

## **НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

На IV редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 29. 01. 2016. године, прихваћено је обавештење ментора проф. др Јелене Кнежевић-Вукчевић и доц. др Биљане Николић о урађеној докторској дисертацији Јелене С. Новаковић Јовановић, дипломираног биолога заштите животне средине, Галеника а.д., Београд, под насловом „Изолација, карактеризација и испитивање пробиотских особина аутохтоних сојева лактобацила“, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Јелена Кнежевић-Вукчевић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Биљана Николић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Драгана Митић-Ђулафић, научни сарадник Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Гордана Завишић, научни сарадник, Галеника а.д. Београд.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

### **ИЗВЕШТАЈ**

#### **Општи подаци о докторској дисертацији:**

Докторска дисертација Јелене Новаковић Јовановић, под насловом „Изолација, карактеризација и испитивање пробиотских особина аутохтоних сојева лактобацила“, урађена је у Институту за истраживање и развој и Служби за биолошка испитивања Контроле квалитета компаније Галеника а.д., на Катедри за микробиологију Биолошког факултета Универзитета у Београду и у Институту за заштиту биља и животну средину у Београду. Дисертација је урађена уз финансијску подршку Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, у оквиру пројекта основних истраживања „Биолошки активни природни производи као потенцијални извори нових лекова и дијететских суплемената“ (ОИ172058), као и иновационог пројекта „Развој пробиотичког препарата за хуману употребу на бази бактерија млечне киселине“ (451-01-0065/2008-01/28).

Докторска дисертација Јелене Новаковић Јовановић, под насловом „Изолација, карактеризација и испитивање пробиотских особина аутохтоних сојева лактобацила“ је написана на 158 страница текста. Дисертација садржи 20 слика и 27 табела, од чега 14 слика и 10 табела у Прилогу. На почетку дисертације приложени су, а нису обухваћени пагинацијом, Захвалница, Посвета, Резиме на српском и енглеском језику, као и Садржај. Пагинирани текст (144 стране) подељен је на осам поглавља и то: Увод (26 страна), Циљ рада (1 страна), Материјал и методе (22 стране), Резултати (26 страна), Дискусија (16 страна), Закључци (3 стране), Литература (29 страна) и Прилог (21 страна). Цитирана литература садржи 285 наслова. На крају дисертације, необухваћена пагинацијом,

приложена су следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије доктората и Изјава о коришћењу.

### **Анализа докторске дисертације:**

Тема докторске дисертације Јелене Новаковић Јовановић је из области биологије микроорганизама, односно бактерија из рода *Lactobacillus*. Предмет истраживања овог рада чине изолација, карактеризација и испитивање пробиотских особина нових аутохтоних изолата лактобацила, као полазних сојева за формулацију новог пробиотско фармацеутског препарата, чијом би се свакодневном употребом смањило или елиминисао низ тегоба гастроинтестиналног порекла, што је веома значајно, како са медицинског и економског, тако и са социјалног становишта.

У поглављу **Увод**, кандидаткиња у више подпоглавља даје детаљан приказ савремене литературе релевантне за пробиотске бактерије. У првом подпоглављу она пише о микробиоти гастроинтестиналног тракта човека, истичући чиниоце који утичу на њено формирање и састав, њен значај за одржавање здравља људског организма, као и значајан удео пробиотских бактерија у њеном саставу. У Уводу се посебан акценат ставља на род *Lactobacillus*; приказују се његова основна морфолошка и биохемијска својства и даје подела у оквиру рода извршена на основу ферментативних карактеристика. Како су површинске карактеристике бактерија од пресудног значаја за успешну колонизацију гастроинтестиналног тракта, објашњена је структура ћелијског зида лактобацила. У даљем тексту дат је историјат истраживања пробиотика са њиховим различитим дефиницијама, које су се јављале и мењале током развоја ове научне области, као и дефиниција коју дају FAO/WHO и која је и данас у употреби. Да би се истакли корисни ефекти пробиотика на здравље домаћина, у посебном подпоглављу приказан је широк спектар њиховог деловања, а који укључује превенцију и терапију различитих патолошких промена гастроинтестиналног и урогениталног тракта, позитиван утицај на кардиоваскуларни систем, посебно на стање хипертензије, њихова имуно-модулаторна и анти-инфламаторна својства и антиканцерогени ефекат. У два крајња подпоглавља Увода наведена су својства која лактобацилима обезбеђују GRAS статус (*Generally Regarded As Safe*) и успешну колонизацију домаћина, а истакнута је и предност пробиотских сојева аутохтоних за човека, као и чињеница да исто географско порекло пробиотских бактерија и домаћина може повећати успешност колонизације гастроинтестиналног тракта и самим тим њихове позитивне здравствене ефекте.

У поглављу **Циљ** наведено је да је циљ дисертације изолација и карактеризација нових аутохтоних сојева лактобацила који поседују особине пробиотика и набројани су конкретни задаци истраживања: изолација нових сојева лактобацила из оралних брисева и фецеса здравих беба и из узорака домаћег сира; идентификација изолата до нивоа врсте; карактеризација услова и динамике раста изолата, испитивање одабраних биохемијских особина и осетљивости на антибиотике и ензиме; одређивање и упоредна анализа пробиотских карактеристика одабраних изолата. Пробиотске карактеристике испитане у овом раду укључују толеранцију на ниске рН вредности и присуство жучних соли, преживљавање у симулираним условима гастроинтестиналног тракта, антимикробну активност и адхезивне особине изолата.

Поглавље **Материјал и методе** организовано је у два подпоглавља. У првом је дат преглед коришћених бактеријских сојева и ћелијске линије, као и подлога и раствора. У другом пододелу описане су методе истраживања: узимање узорака и изолација бактерија, фенотипска и генотипска идентификација, физиолошка и биохемијска карактеризација и евалуација пробиотских особина. Док је крајња фенотипска

идентификација извршена коришћењем комерцијалног кита API CH 50, генотипска идентификација је извршена секвенцирањем гена за 16S rRNA. Физиолошка и биохемијска карактеризација је обухватила испитивање ферментације угљених хидрата и раста у различитим условима средине, испитивање протеолитичке активности и одређивање осетљивости према антибиотицима, ензимима и фенолу. Испитивање пробиотских особина бактерија је укључило тестирање резистенције на ниске рН вредности и присуство жучних соли, као и преживљавање у вештачком желудачном и интестиналном соку. Антимикробна активност према одабраним Грам позитивним и Грам негативним бактеријама, референтним сојевима *Lactobacillus* и гљивама испитана је агар дифузионом методом са бунарићима. Хидрофобност површинских структура лактобацила је испитана МATH тестом, а способност аутоагрегације и коагрегације са бактеријама *E. coli* и *L. monocytogenes* спектрофотометријски. За испитивање способности адхезије изолата за ћелије колоне човека употребљена је ћелијска линија HCT 116 (ATCC CCL-247), која представља линију колоректалног канцера. Добијени резултати су статистички обрађени у програму STATISTICA, verzija 8.0 (StatSoft, Inc., 2007) применом Kolmogorov–Smirnov теста, двофакторском ANOVA анализом, *Post-hoc* анализом коришћењем Fisher LSD теста и Pearson-овом анализом корелације.

Поглавље **Резултати** почиње приказом начина прикупљања узорака, изоловања и идентификације лактобацила. Кандидаткиња је прикупила 43 узорка пореклом из гастроинтестиналног тракта здравих беба и 3 узорка пореклом из домаћег сира са подручја Горњег Милановца. Из њих је изоловала укупно 143 изолата, од којих је за осам (седам из гастроинтестиналних узорака и 1 из сира) прелиминарном идентификацијом утврдила да припадају роду *Lactobacillus*. Сојеви хуманог порекла су означени као Lac1, Lac2, Lac3, Lac4, Lac5, Lac6 и Lac7, а сој из сира као 5s. Фенотипска идентификација, заснована на испитивању ферментације угљених хидрата комерцијалним китовима API 50CH, показала је да је изолат Lac1 најсличнији са *L. fermentum* (99,5% поузданости), Lac2 са *L. brevis* (98,6% поузданости), Lac3 са *L. pentosus* (99,9% поузданости), Lac4 са *L. paracasei* spp. *paracasei* (98,6% поузданости), Lac5 са *L. acidophilus* (85,6% поузданости), Lac6 и Lac7 са *L. plantarum* (99,9% и 99,3% поузданости), а 5s са *L. paracasei/casei* (94% поузданости). Секвенцирање 16s rRNA гена је омогућило генотипску идентификацију до нивоа врсте, која је показала да сојеви Lac1, Lac2, Lac6 и Lac7 припадају врсти *L. plantarum*, Lac3 и 5s врсти *L. casei*, Lac4 врсти *L. paracasei*, а Lac5 врсти *L. gasseri*.

Следеће подпоглавље садржи резултате физиолошке и биохемијске карактеризације изолата, из које је сој Lac5 изостављен због свог изразито спорог раста на чврстим подлогама. У овом делу истраживања показано је да су сви изолати способни да расту у опсегу температуре од 10°C до 40°C, на рН вредностима од 2 до 8 и у опсегу концентрација NaCl од 2% до 6,5%. Концентрацију фенола до 0,4% толерисали су сви испитивани изолати, 0,8% фенола толерисао је Lac3, а сој Lac2 преживљавао је чак и у присуству 1% фенола. Протеолитичку активност показао је само изолат Lac1. Испитивање динамике раста показало је да 5S сој показује видно спорији раст од гастроинтестиналних изолата, који су по овом својству међусобно веома слични. Сви изолати су били резистентни према ванкомицину, амикацину, гентамицину и норфлоксцину, а осетљиви према ампицилину и рифампицину. Такође, сви изолати су показали отпорност према лизозиму,  $\alpha$ -амилази, трипсину, химотрипсину, пронази Е и каталази.

У завршном подпоглављу кандидаткиња је приказала резултате добијене испитивањем пробиотских својстава изолованих лактобацила. Када говоримо о њиховој толеранцији према ниским рН вредностима и условима који владају у проксималном делу гастроинтестиналног тракта (желудац), она је била висока, јер су сви изолати добро преживљавали четворочасовно излагање ниским рН вредностима подлоге (рН 2-4), као и двочасовно излагање вештачком желудачном соку (рН 2). Додатно, сви изолати су били

изразито толерантни на присуство жучних соли у подлози (0,5%-2%) и добро преживљавали у вештачком интестиналном флуиду. Сви изолати су показали антимикуробно дејство према појединим Грам позитивним и Грам негативним бактеријама, за које је утврђено да се заснива на производњи органских киселина, односно снижењу рН. Кандидаткиња је на основу способности везивања за органски растварач хексадекан изолате груписала у групу са умереним степеном хидрофобности коју чине сојеви 5s и Lac7 и групу коју карактерише висока хидрофобност, а чине је сви остали изолати. Способност аутоагрегације и коагрегације са *L. monocytogenes* и *E. coli* је била у позитивној корелацији са утврђеним својством хидрофобности. Испитивање способности адхезије изолата на ћелије колоректалног канцера линије НСТ116 је показало да сви изолати лактобацила поседују адхезивни потенцијал, који је најизраженији код сојева 5s и Lac2. Међутим, утврђена је негативна корелација степена адхезивности са својствима хидрофобности и агрегације.

У поглављу **Дискусија** кандидаткиња компетентно дискутује добијене резултате, поредећи их са подацима из литературе. У првом делу дискусије она се осврће на улогу и значај пробиотских бактерија и сталном потребом за формулацијом нових пробиотских препарата. Имајући у виду да је већина пробиотских препарата присутних на нашем тржишту пореклом из увоза, кандидаткиња потенцира значај формулације домаћег пробиотског препарата, с обзиром да исто географско порекло пробиотског соја и домаћина може повећати успешност колонизације гастроинтестиналног тракта. Како је основни предуслов за пробиотску примену бактерија њихова адекватна идентификација, значајан део овог рада посвећен је овом задатку, а како се резултати генотипске и фенотипске идентификације међусобно разликују, кандидаткиња ту разлику дискутује, истичући предност молекуларних метода идентификације. У даљем тексту кандидаткиња дискутује значај сваког од тестираних својстава изолата (способност преживљавања у условима гастроинтестиналног тракта, толеранцију према фенолу и њихову антимикуробну активност) која их чине пробиотицима. Додатно, протеолитичка активност соја Lac1, који је једини показао ову особину, истиче га као кандидата за тестирање ефекта на снижење крвног притиска. Даља дискусија осврће се на аспекте безбедности употребе пробиотика, те кандидаткиња истиче значај чињенице да су изолати нехемолитични. Међутим, она истовремено указује на неопходност анализе порекла уочене резистенције према антибиотицима и елиминације генетичких детерминанти резистенције на плазмидима, како би се спречио њихов хоризонтални трансфер кроз популацију и тиме сојеви учинили безбедним за употребу. Дискусија хидрофобности и адхезивних својстава, који одређују способност агрегације и везивања за ћелије интестиналног епитела се осврће на посебан значај ових својстава за успешну колонизацију интестинума и заштиту домаћина од ентеропатогених бактерија. Коментаришући добијене резултате, кандидаткиња се осврће на уочену разлику у особинама хидрофобности и способности адхезије на ћелије колона и поткрепљује је сличним литературним подацима који наводе да ова два својства не морају обавезно бити позитивно корелисана. Сумирајући сва испитана пробиотска својства, кандидаткиња истиче да сви испитивани изолати поседују пробиотске карактеристике, али да најбољим кандидатима за даља испитивања сматра хумане изолате Lac2, Lac6 и Lac7, који припадају врсти *L. plantarum* и изолат из сира 5s, који припада врсти *L. casei*. С обзиром да је одабир пробиотских сојева само први корак у процесу развоја пробиотског препарата, у завршном делу дискусије анализирају се смернице даљих истраживања ових изолата, укључујући и технолошке аспекте производње препарата.

Поглавље **Закључци** сумира резултате добијене у овој докторској дисертацији. Кандидаткиња правилно изводи закључке својих истраживања који се односе на изолацију и идентификацију сојева лактобацила, њихову физиолошку и биохемијску карактеризацију, као и компаративну анализу њихових пробиотских особина. Сумирајући

све наведено, кандидаткиња истиче да резултати овог рада могу послужити као основа за даља истраживања која би укључила проверу порекла резистенције на антибиотике, способности компетитивне инхибиције адхезије ентеропатогена, као и *in vivo* истраживања којима би се испитао спектар деловања пробиотика и аспекти здравствене безбедности. На крају кандидаткиња истиче да је крајњи циљ овог рада и будућих истраживања која су овим радом усмерена формулација новог домаћег фармацеутског пробиотског препарата чијом би се свакодневном употребом смањило или елиминисало низ тегоба, пре свега гастроинтестиналног порекла.

Поглавље **Литература** садржи 285 библиографских јединица, које су адекватно цитиране у тексту докторске дисертације.

Поглавље **Прилози** садржи 14 прилога.

### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:**

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

1. Zavišić G., Ristić S., Petričević S., **Novaković Jovanović J.**, Radulović Ž., Janać Petković B, Strahinić I., Piperski V. (2014) Characterization and preliminary lipid-lowering evaluation of a *Lactobacillus* isolate from a traditional Serbian dairy product. *Benef. Microbes*, 6, 119-128.

**M22**

2. **Novaković-Jovanović J.**, Nikolić B., Šeatović S., Zavišić G., Mitić-Ćulafić D., Vuković-Gačić B., Knežević-Vukčević J. (2015) Characterization of some potentially probiotic *Lactobacillus* strains of human origin. *Food Sci. Biotechnol.*, 24, 1781-1788.

**M23**

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Nikolić B., **Novaković Jovanović J.**, Šeatović S., Zavišić G., Radulović Ž., Vuković-Gačić B., Knežević-Vukčević J. (2014) Evaluation of probiotic properties of new lactobacilli human isolates. 5th Congress of Macedonian Microbiologists, Ohrid, R. Macedonia. *Book of Abstracts*, 139.

**M34**

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Jovanović M., **Novaković Jovanović J.**, Nikolić B., Šeatović S., Zavišić G., Mitić-Ćulafić D., Vuković-Gačić B., Knežević-Vukčević J. (2015) Characterization of probiotic properties of human strains of *Lactobacillus plantarum*, X Kongres mikrobiologa Srbije-MIKROMED, Beograd, Apstrakti CD ISBN 978-86-914897-2-4, 223.

**M64**

### **Мишљење и предлог Комисије:**

Докторска дисертација кандидаткиње Јелене Новаковић Јовановић, под насловом „Изолација, карактеризација и испитивање пробиотских особина аутохтоних сојева лактобацила“ представља свестрану студију из области биологије пробиотских бактерија. По обиму, садржају, оригиналности резултата и начинима њиховог представљања и интерпретације, с обзиром на приказ обимне и релевантне литературе, као и изнетим закључцима истраживања, поднети текст има све карактеристике докторске дисертације. Важно је истаћи да је кандидаткиња, на основу резултата добијених у вишегодишњим

истраживањима и прегледа савремене обимне литературе из области, формулисала правце даљих истраживања. Комисија сматра да докторска дисертација Јелене Новаковић Јовановић, дипломираног биолога заштите животне средине, по свом приступу и интерпретираним резултатима представља значајан допринос познавању лактобацила аутохтоних за наше подручје, посебно узимајући у обзир њихову могућу примену као пробиотица. Поред одговора на постављене непосредне циљеве истраживања, добијени резултати представљају основу за будућа истраживања у циљу формулације новог домаћег фармацеутског пробиотског препарата, те тако имају и апликативни значај. Израда докторске дисертације је кандидаткињи Јелени Новаковић Јовановић омогућила да се оспособи за самосталан научни рад, што се може закључити на основу увида у њене досадашње научне активности, садржину дисертације и публиковане резултате.

На основу свега изложеног, комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

У Београду, 07.03.2016. године

#### **КОМИСИЈА:**

---

др Јелена Кнежевић-Вукчевић, редовни професор  
Биолошког факултета Универзитета у Београду

---

др Биљана Николић, доцент  
Биолошког факултета Универзитета у Београду

---

др Драгана Митић-Ђулафић, научни сарадник  
Биолошког факултета Универзитета у Београду

---

др Гордана Завишић, научни сарадник, Галеника а.д., Београд