

TỔNG QUAN THỬ NGHIỆM IN VITRO ĐƯỢC SỬ DỤNG CHO SÀNG LỌC PROBIOTIC LACTOBACILLUS SPP. TIỀM NĂNG

Phạm Đình Khôi⁽¹⁾, Trần Quỳnh Hoa⁽¹⁾, Nguyễn Thị Ngọc Nhi⁽²⁾

(1)Trường Đại học Công thương Thành phố Hồ Chí Minh

(2)Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 22/11/2023; Ngày gửi phản biện 26/12/2023; Chấp nhận đăng 25/01/2024

Liên hệ email: nhintn@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2021.01.507>

Tóm tắt

Probiotic đã không còn là khái niệm xa lạ đối với nhiều người. Lợi ích từ việc bổ sung probiotic vào thực phẩm, dược phẩm cho con người nói chung hay thức ăn chăn nuôi nói riêng đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu. Quá trình từ một chủng vi sinh vật trở thành một sản phẩm probiotic hiệu quả đòi hỏi trải qua rất nhiều thử nghiệm. Đặc biệt, các thử nghiệm in vitro được xem là khởi đầu cần thiết khi sàng lọc một chủng probiotic tiềm năng. Các thử nghiệm in vitro là tiền đề đánh giá khả năng một chủng có thể được ứng dụng để sản xuất hay không, đồng thời là cung cấp một cơ sở sơ bộ xem xét chủng probiotic phục vụ cho lĩnh vực nào là tối ưu nhất. Probiotic thương mại hiện nay thường có nguồn gốc đơn lẻ hoặc kết hợp nhiều chủng vi khuẩn khác nhau từ các vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacteria*,... Trong số đó, được nghiên cứu nhiều nhất là các chủng probiotic *Lactobacillus*. Tuy nhiên, chưa có một nghiên cứu nào đề cập đến các tiêu chuẩn cụ thể trong sàng lọc in vitro đối với các probiotic *Lactobacillus* tiềm năng. Ở bài tổng quan này, chúng tôi tập trung vào việc phân tích và tổng hợp các thử nghiệm in vitro trong sàng lọc probiotic *Lactobacillus* từ các công trình nghiên cứu gần đây, nhằm đưa ra một báo cáo chi tiết về các tiêu chuẩn cần thiết và phương pháp cụ thể khi thử nghiệm in vitro áp dụng cho việc chọn lọc chủng *Lactobacillus* có tiềm năng sản xuất probiotic.

Từ khóa: probiotic, *lactobacillus* spp., probiotic *lactobacillus* spp, in vitro

Abstract

AN OVERVIEW OF IN VITRO TESTS USED FOR PROBIOTIC SCREENING LACTOBACILLUS SPP. POTENTIAL

Probiotics are no longer a strange concept to many people. In general, the benefits of adding probiotics to food, pharmaceuticals for humans, or animal feed in particular have been proven through many studies. The process from a probiotic strain to an effective probiotic product requires a lot of testing. Especially, in vitro tests are

considered as a necessary starting point when screening a potential probiotic strain. In vitro tests are the basis for assessing whether a strain can be used for production or not, and also provide a preliminary basis for considering which probiotic strain serves the most optimal field. Commercial probiotics today are often sourced alone or from a combination of many different bacterial strains from the genera Lactobacillus, Bacillus, Bifidobacteria, etc. Among them, the most researched are Lactobacillus probiotic strains. However, there has not been any study addressing specific standards in in vitro screening for potential probiotics Lactobacillus. In this review, we focus on analyzing and synthesizing in vitro assays for Lactobacillus probiotic screening from research works over the last few years, to providing necessary standards and specific methods for in vitro testing, apply to selecting potential probiotics Lactobacillus strains.

1. Giới thiệu về probiotic

Trong một báo cáo hội thảo chung của Tổ chức nông lương thế giới (FAO) và Tổ chức y tế thế giới (WHO) năm 2001, probiotic được định nghĩa là những vi sinh vật còn sống mà khi đưa vào cơ thể với một lượng thích hợp sẽ mang đến lợi ích sức khỏe cho ký chủ. Một vi sinh vật được xác định là thực phẩm probiotic phải trải qua nhiều thử nghiệm. Chúng cần phải được định danh bằng các phương pháp kiểu gen và kiểu hình, định danh đến chi, loài, chủng. Tiếp theo là đánh giá sự an toàn và tiềm năng probiotic của vi sinh vật đã sàng lọc bằng các thử nghiệm *in vitro* và nghiên cứu trên người (giai đoạn 1) hoặc động vật. Thử nghiệm trên người giai đoạn 2 theo một bố trí thí nghiệm ngẫu nhiên, có kiểm soát giả dược, với cỡ mẫu phù hợp để xác định hiệu quả của chủng. Đến giai đoạn 3 sẽ thử nghiệm hiệu quả probiotic khi so sánh với phương pháp điều trị tiêu chuẩn trong tình trạng cụ thể. Probiotic sau khi kết thúc các thử nghiệm đánh giá phải dẫn nhãn thể hiện đủ thông tin cần thiết được yêu cầu (FAO/WHO., 2002).

Các lợi ích của probiotic đối với sức khỏe con người nói riêng và động vật nói chung đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu. Probiotic được đánh giá như là một giải pháp tiềm năng cho thuốc kháng sinh khi điều trị bệnh về hệ tiêu hóa (Sevin., 2004), làm giảm tình trạng không dung nạp lactose của con người (Heyman., 2000). Chúng là một phần của hệ thống miễn dịch, giúp ngăn ngừa nhiễm trùng, tiêu hóa thức ăn nhằm cung cấp năng lượng cho cơ thể, sự tồn tại của chúng trong cơ thể giúp cạnh tranh dinh dưỡng cần thiết với các vi khuẩn gây hại khác, bảo vệ cơ thể, tăng cường miễn dịch (Inglin., 2017). Các thực phẩm như sữa chua, phô mai, rau, củ, quả muối chua đều có chứa probiotic. Probiotic được bổ sung cho con người thông qua thực phẩm hoặc được phẩm, giúp hỗ trợ hệ tiêu hóa, cân bằng hệ vi sinh đường ruột (Hill và cs., 2014). Trong nuôi trồng thủy hải sản, probiotic được dùng như một chất kháng sinh tự nhiên giúp kiểm soát và ngăn ngừa bệnh tật trên tôm, sù (Meunpol và cs., 2003), cá nước ngọt *Labeo rohita* (Giri và cs., 2013),...

2. Probiotic *Lactobacillus* spp.

2.1. Một số đặc điểm của *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus là vi khuẩn lactic ưa acid, hiếu khí hoặc kỵ khí tùy ý. Chúng có dạng hình que (trực khuẩn) hay hình cầu và không sinh bào tử. Các vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* thường đặc trưng bởi hàm lượng GC thấp trong bộ gen. *Lactobacillus* có phản ứng âm tính với phép thử catalase, phép thử indole và có thể phân giải CaCO_3 .

Quá trình tăng trưởng của *Lactobacillus* spp. đòi hỏi phải được bổ sung nhiều chất dinh dưỡng cần thiết như nguồn carbon, acid amine, vitamine và khoáng chất, đồng thời phải kiểm soát nhiệt độ, pH nghiêm ngặt (Elli và cs., 2000; Ponomarova và cs., 2017). Hiện nay, để nuôi cấy *Lactobacillus*, người ta thường sử dụng môi trường MRS rắn hoặc lỏng.

Quá trình chuyển hóa carbohydrate của *Lactobacillus* có sự tham gia của nhiều loại enzyme, chúng có thể được phân loại theo sự đồng hóa của các hexose như glucose, mannose, galactose, fructose; hay pentose như arabinose và cylose (Pot và cs., 2014; Drissi và cs., 2017). Dựa vào sản phẩm lên men cuối cùng, *Lactobacillus* spp. được chia thành 2 nhóm là lên men đồng hình và lên men dị hình, thứ hai là tùy ý và bắt buộc. Lên men đồng hình bắt buộc luôn thực hiện quá trình đường phân và chỉ tạo ra acid lactic (hơn 85%) theo con đường Embden - Meyerhof - Parnas (EMP) từ quá trình đồng hóa hexose (Abdel-Rahman và cs., 2013; Pessione, 2012; Salvetti và cs., 2012). Việc sử dụng các hexose khác chỉ xảy ra sau khi cạn kiệt glucose, trong đó maltose sẽ bị thủy phân bởi α - glycosidase (Gänzle và cs., 2007). Trong khi đó, *Lactobacillus* lên men dị hình bắt buộc ngoài tạo ra acid lactic, acid acetic, ethanol và CO_2 khi lên men hexose và tạo ra acid lactic, acid acetic và ethanol khi lên men pentose bằng con đường phosphogluconate và phosphoketolase (Abdel - Rahman và cs., 2013). Một số loài có khả năng lên men dị hình tùy ý phụ thuộc vào nguồn carbon sẵn có, có thể chuyển hóa giữa đồng hình và dị hình (DE ANGELIS và cs., 2011; Von Wright và Axelsson, 2019; Drissi và cs., 2017).

2.2. Một số vai trò của probiotic *Lactobacillus* spp.

Sự hiện diện của vi khuẩn *Lactobacillus* giúp cân bằng hệ vi sinh đường ruột ở người, khả năng kháng nấm (Yang và cs., 2010), kháng ung thư (Paolillo và cs., 2009), giảm cholesterol (Wang và cs., 2012), kháng viêm, kháng oxy hóa (Kuda và cs., 2014). Cùng với *Bifidobacterium* và *Bacillus*, *Lactobacillus* cũng có tiềm năng và vai trò rất lớn trong sản xuất chế phẩm probiotic. Trong lên men carbohydrate sinh lactic, chúng có vai trò quan trọng nhất (Cai và cs., 2012; Herbel và cs., 2013). Lợi ích của probiotic *Lactobacillus* đối với hệ miễn dịch đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu. Ở đường ruột, sự hiện diện của probiotic *Lactobacillus* có thể kích thích sự phát triển của các vi khuẩn lactic khác, cũng như tạo mối quan hệ cộng sinh với các lợi khuẩn sẵn có trong ruột (Takahashi và cs., 2007). Probiotic *Lactobacillus* cho thấy khả năng ức chế sự tăng

sinh của tế bào ung thư đại trực tràng, cũng như gia tăng quá trình apoptosis các tế bào này, gia tăng miễn dịch niêm mạc (Delcenrie và cs., 2008; Dallal và cs., 2015).

3. Thử nghiệm *in vitro* trong sàng lọc *Lactobacillus* spp. có tiềm năng probiotic

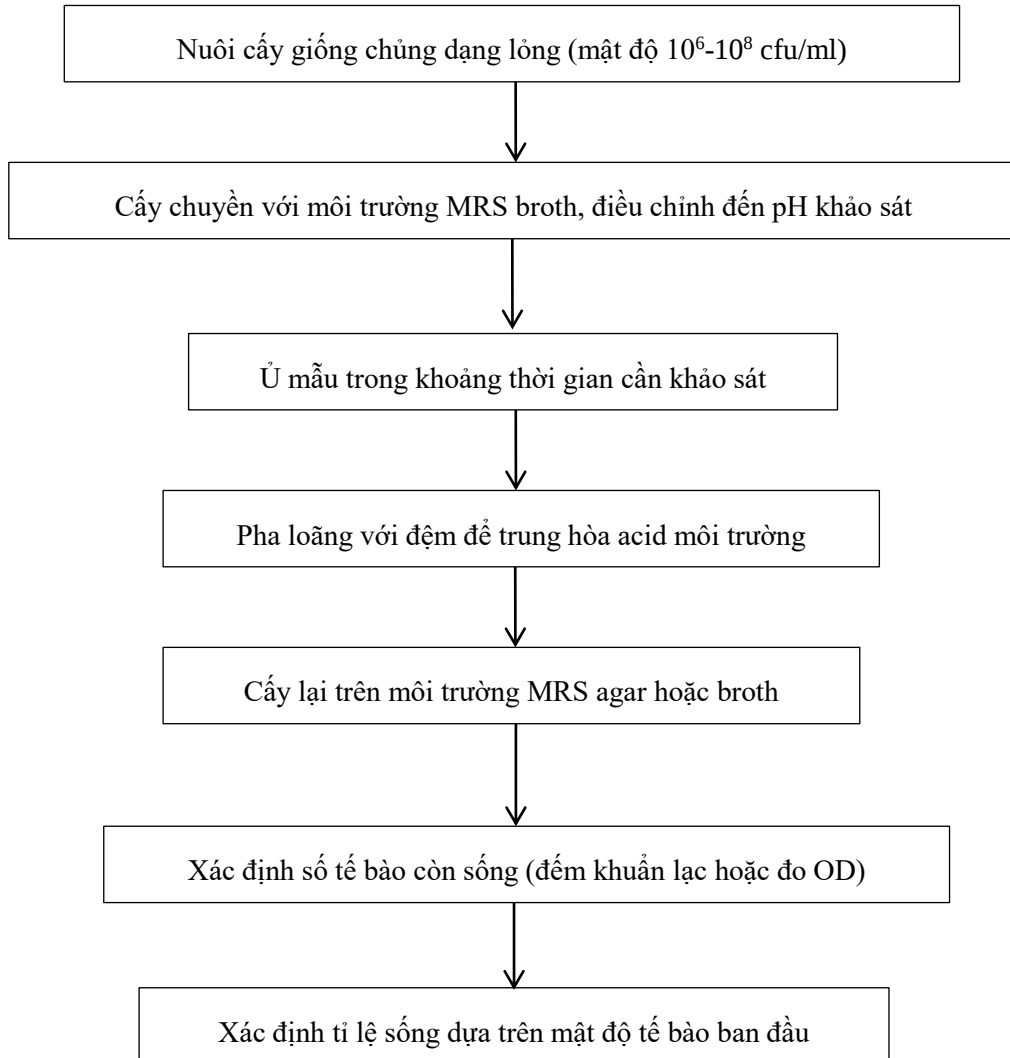
Trong báo cáo chung của FAO/WHO năm 2002, hướng dẫn đánh giá probiotic trong thực phẩm đã đề cập đến một số thử nghiệm *in vitro* tiêu chuẩn trong sàng lọc probiotic tiềm năng (bảng 1), các kiểm tra sâu hơn về độ an toàn và sự phù hợp của chế phẩm đối với con người và động vật sẽ được thực hiện sau đó. Bên cạnh các thử nghiệm sinh hóa đặc trưng và xét nghiệm sinh học phân tử định danh chủng loài cụ thể thì *in vitro* test là thước đo tiêu chuẩn căn bản cho việc xác định một chủng có tiềm năng probiotic. Trong báo cáo này, chúng tôi sẽ tập trung vào các thử nghiệm sàng lọc *in vitro* được sử dụng trong các nghiên cứu những năm qua đối với chủng probiotic *Lactobacillus*. Từ đó cung cấp kiến thức khái quát và quy trình chung cho quá trình lựa chọn chủng probiotic *Lactobacillus* trong tương lai.

Bảng 1. Thử nghiệm *in vitro* thường dùng trong nghiên cứu các chủng probiotic

Kháng acid dạ dày
Kháng acid mật
Bám vào chất nhầy/tế bào biểu mô và dòng tế bào ở người
Hoạt động kháng vi khuẩn gây bệnh
Hoạt tính làm giảm sự bám dính bề mặt của các mầm bệnh
Hoạt động thủy phân muối mật
Khả năng kháng chất diệt tinh trùng (áp dụng cho probiotic dùng cho âm đạo)

3.1. Khả năng chịu acid dạ dày

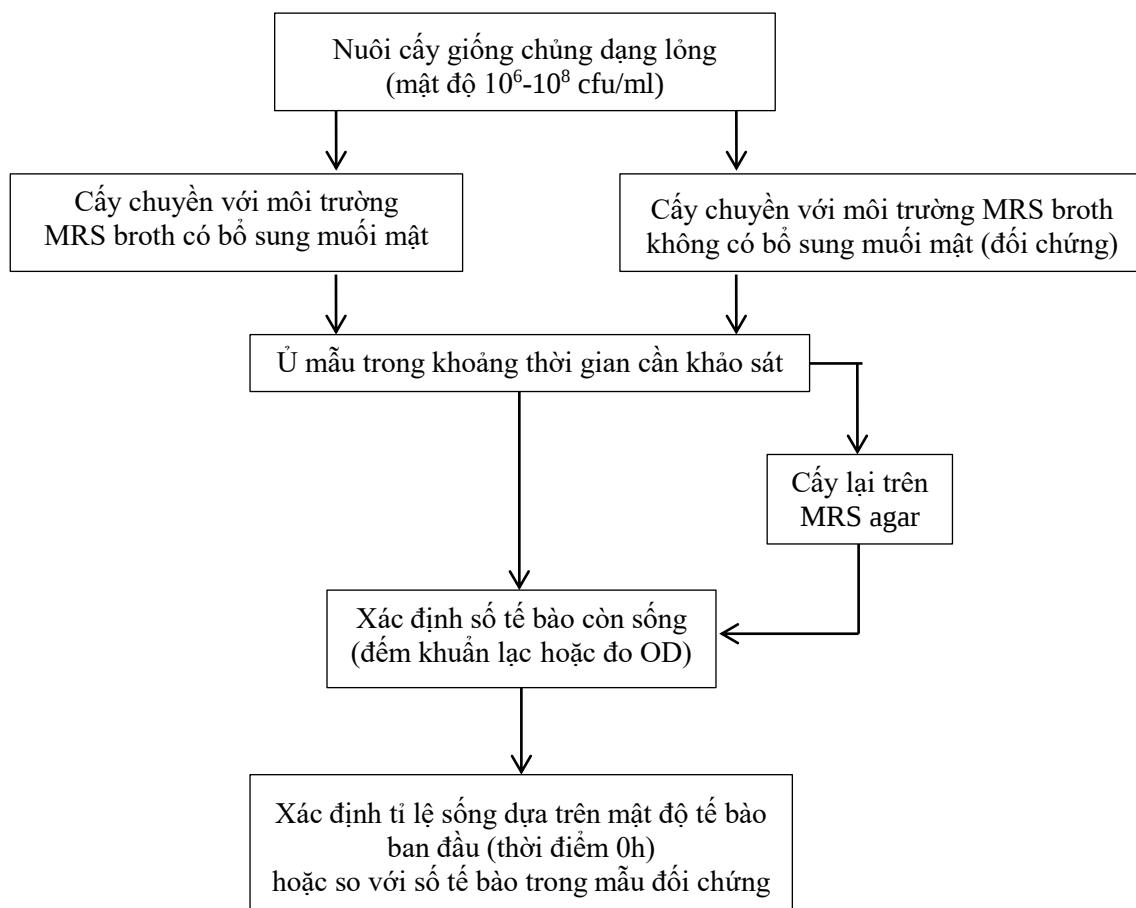
Một trong những thuộc tính đầu tiên và quan trọng nhất của chế phẩm probiotic là khả năng tồn tại trong môi trường acid dạ dày. Sự thay đổi pH của acid dạ dày liên quan đến hoạt động tiết dịch vị ở trạng thái khi đói, trong bữa ăn và sau bữa ăn. Khoảng pH này thông thường sẽ dao động từ 1,5-3,5 (Marieb và Hoehn., 2007). Các loài *Lactobacillus* spp. có thể tồn tại trong điều kiện pH thay đổi từ 4,5-6,5 hoặc thấp hơn nữa (Śliżewska và cs., 2020). Do đó, các thí nghiệm kiểm tra khả năng chịu acid dạ dày của các vi khuẩn probiotic *Lactobacillus* spp cần được thiết kế với pH ở các mức độ khác nhau nằm trong khoảng 1-6,5, trong các khoảng thời gian khác nhau (0-3 giờ), để mô phỏng quá trình đi qua dạ dày (Neha và cs., 2014; Kumar và cs., 2015). Các phương pháp đếm khuẩn lạc, xác định mật độ tế bào và đo OD thường được áp dụng để đánh giá sự tồn tại của vi khuẩn trong thí nghiệm (Ramos và cs., 2013; Samet và Taskin., 2022). Các chủng có khả năng chịu được pH trong thời gian nghiên cứu được xem là có khả năng chịu acid.



Hình 1. Quy trình thử nghiệm in vitro khả năng chịu acid của probiotic *Lactobacillus*

3.2. Khả năng chịu muối mật

Mật (hay dịch mật) là sản phẩm của tế bào gan, tham gia vào quá trình tiêu hóa thức ăn, đặc biệt là tiêu hóa lipid. Dịch mật là một hỗn hợp phức tạp của acid mật liên hợp (muối mật), glycine, cholesterol và một số hợp chất vô cơ khác. Sự bài tiết dịch mật ở gan còn phụ thuộc vào lượng muối mật tuần hoàn. Muối mật là thành phần quan trọng của mật trong việc tiêu hóa và hấp thu lipid. Khả năng chịu muối mật của các chủng probiotic *Lactobacillus* tiềm năng được đánh giá trên khả năng sống trong các môi trường có bổ sung muối mật ở các nồng độ khác nhau (0,3-3,0%) trong khoảng thời gian nuôi cấy nhất định. Kết thúc thời gian nuôi cấy, phương pháp đếm khuẩn lạc hoặc bán định lượng bằng đo OD có thể được sử dụng để đánh giá (Ramos và cs., 2013; Thakur và cs., 2016; Hu và cs., 2018). Các chủng còn sống hoặc có giá trị OD đạt yêu cầu sau thời gian nghiên cứu được gọi là có khả năng chịu muối mật.

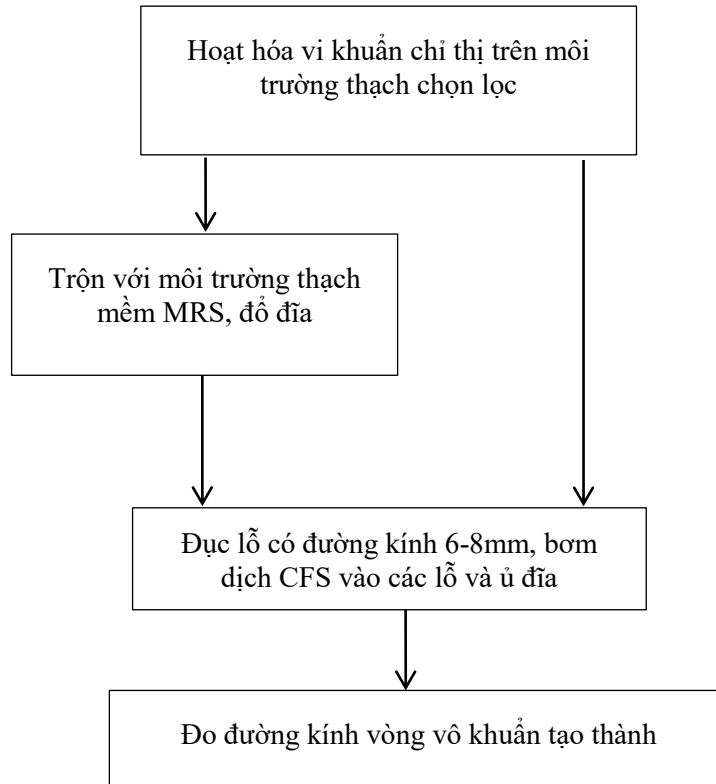


Hình 2. Quy trình thử nghiệm in vitro khả năng chịu muối mật của probiotic *Lactobacillus*

3.3. Khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh

Sự hiện diện của probiotic trong cơ thể vật chủ giúp chống lại sự xâm nhập của các tác nhân gây bệnh. Do đó, vai trò kháng khuẩn được cho là một tiêu chí quan trọng để đánh giá tiềm năng probiotic của các chủng vi sinh vật. Khả năng kháng khuẩn của probiotic *Lactobacillus* spp. nhờ vào các hợp chất có khả năng kháng khuẩn được sinh ra trong quá trình trao đổi chất của chúng, điển hình là các acid hữu cơ như acid lactic, acid acetic, bacteriocins hay hydroxy peroxit (H_2O_2). Để kiểm tra hoạt tính này, phương pháp khuếch tán thường được sử dụng như một phương pháp tiêu chuẩn. Các tác nhân gây bệnh hay vi khuẩn chỉ thị thường dùng là *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Salmonella*,... Ở một số báo cáo, nhóm nghiên cứu sử dụng vi khuẩn chỉ thị sau thời gian nuôi cấy hoạt hóa trong môi trường chọn lọc, trộn với MRS agar mềm (0,75% agar), sau đó phủ lên các đĩa petri chứa môi trường MRS agar đã tiệt trùng, dùng dụng cụ tiệt trùng đục các lỗ đường kính 6-8mm, bơm môi trường không chứa tế bào *Lactobacillus* spp. (cell free supernatants, CFS) và ủ từ 24-48h. CFS được chuẩn bị bằng cách ly tâm thu dịch nổi môi trường MRS lỏng nuôi cấy *Lactobacillus* spp (El-Sayed và cs., 2022). Một số nhóm nghiên cứu khác sẽ sử dụng môi trường tăng sinh

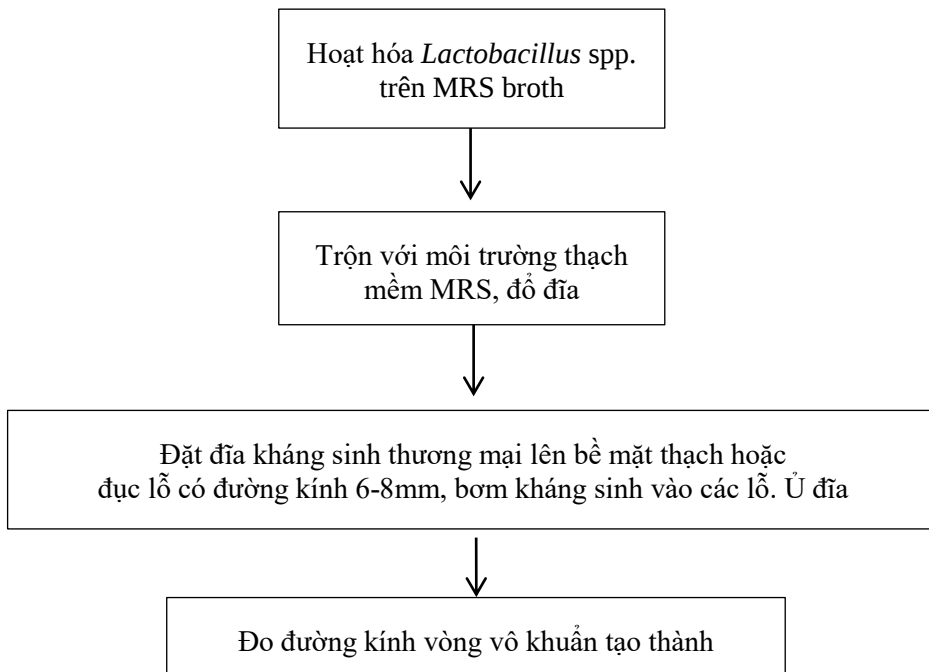
chọn lọc của vi khuẩn chỉ thị, dùng dụng cụ đục lỗ 6-8mm sau đó bơm CFS vào và ủ từ 24-48h (Rushdy và Gomma., 2013). Kết thúc thời gian ủ, đo đường kính vòng vô khuẩn tạo thành để đánh giá khả năng kháng khuẩn của probiotic.



Hình 3. Quy trình thử nghiệm in vitro khả năng kháng khuẩn của probiotic *Lactobacillus*

3.4. Khả năng kháng kháng sinh

Mặc dù *Lactobacillus* spp. thường được công nhận là vi khuẩn an toàn do lịch sử sử dụng an toàn và lâu dài của chúng, tuy nhiên vấn đề kháng kháng sinh vẫn cần được xem xét và đánh giá cẩn thận để xác định sự an toàn của chế phẩm. Môi quan hệ chặt chẽ với hệ vi sinh vật bản địa trong cơ thể có thể dẫn đến sự chuyển gen theo chiều ngang, đặc biệt là các gen mã hóa cho khả năng kháng kháng sinh ở *Lactobacillus* (Lin và cs., 1996; Çataloluk và Gogebakan, 2004). Các nghiên cứu trước đó cũng chỉ ra rằng một số vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng kháng kanamycin và streptomycin (Danielsen và Wind, 2003; Klare và cs., 2007), khả năng kháng clindamycin và chloramphenicol của *L.casei* L-4 (Georgieva và cs., 2015). Để kiểm tra khả năng này, phương pháp khuếch tán thường được ưa chuộng. Canh khuẩn *Lactobacillus* spp. được tăng sinh qua đêm để hoạt hóa và trộn với MRS agar mềm, phủ lên bề mặt đĩa thạch MRS agar, sử dụng đĩa kháng sinh thương mại đặt lên trên và ủ ở 37°C trong 24h (Sharma và cs., 2016). Có thể đục lỗ thạch đường kính 6-8mm rồi bơm chất kháng sinh vào rồi ủ tương tự. Đo đường kính vòng vô khuẩn hình thành sau khi kết thúc thời gian ủ để xác định khả năng kháng kháng sinh của chủng probiotic tiềm năng.

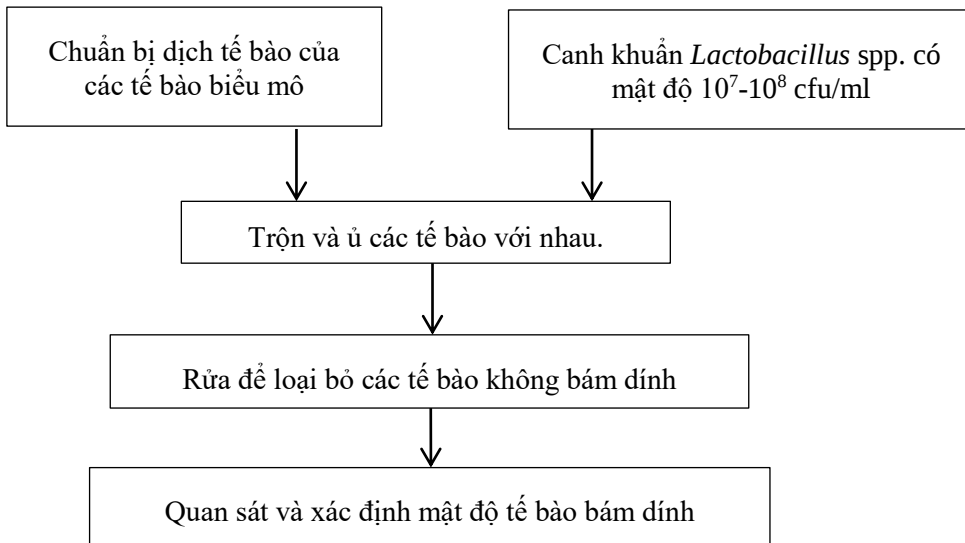


Hình 4. Quy trình thử nghiệm *in vitro* khả năng kháng kháng sinh của probiotic *Lactobacillus*

3.5. Khả năng bám dính trên bề mặt sinh học

Các vi khuẩn probiotic cần phải bám dính trên bề mặt sinh học, đặc biệt là các tế bào biểu mô ruột để có thể tồn tại lâu dài trong đường tiêu hóa, cũng như phát huy vai trò cạnh tranh dinh dưỡng với các tác nhân gây bệnh khác. Nhờ vào khả năng bám dính và kết tụ, *Lactobacillus* spp. hình thành một rào chắn ngăn chặn sự xâm nhập của các mầm bệnh (Kos và cs., 2003). Do đó, khả năng bám dính, tự kết tụ hay đồng kết tụ được xem là một trong những tiêu chí quan trọng trong sàng lọc các chủng probiotic *Lactobacillus* tiềm năng.

Để kiểm tra khả năng bám dính của probiotic *Lactobacillus* spp., người ta thường đánh giá dựa trên tính kỵ nước bề mặt tế bào và khả năng kết dính với các tế bào chuyên biệt. Vi khuẩn có tính kỵ nước bề mặt càng cao thì khả năng bám dính càng lớn. Tính kỵ nước của vi khuẩn thường được xác định bằng kỹ thuật BATH hoặc MATH (bacterial/microbial adherence to hydrocarbons), phát triển bởi Rosenberg (1984) và Geertsema-Doornbusch cùng cộng sự (1993). Các chủng vi khuẩn có tính kỵ nước khi có áp lực cao với hydrocacbon, ngược lại, những chủng liên kết yếu với hydrocarbon thì có tính ưa nước. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu sau này cho rằng tính kỵ nước không thực sự phản ánh đúng tiềm năng probiotic của chủng vi sinh vật (Coeuret và cs., 2004). Vì vậy, một thử nghiệm *in vitro* khác cũng thường được sử dụng để đánh giá khả năng kết dính của probiotic với tế bào ruột, thông qua sử dụng những mô hình về dòng tế bào ruột. Bằng cách ủ các tế bào với chủng probiotic cần thử nghiệm trong một khoảng thời gian nhất định để xác định mức độ bám dính của vi khuẩn (Kumar và cs., 2015).



Hình 5. Quy trình thử nghiệm *in vitro* khả năng bám dính trên bề mặt sinh học của probiotic *Lactobacillus*

4. Kết luận

Nhìn chung, quá trình tạo ra một chế phẩm sinh học đòi hỏi rất nhiều thời gian, kiến thức khoa học và công nghệ. Tùy thuộc vào các điều kiện nghiên cứu khác nhau, các phương pháp khác nhau nếu thích hợp vẫn được sử dụng nhưng vẫn phải đảm bảo tính hợp lý và xác thực của kết quả nghiên cứu. Báo cáo của chúng tôi đã tổng hợp các quy trình thử nghiệm *in vitro* cần thiết và được sử dụng nhiều khi sàng lọc một probiotic *Lactobacillus* tiêu chuẩn. Những thử nghiệm sâu hơn có thể được tiến hành tùy thuộc điều kiện của nhóm nghiên cứu. Trên cơ sở những gì đã tìm hiểu và tổng hợp ở trên, chúng tôi hy vọng rằng đã đóng góp được kiến thức tổng quát cho các công trình khoa học liên quan đến probiotic *Lactobacillus* về sau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology advances*, 31(6), 877-902.
- [2] Cai, Y., Pang, H., Kitahara, M., & Ohkuma, M. (2012). *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus *Lactobacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt_5), 1140-1144.
- [3] Çataloluk, O., & Gogebakan, B. (2004). Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey. *FEMS microbiology letters*, 236(1), 7-12.
- [4] Coeuret, V., Gueguen, M., & Vernoux, J. P. (2004). In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *Journal of dairy research*, 71(4), 451-460.

- [5] Dallal, M. M. S., Mojarad, M., Baghbani, F., Raoofian, R., Mardaneh, J., & Salehipour, Z. (2015). Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on colorectal tumor cells activity (CaCo-2). *Archives of Iranian medicine*, 18(3), 0-0.
- [6] Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International journal of food microbiology*, 82(1), 1-11.
- [7] DE ANGELIS, M., & Gobbetti, M. (2011). *Lactobacillus* spp.: general characteristics. In *Encyclopedia of Dairy Science*, 2nd Edition (Vol. 3, pp. 78-90). Academic Press.
- [8] Drissi, F., Raoult, D., & Merhej, V. (2017). Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals. *Microbial pathogenesis*, 106, 182-194.
- [9] Elli, M., Zink, R., Rytz, A., Reniero, R., & Morelli, L. (2000). Iron requirement of *Lactobacillus* spp.. in completely chemically defined growth media. *Journal of applied microbiology*, 88(4), 695-703.
- [10] El-Sayed, A. I., El-Borai, A. M., Akl, S. H., El-Aassar, S. A., & Abdel-Latif, M. S. (2022). Identification of *Lactobacillus* strains from human mother milk and cottage cheese revealed potential probiotic properties with enzymatic activity. *Scientific Reports*, 12(1), 22522.
- [11] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- [12] Gänzle, M. G., Vermeulen, N., & Vogel, R. F. (2007). Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food microbiology*, 24(2), 128-138.
- [13] Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., ... & Karaivanova, E. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(1), 84-91.
- [14] Gilliland, S. E., & Walker, D. K. (1990). Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *Journal of dairy science*, 73(4), 905-911.
- [15] Giri, S. S., Sukumaran, V., & Oviya, M. (2013). Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish & shellfish immunology*, 34(2), 660-666.
- [16] Herbel, S. R., Vahjen, W., Wieler, L. H., & Guenther, S. (2013). Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. *Gut Pathogens*, 5(1), 1-13.
- [17] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... & Sanders, M. E. (2014). *Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*.
- [18] Hu, P. L., Yuan, Y. H., Yue, T. L., & Guo, C. F. (2018). A new method for the in vitro determination of the bile tolerance of potentially probiotic lactobacilli. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 1903-1910.
- [19] Inglin, R. C. (2017). *Combined phenotypic-genotypic analyses of the genus Lactobacillus and selection of Cultures for Biopreservation of Fermented Food* (Doctoral dissertation, ETH Zurich).

- [20]Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., & Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 153(1-2), 216-222.
- [21]Joint, F. A. O. (2001). *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lave Lactic Acid Bacteria*. Ref Tye Report. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.
- [22]Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., ... & Goossens, H. (2007). Antimicrobial susceptibilities of Lactobacillus, Pediococcus and Lactococcus human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(5), 900-912.
- [23]Kos, B. V. Z. E., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987.
- [24]Kuda, T., Kawahara, M., Nemoto, M., Takahashi, H., & Kimura, B. (2014). In vitro antioxidant and anti-inflammation properties of lactic acid bacteria isolated from fish intestines and fermented fish from the Sanriku Satoumi region in Japan. *Food research international*, 64, 248-255.
- [25]Kumar, A., & Kumar, D. (2015). Characterization of Lactobacillus isolated from dairy samples for probiotic properties. *Anaerobe*, 33, 117-123.
- [26]Marieb, E. N., & Hoehn, K. (2007). Human anatomy & physiology. Pearson education.
- [27]Meunpol, O., Lopinyosiri, K., & Menasveta, P. (2003). The effects of ozone and probiotics on the survival of black tiger shrimp (Penaeus monodon). *Aquaculture*, 220(1-4), 437-448.
- [28]Mishra, V., & Prasad, D. N. (2005). Application of in vitro methods for selection of Lactobacillus casei strains as potential probiotics. *International journal of food microbiology*, 103(1), 109-115.
- [29]Neha, K., P, K. S., & Deepak, C. S. (2014). Screening and evaluation of Lactobacillus spp. for the development of potential probiotics. *African Journal of Microbiology Research*, 8(15), 1573-1579.
- [30]Ohashi, Y., & Ushida, K. (2009). Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal*, 80(4), 361-371.
- [31]Paolillo, R., Carratelli, C. R., Sorrentino, S., Mazzola, N., & Rizzo, A. (2009). Immunomodulatory effects of Lactobacillus plantarum on human colon cancer cells. *International immunopharmacology*, 9(11), 1265-1271.
- [32]Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 86.
- [33]Ponomarova, O., Gabrielli, N., Sévin, D. C., Mülleder, M., Zirngibl, K., Bulyha, K., ... & Patil, K. R. (2017). Yeast creates a niche for symbiotic lactic acid bacteria through nitrogen overflow. *Cell systems*, 5(4), 345-357.
- [34]Pot, B., Felis, G. E., Bruyne, K. D., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J., & Vandamme, P. (2014). *The genus Lactobacillus. Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*, 249-353.
- [35]Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., & Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of Lactobacillus fermentum, Lactobacillus plantarum and Lactobacillus brevis isolates from Brazilian food products. *Food microbiology*, 36(1), 22-29.

- [36] Rushdy, A. A., & Gomaa, E. Z. (2013). Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated from dairy products. *Annals of Microbiology*, 63, 81-90.
- [37] Salvetti, E., Torriani, S., & Felis, G. E. (2012). The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics Antimicrob Proteins* 4, 217-226.
- [38] Samet, K., & Taskin, I. I. (2022). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains. *Research Journal of Biotechnology*, 17, 1.
- [39] Sharma, P., Tomar, S. K., Sangwan, V., Goswami, P., & Singh, R. (2016). Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. isolated from commercial probiotic preparations. *Journal of Food Safety*, 36(1), 38-51.
- [40] Śliżewska, K., & Chlebicz-Wójcik, A. (2020). Growth kinetics of probiotic *Lactobacillus* strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium. *Biology*, 9(12), 423.
- [41] Thakur, N., Rokana, N., & Panwar, H. (2016). Probiotics, Selection criteria, safety and role in health and. *Journal of Innovative Biology January*, 3(1), 259-270.
- [42] Von Wright, A., & Axelsson, L. (2019). *Lactic acid bacteria: an introduction*. In *Lactic acid bacteria* (pp. 1-16). CRC Press.
- [43] Wang, J., Zhang, H., Chen, X., & Chen, Y. Menghebilige, and Bao, Q.(2012). Selection of potential probiotic *Lactobacilli* for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. *Journal of Dairy Science*, 95(4), 1645-1654.
- [44] Yang, E. J., & Chang, H. C. (2010). Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International journal of food microbiology*, 139(1-2), 56-63.