugars and amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, 7160-7164.
- [18] Oliver, C. M., Melton, L. D., Stanley, R. A., Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2006, 46, 337-350.
- [19] Lee, S., Eisenberg, D., Seeded conversion of recombinant prion protein to a disulfide-bonded oligomer by a reduction-oxidation process. *Nature Structural & Molecular Biology* 2003, 10, 725-730.

- [20] Kasran, M., Cui, S. W., Goff, H. D., Covalent attachment of fenugreek gum to soy whey protein isolate through natural Maillard reaction for improved emulsion stability. *Food Hydrocolloids* 2013, 30, 552-558.
- [21] Perrechil, F. A., Santana, R. C., Lima, D. B., Polastro, M. Z., Cunha, R. L., Emulsifying properties of maillard conjugates produced from sodium caseinate and locust bean gum. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 2014, 31, 429-438.
- [22] Lee, Y.-Y., Tang, T.-K., Phuah, E.-T., Alitheen, N. B. M., *et al.*, New functionalities of Maillard reaction products as emulsifiers and encapsulating agents, and the processing parameters: a brief review. *Journal of the science of food and agriculture* 2016, 97, 1379-1385.
- [23] Spotti, M. J., Perduca, M., Piagentini, A., Santiago, L., *et al.*, Gel mechanical properties of milk whey proteinedextran conjugates obtained by Maillard reaction. *Food Hydrocolloids* 2013, 31, 26-32.
- [24] Billaud, C., Maraschin, C., Chow, Y. N., Cheriot, S., *et al.*, Maillard reaction products as "natural antibrowning" agents in fruit and vegetable technology. *Molecular Nutrition & Food Research* 2005, 49, 656-662.
- [25] Nooshkam, M., Varidi, M., Bashash, M., The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food Chemistry* 2019, 275, 644-660.
- [26] Jing, H., Kitts, D. D., Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products. *Food and Chemical Toxicology* 2002, 40, 1007-1015.
- [27] Benjakul, S., Lertittikul, W., Bauer, F., Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system. *Food Chemistry* 2005, 93, 189-196.
- [28] Michalska, A., Amigo-Benavent, M., Zielinski, H., del Castillo, M. D., Effect of bread making on formation of Maillard reaction products contributing to the overall antioxidant activity of rye bread. *Journal of Cereal Science* 2008, 48, 123-132.

- [29] Vhangani, L. N., Van Wyk, J., Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) in a lipid-rich model system. *Food Chemistry* 2016, 208, 301-308.
- [30] Anese, M., Nicoli, M. C., Massini, R., Lerici, C. R., Effects of drying processing on the Maillard reaction in pasta. *Food Research International* 1999, 32, 193-199.
- [31] Sicherer, S. H., Sampson, H. A., Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010, 125, S116-S125.
- [32] Cianferoni, A., Spergel, J. M., Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergology International* 2009, 58, 457-466.
- [33] Loh, W., Tang, M. L. K., The Epidemiology of Food Allergy in the Global Context. *International journal of environmental research and public health* 2018, 15, E2043.
- [34] Comberiati, P., Cipriani, F., Schwarz, A., Posa, D., *et al.*, Diagnosis and treatment of pediatric food allergy: an update. *Italian Journal of Pediatrics* 2015, 41, Art No. PMC4339416.
- [35] Hu, Y., Chen, J., Li, H., Comparison of food allergy prevalence among Chinese infants in Chongqing, 2009 versus 1999. *Pediatrics International: Official Journal of the Japanese Pediatrics Society* 2010, 52, 820-824.
- [36] Sampson, H. A., Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004, 113, 805-819.
- [37] Stone, K. D., Prussin, C., Metcalfe, D. D., IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010, 125, S73-80.
- [38] Gould, H. J., Sutton, B. J., Beavil, A. J., McCloskey, N., *et al.*, The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annual Review of Immunology* 2003, 21, 579-628.
- [39] Bogh, K. L., Madsen, C. B., Food Allergens: Is There a Correlation between Stability to Digestion and Allergenicity? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2016, 56, 1545-1567.

- [40] Taylor, S. L., Lehrer, S. B., Principles and characteristics of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1996, 36, 91-118.
- [41] Masilamani, M., Commins, S., Shreffler, W., Determinants of food allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2012, 32, 11-33.
- [42] Mills, E. N., Sancho, A. I., Rigby, N. M., Jenkins, J. A., Mackie, A. R., Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Molecular Nutrition & Food Research* 2009, 53, 963-969.
- [43] Teuber, S. S., Beyer, K., Comstock, S., Wallowitz, M., *Food Allergy*, American Society of Microbiology 2006.
- [44] Hill, D. J., Hosking, C. S., Cow milk allergy in infancy and early childhood. *Clinical & Experimental Allergy* 1996, 26, 243-246.
- [45] Lam, H. Y., van Hoffen, E., Michelsen, A., Guikers, K., *et al.*, Cow's milk allergy in adults is rare but severe: both casein and whey proteins are involved. *Clinical & Experimental Allergy* 2008, 38, 995-1002.
- [46] Stoger, P., Wuthrich, B., Type I allergy to cow milk proteins in adults. A retrospective study of 34 adult milk- and cheese-allergic patients. *International Archives of Allergy and Immunology* 1993, 102, 399-407.
- [47] Villa, C., Costa, J., Oliveira, M. B. P. P., Mafra, I., Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2018, 17, 137-164.
- [48] Martorell-Aragones, A., Echeverria-Zudaire, L., Alonso-Lebrero, E., Bone-Calvo, J., *et al.*, Position document: IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2015, 43, 507-526.
- [49] Fox, P. F., Milk proteins as food ingredients. *International Journal of Dairy Technology* 2001, 54, 41-55.

- [50] Hochwallner, H., Schulmeister, U., Swoboda, I., Spitzauer, S., Valenta, R., Cow's milk allergy: from allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods* 2014, *66*, 22-33.
- [51] Roth-Walter, F., Berin, M. C., Arnaboldi, P., Escalante, C. R., *et al.*, Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer's patches. *Allergy* 2008, *63*, 882-890.
- [52] Natale, M., Bisson, C., Monti, G., Peltran, A., Garoffo, L. P., *et al.*, Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Molecular Nutrition & Food Research* 2004, *48*, 363-369.
- [53] Monaci, L., Tregoat, V., van Hengel, J. A., Anklam, E., Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research and Technology* 2006, *223*, 149-179.
- [54] Hiraoka, Y., Segawa, T., Kuwajima, K., Sugai, S., Murai, N., α -Lactalbumin: A calcium metalloprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1980, *95*, 1098-1104.
- [55] Matsuo, H., Yokooji, T., Taogoshi, T., Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergology International* 2015, *64*, 332-343.
- [56] Wal, J. M., Cow's milk allergens. *Allergy* 1998, *53*, 1013-1022.
- [57] Wal, J. M., Structure and function of milk allergens. *Allergy* 2001, *56*, 35-38.
- [58] Miciński, J., Kowalski, I. M., Zwierzchowski, G., Szarek, J., *et al.*, Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. *Polish Annals of Medicine* 2013, *20*, 69-76.
- [59] Fiocchi, A., Brozek, J., Schunemann, H., Bahna, L. S., *et al.*, World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatrics Allergy and Immunology* 2010, *21*, 1-125.

- [60] Groetch, M., Nowak-Wegrzyn, A., Practical approach to nutrition and dietary intervention in pediatric food allergy. *Pediatrics Allergy and Immunology* 2013, 24, 212-221.
- [61] Ribeiro, A. C., Ribeiro, S. D. A., Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research* 2010, 89, 225-233.
- [62] Tripodi, S., P., C., Di Rienzo Businco, A., Bianchi, A., *et al.*, Severe anaphylaxis to sheep's milk cheese in a child desensitized to cow's milk through specific oral tolerance induction. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology* 2013, 45, 56-60.
- [63] Burgess, K., Milk and Dairy Products in Human Nutrition, by E. Muehlhoff, A. Bennett and D. McMahon, Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome. *International Journal of Dairy Technology* 2014, 67, 303-304.
- [64] Kumar, D., Verma, A., Chatli, M., Singh, R., *et al.*, Camel milk: alternative milk for human consumption and its health benefits. *Nutrition & Food Science* 2016, 46, 217-227.
- [65] Ehlayel, M., Bener, A., Abu Hazeima, K., Al-Mesaifri, F., Camel milk is a safer choice than goat milk for feeding children with cow milk allergy. *ISRN allergy* 2011, 2011, 391641.
- [66] Boughellout, H., Choiset, Y., Rabesona, H., Chobert, J. M., *et al.*, Lait camelin: nouvelle source de protéines pour enfants allergiques aux protéines du lait de vache? *Revue Française d'Allergologie* 2016, 56, 344-348.
- [67] Taheri-Kafrani, A., Gaudin, J. C., Rabesona, H., Nioi, C., *et al.*, Effects of heating and glycation of beta-lactoglobulin on its recognition by IgE of sera from cow milk allergy patients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57, 4974-4982.
- [68] Gruber, P., Vieths, S., Wangorsch, A., Nerkamp, J., Hofmann, T., Maillard reaction and enzymatic browning affect the allergenicity of Pru av 1, the major allergen from cherry (*Prunus avium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, 4002-4007.

- [69] Maleki, S. J., Chung, S. Y., Champagne, E. T., Raufman, J. P., The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000, *106*, 6.
- [70] Nakamura, A., Watanabe, K., Ojima, T., Ahn, D. H., Saeki, H., Effect of maillard reaction on allergenicity of scallop tropomyosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, *53*, 7559-7564.
- [71] Gruber, P., Becker, W. M., Hofmann, T., Influence of the Maillard reaction on the allergenicity of rAra h 2, a recombinant major allergen from peanut (*Arachis hypogaea*), its major epitopes, and peanut agglutinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, *53*, 2289-2296.
- [72] Zani, I. A., Stephen, S. L., Mughal, N. A., Russell, D., *et al.*, Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells* 2015, *4*, 178-201.
- [73] Ramasamy, R., Yan, S. F., Schmidt, A. M., Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go. *Amino acids* 2012, *42*, 1151-1161.
- [74] Sakaguchi, M., Kinoshita, R., Putranto, E. W., Ruma, I. M. W., *et al.*, Signal Diversity of Receptor for Advanced Glycation End Products. *Acta Medica Okayama* 2017, *71*, 459-465.
- [75] Ilchmann, A., Burgdorf, S., Scheurer, S., Waibler, Z., *et al.*, Glycation of a food allergen by the Maillard reaction enhances its T-cell immunogenicity: role of macrophage scavenger receptor class A type I and II. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010, *125*, 175-183.
- [76] Heilmann, M., Wellner, A., Gadermaier, G., Ilchmann, A., *et al.*, Ovalbumin modified with pyrroline, a Maillard reaction product, shows enhanced T-cell immunogenicity. *Journal of Biological Chemistry* 2014, *289*, 7919-7928.
- [77] Teodorowicz, M., van Neerven, J., Savelkoul, H., Food Processing: The Influence of the Maillard Reaction on Immunogenicity and Allergenicity of Food Proteins. *Nutrients* 2017, *9*, E835.

- [78] Buttari, B., Profumo, E., Capozzi, A., Facchiano, F., *et al.*, Advanced glycation end products of human beta(2) glycoprotein I modulate the maturation and function of DCs. *Blood* 2011, *117*, 6152-6161.
- [79] Akirav, E. M., Henegariu, O., Preston-Hurlburt, P., Schmidt, A. M., *et al.*, The receptor for advanced glycation end products (RAGE) affects T cell differentiation in OVA induced asthma. *PLoS one* 2014, *9*, e95678.
- [80] Toda, M., Hellwig, M., Henle, T., Vieths, S., Influence of the Maillard Reaction on the Allergenicity of Food Proteins and the Development of Allergic Inflammation. *Current Allergy and Asthma Reports* 2019, *19*, 4.
- [81] Verhoeckx, K. C. M., Vissers, Y. M., Baumert, J. L., Faludi, R., *et al.*, Food processing and allergenicity. *Food and Chemical Toxicology* 2015, *80*, 223-240.
- [82] Schuck, P., Jeantet, R., Bhandari, B., Chen, X. D., *et al.*, Recent advances in spray drying relevant to the dairy industry: A comprehensive critical review. *Drying Technology* 2016, *34*, 1773-1790.
- [83] Nijdam, J. J., Langrish, T. A. G., The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. *Journal of Food Engineering* 2006, *77*, 919-925.
- [84] Park, C. W., Bastian, E., Farkas, B., Drake, M., The effect of feed solids concentration and inlet temperature on the flavor of spray dried whey protein concentrate. *Journal of Food Science* 2014, *79*, C19-24.
- [85] Park, C. W., Stout, M. A., Drake, M., The effect of spray-drying parameters on the flavor of nonfat dry milk and milk protein concentrate 70. *Journal of Dairy Science* 2016, *99*, 9598-9610.
- [86] Fang, Y., Rogers, S., Selomulya, C., Chen, X. D., Functionality of milk protein concentrate: Effect of spray drying temperature. *Biochemical Engineering Journal* 2012, *62*, 101-105.
- [87] Schuck, P., le Floch-Fouere, C., Jeantet, R., Changes in Functional Properties of Milk Protein Powders: Effects of Vacuum Concentration and Drying. *Drying Technology* 2013, *31*, 1578-1591.

- [88] Mehta, B. M., Deeth, H. C., Blocked Lysine in Dairy Products: Formation, Occurrence, Analysis, and Nutritional Implications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2016, 15, 206-218.
- [89] Guyomarc'h, F., Francoise, W., Muir, D. D., Leaver, J., Lactosylation of milk proteins during the manufacture and storage of skim milk powders. *International Dairy Journal* 2000, 10, 863-872.
- [90] Koca, N., Erbay, Z., Kaymak-Ertekin, F., Effects of spray-drying conditions on the chemical, physical, and sensory properties of cheese powder. *Journal of Dairy Science* 2015, 98, 2934-2943.
- [91] Sulieman, A. M., Elamin, O. M., Elkhalifa, E. A., Laleye, L., Comparison of Physicochemical Properties of Spray-dried Camel's Milk and Cow's Milk Powder. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering* 2014, 4, 15-19.
- [92] Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., Ashokkumar, M., Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry* 2012, 19, 975-983.
- [93] Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., Ashokkumar, M., Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry* 2011, 18, 951-957.
- [94] Tao, Y., Sun, D. W., Enhancement of food processes by ultrasound: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2015, 55, 570-594.
- [95] Suslick, K. S., Didenko, Y., Fang, M. M., Hyeon, T., *et al.*, Acoustic cavitation and its chemical consequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A-Mathematical Physical and Engineering Sciences* 1999, 357, 335-353.
- [96] Ashokkumar, M., Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrasonics Sonochemistry* 2015, 25, 17-23.
- [97] Singla, R., Grieser, F., Ashokkumar, M., Sonochemical degradation of martius yellow dye in aqueous solution. *Ultrasonics Sonochemistry* 2009, 16, 28-34.

- [98] Okitsu, K., Sonochemical synthesis of metal nanoparticles, In: Theoretical and Experimental Sonochemistry Involving Inorganic Systems, 2011, p. 131–150, *Springer*, Pankaj, M. A. (Ed.), ISBN 978-90-481-3886-9.
- [99] Zhang, K., Park, B.-J., Fang, F.-F., Choi, H. J., Sonochemical preparation of polymer nanocomposites. *Molecules* 2009, 14, 2095-2110.
- [100] Ashokkumar, M., Lee, J., Zisu, B., Bhaskarcharya, R., *et al.*, Hot topic: sonication increases the heat stability of whey proteins. *Journal of Dairy Science* 2009, 92, 5353-5356.
- [101] Villamiel, M., de Jong, P., Influence of High-Intensity Ultrasound and Heat Treatment in Continuous Flow on Fat, Proteins, and Native Enzymes of Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, 3068-3068.
- [102] Balachandran, S., Kentish, S. E., Mawson, R., Ashokkumar, M., Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrasonics Sonochemistry* 2006, 13, 471-479.
- [103] Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., *et al.*, Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2008, 9, 155-160.
- [104] Ashokkumar, M., Bhaskaracharya, R., Kentish, S., Lee, J., *et al.*, The ultrasonic processing of dairy products – An overview. *Dairy Science & Technology* 2009, 90, 147-168.
- [105] Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., Herceg, I. L., Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering* 2008, 86, 281-287.
- [106] Corzo-Martínez, M., Montilla, A., Megías-Pérez, R., Olano, A., *et al.*, Impact of high-intensity ultrasound on the formation of lactulose and Maillard reaction glycoconjugates. *Food Chemistry* 2014, 157, 186-192.

- [107] Guan, Y.-G., Zhang, B.-S., Yu, S.-J., Wang, X.-R., *et al.*, Effects of Ultrasound on a Glycine–Glucose Model System—A Means of Promoting Maillard Reaction. *Food and Bioprocess Technology* 2011, 4, 1391-1398.
- [108] Yu, H., Seow, Y.-X., Ong, P. K. C., Zhou, W., Effects of high-intensity ultrasound on Maillard reaction in a model system of d-xylose and l-lysine. *Ultrasonics Sonochemistry* 2017, 34, 154-163.
- [109] Ong, O. X. H., Seow, Y. X., Ong, P. K. C., Zhou, W., High-intensity ultrasound production of Maillard reaction flavor compounds in a cysteine-xylose model system. *Ultrasonics Sonochemistry* 2015, 26, 399-407.
- [110] Chen, W., Ma, X., Wang, W., Lv, R., *et al.*, Preparation of modified whey protein isolate with gum acacia by ultrasound maillard reaction. *Food Hydrocolloids* 2019, 95, 298-307.
- [111] Sedaghat Doost, A., Nikbakht Nasrabadi, M., Wu, J., A'Yun, Q., Van der Meeren, P., Maillard conjugation as an approach to improve whey proteins functionality: A review of conventional and novel preparation techniques. *Trends in Food Science & Technology* 2019, 91, 1-11.
- [112] Bermudez-Aguirre, D., Mawson, R., Versteeg, K., Barbosa-CÁNovas, G. V., Composition Properties, Physicochemical Characteristics and Shelf Life of Whole Milk after Thermal and Thermo-Sonication Treatments. *Journal of Food Quality* 2009, 32, 283-302.
- [113] Morgan, F., Leonil, J., Molle, D., Bouhallab, S., Modification of bovine beta-lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous solution: effect on association behavior and protein conformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, 47, 83-91.
- [114] Zhu, D., Damodaran, S., Lucey, J., Formation of Whey Protein Isolate (WPI)-Dextran Conjugates in Aqueous Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008, 56, 7113-7118.

- [115] Zhou, H. X., Rivas, G., Minton, A. P., Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annual Review of Biophysics* 2008, *37*, 375-397.
- [116] Rivas, G., Minton, A. P., Macromolecular Crowding In Vitro, In Vivo, and In Between. *Trends in Biochemical Sciences* 2016, *41*, 970-981.
- [117] Kim, J. S., Yethiraj, A., Effect of macromolecular crowding on reaction rates: a computational and theoretical study. *Biophysical Journal* 2009, *96*, 1333-1340.
- [118] Sasahara, K., McPhie, P., Minton, A. P., Effect of Dextran on Protein Stability and Conformation Attributed to Macromolecular Crowding. *Journal of Molecular Biology* 2003, *326*, 1227-1237.
- [119] Ma, Q., Fan, J.-B., Zhou, Z., Zhou, B.-R., *et al.*, The Contrasting Effect of Macromolecular Crowding on Amyloid Fibril Formation. *PloS one* 2012, *7*, e36288.
- [120] Zhuo, X. Y., Qi, J. R., Yin, S. W., Yang, X. Q., *et al.*, Formation of soy protein isolate-dextran conjugates by moderate Maillard reaction in macromolecular crowding conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2013, *93*, 316-323.
- [121] Zhang, X., Qi, J.-R., Li, K.-K., Yin, S.-W., *et al.*, Characterization of soy β -conglycinin–dextran conjugate prepared by Maillard reaction in crowded liquid system. *Food Research International* 2012, *49*, 648-654.
- [122] Nielsen, P. M., Petersen, D., Dambmann, C., Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Food Chemistry and Toxicology* 2001, *66*, 642-646.
- [123] Jiang, Z., Brodkorb, A., Structure and antioxidant activity of Maillard reaction products from α -lactalbumin and β -lactoglobulin with ribose in an aqueous model system. *Food Chemistry* 2012, *133*, 960-968.
- [124] Chawla, S. P., Chander, R., Sharma, A., Antioxidant properties of Maillard reaction products obtained by gamma-irradiation of whey proteins. *Food Chemistry* 2009, *116*, 122-128.

- [125] Ruberto, G., Baratta, M. T., Deans, S. G., Dorman, H. J., Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Medica* 2000, 66, 687-693.
- [126] Raussens, V., Ruyschaert, J.-M., Goormaghtigh, E., Protein concentration is not an absolute prerequisite for the determination of secondary structure from circular dichroism spectra: a new scaling method. *Analytical Biochemistry* 2003, 319, 114-121.
- [127] Stojadinovic, M., Burazer, L., Ercili-Cura, D., Sancho, A., *et al.*, One-step method for isolation and purification of native beta-lactoglobulin from bovine whey. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2012, 92, 1432-1440.
- [128] Lutz, B. M., Kukutsch, N., A., O. L. J., Roßner, S., *et al.*, An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* 1999, 223, 77-92.
- [129] Hoffmann, E., Pauwels, A. M., Alloatti, A., Kotsias, F., Amigorena, S., Analysis of Phagosomal Antigen Degradation by Flow Organelloctometry. *Bio-Protocol* 2016, 6, 1-13.
- [130] Pochard, P., Vickery, B., Berin, M. C., Grishin, A., *et al.*, Targeting Toll-like receptors on dendritic cells modifies the T(H)2 response to peanut allergens in vitro. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010, 126, 92-97 e95.
- [131] Dibbern, D. A., Palmer, G. W., Williams, P. B., Bock, S. A., Dreskin, S. C., RBL cells expressing human FcεRI are a sensitive tool for exploring functional IgE–allergen interactions: studies with sera from peanut-sensitive patients. *Journal of Immunological Methods* 2003, 274, 37-45.
- [132] Ali, E. A., Nakamura, R., Falcone, F. H., Use of Humanized RS-ATL8 Reporter System for Detection of Allergen-Specific IgE Sensitization in Human Food Allergy. *Methods in Molecular Biology* 2017, 1592, 147-161.
- [133] Knipping, K., Simons, P. J., Buelens-Sleumer, L. S., Cox, L., *et al.*, Development of beta-lactoglobulin-specific chimeric human IgEκappa monoclonal antibodies for in vitro safety assessment of whey hydrolysates. *PloS one* 2014, 9, e106025.

- [134] Guan, Y.-G., Wang, J., Yu, S.-J., Xu, X.-B., Zhu, S.-M., Effects of ultrasound intensities on a glycin-maltose model system - a means of promoting Maillard reaction. *International Journal of Food Science & Technology* 2010, *45*, 758-764.
- [135] Martins, S., Jongen, W., van Boekel, M., A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology* 2001, *11*, 364-373.
- [136] Ajandouz, E. H., Tchiakpe, L. S., Dalle Ore, F., Benajiba, A., Puigserver, A., Effects of pH on Caramelization and Maillard Reaction Kinetics in Fructose-Lysine Model Systems. *Journal of Food Science* 2001, *66*, 926 - 931.
- [137] Ziembowicz, S., Kida, M., Koszelnik, P., Sonochemical Formation of Hydrogen Peroxide. *Proceedings* 2017, *2*, 188.
- [138] Rizzi, G. P., Free Radicals in the Maillard Reaction. *Food Reviews International* 2003, *19*, 375-395.
- [139] Villaverde, A., Estevez, M., Carbonylation of myofibrillar proteins through the maillard pathway: effect of reducing sugars and reaction temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013, *61*, 3140-3147.
- [140] Meltretter, J., Seeber, S., Humeny, A., Becker, C.-M., Pischetsrieder, M., Site-Specific Formation of Maillard, Oxidation, and Condensation Products from Whey Proteins during Reaction with Lactose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, *55*, 6096-6103.
- [141] Hawkins, C. L., Davies, M. J., Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2001, *1504*, 196-219.
- [142] Elgawish, A., Glomb, M., Friedlander, M., Monnier, V. M., Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by high glucose in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 1996, *271*, 12964-12971.
- [143] Stathopoulos, P. B., Scholz, G. A., Hwang, Y. M., Rumfeldt, J. A., *et al.*, Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Science* 2004, *13*, 3017-3027.

- [144] Klunk, E. W., Jacob, F. R., Mason, R. P., Quantifying Amyloid b-Peptide (Ab) Aggregation Using the Congo Red-Ab (CR-Ab) Spectrophotometric Assay. *Analytical Biochemistry* 1999, 266, 66-76.
- [145] LeVine, H. r., Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease α -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science* 1993, 2, 404-410.
- [146] Munishkina, L. A., Cooper, E. M., Uversky, V. N., Fink, A. L., The effect of macromolecular crowding on protein aggregation and amyloid fibril formation. *Journal of Molecular Recognition* 2004, 17, 456-464.
- [147] Wei, Y., Chen, L., Chen, J., Ge, L., He, R. Q., Rapid glycation with D-ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SH-SY5Y cells. *BMC cell biology* 2009, 10, 10.
- [148] Liu, G., Zhong, Q., Glycation of whey protein to provide steric hindrance against thermal aggregation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012, 60, 9754-9762.
- [149] Chevalier, F., Choberta, J. M., Popineaub, Y., Nicolasa, M. G., Haertle, T., Improvement of functional properties of b-lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal* 2001, 11, 145-152.
- [150] Li, C. P., Enomoto, H., Ohki, S., Ohtomo, H., Aoki, T., Improvement of Functional Properties of Whey Protein Isolate Through Glycation and Phosphorylation by Dry Heating. *Journal of Dairy Science* 2005, 88, 4137-4145.
- [151] Corzo-Martínez, M., Carrera Sánchez, C., Moreno, F. J., Rodríguez Patino, J. M., Villamiel, M., Interfacial and foaming properties of bovine β -lactoglobulin: Galactose Maillard conjugates. *Food Hydrocolloids* 2012, 27, 438-447.
- [152] Shi, W.-H., Sun, W.-W., Yu, S.-J., Zhao, M.-M., Study on the characteristic of bovine serum albumin-glucose model system, treated by ultrasonic. *Food Research International* 2010, 43, 2115-2118.

- [153] Wang, W. Q., Bao, Y. H., Chen, Y., Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system. *Food Chemistry* 2013, *139*, 355-361.
- [154] Jiang, Z. Y., Woollard, A. C., P., W. S., Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation *FEBS Letters* 1990, *268*, 69-71.
- [155] Bansal, N., Truong, T., Bhandari, B., Feasibility study of lecithin nanovesicles as spacers to improve the solubility of milk protein concentrate powder during storage. *Dairy Science & Technology* 2016, *96*, 861-872.
- [156] Farah, Z., Composition and characteristics of camel milk. *Journal of Dairy Research* 1993, *60*, 603-626.
- [157] Felfoul, I., Jardin, J., Gaucheron, F., Attia, H., Ayadi, M. A., Proteomic profiling of camel and cow milk proteins under heat treatment. *Food Chemistry* 2017, *216*, 161-169.
- [158] Ryskaliyeva, A., Henry, C., Miranda, G., Faye, B., *et al.*, Combining different proteomic approaches to resolve complexity of the milk protein fraction of dromedary, Bactrian camels and hybrids, from different regions of Kazakhstan. *PloS one* 2018, *13*, e0197026.
- [159] Benabdelkamel, H., Masood, A., Alanazi, I. O., Alzahrani, D. A., *et al.*, Proteomic Profiling Comparing the Effects of Different Heat Treatments on Camel (*Camelus dromedarius*) Milk Whey Proteins. *International journal of molecular sciences* 2017, *18*.
- [160] Felix da Silva, D., Ahrné, L., Ipsen, R., Hougaard, A. B., Casein-Based Powders: Characteristics and Rehydration Properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2018, *17*, 240-254.
- [161] Liu, Q., Li, J., Kong, B., Li, P., Xia, X., Physicochemical and antioxidant properties of Maillard reaction products formed by heating whey protein isolate and reducing sugars. *International Journal of Dairy Technology* 2014, *67*, 220-228.

- [162] Katekhong, W., Charoenrein, S., Influence of spray drying temperatures and storage conditions on physical and functional properties of dried egg white. *Drying Technology* 2017, 36, 169-177.
- [163] Maltesen, M. J., van de Weert, M., Drying methods for protein pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technology* 2008, 5, e81-88.
- [164] Atri, M. S., Saboury, A. A., Yousefi, R., Dalgalarondo, M., *et al.*, Comparative study on heat stability of camel and bovine apo and holo α -lactalbumin. *Journal of Dairy Research* 2010, 77, 43-49.
- [165] Oldfield, D. J., Taylor, M. W., Singh, H., Effect of preheating and other process parameters on whey protein reactions during skim milk powder manufacture. *International Dairy Journal* 2005, 15, 501-511.
- [166] Haque, M. A., Chen, J., Aldred, P., Adhikari, B., Denaturation and Physical Characteristics of Spray-Dried Whey Protein Isolate Powders Produced in the Presence and Absence of Lactose, Trehalose, and Polysorbate-80. *Drying Technology* 2015, 33, 1243-1254.
- [167] Hailu, Y., Hansen, E. B., Seifu, E., Eshetu, M., *et al.*, Functional and technological properties of camel milk proteins: a review. *Journal of Dairy Research* 2016, 83, 422-429.
- [168] Haddadin, M. S., Gammoh, S. I., Robinson, R. K., Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. *Journal of Dairy Research* 2008, 75, 8-12.
- [169] Berhe, T., Seifu, E., Ipsen, R., Kurtu, M. Y., Hansen, E. B., Processing Challenges and Opportunities of Camel Dairy Products. *International Journal of Food Science* 2017, 2017, 9061757.
- [170] Cortés Yáñez, D. A., Gagnetten, M., Leiva, G. E., Malec, L. S., Antioxidant activity developed at the different stages of Maillard reaction with milk proteins. *LWT - Food Science and Technology* 2018, 89, 344-349.

- [171] McGookin, B. J., Augustin, M. A., Antioxidant activity of a heated casein-glucose mixture in full-cream milk powder. *Australian Journal of Dairy Technology* 1997, 52, 15-19.
- [172] Giroux, H. J., Houde, J., Britten, M., Use of heated milk protein–sugar blends as antioxidant in dairy beverages enriched with linseed oil. *LWT - Food Science and Technology* 2010, 43, 1373-1378.
- [173] Park, C. W., Bastian, E., Farkas, B., Drake, M., The Effect of Feed Solids Concentration and Inlet Temperature on the Flavor of Spray Dried Whey Protein Concentrate. *Journal of Food Science* 2014, 79, C19-C24.
- [174] Schwarzenbolz, U., Hofmann, T., Sparmann, N., Henle, T., Free Maillard Reaction Products in Milk Reflect Nutritional Intake of Glycated Proteins and Can Be Used to Distinguish “Organic” and “Conventionally” Produced Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2016, 64, 5071-5078.
- [175] Smith, P. K., Masilamani, M., Li, X. M., Sampson, H. A., The false alarm hypothesis: Food allergy is associated with high dietary advanced glycation end-products and proglycating dietary sugars that mimic alarmins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2016, 139, 429-437.
- [176] Gupta, R. K., Gupta, K., Sharma, A., Das, M., *et al.*, Maillard reaction in food allergy: Pros and Cons. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2016, 58, 208-226.
- [177] Toda, M., Heilmann, M., Ilchmann, A., Vieths, S., The Maillard reaction and food allergies: is there a link? *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2014, 52, 61-67.
- [178] Smith, P. K., Do advanced glycation end-products cause food allergy? *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2017, 17, 325-331.
- [179] Seo, J.-H., Hedoux, A., Guinet, Y., Paccou, L., *et al.*, Thermal Denaturation of Beta-Lactoglobulin and Stabilization Mechanism by Trehalose Analyzed from Raman Spectroscopy Investigations. *The Journal of Physical Chemistry B* 2010, 114, 6675–6684.

- [180] Chen, Y., Chen, X., Guo, T. L., Zhou, P., Improving the thermostability of β -lactoglobulin via glycation: The effect of sugar structures. *Food Research International* 2015, *69*, 106-113.
- [181] Stojadinovic, M., Pieters, R., Smit, J., Velickovic, T. C., Cross-linking of beta-lactoglobulin enhances allergic sensitization through changes in cellular uptake and processing. *Toxicology Sciences* 2014, *140*, 224-235.
- [182] Groschwitz, K. R., Hogan, S. P., Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009, *124*, 3-20.
- [183] Hilmenyuk, T., Bellinghausen, I., Heydenreich, B., Ilchmann, A., *et al.*, Effects of glycation of the model food allergen ovalbumin on antigen uptake and presentation by human dendritic cells. *Immunology* 2010, *129*, 437-445.
- [184] Smythe, W. A., Joiner, K. A., Hoppe, H. C., Actin is required for endocytic trafficking in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cellular microbiology* 2008, *10*, 452-464.
- [185] Dinic, J., Ashrafzadeh, P., Parmryd, I., Actin filaments attachment at the plasma membrane in live cells cause the formation of ordered lipid domains. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013, *1828*, 1102-1111.
- [186] Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C. C., *et al.*, Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *Journal of Cell Biology* 2010, *188*, 547-563.
- [187] Vranic, S., Boggetto, N., Contremoulins, V., Mornet, S., *et al.*, Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Particle and Fibre Toxicology* 2013, *10*(1).
- [188] Scheurer, S., Toda, M., Vieths, S., What makes an allergen? *Clinical & Experimental Allergy* 2015, *45*, 1150-1161.
- [189] Areschoug, T., Gordon, S., Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cellular microbiology* 2009, *11*, 1160-1169.

- [190] Araki, N., Higashi, T., Mori, T., Shibayama, R., *et al.*, Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *European Journal of Biochemistry* 1995, 230, 408-415.
- [191] Smole, U., Radauer, C., Lengger, N., Svoboda, M., *et al.*, The major birch pollen allergen Bet v 1 induces different responses in dendritic cells of birch pollen allergic and healthy individuals. *PloS one* 2015, 10, Art No. e0117904.
- [192] Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., Trombetta, E. S., Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 2005, 307, 1630-1634.
- [193] Egger, M., Jurets, A., Wallner, M., Briza, P., *et al.*, Assessing protein immunogenicity with a dendritic cell line-derived endolysosomal degradome. *PloS one* 2011, 6, Art No. e17278.
- [194] Fenaille, F., Morgan, F., Parisod, V., Tabet, J. C., Guy, P. A., Solid-state glycation of beta-lactoglobulin by lactose and galactose: localization of the modified amino acids using mass spectrometric techniques. *Journal of Mass Spectrometry* 2004, 39, 16-28.
- [195] Chen, Y. J., Liang, L., Liu, X. M., Labuza, T. P., Zhou, P., Effect of Fructose and glucose on glycation of beta-lactoglobulin in an intermediate-moisture food model system: analysis by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and data-independent acquisition LC-MS (LC-MS(E)). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012, 60, 10674-10682.
- [196] Nakamura, A., Watanabe, K., Ojima, T., Ahn, D.-H., Saeki, H., Changes in allergenicity and digestibility of squid tropomyosin during the Maillard reaction with ribose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006, 54, 9529-9534.

BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Peruško je rođena 17.6.1988. godine u Beogradu. Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet je upisala 2007. godine na studijskoj grupi Biohemija, a diplomirala 2012. godine sa prosečnom ocenom 9.03 i ocenom 10 na završnom radu. Master akademske studije Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta na smeru Biohemija je završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9.20 i ocenom 10 na završnom radu. Zbog postignutih rezultata dodeljeno joj je Specijalno priznanje Srpskog hemijskog društva za izuzetan uspeh u toku studija.

Doktorske akademske studije na Katedri za biohemiju Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta upisala je 2013. godine.

Od 2014. godine angažovana je na projektu „Molekularne osobine i modifikacije nekih respiratornih i nutritivnih alergena“ finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u zvanju istraživač pripravnik, a od 2015. godine u zvanju istraživač saradnik.

Tokom 2015. godine boravila je tri meseca na Institutu za nauke o proceni rizika na Univerzitetu u Utrehtu u Holandiji, kao dobitnica COST ImpARAS granta za kratku naučnu misiju. Na Departmanu za medicinu, u odeljenju za imunologiju i alergije Karolinska instituta u Stokholmu, u Švedskoj, je boravila u periodu od dva meseca tokom 2017. godine kao dobitnica COST ImpARAS granta i u šestomesečnom periodu oktobar 2018. – mart 2019. godine kao EAACI stipendista. Dobitnica je i FEBS granta za učešće na međunarodnom kongresu u Pragu, 2018. godine i EAACI stipendije za učešće na međunarodnom kongresu u Lisabonu, 2019. godine.

Prvi je autor tri rada u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a), i ko-autor je jednog rada u vrhunskom časopisu međunarodnog značaja (M21). Autor je i brojnih saopštenja na domaćim i međunarodnim naučnim skupovima.

Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije, FEBS-a, Srpske asocijacije za proteomiku i EAACI-a.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија Б. Перушко

Број индекса ДБ 31/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Структура и функција протеина млека модификованих у Мајаровиј реакцији

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кришио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

У Београду,

18.11.2019.

Потпис аутора

Marija Peruzko

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Марија Б. Перушко
Број индекса ДБ 31/2013
Студијски програм Доктор биохемијских наука
Наслов рада

Структура и функција протеина млека модификованих у Мајаровој реакцији

Ментори проф. др Тања Ђирковић Величковић, редовни професор
 Универзитет у Београду – Хемијски факултет
 др Драгана Станић-Вучинић, научни саветник
 Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду,
18.11.2019.

Потпис аутора
Marija Peruzko

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Структура и функција протеина млека модификованих у Мајаровој реакцији

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
- 4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Београду,

18.11.2019.

Потпис аутора

Marija Perić

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.