

## **НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

### **УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ – ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА**

**ПРЕДМЕТ:** Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације Марије Перушко, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета одржаној 12. септембра 2019. године, изабрани смо као чланови Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Марије Перушко, мастер биохемичара, истраживача сарадника Иновационог центра Хемијског факултета у Београду, под називом:

#### **„Структура и функција протеина млека модификованих у Мајаровој реакцији“**

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је, на својој седници одржаној дана 29.3.2018. године, на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (број одлуке: 61206-799/4-18).

Комисија је докторску дисертацију прегледала и подноси Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета следећи:

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **А. Приказ садржаја дисертације**

Докторска дисертација Марије Перушко написана је на 111 страна А4 формата (фонт *Times New Roman* величине 12 типографских тачака, са проредом 1,5). Садржи 4 схеме, 6 слика, 22 графика и 7 табела. Подељена је на поглавља: 1. Увод (2 стране), 2. Општи део (17 страна), 3. Циљеви (2 стране), 4. Материјал и методе (21 страна), 5. Резултати и дискусија (45 страна), 6. Закључци (3 стране) и 7. Литература (21 страна). Поред наведеног, дисертација садржи Извод на српском и енглеском језику (по 2 стране), Садржај (5 страна), Листу скраћеница (3 стране), Захвалницу (1 страна) и Прилоге у којима се налазе Биографија кандидата, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторске дисертације и Изјава о коришћењу.

У **Уводу** је описан предмет истраживања и укратко је дат преглед проблематике у свету којом се ова дисертација бави. Дат је кратак приказ значаја Мајарове реакције за

модификацију протеина млека у циљу унапређења њихових функционалних особина. Такође је дат кратак осврт на утицај Мајарове реакције на алергени потенцијал протеина хране.

У Општем делу се налазе подаци о хемији Мајарове реакције и о факторима који на њу утичу. Детаљно су описани ефекти Мајарове реакције на технолошко-функционалне особина протеина млека. Описане су алергије на храну, са посебном пажњом посвећеној алергенима крављег млека. Објашњено је зашто камиље млеко представља оптималну замену за кравље у исхрани деце алергичне на кравље млеко. Детаљно су описана и досадашња сазнања о ефектима Мајарове реакције на имунолошке и алерголошке особине алергена хране. Такође, разматрана је технолошка прерада млека, уз детаљан опис једне конвенционалне методе (сушење распршивањем, *eng.* Spray-drying) и једне нове технике за обраду хране (ултразвучни третман високог интензитета - сонификација).

У поглављу **Циљеви** је јасно дефинисан главни циљ на основу којег су постављени и описани специфични подциљеви.

У оквиру **Материјала и метода** наведен је детаљан опис експерименталних метода и процедура, њихових модификација, као и реагенса који су коришћени у овој дисертацији. Наведени су извори биолошког материјала, хемикалија, китова и коришћене опреме. Јасно и прегледно су написани подаци о методама убрзавања Мајарове реакције на протеинима кравље сурутке, камиљег млека и бета-лактоглобулина (БЛГ), као и подаци о тестовима и методама коришћеним за структурну и функционалну анализу модификованих протеина млека.

Поглавље **Резултати и дискусија** подељено је на три целине у којима је кандидаткиња детаљно приказала и продискутовала добијене резултате. У првој целини су приказани резултати праћења степена Мајарове реакције убрзане ултразвучним третманом у условима макромолекулског нагомилавања на протеинима сурутке крављег млека. Модификовани протеини су окарактерисани електрофоретским методама, а такође су испитане њихове структурне и оксидативне промене. Побољшање технолошко-функционалних особина је праћено одређивањем температурне и рН стабилности и антоксидативне моћи. У другој целини су описани ефекти сушења распршивањем, у зависности од улазне температуре, на степен реализације Мајарове реакције на протеинима камиљег млека у праху, и упоређени су у односу на постпак лиофилизације. Протеини камиљег млека у праху су анализирани електрофоретским и различитим спектроскопским методама. Такође је упоређена антиоксидативна моћ и растворљивост протеина у зависности од температуре сушења камиљег млека. У трећој целини су испитани ефекти интензивног гликовања у Мајаровој реакцији убрзаној загревањем у раствору (*eng.* Wet-heating) на неке имунолошке особине главног алергена крављег млека, БЛГ. Модификовани БЛГ је окарактерисан електрофоретским методама, циркуларним дихроизмом и одређен је степен гликовања. Нативни и гликовани БЛГ су тестирани у

различитим ћелијским процесима који су значајни за успостављање имунског одговора на протеин. Испитан је њихов транспорт кроз модел систем интестиналног епитела, анализиран је степен и механизам преузимања од стране дендритских ћелија, као и деградација унутар дендритских ћелија, специфични Т-ћелијски одговор у мешовитој култури дендритских и CD4<sup>+</sup> Т-ћелија и способност умрежавања FcεRI рецептора на базофилној ћелијској линији. У оквиру сваке целине сумирани су добијени резултати, који су дискутовани у односу на шири контекст релевантих података из литературе.

На основу детаљно продискутованих резултата, у поглављу **Закључци** су систематски резимирани закључци који су проистекли из ове дисертације и изнет је њихов значај.

У делу **Литература** (198 цитата) обухваћене су публикације релевантне за област истраживања и покривени су сви делови дисертације.

## **Б. Кратак приказ резултата**

Комбинованом применом ултразвучног третмана високог интензитета и услова макромолекулског нагомилавања постигнуто је ефикасно поспешивање Мајарове реакције у модел систему протеина кравље сурутке и арабинозе. Степен гликовања протеина сурутке применом ултразвучног третмана је био значајно већи у условима макромолекулског нагомилавања у поређењу са степеном гликовања који је постигнут само применом ултразвучног третмана. Структурне анализе су показале да примењени третман нема значајан ефекат на секундарну и терцијарну структуру протеина. Детектоване промене на протеинима, као што су оксидација сулфхидрилних група, формирање протеинских карбонила и протеинских хидропероксида, указале су да ултразвучни третман и висок степен одигравања Мајарове реакције доводе до оксидације протеина. Такође, висок степен гликовања је значајно побољшао функционалне особине, као што су антиоксидативни капацитет и температурна и рН стабилност. Закључено је да ултразвучни третман у условима макромолекулског нагомилавања, при ниским температурама и у кратком времену, значајно убрзава Мајарову реакцију, и тако представља ефикасну стратегију за унапређење технолошко-функционалних особина протеина.

Камиље млеко у праху добијено сушењем распршивањем на шест различитих улазних температура (у опсегу 190 °C – 250 °C) или лиофилизацијом је окарактерисано електрофоретским и спектроскопским техникама и упоређен је степен реализације Мајарове реакције. Сушење распршивањем је убрзало Мајарову реакцију у односу на лиофилизацију, а такође су више улазне температуре (230 °C – 250 °C) више потпомogle одигравање Мајарове реакције у односу на ниже температуре сушења (190 °C – 210 °C). Показано је да је Мајарова реакција доминантно напредовала кроз ране и интермедијерне фазе, док су касне фазе остале испод лимита детекције. Структурне анализе су показале да упркос високим улазним температурама, сушење распршивањем није остварило негативан

ефекат на секундарне структуре протеина камиљег млека. Ипак, сушење распршивањем је повећало површинску хидрофобност протеина у односу на третман лиофилизацијом. Побољшање технолошко-функционалних особина протеина камиљег млека у праху, праћено одређивањем антиоксидативне моћи и растворљивости протеина, позитивно је корелирало са степеном реализације Мајарове реакције.

БЛГ је изолован из сировог крављег млека и интензивно гликован у Мајаровој реакцији загревањем у раствору. Показано је да је гликовање БЛГ довело до делимичног развијања протеина и до смањеног трансепителијалног транспорта у модел систему интестиналног епитела. Са друге стране, гликовање је довело до значајно повећаног преузимања алергена од стране дендритских ћелија. Инхибиторне студије су показале да дендритске ћелије препознају како нативну, тако и гликовану форму БЛГ, и преузимају их ендоцитозом посредованом рецепторима чистачима. Указано је да модификације настале услед Мајарове реакције (снижена pI вредност и формирање агрегата) чине гликовану форму бољим лигандом за рецепторе чистаче и доводе до њеног повећаног преузимања од стране дендритских ћелија. Праћење ендолизозомалне деградације алергена унутар дендритских ћелија је показало да је гликовани БЛГ подложнији деградацији. Експеримент мешовите културе дендритских ћелија и БЛГ-специфичних CD4<sup>+</sup> Т-ћелија је указао на слабији потенцијал гликоване форме да доведе до продукције цитокина IFN $\gamma$ , IL-5 и IL-13. Такође, демонстриран је слабији потенцијал гликоване форме да доведе до умрежавања Fc $\epsilon$ RI рецептора на површини хуманизованих ћелија леукемије базофила пацова. Закључно, ови резултати показују да гликовање БЛГ значајно утиче на његове интеракције са ћелијама имунског (алергијског) система и директно указују на значај Мајарове реакције у модулатији имунског одговора.

## **В. Упоредна анализа резултата кандидаткиње са резултатима из литературе**

Мајарова реакција је неензимска реакција између редукујућих шећера и једињења са слободном амином групом, као што су протеини. Спонтано се одвија у биолошким системима, а од посебног је значаја у хемији хране и у медицини. Протеини кравље сурутке налазе широку примену као састојци у бројним прехранбеним производима, где се додају ради побољшања нутритивне вредности, као и због својих технолошко-функционалних особина. Функционалне особине протеина сурутке могу бити додатно побољшане ковалентним везивањем шећера у Мајаровој реакцији [1]. Метода која се уобичајено користи за убрзавање Мајарове реакције је суво загревање које има неколико недостатака: траје неколико дана или недеља, степен реакције се не може контролисати, реакција је ограничена неједнаким контактом међу реактантима па је гликовање непотпуно. Загревање у раствору скраћује реакционо време и омогућава бољу контролу степена реакције. Међутим, високе температуре доводе до агрегације протеина и смањују степен гликовања. Да би се Мајарови гликокоњугати производили као функционални састојци хране, потребно је развијање и оптимизација технолошких процеса за њихову припрему. Примена ултразвука високог интензитета и ниске фреквенције (20-100 kHz) је

нова, нетермичка метода за обраду хране, за коју је показано да под благим условима убрзава Мајарову реакцију [2, 3]. У овој дисертацији је у циљу убрзања Мајарове реакције, на протеинима кравље сурутке као модел систему, први пут примењен ултразвучни третман у условима макромолекулског нагомилавања. Примењена стратегија се показала као врло ефикасна за поспешивање Мајарове реакције, омогућавајући кратко време третмана под благим условима, стабилизацију структуре протеина и њихову минималну агрегацију. Стога су ови резултати значајни у прехранбеној индустрији за развој поступака за добијање протеина жељених технолошких и функционалних особина.

Сушење распршивањем је метода која се у индустрији уобичајено користи за производњу млека у праху. Оно подразумева да се упарено млеко распрши у фине капи које улазе у комору са струјом врелог ваздуха где долази до брзог испаравања воде. Током складиштења млека или млечних производа у праху долази до кристализације лактозе и формирања производа Мајарове реакције [4, 5]. Међутим, до данас је мало познато како сам процес сушења распршивањем и његови параметри утичу на убрзавање Мајарове реакције на протеинима млека. Део ове докторске дисертације се бавио испитивањем ефеката улазне температуре сушења распршивањем на степен реализације Мајарове реакције на протеинима камиљег млека. Показано је да више улазне температуре значајније убрзавају Мајарову реакцију, при чему се добијају протеини камиљег млека побољшаних особина. Ови резултати дају значајан допринос разумевању физичко-хемијских промена до којих долази током процесовања млека сушењем уопште и омогућавају оптимизацију технолошког поступка за добијање производа на бази камиљег млека у праху високог квалитета.

У исхрани човека у развијеним деловима света је заступљена велика количина касних Мајарових производа пореклом из високо процесоване хране, са процењеним дневним уносом око 25 – 75 mg [6]. У новије време, производи Мајарове реакције су доведени у везу са порастом учесталости алергија на храну [7]. Интензивно истраживање у овој области је омогућило боље разумевање имуногености гликованих протеина [8]. Међутим, ефекти Мајарове реакције на алергеност протеина нису потпуно разјашњени до данас. У овој дисертацији је показано да високо гликован алерген млека, БЛГ, у интеракцији са дендритским ћелијама бива у значајнијој мери преузет у поређењу са нативним алергеном. Слично је запажено и са гликованим алергеном јаја, овалбумином [9]. Такође, познато је да гликовање протеина модулише ниво лучења Th1 и Th2 цитокина [10]. У овој тези је показан слабији потенцијал гликованог БЛГ да индукује продукцију цитокина у мешовитој култури дендритских ћелија и БЛГ-специфичних CD4+ Т-ћелија. Добијени резултати показују да гликовање БЛГ у Мајаровој реакцији значајно мења његову судбину у процесима који одређују имуногеност и алергеност протеина млека. Самим тим, ови резултати проширују знање о ефектима прераде хране на алергије на храну, и од значаја су у разматрању предности и мана прераде хране.

- [1] de Oliveira, F. C., dos Reis Coimbra, J. S., de Oliveira, E. B., Zuniga, A. D. G., Rojas, E. E. G., Food Protein-Polysaccharide Conjugates obtained via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2014, 56, 1108-1125.
- [2] Zhang, N., Tu, Z., Wang, H., Liu, G., Wang, Z., Huang, T., Qin, X., Xie, X., Wang, A., Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry Identifies the Glycation Sites of Bovine Serum Albumin Induced by D-Ribose with Ultrasonic Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2018, 66, 563-570.
- [3] Stanic-Vucinic, D., Prodic, I., Apostolovic, D., Nikolic, M., Cirkovic Velickovic, T., 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.
- [4] 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.
- [5] Naranjo, G. B., Gonzales, A. S. P., Leiva, G. E., Malec, L. S., The kinetics of Maillard reaction in lactose-hydrolysed milk powder and related systems containing carbohydrate mixtures. *Food chemistry* 2013, 141, 3790–3795.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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, Art No. 835.
- [9] 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.
- [10] Gupta, R. K., Raghav, A., Sharma, A., Gupta, K., et al., Glycation of clinically relevant chickpea allergen attenuates its allergic immune response in Balb/c mice. *Food chemistry* 2017, 235, 244-256.

## **Г. Објављени радови и саопштења који чине део дисертације**

### ***1. Радови у међународним часописима изузетних вредности (M21a):***

1. **M. Perusko**, A. Al-Hanish, T. Cirkovic Velickovic, D. Stanic-Vucinic. Macromolecular crowding conditions enhance glycation and oxidation of whey proteins in ultrasound-induced Maillard reaction, *Food Chemistry* (2015) 177: 248 – 257, DOI:10.1016/j.foodchem.2015.01.042, ISSN:1613-4125, IF<sub>2015</sub> = 4,052, Chemistry, Applied, 7/72 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615000448>

2. **M. Perusko**, M. van Roest, D. Stanic-Vucinic, P. J. Simons, R. H. H. Pieters, T. Cirkovic Velickovic, J. J. Smit. Glycation of the Major Milk Allergen  $\beta$ -Lactoglobulin Changes Its Allergenicity by Alterations in Cellular Uptake and Degradation, *Molecular Nutrition and Food Research* (2018) 62 (17): Art no. e1800341, DOI: 10.1002/mnfr.201800341, ISSN: 03088146, IF<sub>2018</sub> = 5.151 *Food Science and Technology*, 5/133 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6174979/>

### ***2. Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M64):***

1. **M. Perusko**, M. van Roest, D. Stanic-Vucinic, R. Pieters, T. Cirkovic Velickovic, J. Smit. Effects of Maillard Reaction on Immunogenicity of  $\beta$ -lactoglobulin, *Book of Abstracts*, 53<sup>rd</sup> Meeting of the Serbian Chemical Society, Serbian Chemical Society, pp. 74 - 74, Kragujevac, Serbia, June 10 - 11, 2016.

2. **M. Perusko**, N. Stevanovic, A. Simovic, M. Radomirovic, D. Stanic-Vucinic, S. Ghnimi, T. Cirkovic Velickovic. Spray Drying of Camel Milk Induces Protein Aggregates and Maillard Reaction Products Formation, *Book of Abstracts*, 56<sup>th</sup> Meeting of the Serbian Chemical Society, Serbian Chemical Society, pp. 73 – 73, Nis, Serbia, June 7 - 8, 2019.

3. **M. Perusko**, A. Simovic, N. Stevanovic, K. Smiljanic, M. Radomirovic, D. Stanic-Vucinic, S. Ghnimi, T. Cirkovic Velickovic. Electrophoretic and Mass Spectrometry-based Characterization of Soluble Fraction of Camel Milk Proteins Upon Freeze and Spray Drying Treatment, *The Book of Abstracts*, V SePA Symposium: Proteomics in the Analysis of Food, Environmental Protection and Medical Research, pp. P7, Novi Sad, Serbia, May 31, 2019.

### ***3. Остала саопштења штампана у изводу (Категоризација скупа је у току):***

1. **M. Perusko**, A. Simovic, N. Stevanovic, K. Smiljanic, M. Radomirovic, D. Stanic-Vucinic, S. Ghnimi, T. Cirkovic Velickovic. Physicochemical Characterization of Soluble Proteins of Whole Camel Milk Powders Produced by Spray Drying Treatment at High Temperatures, *Book of Abstracts*, 1st FoodEnTwin Workshop “Food and Environmental -Omics”, pp. 27 - 27, Belgrade, Serbia, June 20 - 21, 2019.

#### **Д. Провера оригиналности докторске дисертације**

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налазе у извештају из програма „iThenticate” којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Структура и функција протеина млека модификованих у Мајаровој реакцији” аутора Марије Перушко, констатујемо да утврђено подудараре текста износи 7 %. Овај степен подударности последица је општих места, личних имена/звања, назива институција/департамента, пуних назива реагенаса/китова, назива произвођача хемикалија/опреме, назива појмова на енглеском језику, што је у складу са чланом 9. Правилника. Стога сматрамо да је утврђено да је докторска дисертација Марије Перушко у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

#### **Ђ. Закључак**

Комисија је прегледала докторску дисертацију кандидаткиње Марије Перушко под насловом „Структура и функција протеина млека модификованих у Мајаровој реакцији” и закључила да је дисертација производ самосталног рада кандидаткиње, да су добијени резултати оригинални и да представљају квалитетан научни допринос у области биохемије, односно у области молекуларних наука о храни. Резултати научно-истраживачког рада кандидаткиње, директно проистекли из истраживања реализованих у оквиру израде докторске дисертације, су публиковани у оквиру два научна рада у међународним часописима изузетних вредности (M21a). Такође, резултати истраживања проистекли из ове дисертације су представљени у виду три саопштења на скуповима националног значаја штампана у изводу (M64) и једног саопштења на скупу чија је категоризација у току.

У овој дисертацији је по први пут испитан ефекат комбиноване примене ултразвучног третмана и макромолекулског нагомилавања на убрзавање Мајарове реакције на модел систему протеина кравље сурутке. Испитане су физичко-хемијске особине модификованих протеина и њихове функционалне особине од значаја у прехранбеној индустрији. Показано је да више температуре сушења распршивањем у значајнијој мери поспешују Мајарову реакцију током добијања камиљег млека у праху, и показана је позитивна корелација између напредовања Мајарове реакције и побољшања функционалних особина протеина камиљег млека. Ефекти Мајарове реакције на имунолошке особине главног алергена крављег млека, БЛГ, су испитане у ћелијским тестовима, при чему је показана значајна модулација одговора ћелија које имају круцијалну улогу у алергијском имунском договору. Резултати ове тезе, осим фундаменталног значаја у разумевању ефеката Мајарове реакције на структуру и функцију протеина, могу имати и директну примену у прехранбеној индустрији, за добијање модификованих протеина жељених технолошко-функционалних особина, као и протеина са смањеним алергеним потенцијалом.



На основу свега изложеног, а у складу са Законом о Универзитету и Статутом Хемијског факултета, Комисија сматра да су испуњени услови за одбрану докторске дисертације и са задовољством предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета да поднету докторску дисертацију Марије Перушко, мастер биохемичара, под насловом „**Структура и функција протеина млека модификованих у Мајаровој реакцији**” прихвати и одобри њену јавну одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

У Београду, 3. октобар 2019. године.

Др Тања Ћирковић Величковић, дописни члан САНУ,  
редовни професор Универзитета у Београду – Хемијског факултета (ментор)

Др Драгана Станић-Вучинић, научни саветник,  
Универзитет у Београду – Хемијски факултет (ментор)

Др Зорана Ферјанчић, ванредни професор,  
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Др Јелена Радосављевић, доцент,  
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Др Маријана Стојановић, научни саветник,  
Институт за вирусологију, вакцине и серуме, „Торлак“