

ALESSIO GIACOMINI<sup>1</sup>, CHIARA NADAI<sup>1</sup>, VIVIANA CORICHI<sup>1</sup>

## Aspettative e limitazioni nell'uso dei fermenti lattici probiotici

<sup>1</sup> Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente (DAFNAE),  
Università degli Studi di Padova

### INTRODUZIONE

Il termine probiotico nasce dall'unione della parola latina pro- (“a favore di”) e dell'aggettivo greco βιωτικός (biotico), proveniente dal sostantivo βίος (bios, “vita”). Si tratta quindi, in linea generale, di sostanze in grado di apportare dei benefici all'organismo umano. In particolare, nel caso dei probiotici, si fa riferimento a organismi viventi e più specificatamente a microrganismi. Il primo studioso a occuparsi di questo tema fu Ill'ja Il'ič Mečnikov (1845-1916), uno studioso russo, di 23 anni più giovane di Pasteur. Mečnikov fu uno dei padri della moderna immunologia, grazie ai suoi studi sul meccanismo della fagocitosi, che gli fruttarono il premio Nobel per la medicina nel 1908. Agli inizi del '900, Mečnikov sviluppò il concetto di probiotico, studiando alcune popolazioni del Caucaso che erano solite consumare grandi quantità di latte fermentato. Mečnikov ipotizzò che questi batteri e l'acido da loro prodotto durante lo sviluppo nel latte, potessero in qualche modo favorire il benessere dell'intestino umano, dato che l'età media di queste popolazioni era superiore a quella di popoli di regioni limitrofe. Sull'onda di questi primi studi, già negli anni '30 Minoru Shirota sviluppò in Giappone un preparato a base di latte scremato fermentato che chiamò Yakult, un prodotto tuttora presente sul mercato, contenente lo stesso ceppo batterico, il *Lactobacillus casei* Shirota, con cui fu inizialmente prodotto. Anche se il termine probiotico fu ufficialmente accettato nel 1965 (Lilly e Stilwell, 1965), nel corso degli anni si sono succedute parecchie definizioni per descrivere questo concetto (tab. 1).

YEAR	DEFINITION
1953	Probiotics are common in vegetable food as vitamins, aromatic substances, enzymes and possibly other substances connected with vital processes
1954	Probiotics are opposite of antibiotic
1955	Deleterious effects of antibiotics can be prevented by probiotic therapy
1974	Organisms and substances that contribute to intestinal microbial balance
1992	Live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving microbial balance
1992	Viable mono- or mixed culture of live microorganisms which, applied to animals or man, have a beneficial effect on the host by improving the properties of the indigenous microflora
1996	Living microorganisms which, upon ingestion in certain numbers, exert health benefits beyond inherent basic nutrition
1999	Microbial cell preparations or components of microbial cells that have a beneficial effect on the health and well-being of the host
2002	Live microorganisms that when administered in adequate amount confer a health benefit on the host (FAO/WHO)

Tab. 1 *Lista delle principali definizioni (in lingua inglese) di probiotico succedutesi negli anni*

La definizione attualmente utilizzata si deve alla FAO e all'Organizzazione Mondiale della Sanità (FAO/WHO, 2002), e definisce i probiotici come «microorganismi vivi che, somministrati in adeguate quantità, conferiscono all'ospite un beneficio in termini di salute». Lo stesso documento definisce anche alcune caratteristiche che un microorganismo probiotico dovrebbe possedere:

- a. deve essere stato anzitutto tassonomicamente definito, cioè si deve conoscere la specie a cui appartiene. I principali probiotici sono batteri, ma anche altri microorganismi, per esempio il lievito *Saccharomyces boulardii*, sono attualmente disponibili sul mercato;
- b. deve essere vivo quando viene ingerito, anche se non necessariamente vitale. Questo significa che i probiotici possono anche essere somministrati in forme quiescenti (ad esempio endospore), come avviene per uno dei probiotici maggiormente commercializzati in Italia, che contiene un unico ceppo della specie *Bacillus clausii* sotto forma di endospora;
- c. deve essere stato sottoposto a una valutazione per documentare i benefici per la salute dell'ospite, cioè nei confronti dell'organismo umano. Questa proprietà deve essere dimostrata da adeguati studi scientifici;
- d. la sua ingestione non deve creare problemi all'organismo umano.

## FONTI DI PROBIOTICI

I microrganismi probiotici sono concepiti per svolgere funzioni benefiche all'interno dell'intestino umano, quindi l'ambiente più indicato dal quale isolare nuovi potenziali ceppi probiotici è proprio quello dove loro si trovano naturalmente e lavorano, cioè l'intestino umano. Per questa ragione, la maggior parte dei batteri probiotici sono stati isolati dal contenuto intestinale, attraverso il campionamento di feci, sia di adulti che di bambini, in particolare lattanti (Hyemin et al., 2021). Altra fonte importante di probiotici è costituita dal latte umano, che ha dimostrato di contenere interessanti ceppi microbici, in particolare appartenenti al genere *Bifidobacterium*. Ulteriore luogo per la ricerca di probiotici sono i prodotti lattiero-caseari fermentati, quali yogurt e vari tipi di latti fermentati e formaggi stagionati. In tempi più recenti, la ricerca si è rivolta anche verso fonti meno tradizionali, quali prodotti fermentati non a base di latte, come frutta, verdura o carni, o dal suolo, oppure dall'apparato digerente di animali, inclusi i pesci.

## REQUISITI DI SICUREZZA

È legittimo chiedersi se qualsiasi microrganismo che abbia dimostrato interessanti proprietà possa essere utilizzato come probiotico. La risposta è chiaramente negativa, perché al di là degli effetti benefici, requisito essenziale per un probiotico è di non arrecare danno, con la sua presenza e/o attività, al consumatore che lo ingerisce. Per chiarire questo aspetto l'Unione Europea, attraverso l'EFSA (*European Food Safety Authority*), ha sviluppato il concetto di QPS (*Qualitative Presumption of Safety*, presunzione qualificata di sicurezza) che si rifà al concetto di GRAS (*Generally Recognized As Safe*) adottato negli Stati Uniti, in base a cui, per essere proposto come probiotico, un microrganismo deve appartenere ad una specie che possieda lo status di QPS. Lo schema operativo per definire tale status è illustrato in figura 1.

Anzitutto il microrganismo deve essere chiaramente identificato a livello di specie (oggi l'approccio preferibile è l'identificazione genetica, tramite la sequenza del 16S rDNA o ancor meglio attraverso la sequenza dell'intero genoma, ormai possibile a costi contenuti). Una volta identificato il microrganismo, bisogna verificare se ci sia una sufficiente quantità di conoscenze sugli aspetti riguardanti la sicurezza per quella specie, definiti come *Sufficient Body of Knowledge*. Si tratta anzitutto di conoscere la storia di utilizzo del microrganismo, per esempio se la specie sia utilizzata da lungo tempo per uso alimentare umano. Ci sono microrganismi che vengono regolarmente ingeriti da millenni

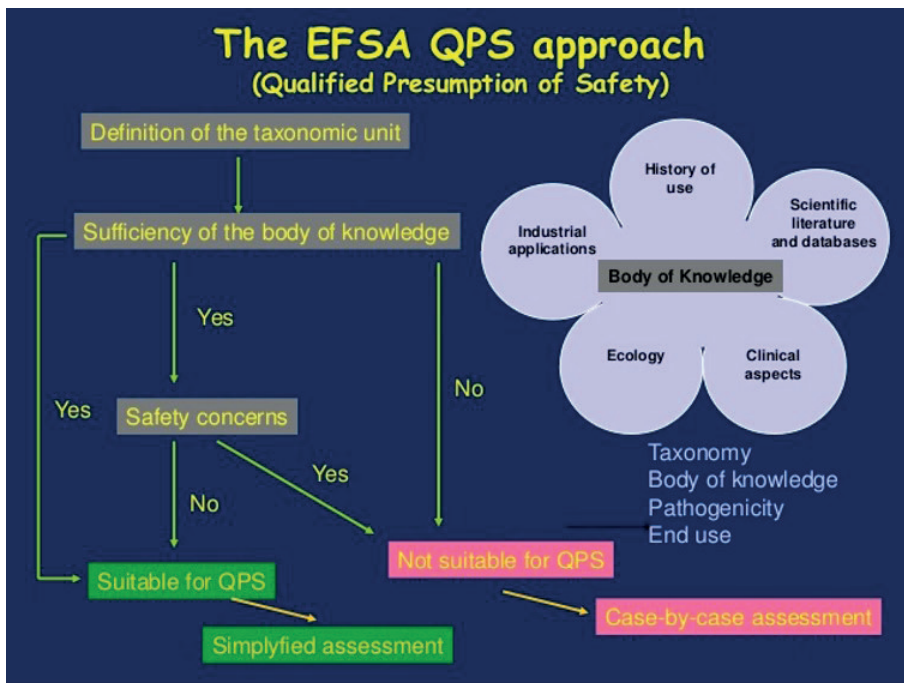


Fig. 1 Diagramma di flusso per l'attribuzione dello status di QPS

(anche se inconsapevolmente, visto che conosciamo l'esistenza dei microbi solo da poco più di cent'anni, grazie agli studi di Pasteur) senza aver creato problemi, come ad esempio i batteri lattici presenti nei lattici fermentati e nei formaggi. Poi deve essere verificato che la letteratura scientifica non riporti presenza di problemi, in particolare in ambito clinico, e se sono già in uso delle applicazioni industriali per microrganismi di quella specie. Tutte queste formazioni costituiscono il "corpo di conoscenza", che viene analizzato per conferire lo status QPS (la lista aggiornata delle specie QPS è consultabile al link <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps>). Qualora la specie non abbia lo status di QPS, il microrganismo dovrà essere sperimentalmente sottoposto a tutti i test per verificarne la sicurezza, *in vitro* prima e poi *in vivo*.

#### I BATTERI LATTICI

La categoria microbica che attualmente contiene la quasi totalità dei batteri probiotici disponibili sul mercato, è quella dei batteri lattici. Si tratta di un

gruppo abbastanza eterogeneo di batteri che possiedono alcune caratteristiche comuni: sono Gram positivi, non sono in grado di formare endospore, sono microrganismi anaerobi, che non utilizzano ossigeno per il loro sviluppo. Il termine “lattici”, non fa riferimento al latte, anche se molti di essi sono presenti in questo alimento, ma è legato alla caratteristica, comune a tutti questi batteri, di produrre acido lattico attraverso la fermentazione degli zuccheri, in particolare del glucosio. Oltre che nel latte possono essere trovati infatti nell'intestino umano e degli animali, sui vegetali e su vari materiali organici in decomposizione. Da qui possono essere trasportati e quindi ritrovati nelle acque, nel suolo e sulle superfici dei vegetali. Batteri lattici possono anche essere isolati da alimenti fermentati quali formaggi, latti fermentati, carni e bevande. La tabella 2 riporta un elenco dei principali generi di batteri lattici di interesse alimentare, a cui appartengono molti dei probiotici attualmente noti.

Tests	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Pediococcus</i>
Cell morphology	Cocci/round	Rods	Cocci/ovoid	Cocci/chain	Cocci/round	Cocci/round
Gram test	+	+	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-	-	-
Catalase test	-	-	-	-	-	-
CO <sub>2</sub> from glucose	+	+	+	-	+	-
<b>Fermentation of carbohydrate</b>						
Glucose	-	+	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	±	±	±	±	+
Sucrose	+	+	±	±	-	+
Melibiose	±	±	-	-	-	-
Raffinose	+	-	-	-	-	±
Sorbitol	-	+	±	-	-	±
<b>Growth at (T°)</b>						
10 °C	-	-	-	-	±	-
15 °C	+	+	+	-	+	+
45 °C	±	±	-	±	±	±
<b>Growth at (%NaCl)</b>						
2%	+	-	+	+	±	+
4%	+	±	-	+	+	+
6.5%	±	-	-	-	-	-

+ = Positive, - = negative, ± = varies between isolates

Tab. 2 *Principali generi di batteri lattici di interesse alimentare e alcuni caratteri distintivi rilevanti (Wassie e Wassie, 2016)*

#### PRINCIPALI CARATTERISTICHE DEI PROBIOTICI

La prima caratteristica che deve essere posseduta da un probiotico è la capacità di resistere allo stress dovuto al transito attraverso il tratto gastrointestinale umano. Proprio per proteggersi da microrganismi potenzialmente dannosi, in-

fatti, l'apparato gastrointestinale è dotato di numerose difese naturali, a partire dagli enzimi presenti nella saliva, alla forte acidità dello stomaco, alla presenza dei sali biliari e di microrganismi competitivi stabilmente residenti nell'intestino. Per poter raggiungere l'intestino, il probiotico deve quindi essere in grado di sopravvivere in numero sufficiente al transito intestinale. Questa proprietà viene normalmente valutata *in vitro*, simulando artificialmente l'ambiente dello stomaco e dell'intestino. La figura 2 mostra i risultati relativi alla perdita di vitalità di 10 ceppi probiotici a seguito dell'incubazione di un'ora in succo gastrico, seguita da 3 o 5 ore in succo enterico. Si osserva che i microrganismi hanno buona capacità di resistenza, in quanto la perdita di vitalità risulta contenuta, al di sotto di 1,5 logaritmi. I primi nove ceppi sono dei nuovi isolati, mentre l'ultimo è il noto *Lactobacillus rhamnosus* GG, da tempo presente in commercio, che evidenzia una perdita di vitalità notevolmente maggiore, specie per incubazioni prolungate. Questo risultato suggerisce come ci sia ancora molto spazio per ricercare nuovi microrganismi probiotici, dotati di migliori caratteristiche rispetto a quelli che si trovano attualmente in commercio.

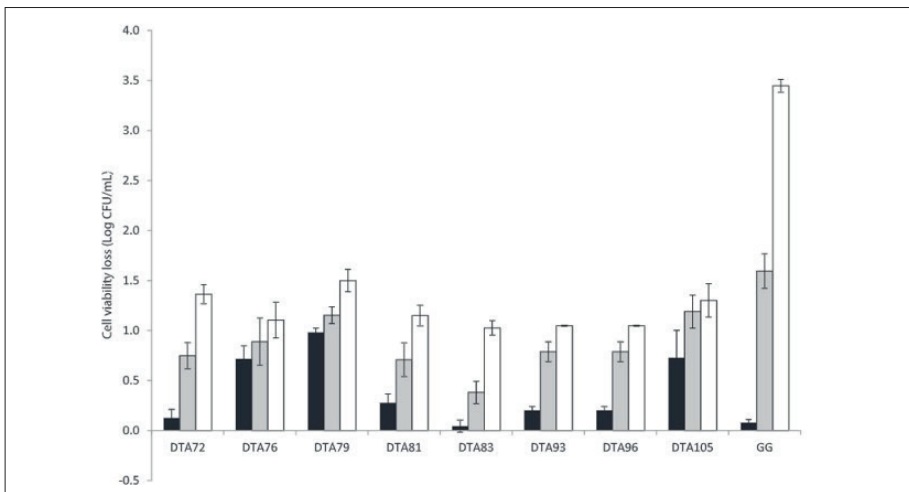


Fig. 2. Perdita di vitalità di ceppi di *Lactobacillus* sottoposti a transito in condizioni gastrointestinali simulate. Nero: dopo un'ora di incubazione in succo gastrico; grigio: dopo un'ulteriore incubazione di 3 ore in succo intestinale; bianco: dopo ulteriori 2 (totale 5) ore di incubazione in succo intestinale (Tarrach et al., 2019)

Successivamente a questa fondamentale proprietà devono essere testate le potenzialità probiotiche del ceppo. La tabella 3 elenca alcune delle principali caratteristiche che vengono ricercate nei potenziali batteri probiotici.

- Resistenza alle condizioni del tratto gastrointestinale
- Test di sensibilità agli antibiotici (assenza di antibiotico-resistenza trasmissibile, ...)
- Attività benefiche (es: riduzione del colesterolo, produzione di GABA, ...)
- Produzione di sostanze benefiche (es: folati, vitamine)
- Attività antimicrobica contro batteri patogeni
- Adesione a cellule tumorali
- Attività citotossica contro cellule tumorali
- Assenza di citotossicità verso cellule umane
- ...

Tab. 3 *Elenco delle principali attività riscontrabili nei microrganismi probiotici*

Tra queste spicca la necessità di verificare l'assenza di geni per antibiotico-resistenza che siano trasmissibili (cioè collocati su molecole di DNA mobili, come plasmidi o trasposoni). Tra le attività maggiormente studiate nei probiotici, molto interessante risulta la capacità di bloccare lo sviluppo di cellule tumorali, valutando la capacità di adesione e la capacità citotossica, parallelamente all'assenza di tossicità verso le cellule umane sane. Questi test vengono condotti in vitro mediante l'uso di colture cellulari, ma su questo tema si ritrova in letteratura anche un crescente numero di studi su animali (Duarte et al., 2020).

Per ovviare alla debolezza di un ceppo nei confronti del transito gastrointestinale, si può ricorrere ad approcci tecnologici, tra cui l'incapsulazione dei microrganismi all'interno di matrici inerti. La figura 3 mostra l'incremento di vitalità a seguito dell'uso di diversi materiali. A partire da sodio alginato, un materiale da tempo usato per questo scopo, si è aggiunta inulina (un polimero del fruttosio presente in molti vegetali), oppure gelatina, oppure fucosil-lat-tato, un'oligosaccaride presente nel latte umano. Come si vede dal grafico, rispetto al ceppo TH982 non protetto, i vari metodi di incapsulazione consentono un incremento di vitalità quando sottoposti a transito gastrointestinale simulato, che nel caso di S+I e di S+F raggiunge valori decisamente rilevanti.

#### EFFICACIA DEI PROBIOTICI

La domanda fondamentale riguardo i ceppi probiotici è se questi attuino nell'ambiente intestinale le attività che dimostrano in laboratorio. La risposta non è facile. Anche se tutte le proprietà probiotiche vengono accuratamente testate, scientificamente misurate e i risultati pubblicati su riviste scientifiche specializzate, il problema nasce dal fatto che in laboratorio la valutazione viene fatta in maniera molto mirata, studiando un determinato microrganismo per una specifica funzione. Ad esempio, la capacità di contrastare un batterio patogeno viene verificata

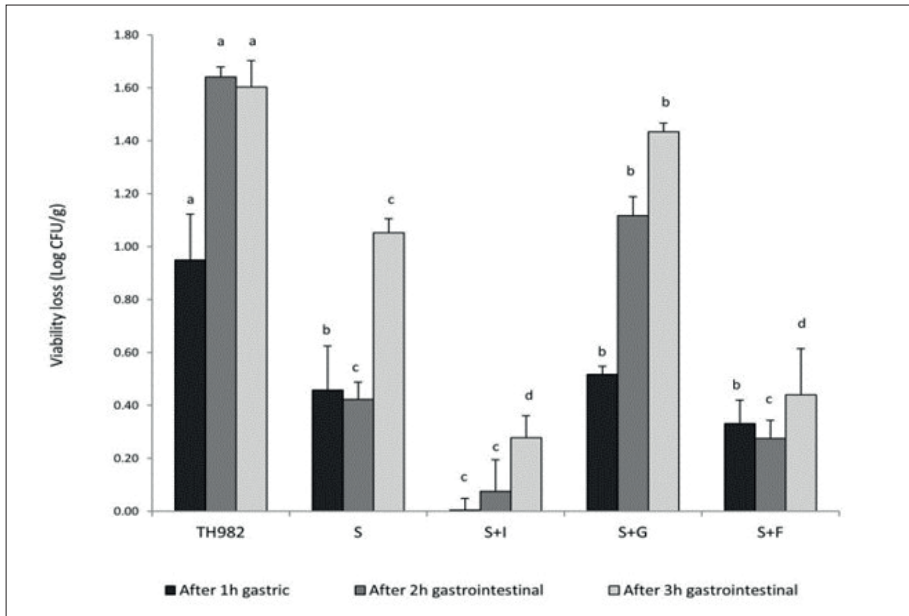


Fig. 3 Livelli di sopravvivenza di cellule del batterio probiotico *Streptococcus thermophilus* TH982 durante l'esposizione a condizioni simulate di transito gastrointestinale, incapsulato con diversi materiali: S: sodio alginato; S+I: sodio alginato + inulina; S+G: sodio alginato + gelatina; S+F: sodio alginato + fucosil-lattato (Pakroo et al., 2021)

coltivando assieme probiotico e patogeno e misurando gli effetti in termini di mortalità del patogeno. Oppure, la capacità di degradare il colesterolo viene valutata in un substrato nel quale viene aggiunto del colesterolo e misurando la quantità che il microorganismo riesce a eliminare. Quando si passa all'interno dell'intestino umano, il quadro si arricchisce di un numero incredibilmente elevato di altri fattori, che costituiscono altrettante variabili da valutare scientificamente. In particolare, queste sono legate alla genetica di ciascun individuo e alla composizione di quella che una volta veniva denominata la flora intestinale, che oggi viene definita microbiota. Attualmente è noto che il numero di microrganismi, prevalentemente batteri, che abitano sulla superficie e all'interno del corpo di una persona sana è di circa 30.000 miliardi, pari circa al numero di cellule umane che costituiscono il corpo stesso. La maggior parte di queste cellule batteriche si trova nel microbiota intestinale, che risulta enormemente diverso da individuo a individuo. Arrivare quindi a definire nel dettaglio le interazioni possibili tra il probiotico e l'enorme biodiversità presente nell'intestino di ogni persona è operazione praticamente irrealizzabile. Per tale ragione risulta molto difficile oggi de-

terminare scientificamente un rapporto di causa effetto *in vivo* di quello che invece è chiaramente determinabile *in vitro* (Scourboutakos et al., 2017). Quindi, non potendo avere dei dati scientifici, in Italia la legge non consente di scrivere sulle confezioni di probiotici indicazioni specifiche quali “abbassa il colesterolo” o “uccide il patogeno XYZ”. È possibile indicare genericamente che “Favorisce l'equilibrio della flora intestinale”. Ciò non significa che il microbo non svolga quella determinata azione, ma siccome non si può quantificarne l'effettiva entità nel complicatissimo habitat intestinale, si può solo esprimere un giudizio di tipo qualitativo, quale quello di favorire l'equilibrio della flora intestinale.

#### NON SOLO PROBIOTICI

Accanto ai probiotici, da circa trent'anni si è andata sviluppando anche la categoria dei prebiotici. Anche se i nomi sono molto simili, si tratta in realtà di concetti molto diversi. I prebiotici, infatti, a differenza dei probiotici, non sono organismi viventi, ma fibre, e più precisamente polisaccaridi che hanno la caratteristica di non essere digeribili dall'organismo umano. Queste molecole attraversano infatti l'intestino tenue e arrivano nel colon, dove sono invece selettivamente utilizzate da alcune specie batteriche che risiedono stabilmente in questa parte dell'apparato digerente. I prebiotici vengono preferibilmente utilizzati da batteri benefici e in particolare dai bifidobatteri. L'ingestione di prebiotici ha infatti dimostrato di essere in grado di incrementare lo sviluppo di questa categoria di batteri nell'ultima parte dell'intestino. Nella tabella 4 è riportata una lista dei principali alimenti contenenti molecole prebiotiche.

ALIMENTO	PRINCIPALE PREBIOTICO PRESENTE
Radice di cicoria	Inulina (polimero del fruttosio)
Topinambur	Inulina
Aglio	Frutto-oligosaccaridi (FOS)
Cipolle	Frutto-oligosaccaridi (FOS)
Asparagi	Inulina
Banane	Inulina, amido resistente
Orzo	Beta-glucani
Avena	Beta-glucani, amido resistente
Semi di lino	Fibre solubili mucillaginose
Carciofi	Inulina
Crusca di frumento	Arabino-xilani oligosaccaridi (AXOS)

Tab. 4 *Alcuni tra i principali alimenti contenenti prebiotici e tipologia di molecole maggiormente presente*

Un prodotto che contenga probiotici e prebiotici viene definito sinbiotico, evidenziando la sinergia che si genera tra il microbo e la fibra (sarebbe errato invece denominarlo simbiotico, termine che descrive una relazione tra due esseri viventi). Un sinbiotico non è dato dal semplice mescolamento di un batterio probiotico con una fibra indigeribile, ma deve essere dimostrato che la molecola prebiotica favorisce lo sviluppo di quello specifico probiotico all'interno dell'intestino (Penka e Kaloyan, 2017).

Ulteriori più recenti sviluppi delle ricerche hanno portato alla definizione dei postbiotici. Si tratta di prodotti che contengono microrganismi probiotici che sono stati però inattivati. Questi prodotti possono essere costituiti dalle cellule del probiotico inattivate, o dalle cellule morte unitamente alle molecole che queste hanno prodotto durante il loro sviluppo. L'uccisione delle cellule rende il prodotto più stabile durante la conservazione (può essere mantenuto a temperatura ambiente anziché refrigerato), ma le cellule anche se morte conservano alcune importanti proprietà, tra le quali la stimolazione della risposta immunitaria ed effetti sulla permeabilità dell'epitelio intestinale. Un postbiotico recentemente immesso in commercio è costituito da cellule pastorizzate di *Akkermansia muciniphila*, uno dei batteri più studiati del microbiota intestinale, la cui presenza si è dimostrata maggiore in persone in buono stato di salute.

Gli studi più recenti sui microrganismi potenzialmente benefici per l'organismo umano stanno portando alla luce relazioni impensabili fino a pochi anni fa. Un esempio tra i più eclatanti è il *Gut-Brain axis*, l'asse intestino-cervello, cioè la comunicazione bidirezionale esistente fra microbiota intestinale e sistema nervoso centrale (Carabotti et al., 2015). È stato rilevato come alterazioni del microbiota intestinale (disbiosi) possano influenzare alcuni comportamenti, quali l'umore o lo stato di depressione su animali di laboratorio. La cosa potrebbe sorprendere, ma in realtà esistono dei farmaci che agiscono sugli stati di depressione o di ansia. Non c'è quindi da stupirsi se tali molecole, invece che essere ingerite sotto forma di pillole, possano essere direttamente prodotte da microrganismi che si trovano nell'intestino.

#### RIASSUNTO

I batteri lattici costituiscono un'ampia categoria di microrganismi piuttosto diffusi sul nostro pianeta. Essendo individui esigenti dal punto di vista metabolico, si ritrovano con facilità in ambienti ricchi di sostanze nutritive. Tra questi, l'intestino animale e umano rappresentano degli ottimi habitat in cui questi microrganismi sono ben presenti e partecipano in modo significativo ai processi metabolici. Con il termine probiotici (dal greco

*pro bios*, a favore della vita) si intendono microrganismi «che si dimostrano in grado, una volta ingeriti in adeguate quantità, di esercitare funzioni benefiche per l'organismo». Negli ultimi anni si è assistito a un crescente interesse sia scientifico che commerciale verso questi microrganismi, prevalentemente appartenenti alla categoria dei batteri lattici. Ciò ha portato all'isolamento, identificazione e caratterizzazione di un buon numero di ceppi potenzialmente probiotici che hanno dimostrato possedere interessanti attività benefiche in vitro. Il mantenimento di tali attività anche in vivo, su animali di laboratorio e ancor più sull'uomo, presenta indubbiamente delle difficoltà, legate principalmente al fatto che il probiotico, una volta ingerito, si trova a interagire con il microbiota intestinale, costituito da un'enorme popolazione di alcune migliaia di miliardi di batteri, molto ben adattati allo specifico ambiente. Tale problematica convivenza normalmente influenza il comportamento del probiotico, finendo per interferire anche con lo sviluppo della sua attività benefica.

#### ABSTRACT

*Expectations from and limitations of the lactic, probiotic ferments.* Lactic acid bacteria represent a large group of microorganisms quite widespread on our planet. Being metabolically demanding, they can be easily found in nutrient-rich environments. Among these, animal and human intestines represent excellent habitats where these microorganisms are present and participate significantly to metabolic processes. The term probiotics (from the Greek *pro bios*, in favor of life) refers to microorganisms «which prove capable, once ingested in adequate amounts, of exercising beneficial functions for the organism». In the recent years there has been an upsurge of scientific and commercial interest on these microorganisms, which mainly belong to the lactic acid bacteria group. This has led to the isolation, identification, and characterization of a number of potentially probiotic strains showing interesting beneficial activities in vitro. The maintenance of these activities also in vivo, in laboratory animals and humans, undoubtedly presents some difficulties, mainly linked to the fact that the probiotic, once ingested, must interact with the intestinal microbiota, consisting of a huge population of several trillions of bacteria, very well adapted to that specific environment. This problematic coexistence normally influences the behavior of the probiotic microbe, eventually interfering with the development of its beneficial activity.

#### BIBLIOGRAFIA

- CARABOTTI M., SCIROCCO A., MASELLI M. A., SEVERIA C. (2015): *The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems*, «Annals of Gastroenterology», 28 (2), pp. 203-209.
- DUARTE V., CRUZ B. C.S., TARRAH A., DIAS R.S., MOREIRA L.P.D., LEMOS JUNIOR W.J.F., SILVA L.C.F., SANTANA G.R., DE OLIVEIRA L.L., PELUZIO M.D.C.G., MANTOVANI H.C., CORICH V., GIACOMINI A., OLIVEIRA P.S. (2020): *Chemoprevention of DMH-induced early colon carcinogenesis in male balb/c mice by administration of Lactobacillus*

- paracasei *DTA81*, «Microorganisms», 8 (12), pp. 1-22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121994>
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002): *Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*, Food and Agricultural Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>
- HYEMIN K., YULAH J., JI-EUN K., YONG GYONG K., NAM-SOO P., CHANG-HO K. (2021): *Anti-obesity potential of Lactobacillus spp. isolated from infant faeces*, «Biotechnology and Bioprocess Engineering», 26 (4), pp. 575-585. <https://doi.org/10.1007/s12257-020-0309-x>
- LILLY D.M., STILWELL R.H. (1965): *Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms*, «Science», 147, pp. 747-748. <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>
- PAKROO S., GHION G., TARRAH A., GIACOMINI A., CORICH V. (2021): *Effects of 2-fucosyllactose-based encapsulation on probiotic properties in Streptococcus thermophilus*, «Applied Sciences», 11, 5761. <https://doi.org/10.3390/app11135761>
- PENKA P., KALOYAN P. (2017): Chapter 7. *Prebiotic-Probiotic Relationship: The Genetic Fundamentals of Polysaccharides Conversion by Bifidobacterium and Lactobacillus Genera*, in *Handbook of Food Bioengineering*, Editor(s): A.M. Grumezescu, A.M. Holban, Academic Press, pp. 237-278, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811413-1.00007-3>
- SCOURBOUTAKOS M.J., FRANCO-ARELLANO B., MURPHY S.A., NORSEN S., COMELLI E.M., L'ABBÉ M.R. (2017): *Mismatch between probiotic benefits in trials versus food products*, «Nutrients», 9 (4), p. 400. <https://doi.org/10.3390/nu9040400>
- TARRAH A., DA SILVA DUARTE V., DE CASTILHOS J., PAKROO S., LEMOS JUNIOR W.J.F., LUCHESE R.H., FIORAVANTE GUERRA A., ROSSI R.C., RIGHETTO ZIEGLER D., CORICH V., GIACOMINI A. (2019): *Probiotic potential and biofilm inhibitory activity of Lactobacillus casei group strains isolated from infant feces*, «Journal of Functional Foods», 54, pp. 489-497. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.004>
- WASSIE M., WASSIE T. (2016): *Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk*, «International Journal of Advanced Research in Biological Sciences», 3 (8), pp. 44-49. <https://ijarbs.com/pdfcopy/aug2016/ijarbs8.pdf>