



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département Microbiologie
Laboratoire de recherche de rattachement : Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA)

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie **Filière** : Biotechnologie
Spécialité : Biotechnologie Alimentaire

Présentée par
OUARABI Lylia

Thème

Isolement et caractérisation de souches de *Lactiplantibacillus* à partir de fruits locaux à effet probiotique et productrices d'exopolysaccharides

Soutenue le :

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mr KECHA Mouloud

Professeur

Univ. de Béjaïa

Président

Mme HAMMA-FARADJI Samia

Professeur

Univ. de Béjaïa

Rapporteur

Mr DRIDER Djamel

Professeur

Univ. de Lille, France

Co-rapporteur

Mme OUKIL Naima

Professeur

Univ. de Béjaïa

Examinatrice

Mme SIFOUR Houria

Professeur

Univ. de Jijel

Examinatrice

Année Universitaire : 2024-2025

Je dédie ce travail de thèse à mes parents,

Il est difficile de trouver les mots justes pour vous exprimer toute ma reconnaissance. Vous êtes le fondement de tout ce que je suis. Votre amour, vos sacrifices silencieux, votre force dans les moments durs, et votre foi en moi, même quand je doutais, m'ont portée jusqu'ici. Si j'ai pu avancer, c'est parce que vous étiez là, toujours. Vous êtes mes repères, mes piliers, les racines solides de tout ce que j'ai pu construire. Ce travail, c'est aussi le vôtre.

A mes sœurs, Lydia et Liza, mes « matatit »

Merci d'avoir été là dans chaque étape de ma vie. Votre présence, vos conseils, votre écoute et votre amour sont ce que j'ai de plus précieux. Vous m'avez toujours entourée d'une affection qui ne demande rien, mais donne tout.

A mes neveux, Anya et Aylane

Merci pour vos sourires, vos rires, votre douceur. Vous avez illuminé mes journées les plus chargées sans même vous en rendre compte.

A ma tante Lamia et ma cousine Melissa « zamoumi »

Merci pour toutes nos histoires, nos pique-niques, nos fous rires. Merci surtout d'avoir été des personnes sur qui je pouvais réellement compter, sans condition.

A mes amis

Woody : merci d'avoir été là depuis le tout début. Pour tes conseils toujours justes, ta sagesse, ta constance. Ta présence m'a rassurée et portée bien plus que tu ne le crois.

Athenna : Pour nos longues conversations, nos aventures à Lille, nos randonnées et nos vocaux de trois heures... Merci d'avoir été une amie vraie, entière, sur qui j'ai toujours pu compter.

Menad : Merci pour tes encouragements, ton soutien, tes conseils et pour m'avoir toujours écoutée, même quand je me plaignais de tout et de rien. Ta patience et ta disponibilité m'ont souvent permis d'avancer.

Adib : Pour avoir supporté mes crises de panique, parfois imprévisibles, souvent dramatiques. Merci d'avoir été là pour “sauver” tous mes comptes (et un peu moi aussi). Ton humour et ta patience ont été essentiels.

Merci

Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné la force, la volonté et d'avoir mis sur mon chemin toutes les personnes qui ont contribué à la concrétisation de ce travail.

Avant toute chose, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à ma directrice de thèse, **Pr HAMMA-FARADJI Samia**, pour sa confiance, son encadrement rigoureux, sa disponibilité constante et ses conseils avisés tout au long de cette recherche. Son accompagnement a été fondamental pour la réussite de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères vont également à mon co-directeur de thèse, **Pr Djamel Drider**, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser une partie de mes travaux en France. Au-delà de son rôle scientifique, il a su se montrer d'un soutien humain et moral remarquable, comme un membre de ma propre famille durant mon séjour à Lille. Sa bienveillance, son attention et son implication ont été inestimables.

Je remercie chaleureusement **Dr BELGUESMIA Yanath**, du Laboratoire Régional de l'Institut Charles Viollette (Université de Lille), pour son aide précieuse, sa disponibilité et son expertise, qui ont grandement contribué à l'avancement de mes travaux.

Je tiens aussi à adresser mes vifs remerciements à toute l'équipe du Laboratoire de Biotechnologies Microbienne et Enzymatique et de Biomolécules (LBMEB), du Centre de Biotechnologie de Sfax, pour leur accueil et leur soutien. Une mention particulière à **Pr BEN SALAH Riadh** et **Dr TRABELSI Imene** pour leur encadrement attentif et leur aide précieuse durant mon séjour à Sfax.

Je remercie l'ensemble des membres du jury : **Pr KECHA Mouloud** (U. Bejaia), pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury ; **Pr SIFOUR Houria** (U. Jijel), ainsi que **Pr OUKIL Naima** (U. Bejaia) pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de nous faire part de leurs précieuses remarques.

Un grand merci à **Dr BARACHE Nacim**, qui a été bien plus qu'un collègue : un véritable grand frère, toujours présent, depuis mes premiers pas dans ce parcours, prêt à m'aider et à me conseiller à chaque étape. Je n'oublie pas **ZIDI Ghania**, pour toutes les expériences partagées, nos pauses déjeuner pleines de rires, nos weekends passés au laboratoire et surtout pour tes conseils toujours judicieux. Merci pour ta présence fidèle au laboratoire, tu as été un véritable pilier sur qui je pouvais compter.

À ma sœur, **Dr OUARABI Liza**, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance pour son aide plus que précieuse. Ton soutien, ta patience, ton écoute et ton expertise ont été indispensables. Tu as été une inspiration constante, et je te remercie du fond du cœur d'avoir été à mes côtés.

Ma sincère reconnaissance est exprimée envers les membres du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), qu'ils soient enseignants, ingénieurs ou doctorants, pour leur précieuse aide et pour l'atmosphère de travail conviviale que nous avons partagée. Je tiens également à exprimer mes remerciements au **Pr KECHA Mouloud**, Directeur de laboratoire LMA, pour avoir créé les conditions dans lesquelles j'ai mené à bien ce travail.

Enfin, je souhaite remercier tous les enseignants de l'Université de Bejaia qui ont contribué à ma formation tout au long de mes trois cycles universitaires. Leur dévouement et leur enseignement m'ont permis de franchir chaque étape de ce parcours académique.

BL : Bactérie Lactique
GRAS : Generally Recognized As Safe
QPS : Qualified Presumption of Safety
EPS : Exopolysaccharide
ERO : Espèce Réactive d'Oxygene
ISAPP : Association Scientifique Internationale pour les Probiotiques et les Prébiotique
NCBI : National Center for Biotechnology Information
EFSA : European Food Safety Authority
UFC : Unité Formant Colonie
FAO : Food and Agriculture Organization
WHO : World Health Organization
DAA : Diarrhée Associée aux Antibiotiques
MII : Maladies Inflammatoires de l'Intestin
SII : Syndrome du Côlon irritable
MCV : Maladies Cardiovasculaires
BSH : Bile Salt Hydrolase
HoPS : Homopolysaccharide
HePS : Hétéropolysaccharide
GH : Glycosyl Hydrolase
GS : Glucansucrase
FS : Fructanscurase
GT : Glycotransférase
SOD : Superoxyde Dismutase
CAT : Catalase
AGCC : Acide Gras à Chaîne Courte
MRS : Man-Rogosa-Sharpe
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
MATH : Microbial Adhesion To Hydrocarbons
TSB : Trypticase-Soja Broth
SVF : Serum de Veau Fœtal
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
MOI : Multiplicity Of Infection
MH : Mueller-Hinton
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
ABTS : 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
TCA : Trichloroacetic Acid
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
TFA : Trifluoroacetic Acid
FT-IR : Fourier Transform InfraRed Spectroscopy
KBr : Bromure de Potassium
BHT : Butylated Hydroxytoluene
ACP : Analyse en Composantes Principales
F : Figue
FB : Figue de Barbarie
D : Datte
M : Mûre
Dim : Dimension

SOD : Superoxyde Dismutase

NOX : NADH Oxydase

Figure 1. Pourcentage de survie des isolats de bactéries lactiques en conditions acides ou en présence de sels biliaires.....	40
Figure 2. Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ADNr 16S des isolats et des souches standard apparentées, généré par le logiciel MEGA XI	42
Figure 3. Pourcentage d'auto-agrégation après 2 et 4 heures d'incubation.....	43
Figure 4. Pourcentage d'hydrophobicité de la surface cellulaire des souches de <i>L. plantarum</i>	44
Figure 5. Adhésion de <i>L. plantarum</i> à des microplaques de polystyrène à 96 puits	45
Figure 6. Analyse en composantes principales (ACP) basée sur les propriétés probiotiques des souches de <i>L. plantarum</i> sélectionnées, réalisée sur FactoMineR	46
Figure 7. Pourcentage d'adhésion des souches sélectionnées aux cellules Caco-2	48
Figure 8. Effet des souches sélectionnées sur l'activité métabolique des cellules Caco-2	49
Figure 9. Organisation génétique des clusters de gènes de bactériocines dans la souche <i>L. plantarum</i> F13 à l'aide du serveur web BAGEL4, permettant l'identification des contigs hébergeant les gènes des plantaricines E, F, A, N, J et K A. entérocytine A et lacticine F B. entérocytine P C. entérolysine A D. gènes. E. Diagramme de Venn montrant les gènes ou pseudogènes codant pour des protéines communes et uniques dans les génomes des souches <i>L. plantarum</i> D21 (bleu), F8 (vert), F13 (rouge) et FB23 (jaune).....	54
Figure 10. Activités antioxydantes des surnageants de culture et des cellules intactes des souches de <i>L. plantarum</i> déterminées par la méthode du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et des surnageants de culture déterminées par la méthode de l'acide 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS+)).....	57
Figure 11. Aspects des colonies de <i>L. plantarum</i> sur de la MRS supplémentée en saccharose. <i>L. plantarum</i> cultivé sur gélose MRS contenant 5% de saccharose (a) ou 2% de glucose (b) à 37°C après 48h d'incubation.	58
Figure 12. A. Analyse CCM de l'EPS (1) EPS-F8 hydrolysé, (2) glucose, (3) galactose, (4) fructose, (5) arabinose, (6) rhamnose, (7) mannose, (8) xylose, (9) EPS-FB23 hydrolysé. B. Analyse HPLC de l'EPS-F8 hydrolysé par TFA. C. Analyse HPLC de l'EPS-FB23 hydrolysé par TFA. D. Analyse HPLC du glucose	61
Figure.13. A. Spectre FT-IR de l'EPS-F8 B. de l'EPS-FB23 dans la gamme de 400-4000 cm ⁻¹	63
Figure 14. Absorbance de l'EPS-F8 et de l'EPS-FB23 dans la gamme de longueurs d'onde 200-800 nm.....	64
Figure 15. Activité antioxydante des EPS-F8 et EPS-FB23 des souches de <i>L. plantarum</i> détectées par la méthode du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH).....	65
Figure 16. Activité antioxydante des EPS-F8 et EPS-FB23 des souches de <i>L. plantarum</i> détectées par la méthode de 2,2 azino-bis (3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS +))	66
Figure 17. Activité antioxydante des EPS-F8 et EPS-FB23 des souches de <i>L. plantarum</i> détectées par le pouvoir réducteur déterminé à A 700nm	67

Tableau 1. Utilisation des bactériocines dans la conservation des aliments (Mohellebi, 2024).....	16
Tableau 2. Les facteurs influençant la synthèse des exopolysaccharides des bactéries lactiques.....	22
Tableau 3. Signification des scores d'identification obtenus par spectrométrie MALDI-TOF.....	28
Tableau 4. Numéro d'accèsion des souches de <i>L.plantarum</i> isolées des fruits	41
Tableau 5. Diamètre des zones d'inhibition des tests d'activité antibactérienne des souches de <i>L. plantarum</i>	50
Tableau 6. Production d'acide lactique par les souches de <i>L. plantarum</i>	52
Tableau 7. Analyse physicochimique des EPS produits par <i>L. plantarum</i> F8 et FB23... ..	59

INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
Les bactéries lactiques en tant que probiotiques	4
1. Historique et définitions des probiotiques	4
2. Les lactobacilles comme candidats probiotiques : classification, diversité et répartition écologique	4
2.1. Importance de <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> en tant que probiotique	5
3. Critères de sélection d'une souche probiotique	6
3.1. Critères de sécurité	6
3.1.1. Origine de la souche	6
3.1.2. Identification de la souche	6
3.1.3. Non pathogénicité de la souche	7
3.1.4. Présence de gènes de résistance aux antibiotiques	7
3.2. Critères fonctionnels	8
3.2.1. Résistance aux conditions gastriques	8
3.2.2. Résistance aux conditions intestinales	8
3.2.3. Adhésion aux cellules épithéliales	9
3.2.4. Capacité à procurer des effets bénéfiques pour la santé	9
3.3. Critères technologiques	9
4. Les bactéries lactiques d'origine fruitière : une alternative prometteuse aux souches traditionnelles	10
5. Rôle des probiotiques	11
5.1. Bienfaits sur le microbiote intestinal	11
5.2. Activité antioxydante	12
5.3. Effet hypocholestérolémiant	12
5.4. Biopréservation des aliments	13
6. Les principaux postbiotiques produits par les bactéries lactiques	14
6.1. Acides organiques	15
6.2. Bactériocines	16
Les exopolysaccharides des bactéries lactiques	19
1. Structure et classification des exopolysaccharides bactéries lactiques	19
1.1. Homopolysaccharides (HoPS)	20

1.2.Hétéropolysaccharides (HePS).....	20
2.Voies de biosynthèse des EPS des bactéries lactiques	20
2.1.Voie de synthèse extracellulaire.....	21
2.2.Voie dépendante Wzx/Wzy.....	21
3.Facteurs affectant la synthèse des exopolysaccharides des bactéries lactiques	22
4.4.Effets bénéfiques des EPS	23
4.1.Propriété antioxydante.....	23
4.2.Effet prébiotique.....	23
4.3.Activité antimicrobienne	24
MATERIEL ET METHODES.....	26
Isolement et caractérisation de souches probiotiques	26
1.Isolement des souches de bactéries lactiques de fruits.....	26
2.Criblage des isolats sur leur résistance au pH acide et à la bile	26
2.1.Tolérance au pH acide	26
2.2.Tolérance à la bile	27
3.Identification moléculaire des isolats	27
3.1.Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF	27
3.2.Identification par séquençage de l'ADNr 16S	28
4.Caractérisation des propriétés de surface des souches	29
4.1.Auto-agrégation.....	29
4.2.Hydrophobicité de la paroi	29
4.3.Formation de biofilm sur microplaque en polystyrène	30
4.4.Adhésion sur cellules Caco-2	30
5.Etude de l'innocuité des souches	31
5.1.Activité hémolitique	31
5.2.Cytotoxicité sur cellules Caco-2	31
6.Mise en évidence des mécanismes antagonistes des souches	32
6.1.Activité antibactérienne.....	32
6.2.Quantification de l'acide lactique	33
6.3.Séquençage du génome complet et recherche de bactériocines	33
7.Activité antioxydante des souches	34
7.1.Méthode au 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	34
7.2.Méthode au 2,2'-azino-bis-(3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS+).....	34

Potentiel de production d'EPS par <i>L. plantarum</i>	35
1.Criblage de souches de <i>L. plantarum</i> productrices d'EPS	35
2.Production et extraction d'EPS	35
3.Caractérisation physicochimique des EPS	35
4.Etude de la composition en monosaccharides des EPS.....	35
4.1.Chromatographie sur couche mince (CCM)	35
4.2.Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	36
5.Analyse structurale des EPS.....	36
5.1.Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de fourier (FT-IR)	36
5.2.Analyse par spectroscopie ultraviolet-visible (UV-visible)	36
6.Détermination de l'activité antioxydante des EPS	36
6.1.Piégeage du radical DPPH	36
6.2.Piégeage du radical ABTS+	37
6.3.Mesure du pouvoir réducteur	37
Analyse statistique	38
 RESULTATS ET DISCUSSION	 39
Isolement de bactéries lactiques	39
Evaluation du potentiel probiotique	39
1.Screening des bactéries lactiques sur la base de leur résistance au pH acide et à la bile	39
2.Identification moléculaire des bactéries lactiques.....	41
3.Criblage des souches sur la base de leurs propriétés physiologiques et fonctionnelles	43
3.1.Auto-agrégation et hydrophobicité de la surface cellulaire	43
3.2.Formation de biofilm sur des microplaques en polystyrène	45
3.3.Traitement des résultats en composante principale (ACP)	45
3.4.Adhésion sur cellules épithéliales Caco-2.....	48
4.Activité hémolytique et cytotoxicité sur cellules Caco-2.....	49
5.Mise en évidence des mécanismes antagonistes des souches	50
5.1.Activité antibactérienne.....	50
5.2.Quantification de l'acide lactique	52
5.3.Séquençage du génome complet et recherche des bactériocines	53
6.Activité antioxydante des souches	56

Production d'exopolysaccharides	58
1. Production et extraction d'EPS	58
2. Caractérisation physicochimique des EPS	59
3. Composition en monosaccharides des EPS.....	60
4. Analyse structurale des EPS.....	63
5. Activité antioxydante des EPS de <i>L. plantarum</i>	65
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	 69
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXE	

Introduction

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, procurent un bénéfice à la santé de l'hôte **(FAO/OMS, 2002)**. Afin d'être considérée comme probiotique, une souche bactérienne doit répondre à des critères bien établis tels que la tolérance à l'acidité gastrique et aux sels biliaires, la capacité d'adhésion à l'épithélium intestinal, l'auto-agrégation, ainsi que l'innocuité **(Khusro et al., 2021)**. Ces critères sont essentiels pour garantir l'efficacité et la sécurité des souches utilisées dans les applications alimentaires ou thérapeutiques.

Ces souches probiotiques se retrouvent naturellement dans divers aliments fermentés tels que le yaourt, le kéfir, la choucroute et le kimchi, ainsi que sous forme de compléments alimentaires **(Khushboo et al., 2023)**. Traditionnellement, les cultures bactériennes actives proviennent des produits laitiers fermentés, mais des études récentes montrent que les fruits peuvent également constituer une source significative de bactéries lactiques bénéfiques **(Valero-Cases et al., 2020)**. Par rapport aux légumes, les fruits présentent un avantage supplémentaire pour la santé publique, notamment en raison de leur richesse en composés organiques acides qui permettent le maintien d'un pH inférieur à 4,6, favorisant ainsi une sélection naturelle des microorganismes dominants **(Alegbeleye et al., 2022)**. Cette combinaison de nutriments, incluant des glucides, des minéraux et des composés azotés, ainsi qu'un pH acide, crée des conditions idéales pour la croissance des bactéries lactiques **(Naeem et al., 2012)**.

Les bactéries lactiques (BL) sont des microorganismes Gram positif, non sporulés, aérotolérants ou anaérobies facultatifs, largement impliqués dans la fermentation d'aliments. Leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe) et leur présomption de sécurité qualifiée (QPS) en font des candidats privilégiés comme probiotiques dans l'industrie agroalimentaire **(Hazards et al., 2020)**. Outre leur rôle technologique, les BL sont connues pour leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte.

Parmi elles, *Lactiplantibacillus plantarum* se distingue par sa capacité d'adaptation à divers environnements. Cette bactérie est retrouvée dans le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux, mais également dans plusieurs produits alimentaires, qu'il s'agisse de viandes, de poissons, de légumes fermentés ou de produits laitiers **(Mao et al., 2021)**. Son intérêt réside dans sa polyvalence : elle intervient dans la fermentation, la biopréservation alimentaire, capable d'inhiber la croissance des microorganismes d'altération et des pathogènes via la

production de métabolites antimicrobiens et présente de fortes propriétés probiotiques **(Agriopoulou et al., 2020; De Simone et al., 2024)**.

Les effets bénéfiques attribués aux probiotiques incluent la réduction du taux de cholestérol **(Simons et al., 2006)**, le renforcement de l'activité antioxydante **(Ejtahed et al., 2012)**, l'amélioration de la digestion du lactose **(Hertzler et Clancy, 2003)** et des effets immunomodulateurs **(Rousseaux et al., 2023)** ainsi que les activités antimicrobiennes à l'égard des pathogènes **(Mikkili et al., 2018)**.

Un aspect particulièrement intéressant est le potentiel antimicrobien de certaines souches probiotiques, notamment *L. plantarum*. Cette espèce inhibe de nombreux pathogènes par production d'acides organiques, de peroxyde d'hydrogène, et surtout de bactériocines **(Agriopoulou et al., 2020; De Simone et al., 2024)**. Ces substances jouent un rôle important dans la biopréservation des aliments en limitant la croissance de microorganismes d'altération ou pathogènes.

Par ailleurs, *L. plantarum* est également reconnue pour sa capacité à produire des exopolysaccharides (EPS), des polymères de sucres possédant des propriétés fonctionnelles variées. Ces EPS, produits par les bactéries lactiques sous forme de polymères extracellulaires ou attachés à la membrane cellulaire, jouent un rôle clé dans la protection cellulaire contre divers stress environnementaux et biotiques **(Zhang et al., 2024)**. De plus, ils présentent un intérêt majeur pour l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique grâce à leurs propriétés physicochimiques uniques, notamment leur rôle en tant qu'agents épaississants naturels et stabilisants **(Jurášková et al., 2022)**.

Les EPS possèdent également des propriétés bioactives reconnues, telles que des effets immunomodulateurs, antimicrobiens, antitumoraux, hypocholestérolémiants et antioxydants **(Zhang et al., 2023)**. Ces dernières années, leur capacité à lutter contre le stress oxydatif a suscité un intérêt croissant. En effet, les espèces réactives de l'oxygène (ERO), incluant le peroxyde d'hydrogène, les radicaux superoxyde et hydroxyle, sont connues pour causer des maladies chroniques telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et les pathologies neurodégénératives **(Li et al., 2014)**. Dans ce contexte, les EPS produits par les bactéries probiotiques, notamment ceux de *L. plantarum*, sont étudiés pour leur capacité à neutraliser ces radicaux libres en stimulant la production d'enzymes antioxydantes et de glutathion **(Angelin et Kavitha, 2020)**.

Compte tenu du rôle clé des EPS dans la biopréservation des aliments et leur potentiel comme ingrédients fonctionnels, leur exploitation dans le secteur agroalimentaire suscite un intérêt considérable. De plus, les EPS issus de bactéries probiotiques offrent une alternative aux additifs de synthèse, répondant ainsi à la demande croissante des consommateurs pour des aliments plus naturels et sans conservateurs artificiels (**Jurášková et al., 2022**).

Dans ce contexte, notre étude a pour principaux objectifs :

- L'isolement, dans un premier temps, de souches de lactobacilles à partir de fruits cultivés en Algérie.
- La sélection et identification moléculaire des souches répondant aux critères probiotiques.
- La mise en évidence de leurs effets bénéfiques (activités antibactérienne et antioxydante).
- La production et caractérisation d'exopolysaccharides produits par les souches probiotiques sélectionnées.

Synthèse bibliographique

I. Les bactéries lactiques en tant que probiotiques

I.1. Historique et définition des probiotiques

L'histoire des probiotiques remonte aux débuts de la civilisation, lorsque l'homme a commencé à consommer des aliments fermentés. Les premières utilisations documentées datent d'environ 2000 ans avant Jésus-Christ. Tout en ignorant l'existence des probiotiques, les premiers producteurs d'aliments ont transformé le lait en produits laitiers fermentés à l'aide de bactéries et de levures (**Gogineni, 2013**). Le concept des probiotiques en médecine remonte au début des années 1900, lorsque un chercheur scientifique russe du nom d'Elie Metchnikoff a émis la théorie que les bonnes bactéries retrouvées dans le yaourt avaient le pouvoir d'améliorer le microbiome intestinal (**Mahalak et al., 2022**).

Au fil des années, le terme « probiotique » venant du grec qui signifie « pour la vie », a bénéficié de plusieurs définitions. En 1965, **Lilly et Stillwell** propose la définition suivante « substances produites par des microorganismes qui stimulent la croissance d'autres microorganismes ». Plus tard, c'est au tour de **Parker (1974)** de redéfinir le terme comme suit « organismes et substances qui contribuent à l'équilibre de la microflore intestinale ». Ensuite, **Fuller** en **1989** inaugure l'ère moderne des probiotiques avec une rectification de la définition, soulignant la viabilité des microorganismes. Ainsi un probiotique est défini ainsi « un complément alimentaire microbien vivant qui affecte de manière bénéfique l'animal hôte en améliorant son équilibre intestinal ». D'autre part, en **1998**, **Guarner et Schaafsma** ont déclaré qu'il est nécessaire d'utiliser la dose appropriée de souches probiotiques pour obtenir un effet bénéfique.

Aujourd'hui, la définition scientifique la plus largement acceptée des probiotiques est celle formulée en 2002 par la FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture) et l'OMS (Organisation mondiale de la santé), est la suivante : « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte » (**FAO/OMS 2002**). La consultation d'experts FAO/OMS a conclu que les propriétés et les bienfaits potentiels des probiotiques dépendent du dosage utilisé et ne peuvent pas être extrapolés d'une souche microbienne à une autre, même si elles font partie de la même espèce (**Britton et al., 2021**). Enfin en 2013, l'Association scientifique internationale pour les probiotiques et les prébiotiques (ISAPP) a soutenu la même définition (**Hill et al., 2014**).

I.2. Les lactobacilles comme candidats probiotiques : classification, diversité et répartition écologique

Les bactéries lactiques ont été classées en fonction de leur morphologie cellulaire, leur mode de fermentation du glucose, leur capacité à utiliser les sucres et de leur température de croissance **(Mokoena, 2017)**. Les bactéries lactiques appartiennent, dans la taxonomie actuelle, tel que décrit dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, à l'embranchement des *Firmicutes*, à la classe des *Bacillus*, à l'ordre des *Lactobacillaceae*, ainsi qu'aux familles des *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* et *Streptococcaceae* **(Coelho et al., 2022)**.

La famille des *Lactobacillaceae* comprend les genres *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus* et *Pediococcus*, la famille des *Leuconostocaceae* comprend les genres *Leuconostoc*, *Weissella*, *Fructobacillus* et *Oenococcus*, et la famille des *Streptococcaceae* comprend les genres *Lactococcus*, *Streptococcus* et *Lactovum* **(Mattarelli et al., 2014)**.

Les lactobacilles désignent tous organismes classés dans la catégorie des *Lactobacillaceae*. Ce sont des bactéries à Gram positif, non sporulées, bacilles ou coccobacilles, aérotolérantes ou anaérobies **(Coelho et al., 2022)**. La plupart des souches sont mésophiles. Les membres du genre *Lactobacillus* bénéficient le plus souvent du statut GRAS **(Salminen et al., 1998)**. Au total, 261 espèces différentes appartenant au genre *Lactobacillus*, avec un degré de diversité relativement élevé **(Coelho et al., 2022)**, ont été signalées en mars 2020 **(Zheng et al., 2020)**. Une reclassification du genre *Lactobacillus* en 25 genres, dont 23 nouveaux, a été proposée sur la base de la phylogénie du génome, des séquences du génome entier et des propriétés écologiques et métaboliques des bactéries **(Zheng et al., 2020)**. Parmi les genres nouvellement proposés, on peut citer : *Lapidilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus* et *Lentilactobacillus*. Les lactobacilles sont des bactéries ubiquitaires se trouvant dans divers habitats tels que les aliments, les plantes ainsi que dans les voies orales et gastro-intestinales des humains et des animaux **(Nicolescu et al., 2023)**.

I.2.1. Importance de *Lactiplantibacillus plantarum* en tant que probiotique

Lactiplantibacillus plantarum (*L. plantarum*) initialement *Lactobacillus plantarum*, est une des souches appartenant aux bactéries lactiques **(Zheng et al., 2020)**. *L. plantarum* possède une grande capacité d'adaptation écologique et métabolique. Cette souche existe dans de nombreux habitats comme les produits laitiers, la viande le poisson ou encore les fruits **(Filannino et al., 2018)**. *L. plantarum* a été largement utilisée comme starter en améliorant la saveur, la texture et les propriétés organoleptiques des aliments fermentés **(Cui et al., 2020)**. Elle leur apporte notamment des propriétés fonctionnelles en produisant des composants bioactifs, des exopolysaccharides et de la vitamine B12 **(Zhou et al., 2019; Cui et al., 2020; Thompson et**

al., 2020). De plus, sa capacité à produire des métabolites antimicrobiens comme les bactériocines et les acides organiques fait de *L. plantarum* un excellent agent de conservation (Wang et *al.*, 2015; Ait Seddik et *al.*, 2017).

I.3. Critères de sélection d'une souche probiotique

Pour considérer une souche comme étant probiotique, il faut qu'elle réponde à certains critères afin d'atteindre leur site d'action et exercer son effet bénéfique tout en étant inoffensive pour l'hôte (Shewale et *al.*, 2014).

I.3.1. Critères de sécurité

Les critères de sécurité servent à sélectionner des microorganismes exempts de facteurs de pathogénicité ou toxicité et de vecteurs qui permettent la transmission de gènes de résistance aux antibiotiques (Iqbal et *al.*, 2021).

I.3.1.1. Origine de la souche

Certains auteurs soulèvent l'importance de l'origine humaine d'une souche probiotique. En effet, la plupart des probiotiques retrouvés dans le marché aujourd'hui sont d'origine humaine afin d'augmenter le taux de compatibilité avec le tractus gastro-intestinal humain. Cependant une large gamme de nouvelles sources d'isolement est exploitée afin d'isoler de nouvelles souches probiotiques (ex : fruits, légumes fermentés, charcuterie) (de Melo Pereira et *al.*, 2018; Iqbal et *al.*, 2021).

I.3.1.2. Identification de la souche

L'élément clé d'une caractérisation correcte des probiotiques est l'identification et la dénomination correctes des souches. Les souches probiotiques doivent être nommées conformément à la nomenclature bactérienne actuellement en vigueur, basée sur le Code international de nomenclature (Oren et *al.*, 2023). En général, cette identification est réalisée le plus tôt possible lors du processus de sélection d'un probiotique (Yadav et *al.*, 2017).

L'identification des microorganismes probiotiques consiste à déterminer si une souche appartient à un genre et à une espèce établis et nommés, ainsi qu'à des sous-espèces pour les espèces pour lesquelles des sous-espèces ont été décrites. Plusieurs méthodes moléculaires sont largement applicables afin d'assurer une identification correcte. Le séquençage de l'ADN ribosomique 16S est un moyen bien connu et fiable d'identifier les espèces, à condition d'utiliser des séquences de référence fiables. La séquence obtenue doit être comparée et validée par une grande base de données de référence (Binda et *al.*, 2020). Cependant, le « gold-standard » pour l'identification d'un probiotique est le séquençage de son génome complet. Ceci permet l'identification au niveau de la souche, ce qui est essentiel pour son suivi lors de la production et pour l'investigation de l'étiologie d'infections suspectées. Des bases de données de référence

sont disponibles afin de déposer les séquences génomiques telles que NCBI (National Center for Biotechnology Information). De plus, de séquençage permet de détecter les gènes préoccupants comme ceux liés à la pathogénicité ou à la résistance aux antibiotiques **(Cohen, 2018; Freedman et al., 2020; Poindexter et Committee on fetus and newborn, 2021)**.

I.3.1.3. Non pathogénicité de la souche

La non pathogénicité d'un microorganisme est considérée comme l'un des critères les plus important à prendre en compte lors de la sélection d'un probiotique. La plupart des souches de bactéries lactiques sont considérées comme sûres pour une utilisation dans les aliments ou compléments alimentaires. Ceci est dû à leur historique de non pathogénicité qui reste la meilleure preuve de leur innocuité **(Bourdichon et al., 2018)**. En effet, le statut GRAS (Generally Recognized as Safe) a été attribué à ces microorganismes de plus, l'EFSA (European Food Safety Authority) a accordé à un certains nombres de lactobacilles le statut QPS (Qualified Presumptions of Safety) **(EFSA, 2007)**. Toutefois, sous certaines circonstances, des métabolites nuisibles comme les amines biogènes et les toxines (comme l'hémolysine), susceptibles de provoquer des désagréments ou des maladies, peuvent être générés par certaines variétés de lactobacilles ou de bifidobactéries. Il est donc conseillé de surveiller ces processus métaboliques **(Sanders et al., 2010)**.

I.3.1.4. Présence de gènes de résistance aux antibiotiques

L'évaluation de la résistance aux antibiotiques chez les probiotiques repose sur plusieurs critères, notamment la présence de gènes facilitant leur transfert horizontal, leur capacité à être fonctionnels après transmission, ainsi que la distinction entre résistance intrinsèque et acquise. Une attention particulière est portée sur la prévalence du phénotype de résistance et son impact sur l'antibiorésistance globale, ainsi que sur l'importance clinique des antibiotiques concernés **(Merenstein et al., 2023)**. Le principal risque réside dans le transfert potentiel de gènes de résistance via des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, transposons, intégrons et bactériophages, ce qui pourrait accélérer l'émergence de bactéries pathogènes multi-résistantes **(de Melo Pereira et al., 2018)**. Toutefois, la résistance intrinsèque, due à des mutations chromosomiques, ne constitue pas un risque majeur puisqu'elle n'est transmise qu'à la descendance directe de l'organisme. Certaines souches résistantes peuvent même être utilisées après un traitement antibiotique afin de restaurer le microbiote intestinal **(Hammad et Shimamoto, 2010; Gueimonde et al., 2013)**.

I.3.2. Critères fonctionnels

I.3.2.1 Résistance aux conditions gastriques

Les souches probiotiques doivent être capables de survivre dans le tractus gastro-intestinal. La survie des probiotiques ingérés varie en fonction de la souche (**Shewale et al., 2014**). Le suc gastrique, produit en quantité de 1,5 à 2,0 litres par jour, contient plusieurs composants essentiels, dont l'eau, l'acide chlorhydrique, les électrolytes, le mucus et des enzymes digestives comme la lipase et le pepsinogène. Lors de la digestion, ces sécrétions se mélangent au bol alimentaire, maintenant un pH gastrique très acide, variant entre 0,9 et 3,0, sur une période de transit de 5 minutes à 2 heures (**Castro-López et al., 2023**). En conséquent, un effet antimicrobien est exercé par la composition unique et le faible pH des sécrétions gastriques, dans lesquelles les micro-organismes allochtones, tels que les probiotiques, peuvent être rapidement détruits (**Bustos et al., 2024**).

I.3.2.2. Résistance aux conditions intestinales

Une fois dans l'intestin, les bactéries sont confrontées à divers facteurs qui perturbent leur existence permanente notamment l'activité des enzymes digestives, les changements soudains de pH, les propriétés détergentes des acides biliaires et les molécules produites par le système immunitaire de l'hôte (**Bustos et al., 2018; Mbye et al., 2020**). En effet, lors du passage de l'estomac à l'intestin, les probiotiques sont confrontés à une forte augmentation du taux de pH allant de 2,0 à 6,0, ceci est dû principalement à la présence de bicarbonate. Ce changement brutal peut endommager la membrane et altérer la structure des protéines et de l'ADN compromettant ainsi la viabilité des probiotiques (**Castro-López et al., 2023**). De plus, les cellules sont exposées à l'action des sécrétions pancréatiques, principalement composées d'enzymes digestives comme des protéases, amylases et lipases réduisant ainsi leur adhésion au mucus intestinal (**Ouwehand et al., 2001; Sensoy, 2021**). Les sécrétions biliaires sont produites et sécrétées par le foie, stockées dans la vésicule biliaire et sécrétées dans le duodénum. Il s'agit d'une solution alcaline ayant un pH variant de 7 à 8 composée principalement d'acides biliaires (**Chai et al., 2023**).

I.3.2.3. Adhésion aux cellules épithéliales

La capacité d'adhésion à l'hôte est un critère de sélection classique pour les bactéries probiotiques potentielles qui pourraient entraîner une colonisation contribuant à promouvoir les effets immunomodulateurs, ainsi qu'à stimuler la barrière intestinale et les fonctions métaboliques (**Monteagudo-Mera et al., 2019**).

Le mécanisme d'adhésion est influencé par divers facteurs, notamment les éléments de la paroi cellulaire, les protéines, le mucus intestinal et les conditions environnementales (**Monteagudo-Mera et al., 2019; Paliwoda et Nowak, 2019**). Les bactéries appartenant à la famille des

Lactobacillaceae, contiennent à la surface cellulaire des polysaccharides capsulaires, des acides teichoïques et lipoteichoïques, ainsi que des protéines de liaison spécifiques (mucine, fibronectine, collagène) et des lipoprotéines. Ces composants favorisent l'adhésion et la formation de biofilms sur les surfaces (Archer et al., 2018; Monteagudo-Mera et al., 2019; Paliwoda et Nowak, 2019).

I.3.2.4. Capacité à procurer des effets bénéfiques pour la santé

Un des critères primordiaux qu'une souche probiotique doit remplir est sa faculté à avoir un impact positif sur la santé de l'hôte. Les fonctions les plus communes des probiotiques est la prévention de divers pathologies en stabilisant le microbiome intestinal par plusieurs mécanismes (Liu et al., 2018; Skoufou et al., 2024) dont :

- l'inhibition de la croissance des pathogènes en entrant en compétition avec eux pour les nutriments ou en produisant des métabolites antimicrobiens
- la production de métabolites essentiels comme les vitamines, les acides aminés, les acides gras saturés nécessaires pour la santé de l'hôte.
- Stimulation de l'immunité de l'hôte en renforçant l'intégrité de la barrière intestinale.

I.3.3. Critères technologiques

Les probiotiques doivent répondre à des normes technologiques strictes telles que de bonnes propriétés sensorielles, la viabilité pendant le traitement et la stabilité dans le produit et pendant le stockage afin de rester actifs tout au long du processus de fabrication (de Albuquerque et al., 2018).

La survie des probiotiques comporte deux aspects qui doivent être pris en compte. Le premier consiste à savoir si les souches sélectionnées peuvent initialement survivre au tractus gastro-intestinal et rester viables tout au long du processus de fabrication de l'aliment. La faible tolérance au pH gastrique et les concentrations élevées en sels biliaires sont les critères les plus importants pour la sélection des souches probiotiques (Neffe-Skocińska et al., 2018). Il est également important de s'assurer que les aliments probiotiques contiennent le niveau minimum recommandé de probiotiques (10^6 - 10^7 UFC/mL de produit) dans le produit final (Roobab et al., 2020). Cette teneur en probiotiques doit être maintenue tout au long de la durée de conservation du produit, car le nombre de cellules probiotiques viables détermine leurs effets sur la santé. Par conséquent, les probiotiques doivent répondre à des normes technologiques strictes pour rester actifs tout au long du processus de fabrication et de stockage (Palanivelu et

al., 2022). Une fois toutes les étapes de sélection franchies avec succès, une souche peut être considérée comme probiotique et utilisée chez l'Homme efficacement et sans danger.

I.4. Les bactéries lactiques d'origine fruitière : une alternative prometteuse aux souches traditionnelles

Les bactéries lactiques sont connues pour être isolées de diverses habitats. Qu'il s'agisse de produits laitiers et des viandes, d'animaux vertébrés ou invertébrés (lait maternel, estomac de poulets et rats), de l'environnement (air, sols) ou de l'environnement aquatique (**Alyami et al.**, 2022). Cependant, le criblage de souches probiotiques à partir de sources non conventionnelles comme les aliments et les boissons traditionnels fermentés, les légumes et les fruits a récemment fait l'objet d'une attention croissante (**Kariyawasam et al.**, 2021).

Traditionnellement, les fruits sont considérés comme plus sûrs sur le plan microbiologique que d'autres denrées alimentaires non transformées telles que la viande, le lait, les œufs, la volaille et les produits de la mer (**Naeem et al.**, 2012). Ce sont des aliments riches en glucides, faibles en protéines typiquement acides. Cette acidité est une caractéristique considérée comme le principal facteur de sélection de la microflore prédominante de ces derniers, car elle empêche la survie de la plupart des micro-organismes (détériorateurs et (phyto) pathogènes) qui colonisent leur surface (**Naeem et al.**, 2012; **de Albuquerque et al.**, 2018). De plus, le pH acide et la présence de composés phénoliques aux propriétés antimicrobiennes permettent aux Lactobacilles d'origine fruitière d'acquérir une adaptation naturelle à ces caractéristiques intrinsèques ce qui peut influencer positivement leur survie lors de la transformation et du stockage des aliments, ainsi que dans le tractus gastro-intestinal humain soumis à des conditions acides difficiles (**Garcia et al.**, 2016; **Nematollahia et al.**, 2016).

D'autre part, il est important de considérer que le développement de produits probiotiques dérivés de matrices alimentaires à base de fruits soit une alternative viable pour diversifier l'ingestion de ces microorganismes par la population, étant donné que l'utilisation de matrices lactières est limitée par les personnes allergiques aux protéines du lait, intolérantes au lactose ou végétaliennes (**Trindade et al.**, 2022). Les probiotiques autochtones isolés des fruits sont donc les candidats les mieux adaptés aux environnements fruitiers, ce qui leur confère une meilleure stabilité et viabilité lorsqu'ils sont intégrés dans des produits à base de fruits, garantissant ainsi leur efficacité (**Sornplang et Piyadeatsoontorn**, 2016).

I.5. Rôles des probiotiques

Les probiotiques peuvent exercer un effet positif sur le corps humain en agissant directement sur les microorganismes ou indirectement en stimulant l'hôte à produire des actions bénéfiques (**Latif et al.**, 2023). Les principaux effets bénéfiques pour la santé produits par les micro-

organismes probiotiques sont l'établissement de conditions favorables dans l'intestin, un système immunitaire fort et un système digestif sain (**Anwer et Wei, 2024**).

I.5.1. Bienfaits sur le microbiote intestinal

L'intestin joue un rôle essentiel dans la digestion et l'absorption des nutriments, ainsi que dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale. De nombreuses bactéries commensales résident dans le tractus gastro-intestinal humain et constituent une communauté active qui influence considérablement la physiologie humaine (**Shehata et al., 2022**). La modification de cette communauté peut être obtenue par l'administration d'antibiotiques, de probiotiques ou de prébiotiques, ou par transplantation fécale (**Shahverdi, 2016**). Cela peut causer une perturbation de l'équilibre de cette microflore et engendrer des troubles cliniques aigus et chroniques tels que la diarrhée associée aux antibiotiques (DAA), les ulcères, les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) et le syndrome du côlon irritable (SII) (**Saber et al., 2017; Su et al., 2021**).

Le rétablissement d'un microbiote intestinal sain peut être utilisé comme approche pratique pour gérer les maladies intestinales. Les probiotiques constituent l'un des moyens les plus efficaces d'influencer la santé et les maladies humaines en équilibrant la flore intestinale (**Lee et al., 2018**). Ils peuvent contrôler les fonctions de l'épithélium intestinal en préservant la barrière épithéliale, en favorisant la survie des cellules, en stimulant la synthèse d'agents antibactériens et de protéines qui protègent les cellules, en augmentant la production d'enzymes (lactase), en renforçant les réponses immunitaires protectrices et en empêchant la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-4 et l'IL-13 (**Jang et al., 2019; Gul et Durante-Mangoni, 2024**).

Les métabolites secondaires, tels que les bactériocines, les exopolysaccharides, les vésicules extracellulaires, les acides gras à chaînes courtes, protéines extracellulaires, sont produits par les probiotiques. Ils peuvent réguler la barrière épithéliale intestinale, intégrer la sécrétion de certains peptides antimicrobiens et augmenter instantanément la sécrétion de mucus par les cellules de gobelet (**Liu et al., 2020**). On note également la production d'acides organiques permettant la réduction du pH du tractus gastro-intestinal créant ainsi une situation défavorable pour les microorganismes et limitant la croissance des agents pathogènes, ne pouvant pas se développer à un faible pH (**Biswasroy et al., 2021**).

I.5.2. Activité antioxydante

L'interaction de l'oxygène avec certaines molécules peut entraîner la formation d'atomes hautement réactifs, appelés radicaux libres, possédant des électrons non appariés dans leur enveloppe externe et qui peuvent se comporter comme des oxydants (**Chandrasekaran et al.,**

2017). Un déséquilibre entre les espèces réactives de l'oxygène (ERO), y compris le superoxyde (O_2^-), l'hydroxyle (OH^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le système de défense antioxydant de l'organisme est défini comme un stress oxydatif (**Musazadeh et al., 2023**).

Le stress oxydatif désigne l'état dans lequel la production excessive d'ERO dépasse la capacité de défense antioxydante d'un organisme. En effet, une production excessive d'ERO ou une défense antioxydante déficiente peut endommager les composants cellulaires, tels que les lipides, les protéines et l'ADN, entraînant des maladies cardiovasculaires, des cancers et des troubles neurodégénératifs comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington (**Guo et al., 2020; Wu et al., 2023**).

La consommation de probiotiques seuls ou dans des aliments fonctionnels a montré qu'ils peuvent présenter une activité antioxydante et réduire les dommages causés par l'oxydation de différentes manières. Il a été rapporté par plusieurs auteurs une production d'antioxydants par les probiotiques. Les composés antioxydants produits par les probiotiques comprennent la superoxyde dismutase, la glutathion dismutase, l'acide ascorbique, la mélatonine et le glutathion (**de Melo Pereira et al., 2018**). Les probiotiques peuvent aussi exercer un effet antioxydant indirect en produisant des exopolysaccharides (**Liu et al., 2020**).

I.5.3. Effet hypocholestérolémiant

Un taux élevé de cholestérol dans le sang a été impliqué dans les maladies cardiovasculaires (MCV), en particulier l'athérosclérose ; en conséquence, l'incidence de l'infarctus cérébral, de la thrombose cérébrale et de la cardiopathie augmente de plus en plus (**Zhou et al., 2019 ; Majeed et al., 2019**).

Malgré les effets secondaires, les méthodes pharmacologiques, en particulier les médicaments hypocholestérolémiants, continuent d'être utilisées. Par conséquent, la recherche d'un médicament hypocholestérolémiant sûr, efficace et sans effets indésirables devient de plus en plus urgente.

Les probiotiques ont prouvé leur effet hypocholestérolémiant considérable. En effet, les mécanismes de réduction du cholestérol par les bactéries probiotiques sont les suivants : l'assimilation du cholestérol par les cellules bactériennes en croissance, la précipitation du cholestérol avec la bile déconjuguée et la liaison du cholestérol aux cellules (**Shehata et al., 2022**). Néanmoins, le mécanisme le plus courant associé à l'effet hypocholestérolémiant des probiotiques est la déconjugaison enzymatique des sels biliaires par la production de la Bile Salt Hydrolase (BSH). En effet, les probiotiques sont capables d'hydrolyser les sels biliaires conjugués à la glycine ou à la taurine en ces résidus d'acides aminés et en acides biliaires. Les sels biliaires alors déconjugués et moins solubles, seront excrétés dans les fèces au lieu de

rejoindre la circulation entérohépatique et seront remplacés par de nouveaux sels biliaires formés à partir du cholestérol puisé du sang. Ainsi, plus les sels biliaires sont excrétés, plus le cholestérol est éliminé de la circulation sanguine **(Mahmoudi et al., 2017)**.

I.5.4. Biopréservation des aliments

La biopréservation est une technique moderne visant à prolonger la durée de conservation des aliments en utilisant des micro-organismes tels que les BL pour prévenir leur détérioration **(Mohellebi et al., 2024; Zavišić et al., 2024)**.

Les méthodes de conservation des aliments peuvent être classées en techniques traditionnelles (cuisson, salage, séchage, marinage, congélation et fermentation) et en techniques modernes (pasteurisation, emballage sous vide, technologie des champs électriques pulsés, congélation à haute pression, ultrasons, nanotechnologies pour éliminer les toxines, biopréservation, additifs alimentaires, antioxydants et additifs antimicrobiens naturels tels que la nisine, la reutérine et la pédiocine **(Pisoschi et al., 2018; Quinto et al., 2019; Winkelströter et al., 2022; Jabeen et al., 2023)**.

Les conservateurs ralentissent la détérioration des aliments en stoppant la croissance des micro-organismes et les changements physiques de couleur, de texture et de saveur qui conduisent à la détérioration. Ils sont classés en conservateurs naturels (sel, sucre, vinaigre, miel) et chimiques (sorbates, nitrites, benzoates) **(Dwivedi et al., 2017)**. Un conservateur idéal doit avoir les propriétés suivantes : ne pas être irritant, maintenir la consistance du produit, préserver le goût et la santé, être non toxique, être physiquement et chimiquement stable, être compatible avec tous les autres ingrédients, être un bon agent antimicrobien, être efficace, et avoir une durée de conservation plus longue **(Abdumumeen et al., 2012)**.

Les probiotiques, en tant que biopréservateurs biologiques, constituent une stratégie prometteuse pour prévenir les infections d'origine alimentaire et inhiber la formation de biofilms **(Amalaradjou et Bhunia, 2012; Tomé et al., 2023)**. En particulier les BL qui sont naturellement présents dans certains aliments, ce qui permet un stockage à long terme à des températures supérieures à la réfrigération. En outre, elles exercent leur effet de biopréservation en entrant en compétition avec les pathogènes pour les nutriments et en produisant des métabolites antimicrobiens, tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone et des bactériocines **(Castillo et al., 2012; Singh, 2018; Khaneghah et al., 2020)**.

I.6. Les principaux postbiotiques produits par les bactéries lactiques

En raison de la résistance croissante des micro-organismes aux conservateurs chimiques et de la diminution de l'efficacité des agents antimicrobiens synthétiques, il existe une demande croissante de composés bioactifs naturels dotés d'une activité antimicrobienne. Ce besoin est d'autant plus urgent que les agents pathogènes d'origine alimentaire représentent un risque majeur pour la santé des consommateurs, provoquant diverses maladies telles que douleurs abdominales, diarrhée, fièvre, hypotension artérielle, vomissements et autres troubles gastro-intestinaux (**Khaneghah et al., 2020**). Dans ce contexte, les probiotiques sont apparus comme une solution à double objectif, à la fois pour enrichir les aliments en micro-organismes bénéfiques et pour servir de moyen de conservation naturelle grâce à leurs métabolites antimicrobiens (**Sharafi et al., 2024**). Parmi ces composés bioactifs, les postbiotiques - sous-produits métaboliques des probiotiques-, ont attiré l'attention en tant que stratégie efficace pour améliorer la qualité et la sécurité des aliments. Les postbiotiques, disponibles sous forme sèche ou liquide, peuvent être incorporés dans les formulations alimentaires et les matériaux d'emballage, et avoir des effets antimicrobiens et antioxydants grâce à la présence d'acides organiques, de bactériocines, d'exopolysaccharides et de peptides bioactifs (**Franco, 2024**).

Par rapport aux probiotiques, les postbiotiques offrent plusieurs avantages : une structure chimique claire et des paramètres de dosage sûrs, prolongeant la durée de conservation jusqu'à cinq ans (**Tomar et al., 2015**). Une plus grande stabilité et sécurité car leur viabilité n'est pas nécessaire pour qu'ils soient fonctionnels (**Barros et al., 2020**). Un profil à faible risque car ils ne nécessitent pas l'ingestion de milliards de bactéries viables (**Shigwedha et al., 2014**). La stabilité à différentes températures et gammes de pH (**Thorakkattu et al., 2022**), et l'impossibilité de transférer les gènes de résistance aux antimicrobiens (**Aggarwal et al., 2022**).

I.6.1. Acides organiques

Les bactéries lactiques participent à divers processus métaboliques, tels que la fermentation lactique. Ce processus aboutit à la synthèse de plusieurs acides organiques, dont l'acide lactique, qui existe sous la forme de deux isomères optiques, l'acide D-lactique et l'acide L-lactique : L'acide D-lactique et l'acide L-lactique. L'acide lactique est un composé biologique qui trouve de nombreuses applications. Il est largement utilisé dans l'agriculture, l'alimentation, la médecine, l'industrie chimique et la protection de l'environnement (**Wang et al., 2021**).

La production d'acide lactique dans le métabolisme des bactéries lactiques suit deux voies principales. La voie homofermentaire et la voie hétérofermentaire. Cette dernière, également connue sous le nom de pentose phosphocétolase ou voie du 6-phosphogluconate, produit non

seulement de l'acide lactique, mais aussi des quantités considérables de dioxyde de carbone (CO₂) et d'éthanol ou d'acétate en tant que sous-produits **(Shi et Maktabdar, 2022)**.

L'activité antimicrobienne des acides organiques est largement attribuée au faible pH du substrat et à la forme non dissociée de la molécule d'acide, qui varie en fonction de la composition du milieu **(Zalán et al., 2010)**. Le mécanisme clé implique la diffusion passive de l'acide lipophile non dissocié à travers les membranes des cellules bactériennes, ce qui entraîne une acidification intracellulaire. Cela perturbe le gradient électrochimique de protons, provoquant une accumulation intracellulaire d'anions, conduisant à la bactériostase et finalement à la mort cellulaire **(Peetermans et al., 2021)**.

Au-delà de leurs propriétés antimicrobiennes, les acides organiques présentent également de puissants effets antioxydants et ont été reconnus comme sûrs (GRAS), ce qui souligne leur sécurité d'utilisation dans les aliments **(Chauhan et Rao, 2024)**.

I.6.2. Bactériocines

Les bactériocines sont des protéines complexes ou peptides produits par diverses espèces de BL et ayant le statut GRAS **(Mora-Villalobos et al., 2020)**. Elles constituent un groupe hétérogène de peptides engendrés par synthèse ribosomique bactérienne, qui ont une activité antimicrobienne spécifique sur un spectre de microbes cibles, qui peut être étroit ou large en fonction de la souche productrice **(Gaspar et al., 2018)**. Ces peptides antimicrobiens présentent des caractéristiques différentes en termes de poids moléculaire, de propriétés biochimiques, de spectre d'activité et de mode d'action **(Barache et al., 2024)**. En raison de leur grande polyvalence antimicrobienne, ils ont été considérés comme des conservateurs biologiques, des alternatives aux antibiotiques, des modulateurs intestinaux bénéfiques pour la santé et des stimulateurs de croissance animale **(O'Connor et al., 2020)**.

Les bactériocines sécrétées par les BL sont thermostables et sensibles aux protéases. Elles agissent comme des déstabilisateurs de la membrane cytoplasmique, entraînant la formation de pores dans la membrane cellulaire des bactéries, l'inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire et l'interruption des voies métaboliques **(Kumariya et al., 2019; Darbandi et al., 2022)**. Les bactéries à Gram positif sont généralement plus sensibles aux bactériocines, tandis que les bactéries à Gram négatif y sont généralement résistantes **(Sidhu et al., 2021)**. Des exemples de bactériocines utilisées dans la conservation des aliments sont regroupés dans le **tableau 1**.

Tableau 2. Utilisation des bactériocines dans la conservation des aliments (Mohellebi, 2024)

Aliment conservé	Bactérie lactique utilisée	Bactériocine	Microorganisme cible	Référence
Produits de la mer				
Saumon fumé	<i>Carnobacterium divergens</i> V41	Divercine V41	<i>L. monocytogenes</i>	Richard et al. (2003)
Saumon fumé		Nisine	<i>L. monocytogenes</i>	Heir et al. (2023)
Saumon fumé		Nisine	<i>L. monocytogenes</i>	Neetoo (2008)
Saumon fumé		Nisine	<i>L. monocytogenes</i>	Chen et al. (2022)
Filets de Saumon	<i>Enterococcus faecium</i> MA115 (Souche productrice de bactériocine)		<i>L. monocytogenes</i>	Amin et al. (2023)
Crevettes cuites		Nisine	<i>L. monocytogenes</i>	Zhao et al. (2020)
Filets de bar		Nisine	Flore totale mésophile, flore totale psychrophe et entérobactéries	Ucar et al. (2020)
Crevettes	<i>Lactococcus lactis</i> LL-HSTU-FPP (Souche productrice de bactériocine)		<i>E. coli</i> , <i>Vibrio cholera</i> et <i>S. aureus</i>	Biki et al. (2023)
Saumon frais	<i>Enterococcus faecalis</i> L04	Bactériocine EFL4	Flore totale viable	Mei et al. (2020)
Filets de poisson	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GP1	Bactériocine GP1	Coliforms, <i>Aeromonas</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp. et <i>Vibrio</i> sp	Sarika et al. (2019)
Saucisses d'esturgeon	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> S4, L-ZS9, <i>Lactobacillus pentosus</i> 31-1, <i>Lactobacillus plantarum</i> Y9, pl-2, L. <i>paraplantarum</i> P, <i>Lactobacillus acidophilus</i> N4, and <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG		Entérobactéries	Wang et al. (2015)

Aliment conservé	Bactérie lactique utilisée	Bactériocine	Microorganisme cible	Référence
	(Souches productrices de bactériocines)			
Crevettes décortiquées et ionisées	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KT2W2L producteur de Nisin Z		<i>B. thermosphacta</i> et <i>L. innocua</i>	Hwanhlem et al. (2015)
Produits carnés				
Saucisse de mouton	<i>Enterococcus faecium</i> EO1	Enterocine A	<i>L. monocytogenes</i>	Junges da Costa et al. (2021)
Viande de bœuf	<i>L. plantarum</i> 163	Plantaricine EmF	<i>L. monocytogenes</i>	Zhao et al. (2022)
Alheira (produit traditionnel de viande fermentée portugais)		Bactériocine HA-6111-2	<i>Listeria innocua</i>	Castro et al. (2018)
Jambon tranché		Pediocine	<i>L. innocua</i> et <i>Salmonella</i>	Santiago-Silva et al. (2009)
Steaks de chameau		Nisine	Flore totale psychrophe et <i>Pseudomonas</i> spp	Djenane et al. (2020)
Viande hachée de bœuf	<i>Enterococcus faecium</i> FL31	Enterocine BacFL31	Flore totale psychrophe et entérobactéries	Mtibaa et al. (2019)
Saucisses	<i>Enterococcus faecalis</i> A-48-32	Enterocine AS-48	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ananou et al. (2005)
Viande de bœuf		Nisine	<i>Carnobacteria</i> bactéries lactiques et <i>Brochotrix thermosphacta</i>	Ercolini et al. (2010)
Saveloy cuit, tranché et emballé sous atmosphère modifiée	<i>Leuconostoc carnosum</i> 4010 (Souche productrice de bactériocine)		<i>L. monocytogenes</i>	Jacobsen et al. (2003)
Produits laitier				
Fromage	<i>L. plantarum</i> 1QB77 (Souche productrice de bactériocine)		<i>L. monocytogenes</i>	Margalho et al. (2021)
Fromage "Minas Frescal"	<i>Enterococcus faecium</i> EO1		<i>L. monocytogenes</i>	da Costa et al. (2018)

Aliment conservé	Bactérie lactique utilisée	Bactériocine	Microorganisme cible	Référence
	(Souche productrice de bactériocine)			
Fromage (Minas-type)		Cereine 8A	<i>L. monocytogenes</i>	Bizani et al. (2008)
Lait écrémé		Aureocine A53	<i>L. monocytogenes</i>	Fagundes et al. (2016)
Fromage blanc doux	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> MG847589 (Souche productrice de bactériocine)		<i>S. aureus</i>	Shehata et al. (2024)
Lait UHT		Lactococcine BZ and enterocine KP	<i>L. monocytogenes</i>	Yildirim et al. (2016)
Fruits, legumes				
Chou	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> CICC 6257		<i>L. monocytogenes</i>	Dong et al. (2020)
Pomme et laitue	<i>Leuconostoc</i> spp. and <i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>L. monocytogenes</i>	Trias et al. (2008)
Laitue entière emballée, salade de roquette, feuilles d'épinards et persil	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT016	Pediocine D T016	<i>L. monocytogenes</i>	Ramos et al. (2020)
Laitue		Paracine wx7	<i>E. faecalis</i> résistant à la Vancomycine	Zhao et al. (2024)
Boisson fermentée à base de <i>Houttuynia cordata</i> Thunb	<i>Enterococcus faecium</i> OV3-6		<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>B. cereus</i> et <i>S. aureus</i>	Choeisoongn ern et al. (2023)
Banane		Fermencine SA715	Flore totale	Wayah et Philip (2018)
Vin d'ananas	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014 (Souche productrice de bactériocine)		<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> et <i>B. subtilis</i>	Kumari et al. (2022)
Laitue légèrement transformée	<i>Lactococcus lactis</i>	Bactériocine RUC9	<i>L. monocytogenes</i>	Randazzo et al. (2009)

II. Les exopolysaccharides des bactéries lactiques

II.1. Structure et classification des exopolysaccharides des bactéries lactiques

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères d'hydrates de carbone produites en réponse à des signaux environnementaux. Ils se composent d'un mélange de divers types de biomolécules formant une structure composée principalement d'hydrates de carbone et de certains substituants comme l'acétate, le pyruvate, le succinate et le phosphate (**Bhagat et al., 2021; Al-Nabulsi et al., 2022**). Selon l'endroit où ils se trouvent, les polysaccharides extracellulaires bactériens peuvent être classés en polysaccharides type slime (également appelés EPS libres) ou en polysaccharides capsulaires, qui sont faiblement attachés ou même complètement sécrétés dans l'environnement extracellulaire (**Xiao et al., 2022**).

Les EPS capsulaires offrent une protection aux cellules bactériennes contre la phagocytose, le stress osmotique, les composés antimicrobiens et les métaux lourds, et retiennent également l'eau, protégeant ainsi les microbes contre la sécheresse. Ils ont également d'autres fonctions comme l'adhésion et l'agrégation et aident à la colonisation bactérienne et à la pathogénicité, et facilitent l'échange de gènes et de métabolites au sein des communautés bactériennes (**Costa et al., 2018; Nguyen et al., 2020; Arayes et al., 2023**).

La plus grande variété de structures a été rapportée chez les lactobacilles (**Nicolescu et al., 2023**), ces polymères sont ainsi classés en homopolysaccharides (HoPS) et en hétéropolysaccharides (HePS) en fonction de leur composition monomérique (**Amer et al., 2021**).

II.1.1. Homopolysaccharides (HoPS)

Les homopolysaccharides (HoPS) constituent la classe la plus élémentaire des EPS, car ils ont la particularité d'être constitués d'un seul type d'unités répétitives de monosaccharides, qui peuvent être du D-fructose dans le cas des fructanes ou du D-glucose dans le cas des glucanes (**Abarquero et al., 2022; Nabot et al., 2022**). Les résidus monomères sont liés pour former des structures linéaires ou ramifiées avec un poids moléculaire allant de 10^5 et 10^6 Da atteignant des valeurs jusqu'à 10 g.L^{-1} (**Caggianiello et al., 2016; Lynch et al., 2018; Abid et al., 2018**). Les HoPS sont divisés en quatre classes : α -glucanes, β glucanes, β -fructanes et galactanes (**van Hijum et al., 2006**).

II.1.2. Hétéropolysaccharides (HePS)

Contrairement aux HoPS, les hétéropolysaccharides (HePS) ont une structure très complexe dont le squelette est formé de trois à huit monosaccharides, de dérivés de monosaccharides ou de monosaccharides substitués. Les HePS contiennent généralement des sucres dans des

proportions différentes, comme le D-glucose, le D-galactose ou le L-rhamnose. Dans une moindre mesure, ils peuvent contenir des monosaccharides tels que le ribose et le fructose, des monosaccharides N-acétylés et des substituants inorganiques tels que l'acide glucuronique, le phosphate ou le glycérol (Daba et al., 2021; Tang et al., 2023). La structure des HePS peut être ramifiée ou non, avec un poids moléculaire compris entre 10^4 et 10^6 Da et une production variant entre 25 et 600 mg.L⁻¹ (Torino et al., 2015; Panchal et al., 2022; Fuso et al., 2023). Ils sont produits par des bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Leuconostoc* (Lynch et al., 2018).

II.2. Voies de biosynthèse des EPS des bactéries lactiques

Les micro-organismes utilisent quatre voies communes pour la biosynthèse de l'EPS : la voie extracellulaire, la voie dépendante de la synthase, la voie dépendante du transporteur de la cassette de liaison de l'ATP et la voie dépendante de Wzx/Wzy (Bibi et al., 2021). La voie de synthèse extracellulaire et la voie dépendante de Wzx/Wzy sont typiquement les voies universelles de biosynthèse de l'EPS chez les BL. Pour cette raison, nous ne mettrons l'accent que sur ces deux voies (Zhou et al., 2019).

II.2.1. Voie de synthèse extracellulaire

Les bactéries lactiques utilisent la voie de synthèse extracellulaire pour synthétiser les HoPS (Angelin et Kavitha, 2020). La biosynthèse des HoPS est décrite dans les genres *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus* (Zeidan et al., 2017). Les HoPS sont principalement produits de manière extracellulaire à partir d'un substrat existant, principalement des molécules de saccharose, qui fonctionnent comme donneurs des monosaccharides correspondants (Gangoiti et al., 2018; Zhou et al., 2019). Les enzymes qui catalysent la polymérisation des HoPS appartiennent à la famille des glycosyl hydrolases (GH) ; les alpha-glucanes sont formés par les glucansucrases (GS, GH family 70) et les bêta-fructanes sont formés par les fructansucrases (FS, GH family 68) (Anwar et al., 2010 ; Côté et Skory, 2012 ; Zannini et al., 2016 ; Daba et al., 2021).

En bref, le processus comprend les deux étapes suivantes. Tout d'abord, le processus de polymérisation au cours duquel le substrat est hydrolysé avec l'aide de l'enzyme sensible, puis la liaison des résidus monosaccharides résultants à une chaîne acceptante de glycanes, suivie de la libération directe des chaînes polymérisées dans l'environnement extracellulaire (Abarquero et al., 2022).

Cependant, la synthèse des bêta-glucanes présente des différences par rapport à la synthèse d'autres HoPS. La synthèse est effectuée en utilisant des sucres nucléotidiques comme substrat

et synthétise les unités répétitives dans le cytosol et les exporte par transport membranaire vers le milieu extracellulaire (**Werning et al., 2022**).

II.2.2. Voie dépendante Wzx/Wzy

Les HePS sont principalement produites par la voie dépendante Wzx/Wzy, qui est plus complexe que la voie de synthèse extracellulaire et implique davantage d'enzymes, de transporteurs et de protéines codées par des gènes d'origine chromosomique ou plasmidique. Ainsi, les HePS ont une structure plus variée que les HoPS (**Angelin et Kavitha, 2020; Yang et al., 2023**). La voie Wzx/Wzy-dépendante comprend cinq étapes principales : (1) la phosphorylation ou transport des monosaccharides et des disaccharides. (2) la formation de nucléotides de sucre (activation des monosaccharides). (3) la synthèse des unités répétitives par des glycotransférases (GT). (4) la translocation des unités répétitives de la surface intracellulaire à la surface extracellulaire par la flippase (Wzx). (5) la polymérisation des unités répétitives par la protéine Wzy et la libération d'une longue chaîne à la surface de la cellule (**Zhou et al., 2019**).

II.3. Facteurs affectant la synthèse des exopolysaccharides des bactéries lactiques

Il a été établi qu'une trentaine d'espèces différentes de BL produisent des exopolysaccharides (EPS). Parmi celles-ci, *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Latilactobacillus sakei*, et *Lactiplantibacillus plantarum* sont quelques-unes des espèces BL les plus connues (**Fuso et al., 2023**). La capacité de synthèse des EPS par les BL varie et dépend de nombreux facteurs, et est spécifique à l'espèce et à la souche (**Berthold-Pluta et al., 2019**). Dans des conditions non optimisées, le rendement en EPS est inférieur à 1g/L pour la majorité des souches de BL (**Prete et al., 2024**). Cependant, l'optimisation de différentes circonstances pendant la fabrication d'exopolysaccharides peut entraîner un rendement plus élevé d'exopolysaccharides (**Kanamarlapudi et Muddada, 2017; Sasikumar et al., 2017; Bancalari et al., 2020**). Le **tableau 2** résume les différents facteurs influençant la synthèse des exopolysaccharides des bactéries lactiques.

Tableau 2. Les facteurs influençant la synthèse des exopolysaccharides des bactéries lactiques

Facteur	Rôles	Références
Source de carbone	L'ajout de monosaccharides et disaccharides (saccharose, fructose, maltose) dans les milieux de culture, comme le MRS, augmente significativement la production d'EPS. Des milieux alternatifs (lait écrémé,	(Li et al., 2016; Bachtarzi et al., 2019; Berthold-Pluta et al., 2019; Guérin et al., 2020; Ma'unatin et al., 2020; Minari et al., 2024; Pintado et al., 2024)

	semi-définis) peuvent aussi améliorer le rendement.	
Source d'azote	La production d'EPS varie selon la source d'azote utilisée : peptone, extrait de bœuf, extrait de levure, tryptone, caséine, chlorure d'ammonium, nitrate de sodium, nitrate d'ammonium, urée, sulfate d'ammonium.	(Leroy et Vuyst, 2016; Arayas et <i>al.</i> , 2023)
pH du milieu	Le pH optimal pour la production d'EPS est souvent autour de 6,0, mais cela dépend de la souche. Le pH influe différemment selon les espèces, les conditions de fermentation et la composition du milieu.	(Ju et <i>al.</i> , 2022; Prete et <i>al.</i> , 2024)
Température	Une température légèrement inférieure à la température de croissance optimale peut favoriser la production d'EPS, probablement en réponse à un stress thermique.	(Berthold-Pluta et <i>al.</i> , 2019; Wang et <i>al.</i> , 2023)

II.4. Effets bénéfiques des EPS

Les propriétés moléculaires et structurelles uniques des EPS, notamment leur poids moléculaire, leur alignement et leur composition en monosaccharides, qui influencent leur bioactivité, sont intimement liées à leurs effets bénéfiques sur la santé (**Wang et al., 2020**). Outre les propriétés technologiques et organoleptiques, les EPS produits par les BL sont associés à diverses propriétés biologiques, telles que les capacités antioxydantes, prébiotiques, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et hypocholestérolémiantes (**Patel et al., 2012; Angelin et Kavitha, 2020**).

II.4.1. Propriété antioxydante

La surproduction d'ERO peut entraîner un stress oxydatif et une oxydation induite par les radicaux libres, conduisant à de multiples dommages aux molécules biologiques telles que les lipides, les protéines et l'ADN en brisant les phosphodiesteres. Cela peut entraîner des dommages aux tissus qui peuvent conduire à une série de maladies telles que le diabète, les maladies inflammatoires et neurologiques (**Rani et al., 2018; Rahbar Saadat et al., 2019; Feng et Wang, 2020; Jomova et al., 2023**). Des recherches ont montré que la consommation d'antioxydants naturels peut contribuer à réduire le risque de maladies chroniques (**Sahiner et al., 2022**). L'EPS produit à partir de BL a une excellente capacité antioxydante puisqu'il peut stimuler l'activité des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), ainsi que piéger les radicaux libres (**Lobo et al., 2019**). Outre les facteurs génétiques, l'activité antioxydante est déterminée à la fois par les conditions externes (pH,

température, oxygène, sources de carbone et d'azote) et par la structure de l'EPS (**Polak-Berecka et al., 2013; Rahbar Saadat et al., 2019**).

II.4.2. Effet prébiotique

Les prébiotiques sont initialement définis par **Gibson et Roberfroid (1995)** comme "un ingrédient alimentaire non digestible qui a un effet bénéfique sur l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre limité de bactéries dans le côlon, et qui améliore ainsi la santé de l'hôte". Ces substrats non digestibles comprennent les oligosaccharides, les fibres alimentaires et les acides gras à chaîne courte. Cette définition a été récemment modifiée par l'Association scientifique internationale pour les probiotiques et les prébiotiques (ISAPP) comme "un substrat qui est utilisé de manière sélective par les micro-organismes de l'hôte et qui confère un avantage pour la santé" (**Gibson et al., 2017**).

Comme les EPS ne sont pas dégradés par les enzymes digestives humaines, ils restent plus longtemps dans le tractus gastro-intestinal, ce qui facilite la colonisation des bactéries probiotiques (**Patel et al., 2012**). En effet, les EPS favorisent la prolifération des bactéries bénéfiques, principalement les BL et les bifidobactéries, tout en contribuant à la suppression des souches pathogènes, une caractéristique qui présente un immense potentiel thérapeutique (**Tang et al., 2020**). En outre, la fermentation des EPS par les bactéries bénéfiques produit des acides gras à chaîne courte (AGCC) qui jouent un rôle dans la préservation de la santé intestinale, la régulation du métabolisme des lipides et du glucose, la modulation immunologique et l'atténuation de l'inflammation (**Campos-Perez et Martinez-Lopez, 2021**).

II.4.3. Activité antimicrobienne

Les EPS produits par les BL ont montré un effet inhibiteur notable contre diverses souches bactériennes Gram-positives (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*) et Gram-négatives (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*) (**Jeong et al., 2017; Trabelsi et al., 2017; Rani et al., 2018; Salimi et Farrokh, 2023**).

Les mécanismes antibactériens des EPS peuvent être liés à la perturbation des membranes ou des parois cellulaires des souches bactériennes (**Hasheminya et Dehghannya, 2020**). Les EPS microbiens comportent de nombreux groupes fonctionnels, notamment des groupes hydroxyle-phosphate et carbonyle. Il a été rapporté que ces groupes jouent un rôle dans les interactions entre les EPS microbiennes et la membrane cellulaire ou la paroi cellulaire des bactéries pathogènes (**Riaz Rajoka et al., 2020**). De plus, les EPS sont impliqués dans le blocage des récepteurs et des canaux de certaines bactéries (**Abdalla et al., 2021**). En effet, les EPS ne peuvent pas pénétrer dans d'autres cellules, et donc, leur effet antibactérien peut être dû à la

combinaison d'oligopeptides dans les cellules gram-positif ou d'acyl-homosérine lactone dans les cellules gram-négatif. Ces composés sont des molécules de signalisation liées au biofilm. Les EPS utilisent donc ce mécanisme pour interrompre la communication cellulaire et par conséquent arrêter la formation du biofilm (**Spanò et al., 2016; Sivasankar et al., 2018**). Le biofilm offre un environnement de survie favorable aux bactéries pathogènes, ce qui augmente le risque d'infections chroniques et récurrentes, ainsi que la résistance aux antibiotiques. Il représente également un défi majeur pour la sécurité alimentaire et le secteur médical, et sa perturbation est une propriété activement recherchée (**Riaz Rajoka et al., 2020**). Un autre effet antimicrobien peut être expliqué *in vivo* par l'effet prébiotique en favorisant la colonisation des bactéries probiotiques à la surface du tractus gastro-intestinal et finalement remplacer les bactéries pathogènes dans un mode d'inhibition compétitif (**Paynich et al., 2017; Zhou et al., 2019**).

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au sein de :

- Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) (équipe : Aliments fonctionnels et Bioconservation) à l'Université A. Mira-Bejaia (Algérie) pour la partie probiotique.
- Laboratoire Régional de l'Institut Charles Viollette à l'Université de Lille (France) pour l'identification moléculaire des souches, le séquençage du génome, la culture cellulaire et le dosage de l'acide lactique.
- Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes au Centre de Biotechnologie de Sfax (Tunisie) pour la partie sur les exopolysaccharides.

I. Isolement et caractérisation de souches probiotiques

I.1. Isolement des souches de bactéries lactiques de fruits

Afin d'isoler des souches de bactéries lactiques, huit échantillons de fruits mûrs ont été récoltés dans des champs agricoles à Ath Yenni (Tizi Ouzou, Algérie), dans la vallée de la Soummam (Bejaia, Algérie) et dans la région de Ouargla (Algérie). Il s'agit de mûrier blanc (*Morus alba* L.), de figue de barbarie (*Opuntia ficus-indica*), de datte (*Phoenix dactylifera* L.), de figue (*Ficus carica*) et de raisin (*Vitis vinifera*). La procédure d'isolement a été réalisée selon les instructions rapportées par **Barache et al. (2020)**. Les échantillons ont été placés dans des sacs hermétiques et transportés au laboratoire. Ensuite, 100 g de chaque fruit ont été mélangés à 100 ml d'eau saline stérile (8,5 g NaCl l⁻¹) à l'aide d'un mixeur. Après fermentation du mélange de fruits à 37°C pendant 24 heures, 100 µl de chaque broyat de fruits ont été inoculés dans 10 ml de bouillon de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (pH 6,5) (Conda, Madrid, Espagne) et incubés à 37°C pendant 24 heures. Les cultures obtenues ont étéensemencées sur des boîtes de gélose MRS et incubées à nouveau à 37°C pendant 48 heures. Les colonies obtenues ont fait l'objet d'une identification préliminaire basée sur leur aspect macroscopique sur boîte de gélose, l'observation microscopique après coloration de Gram et le test de révélation de la catalase. Les isolats Gram-positif et catalase-négatif ont été conservés et stockés à -80 °C dans du bouillon MRS contenant 30 % (v/v) de glycérol (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Allemagne) pour la suite du travail.

I.2. Criblage des isolats sur leur résistance au pH acide et à la bile

I.2.1. Tolérance au pH acide

Les isolats ont été sélectionnés sur la base de leur résistance à la bile et au pH acide. Ce test a été réalisé pour mimer la survie des isolats lors du passage dans le tractus gastro-intestinal humain (GIT), en utilisant la méthode décrite par **Ait Seddik et al. (2017)**. Pour la tolérance au

pH acide, les isolats ont été cultivés dans 5 ml de bouillon de MRS (Conda, Madrid, Espagne) pendant 18 h à 37°C. Les cellules ont ensuite été récoltées par centrifugation (8000 g, 4°C, 10 min), lavées deux fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 7,2) et remises en suspension dans 5 ml de bouillon MRS ajusté à pH 2,0 avec du chlorure d'hydrogène (HCl) en présence de pepsine (Loba Chemie, Inde) à 3 mg.ml⁻¹. Des aliquotes de 100 µl ont été prélevées après 0 et 2 h d'incubation à 37°C, diluées en série et placées sur gélose MRS pour déterminer le nombre de cellules viables, exprimé en UFC.ml⁻¹.

I.2.2. Tolérance à la bile

Pour la tolérance à la bile, 5 ml de PBS au pH 8,0 contenant 0,3 % (w/v) de sels biliaries (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) ont été inoculés avec des isolats à 10⁸ CFU.ml⁻¹ après standardisation puis incubés à 37 °C pendant 4 h. Après incubation, le taux de survie a été déterminé comme décrit précédemment pour le test de tolérance à l'acide, tel que rapporté par (Ait Seddik et al., 2017).

I.3. Identification moléculaire des isolats

I.3.1. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

- **Principe de la méthode**

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionisation, Time Of Flight) est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur « temps de vol » qui est proportionnel à leur masse et à leur charge. Les spectromètres de masse sont composés de trois éléments : • une source d'ionisation (le laser), qui ionise et fractionne les échantillons à analyser, • un analyseur, qui permet de séparer les ions produits selon le rapport de leur masse sur leur charge électrique (rapport m/z) • et un détecteur qui détecte les ions. Le résultat obtenu est un ensemble de pics ou un spectre de masse représentant les rapports m/z des ions détectés sur l'axe des abscisses et l'intensité relative de ces ions sur l'axe des ordonnées. Ce spectre de masse peut ensuite être comparé aux milliers de spectres de référence contenus dans la base de données de l'appareil (Wieser et al., 2012; Ait Seddik et al., 2017).

- **Mode opératoire**

La spectrométrie MALDI-TOF a été utilisée pour l'identification des souches (Nacef et al., 2017). À cette fin, les souches ont été cultivées sur de la gélose MRS (Conda, Madrid, Espagne) pendant 48 h et des colonies pures ont été déposées sur une cible MALDI en acier rectifié. Les spots (trois spots pour chaque isolat) ont été recouverts de 1 ml de solution d'acide formique à 70 % (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), séchés à température ambiante, puis recouverts à

nouveau de 1 ml de solution matricielle (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique [HCCA] ; Bruker Daltonics) dissoute dans 50 % (v/v) d'acétonitrile (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 47.5 % (v/v) d'eau et 2,5 % (v/v) d'acide trifluoroacétique (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) et laissée à sécher avant d'être analysée à l'aide du MALDI Biotyper. La cible a été analysée à l'aide du spectromètre MALDI-TOF MS Autoflex speed TM (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne) en mode positif linéaire. Les spectres de masse ont été analysés dans la gamme m/z de 2000 à 20 000 et un étalon de test bactérien (BTS, Bruker Daltonics) a été utilisé pour l'étalonnage de l'instrument conformément aux recommandations de Bruker. Les rapports m/z des ions détectés dans chaque profil MALDI-TOF MS ont été déterminés à l'aide de Flex Analysis 3.4 pour comparaison avec la base de données. Les identifications ont ensuite été représentées avec des scores entre 0 et 3 et qui correspondent à la fiabilité de l'identification. La signification des scores est donnée dans le **tableau 3**.

Tableau 3. Signification des scores d'identification obtenus par spectrométrie MALDI-TOF

Score	Interprétation
2,00 - 3,00	Identification hautement fiable
1,70 - 1,99	Identification peu fiable
0,00 – 1,69	Aucune identification possible

I.3.2. Identification par séquençage de l'ADNr 16S

L'ADN total des souches phylogénétiquement distinctes a été extrait de chaque souche sélectionnée et le gène codant l'ARNr 16S a été amplifié en utilisant les amorces spécifiques au domaine ADNr 16S à savoir :

S1: 5'-AGAGTTTGATC(A,C)TGGCTCAG-3' et

S2: 5'-GG(A,C)TACCTTGTTACGA(T,C)TTC-3'

Les amplifications ont été réalisées dans un volume réactionnel de 50 μ l. Ce dernier contenait 25 μ l de DreamTaq™ PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 2,5 μ l de chaque amorce (20 μ M), 15 μ l d'eau dépourvue de nucléases (nucleases free) et 5 μ l d'ADN (30 ng/ μ l). L'amplification a été réalisée suivant le programme suivant : Dénaturation à 94°C/3 min, 29 cycles (94°C/40 s, 55°C/50 s et 72°C/2 min) et enfin une extension finale à 72°C/10 min. Les différents produits d'amplification ont été purifiés en utilisant le kit de purification NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Les amplicons purifiés ont été envoyés pour séquençage à Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Allemagne). Les séquences obtenues (sens et anti sens) ont été assemblées en une seule séquence 5'-3' et

ont été ensuite analysées à l'aide du BLAST (basic local alignment search tool) sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

I.4. Caractérisation des propriétés de surface des souches

I.4.1. Auto-agrégation

Le test d'auto-agrégation a été réalisé selon la méthode de **Kos et al. (2003)**. Les souches lactiques ont été cultivées à 37°C pendant 18 h dans du bouillon MRS. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 8000 g/ 10 min, à 4°C, lavées deux fois avec du PBS (10 mM, pH 7,2), et remises en suspension dans le même tampon de façon à obtenir une charge de 10⁸ UFC/ml. Les suspensions cellulaires (10 ml) ont été mélangées au vortex pendant 10 s et l'auto-agrégation a été déterminée après 2 h et 4 h d'incubation à 37°C. Pour cela, 1 ml de la partie supérieure de la suspension a été récupéré et l'absorbance (A) mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Specord® Shimadzu, Allemagne). L'auto-agrégation (%) a été exprimée par la formule :

$$\text{Auto - agrégation (\%)} = 1 - (A_t/A_0) \times 100$$

Où A_t représente l'absorbance au temps $t = 2 \text{ h}/4 \text{ h}$ et A_0 l'absorbance à $t = 0$.

I.4.2. Hydrophobicité de la paroi

L'hydrophobicité de la paroi bactérienne a été déterminée par la méthode MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbons) suivant le protocole décrit par **Rosenberg et al. (1980)**. Pour cela, des cultures bactériennes de 18 h dans du bouillon MRS ont été centrifugées à 8000g/ 10 min, à 4°C. Les culots ont été lavés deux fois avec du PBS (10 mM, pH 7,2) puis remis en suspension dans le même tampon de façon à obtenir une charge de 10⁸ UFC/ml. Par la suite, 1 ml de xylène a été ajouté à 3 ml de la suspension bactérienne. Après mélange au vortex pendant 90s, la solution a été laissée au repos pendant 15 min afin de permettre la séparation des phases aqueuse et organique. Ensuite, 1 ml de la phase aqueuse a été aspiré délicatement et l'absorbance a alors été déterminée à 600 nm. Le pourcentage d'hydrophobicité a été calculé selon la formule :

$$\text{Hydrophobicité (\%)} = 1 - (A/A_0) \times 100$$

Où A_0 représente l'absorbance de la suspension avant mélange avec le solvant et A l'absorbance de la phase aqueuse après formation du système à deux phases.

I.4.3. Formation de biofilm sur microplaque en polystyrène

La méthode semi quantitative d'adhésion en microplaques en polystyrène a été utilisée dans cette étude comme décrit précédemment par **Ait Ouali et al. (2014)**. Brièvement 100 µl, de chaque culture bactérienne (10⁸ UFC/ml) dans du bouillon MRS, ont été ajoutés aux puits de microplaques stériles de 96 puits préalablement remplis avec 100 µl de bouillon de Trypticase-soja (TSB) (Difco, Detroit, MI, USA). Les microplaques ont été laissées pendant 15 min sous

légère agitation avant d'être incubées pendant 24 h à 37°C. Les cultures ont été décantées et les puits ont été lavés deux fois avec du tampon PBS (10 mM, pH 7,2) pour éliminer les cellules non adhérentes. Les cellules adhérentes dans chaque puits ont été fixées avec 200 µl d'éthanol à 96 % (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Après 15 min, les microplaques ont été vidées et laissées sécher, puis remplies avec 200 µl/puits d'une solution de cristal violet (Biochem Chemopharma, Québec, Canada) à 0,1 % (m/v) et laissées pendant 30 min. Les cellules colorées ont été lavées deux fois avec 200 µl de PBS (10 mM, pH 7,2) et le colorant extrait avec 200 µl d'éthanol à 96% (Sigma-Aldrich). La quantité de biomasse a été quantifiée en mesurant l'absorbance (A) à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (ELX800. BioTek, USA). Ces souches ont été classées en quatre catégories suivant la classification de **Stepanovic et al. (2000)**. En considérant l'absorbance du bouillon TSB stérile comme témoin (Ac), les interprétations suivantes ont servi tout au long de cette expérience : $A \leq Ac$, non adhérent (non producteur de biofilm) ; $2Ac \geq A > Ac$, faiblement adhérent (faible producteur de biofilm) ; $4Ac \geq A > 2Ac$, modérément adhérent (producteur de biofilm modéré) ; et fortement adhérent (fort producteur de biofilm), $A > 4Ac$.

I.4.4. Adhésion sur cellules Caco-2

La lignée cellulaire utilisée pour le test d'adhésion est celle de l'adénocarcinome colorectal humain Caco-2 (**Pinto, 1983**) cultivée dans une atmosphère contrôlée de 5 % de CO₂ à 37°C dans du DMEM contenant 4,5 g de glucose l-1, 2 mM de L-glutamine, 100 U de pénicilline ml⁻¹, 100 U de streptomycine ml⁻¹, 1 % (v/v) d'acides aminés non essentiels et 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF). Tous les réactifs ont été achetés à PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Allemagne). Cet essai a été réalisé selon le protocole décrit précédemment par (**Belguesmia et al., 2011**). Brièvement, pour évaluer la capacité d'adhésion, des monocouches de cellules Caco-2 ont été préparées dans des plaques de culture tissulaire à 24 puits en ensemençant 4.10⁻⁴ cellules par puits et incubées pendant 7 jours. Après le temps d'incubation, les cultures sélectionnées sur bouillon MRS ont été récoltées par centrifugation (8 000×g, 4°C, 10 min), remises en suspension dans du DMEM sans SVF ni antibiotiques, puis appliquées sur des monocouches de cellules Caco-2 confluentes (10⁶ UFC par puits). Après 2 h d'incubation à 37 °C (5 %, CO₂ et 95 % air), les monocouches cellulaires ont été lavées deux fois avec 500 µl de PBS (10 mM, pH 7,2) pour éliminer les bactéries non adhérentes et lysées par incubation à température ambiante pendant 15 min en présence de 200 µl de trypsine/EDTA Gibco® (Thermo Fisher Scientific). Les lysats ont été dilués en série et déposés sur de la gélose MRS (pH 6,5) (Conda, Madrid, Espagne) pour déterminer le nombre de bactéries adhérentes.

I.5. Etude de l'innocuité des souches

I.5.1. Activité hémolytique

Les souches lactiques ont été caractérisées pour leur activité hémolytique (**Argyri et al., 2013**). À cette fin, des aliquotes de 5 µl obtenues à partir de chaque souche, cultivée en anaérobiose pendant 18 h à 37 °C sur bouillon MRS (pH 6,5) (Conda, Madrid, Espagne) ont été placées directement sur de la gélose au sang Columbia et incubées à 37 °C pendant 48 h. Après cette période, les plaques de gélose au sang ont été examinées pour détecter la présence de signes de β-hémolyse (zones claires autour des colonies), d'α-hémolyse (zones verdâtres autour des colonies) ou de γ-hémolyse (pas de zones autour des colonies).

I.5.2. Cytotoxicité sur cellules Caco-2

Pour évaluer l'effet des souches lactiques sur les cellules humaines, les cellules intestinales Caco-2 ont été utilisées comme modèle in vitro. Ces cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère modifiée de 5 % de CO₂ dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 5 mM de L-glutamine, 100 U de pénicilline ml⁻¹, 100 U de streptomycine ml⁻¹ et 10 % (v/v) de SVF. Tous les réactifs de culture cellulaire ont été fournis par PAN-Biotech (Aidenbach, Allemagne). Pour les essais de cytotoxicité, les cellules Caco-2 ont étéensemencées dans des microplaques à 96 puits à raison de 8.10³ cellules par puits et incubées pendant 7 jours. Le milieu de culture a été changé après 3 jours d'incubation. Des cultures fraîches de lactobacilles ont été centrifugées (8 000×g, 4°C, 10 min). Les culots ont été lavés avec du PBS stérile 0,01 M (pH 7,2) et remis en suspension dans du DMEM sans SVF ni antibiotiques. Les monocouches Caco-2 ont été lavées avec du milieu DMEM sans SVF ni antibiotiques, puis les bactéries ont été ajoutées dans les puits à un ratio ou MOI (multiplicité d'infection) de 1:10 (Caco-2/Lactobacilles). Les puits contenant uniquement du milieu DMEM ont été utilisés comme témoins. Les microplaques ont été incubées pendant 24 heures à 37°C sous 5 % de CO₂. Après incubation, le milieu a été retiré et les monocouches de cellules Caco-2 ont été lavées deux fois avec du milieu DMEM sans SVF ni antibiotique. L'activité métabolique des cellules Caco-2 a été déterminée après 24 heures d'incubation à un ratio de 1:10 (Caco-2/Lactobacilles). Après 24 h de contact avec les souches de lactobacilles. Les puits ont été lavés avec du PBS et la cytotoxicité a été mesurée en utilisant de l'iodure de propidium. Après incubation dans l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un lecteur SpetraMax (excitation 535 nm/émission 617 nm). Les résultats sont exprimés en pourcentage de mort des cellules Caco-2.

I.6. Mise en évidence des mécanismes antagonistes des souches

I.6.1. Activité antibactérienne

Pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches de *L. plantarum* isolées, deux tests de diffusion sur gélose sont utilisés : Le test des spots (**Fleming et al., 1975**) et le test des puits (**Barefoot et Klaenhammer, 1983**). Dans ces deux tests, deux souches cibles sont utilisées ; il s'agit de souches pathogènes de référence : *S. aureus* ATCC 6538 et *E. coli* ATCC 8739.

- **Test des spots**

Pour le test des spots, 5 µl d'une culture de lactobacilles ont été déposés sur gélose MRS (Conda, Madrid, Espagne). Après séchage des spots, les boîtes sont incubées pendant 18 heures à 37°C. Ensuite, 10 ml de gélose Mueller-Hinton (MH) (Conda, Madrid, Espagne) (8 g.l⁻¹) en surfusion, préalablement ensemencée avec la souche cible à 10⁶ UFC.ml⁻¹, ont été ajoutés et incubés à nouveau pendant 18 h à 37°C. Après incubation, les géloses ont été inspectées, toute zone d'inhibition caractérisée par la présence de zones claires autour des puits a été enregistrée et les diamètres ont été mesurés.

- **Test des puits**

Pour ce test, des cultures de 18 h des souches de lactobacilles dans du bouillon MRS sont centrifugées (8 000 g/ 10 min, 4°C) et les surnageants sont récupérés et filtrés (filtre à seringue de 0,45 µm de porosité). En parallèle, des cultures de 18 h des souches pathogènes sont diluées puis inoculées dans de la gélose MH (Conda, Madrid, Espagne) en surfusion de façon à obtenir une concentration finale de 10⁶ UFC.ml⁻¹. La gélose est coulée dans des boîtes de Pétri, dans lesquelles une couche de gélose MRS est préalablement coulée, et des puits sont creusés après solidification (les puits sont obturés par une goutte de gélose en surfusion). Les puits sont ensuite remplis par 100 µl des surnageants acellulaires natifs et neutralisés (pH 6,5) des souches de lactobacilles et les boîtes sont entreposées à 4°C pendant 2 h avant d'être incubées à 37°C pendant 18 h. Après incubation, des zones d'inhibition sont recherchées autour des puits et leurs diamètres sont mesurés.

I.6.2. Quantification de l'acide lactique

La quantification de l'acide lactique produit par les souches de Lactobacilles a été réalisée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) sur un spectra system P1000XR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en utilisant une colonne fast fruit juice (50 mm × 7,8 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) (**Barache et al., 2020**). La phase mobile utilisée était du H₃PO₄ (0,05 %, w/w) à un débit de 0,6 ml.min⁻¹ et une température de 55°C. Les surnageants de cultures de Lactobacilles ont été prélevés après 8, 18 et 24 h d'incubation à 37°C dans du bouillon MRS (Conda, Madrid, Espagne), puis centrifugés (8000 g, 4°C, 10 min)

et filtrés à travers un filtre de 0,2 µm/pore. Une courbe d'étalonnage de l'acide lactique pur (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) avec des concentrations de 1, 5, 10, 15 et 20 g.l⁻¹ a été réalisée pour établir la corrélation entre les données obtenues à partir de la surface du pic chromatographique et la concentration de l'acide lactique produit (**Figure1**, Annexe). Le pic correspondant à l'acide lactique élué à 5,32 min a été identifié à l'aide du logiciel Azur.

I.6.3. Séquençage du génome complet et recherche de bactériocines

Afin de mieux comprendre l'origine de l'effet antimicrobien des souches, le séquençage du génome des souches exprimant des propriétés antagonistes contre les micro-organismes cibles testés a été réalisé par Eurofins (Ebersberg, Allemagne). Les ébauches de séquences du génome entier des souches ont été analysées à l'aide de RAST, qui permet l'analyse des cadres de lecture ouverts. Elles ont ensuite été recherchées dans la base de données SEED. Outre l'analyse de l'ADNr 16S, l'identification des souches a également été confirmée par l'analyse de la séquence du gène *recA*, obtenue après séquençage du génome entier. Les séquences génomiques des souches considérées comme appropriées ont été recherchées dans des bases de données de bactériocines telles que BAGEL4 (<https://bagel4.molgenrug.nl>) et Antismash (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) afin de révéler la présence de déterminants génétiques putatifs de composés antimicrobiens, y compris de bactériocines.

I.7. Activité antioxydante des souches

I.7.1. Méthode au 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Des cultures de Lactobacilles ont été inoculées dans du bouillon MRS (Conda, Madrid, Espagne) et incubées à 30 °C pendant 18 h. La culture d'une nuit a été centrifugée (8 000 g, 4 °C, 10 min). Les surnageants acellulaires ont été soumis à un essai de piégeage des radicaux libres 2,2-di-phényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), comme décrit par **Sharma et al. (2017)**. Un volume de 500 µl de surnageant a été ajouté à 3 ml de DPPH fraîchement préparé (5 mg/100 ml de méthanol), mélangé par vortex et incubé pendant 30 min dans l'obscurité. Pour la préparation des cellules intactes, les cellules de Lactobacilles ont été récoltées par centrifugation (8000 g, 4°C, 10 min) après 18 h d'incubation à 37°C, puis elles ont été lavées trois fois avec du PBS (10 mM, pH 7,2) et remises en suspension à 10⁸ UFC.ml⁻¹ dans ce même tampon. L'absorbance a été mesurée à 515 nm avec du bouillon MRS non inoculé (Conda, Madrid, Espagne) comme blanc. L'acide ascorbique (Sigma-Aldrich, Suisse) a été utilisé comme étalon synthétique et naturel. Le pourcentage d'activité de piégeage des radicaux a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de piégeage(\%)} = [1 - A_{515}(\text{échantillon})/A_{515}(\text{blanc})] \times 100\%$$

I.7.2. Méthode au 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS+)

L'activité antioxydante a été déterminée à l'aide de la méthode de cation du radical ABTS⁺ (2,2-Azino-bis : 3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonique acide) précédemment décrite par **Pieniz et al. (2014)**. L'ABTS⁺ a été préparé en faisant réagir une solution mère d'ABTS avec du persulfate de potassium (2,45 mM) (concentration finale) et en laissant reposer le mélange pendant 16 h à température ambiante avant de l'utiliser. Le radical a été dissous dans l'eau (7 mM). La solution a ensuite été utilisée pendant un maximum de trois jours. Avant l'analyse, la solution d'ABTS⁺ a été diluée avec de l'éthanol (Honeywell Riedel-de Haën™, Allemagne) jusqu'à une absorbance de 0,700 - 0,020 à 734 nm. L'acide ascorbique (Sigma-Aldrich, Suisse) a été utilisé comme étalon dans la gamme de 0-9 mg.ml⁻¹. Ensuite, 1 ml de solution ABTS⁺ a été ajouté à 10 ml de chaque échantillon (ou standard). L'absorbance a été déterminée après 5 minutes. D'autre part, de l'eau ultrapure a été utilisée comme contrôle. Le pourcentage (%) d'inhibition de l'absorbance à 734 nm a été déterminé à partir de la même équation que celle du test DPPH.

II. Potentiel de production d'EPS par *L. plantarum*

II.1. Criblage de souches de *L. plantarum* productrices d'EPS

Les souches probiotiques sélectionnées de *L. plantarum* ont été examinées pour leur capacité à produire des EPS à partir de saccharose. Les échantillons ont étéensemencés sur un milieu gélosé De Man, Rogosa et Sharpe (MRS) (Conda, Madrid, Espagne) contenant 5% (p/v) de saccharose, 10 g/l de tryptone, 10 g/l d'extrait de viande, 5 g/l d'extrait de levure, 5 g/l d'acétate de sodium, 2 g/l de phosphate disodique, 2 g/l de citrate de tri-ammonium, 0,1 g/l de MgSO₄, et 0,05 g/l de MnSO₄ (pH 6,5). Après une incubation de 24 à 48 heures à 30 °C dans des conditions anaérobies, les boîtes de gélose ont été contrôlées pour vérifier la présence de colonies présentant un aspect mucoïde.

II.2. Production et extraction des EPS

L'EPS a été produit et extrait selon la méthode de **Cerning et al. (1992)**. En bref, les souches sélectionnées ont été cultivées dans 100 ml de MRS-sucrose dans un erlenmeyer à 30 °C. Après 72 heures d'incubation, de l'acide trichloracétique (TCA) a été ajouté à la culture à une concentration finale de 4 % (p/v) et le mélange a été agité pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules et les protéines précipitées ont été éliminées par centrifugation (10 000 × g, 4 °C, 15 min). L'EPS brut a été précipité à partir du surnageant par addition de 2 volumes d'éthanol froid stocké à 4 °C pendant 24 h. L'EPS brut a été recueilli par centrifugation à 10 000 × g pendant 20 min. Le culot a été dissous dans de l'eau désionisée puis lyophilisé. La masse sèche de polymère d'EPS purifiée a été déterminée en mesurant la masse du précipité.

II.3. Caractérisation physicochimique des EPS

Diverses propriétés physicochimiques telles que l'humidité, les cendres, les graisses, les hydrates de carbone et les protéines de l'EPS extrait ont été déterminées. La teneur en hydrates de carbone a été déterminée par la méthode colorimétrique à l'acide phénol sulfurique (**Du Bois et al., 1956**). Une courbe standard a été obtenue en utilisant un étalon de glucose (Sigma Aldrich, USA) à 25, 50, 100, 150 et 200 µg/ml (**Figure 2**, Annexe). Les teneurs en humidité, en cendres, en protéines et en matières grasses de l'EPS ont été évaluées selon les méthodes de **AOAC International, (2000)**. La matière grasse brute a été déterminée par gravimétrie après extraction Soxhlet des échantillons séchés avec de l'hexane.

II.4. Etude de la composition en monosaccharides des EPS

II.4.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Afin d'évaluer la composition en monosaccharide de l'EPS, une quantité de 2 mg a été hydrolysée dans 250 µl d'acide trifluoroacétique (4 M) pendant 8 h à 100° C. L'EPS hydrolysé a été analysé par CCM. Le solvant de développement était un mélange chloroforme/acide acétique/eau (6 : 7 : 1). La révélation est obtenue par pulvérisation de 5% (v/v) de H₂SO₄ dans l'éthanol suivie d'une incubation et d'un séchage à l'étuve à 105° C pendant 10 min. Les étalons utilisés sont les suivants : glucose, galactose, fructose, arabinose, rhamnose, mannose et xylose à une concentration de 10 g/ml.

II.4.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Les compositions en monosaccharides ont été analysées par HPLC en utilisant une colonne Aminex HPX-C avec une phase mobile de 0,001 N H₂SO₄. L'échantillon a été hydrolysé en dissolvant 2 mg d'EPS dans 250 µl d'acide trifluoroacétique (TFA) 4 M à 100° C pendant 8 h. Ensuite, 20 µl de l'hydrolysat obtenu ont été ajoutés à 980 µl de H₂O et filtrés à travers un filtre de 0,45 µm de taille de pores. La composition en monosaccharides a été analysée à un débit de 0,6 ml/min et à 80° C. Le glucose, le fructose, le galactose, le mannose, l'arabinose, le rhamnose et le xylose ont été utilisés comme monosaccharides standards.

II.5. Analyse structurale des EPS

II.5.1. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de fourier (FT-IR)

Les groupes de structure des EPS extraits ont été identifiés à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge transformé de Fourier (spectromètre Nicolet FTIR) équipé d'un accessoire de réflexion totale atténuée (ATR) horizontal. 1 mg d'échantillon séché a été broyé avec de la poudre de bromure de potassium (KBr), puis pressé en pastilles de 1 mm pour la mesure FTIR de 4000 à 400 cm⁻¹. Les données ont été analysées par le logiciel de collecte de données OPUS 3.0 (Bruker, Ettlingen, Allemagne).

II.5.2. Analyse par spectroscopie ultraviolet-visible (UV-visible)

Les spectres UV-visible ont été déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre TU-1900 à 25° C dans la gamme de longueurs d'onde de 200-800 nm (**He et al., 2015**). L'échantillon d'EPS a été dissous dans de l'eau ultrapure jusqu'à une concentration finale de 0,05 %.

II.6. Détermination de l'activité antioxydante des EPS

II.6.1. Piégeage du radical DPPH

L'activité de piégeage du radical DPPH des EPS a été déterminée selon la méthode décrite par **Bersuder et al. (1998)**. Brièvement, la poudre d'EPS a été dissoute dans de l'eau ultrapure à différentes concentrations (0,5, 2, 4, 7 et 10 mg/ml). 500 µl de chaque échantillon ont été mélangés avec 375 µl d'éthanol à 99,5 % et 125 µl de DPPH (0,02 % dans l'éthanol). Ensuite, les mélanges ont été incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 1 h, et la réduction du radical DPPH a été mesurée à l'absorbance de 517 nm. L'hydroxytoluène butylé (BHT) a été utilisé comme contrôle positif. Le pourcentage de piégeage du radical DPPH a été calculé comme suit:

$$\text{Activité de piégeage du radical DPPH (\%)} = \frac{(A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon})}{A \text{ contrôle}} \times 100$$

Où A contrôle est l'absorbance de la réaction de contrôle et A échantillon est l'absorbance de l'EPS. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata.

II.6.2. Piégeage du radical ABTS+

La méthode de mesure de l'activité de neutralisation du radical ABTS est basée sur la procédure décrite par **Wang et al. (2017)** avec quelques modifications. Pour générer le radical ABTS, des solutions de 7 mM d'ABTS et de 2,4 mM de persulfate de potassium ont été mélangées en volumes égaux et laissées reposer dans l'obscurité à température ambiante pendant 16 h. Ensuite, 500 µL d'EPS de différentes concentrations (0,5, 2, 4, 7 et 10 mg/mL) ont été mélangés à 1 mL de la solution de radical ABTS et incubés pendant 10 min à température ambiante dans l'obscurité. L'absorbance de la solution résultante a été mesurée à 734 nm. Dans le groupe témoin, l'ABTS a été remplacé par un volume égal d'eau distillée, tandis que dans le groupe de contrôle, l'EPS a été remplacé par un volume égal d'eau distillée. Le BHT a été utilisé comme contrôle positif. L'activité de neutralisation du radical ABTS a été déterminée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Activité de piégeage du radical ABTS (\%)} = \frac{A_0 - (A_1 - A)}{A_0} \times 100$$

A est l'absorbance du blanc, A₀ est l'absorbance du témoin et A₁ est l'absorbance de l'échantillon d'EPS.

II.6.3. Mesure du pouvoir réducteur

L'activité du pouvoir réducteur a été déterminée en testant le pouvoir réducteur du fer selon la méthode rapportée par **Yildirim et al. (2001)**. Des échantillons d'EPS ont été dissous dans un tampon phosphate 0,2 mol/l (pH 6,6) à une série de concentrations (0-15 mg/ml). 2,5 ml de chaque échantillon ont été mélangés à 2,5 ml de 10 mg/ml de ferricyanure de potassium, et le mélange a été incubé à 50° C pendant 20 minutes. Ensuite, 2,5 ml d'acide trichloracétique à 100 mg/ml ont été ajoutés au mélange. Après centrifugation, 2,5 ml du surnageant ont été mélangés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de chlorure ferrique (0,1 %, p/v). Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 minutes et l'absorbance a été mesurée à 700 nm. Le BHT a été utilisé comme contrôle positif.

III. Analyse statistique

Les résultats présentés dans cette étude représentent la moyenne de trois répétitions. Les comparaisons statistiques entre les différents résultats obtenus ont été effectuées par analyse de la variance ANOVA à l'aide du logiciel XLSTAT 2009. Les données obtenues pour la résistance à l'acide et la tolérance aux sels biliaires, l'auto-agrégation, l'hydrophobicité et la capacité de formation de biofilm de tous les isolats BL ont été analysées par l'analyse en composantes principales (ACP) à l'aide du logiciel FactoMineR. L'analyse en composantes principales a été effectuée à l'aide de la version R 3.5.2 (www.r-project.org, R foundation for statistical computing). Tous les graphs ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 8.

Résultats et discussion

I. Isolement de bactéries lactiques

Vingt-et-un isolats ont été obtenus à partir de cinq fruits (figue de Barbarie, figue fraîche, mûre blanche, raisin et datte) récoltés dans les régions de Kabylie et de Ouargla (Algérie). Ces isolats ont été classés dans le groupe des BL sur la base de leur coloration Gram-positif et de l'absence de catalase. Après 24 heures de fermentation, 5 isolats ont été obtenus à partir de la purée de figues de barbarie, 10 isolats à partir de la purée de figues fraîches, 2 isolats à partir de la purée de mûres blanches, 1 isolat à partir de la purée de dattes et 3 isolats à partir de la purée de raisin.

II. Evaluation du potentiel probiotique

II.1. Screening des bactéries lactiques sur la base de leur résistance au pH acide et à la bile

La survie de tous les isolats BL a été évaluée sous pH acide et en présence de sels biliaries. Cependant, seules 10 souches ont été capables de tolérer à la fois le stress biliaire et le stress acide. Les souches ont été isolées à partir de figues (F2, F3, F8), de figues de Barbarie (F13, FB13, FB23 et FB24), de dattes (souche D21), de mûres (souches M1 et M2) (**Figure 1**).

La résistance à l'acidité dans un bouillon MRS (pH 2) contenant 3 mg.ml⁻¹ de pepsine après 2 heures d'incubation à 37°C a montré un taux de survie compris entre 70,653 ± 0,592 % et 98,71 ± 1,27 %, ce qui était similaire pour tous les isolats. Cependant, lorsque le temps d'incubation a été porté à 4 heures, les taux de survie de ces isolats ont diminué. L'isolat D21 avait un taux de survie de 94,72 ± 1,554 %, suivi par les isolats F8, M1, FB23 et F1. En ce qui concerne la résistance à la bile, des taux de survie supérieurs à 50 % ont été enregistrés pour les isolats F8, FB23, FB24, FB13 et D21, avec un taux de survie maximal de 58,803 ± 0,179 % pour l'isolat D21. Les isolats les moins résistants étaient FB3 et M1 avec des taux de survie de 25,55 ± 3,156% et 25,337 ± 0,299%, respectivement (**Figure 1**).

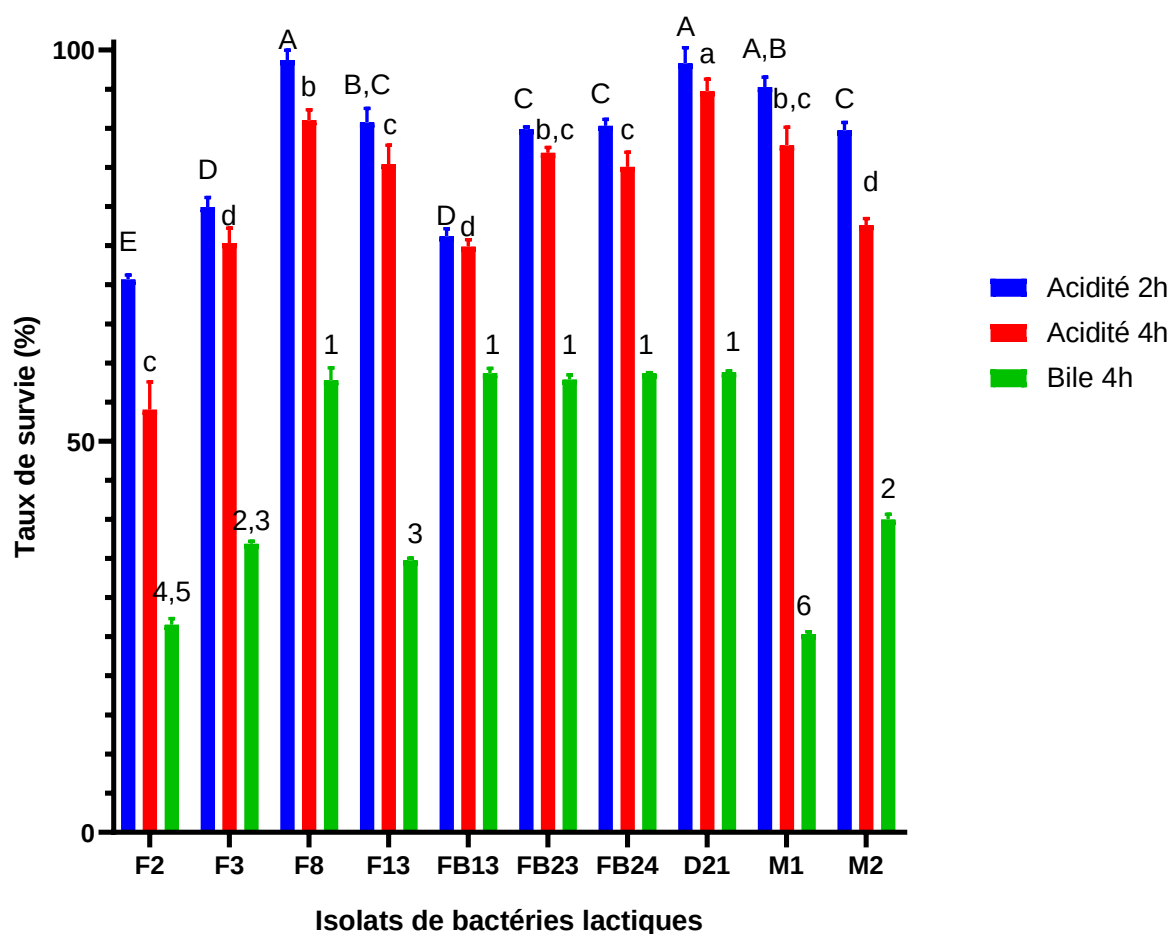


Figure 1. Pourcentage de survie des isolats de bactéries lactiques en conditions acides ou en présence de sels biliaires. Chaque essai a été réalisé en trois exemplaires. Les moyennes et les barres d'erreurs standard sont présentées. Les moyennes à l'intérieur d'une colonne avec des lettres différentes (nombre, minuscules et majuscules) sont significativement différentes ($p < 0,05$) en utilisant l'ANOVA unidirectionnelle avec le test de Tukey pour les comparaisons par paires.

Une bactérie doit présenter plusieurs caractéristiques spécifiques afin d'être considérée comme un probiotique potentiel. Elle doit être capable de survivre dans l'environnement à faible pH du tractus gastro-intestinal et d'atteindre le site d'action dans un état physiologique viable (Padmavathi et al., 2018; Zheng et al., 2020). Il est bien connu que le liquide gastrique est très acide ; le pH de l'estomac fluctue entre 2 et 3 et peut être aussi bas que 1,5 pendant le jeûne (Dunne et al., 2001; Le et Yang, 2018). En revanche, la tolérance aux sels biliaires est considérée comme une condition nécessaire à la colonisation bactérienne et à l'activité métabolique dans l'intestin grêle de l'hôte, qui est faiblement basique avec une concentration de 0,3 % de sels biliaires (Elbanna et al., 2018).

La résistance aux conditions gastro-intestinales varie selon le genre et l'espèce, les Lactobacilles sont généralement résistants (**de Melo Pereira et al., 2018**). Les souches étudiées, nommées F2, F3, F8, F13, FB13, FB23, FB24, D21, M1 et M2, ont montré un niveau élevé de résistance à l'acide et à la bile. La résistance des souches de *L. plantarum* à un pH acide peut être due à plusieurs mécanismes tels que la pompe à protons dépendante de la force motrice des protons (PMF), qui est le système de tolérance à l'acide le plus important dans le maintien de l'homéostasie du pH (**Wang et al., 2018; Guan et Liu, 2020**). Des résultats similaires ont été enregistrés par des souches de *L. plantarum* d'origine végétale survivant à un pH 2 à un taux important après 2h d'exposition (**Barache et al., 2020**). De même, **Vitali et al. (2012)** ont rapporté que les bactéries lactiques isolées à partir de fruits et légumes crus qui ont montré la meilleure résistance à l'acide appartiennent à l'espèce *L. plantarum*. Tout comme la résistance aux faibles pH, le taux de survie à la bile a révélé que toutes les souches de *L. plantarum* étaient capables de survivre à la présence de 0,3 % de sels biliaires, mais à des taux différents qui dépendent de la souche.

II.2. Identification moléculaire des bactéries lactiques

Les 10 isolats ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette identification a révélé la présence d'une seule espèce dominante, à savoir *L. plantarum*. L'identification de ces souches a été confirmée par le séquençage de l'ADNr 16S, qui a corroboré les identifications par spectrométrie de masse. Toutes les souches utilisées dans cette étude ont été déposées dans GenBank sous des numéros d'accès (**Tableau 4**). Ces dépôts garantissent que les souches sont accessibles au public pour d'autres recherches et validations.

Tableau 4. Numéro d'accèsion des souches de *L.plantarum* isolées des fruits

Code de la souche	Numéro d'accèsion
F2	PP382194
F3	PP382838
F8	PP383758
F13	PP383941
FB13	PP383940
FB23	PP383982
FB24	PP384000
D21	PP384145
M1	PP384174
M2	PP384178

Un arbre phylogénétique a été construit sur la base de leurs séquences d'ADNr 16S comparées à des espèces apparentées obtenues à partir de la base de données NCBI et générées à l'aide du logiciel MEGA XI (**figure 2**). Ces dix souches ont ensuite été sélectionnées et analysées pour leurs propriétés probiotiques.

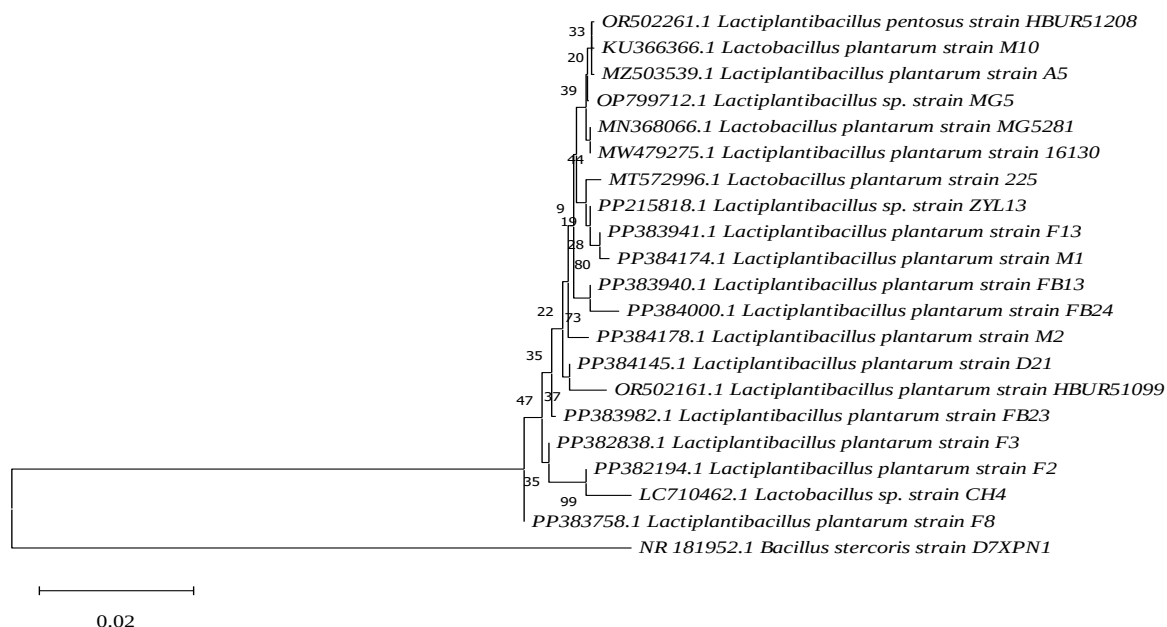


Figure 2. Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ADNr 16S des isolats et des souches standard apparentées, généré par le logiciel MEGA XI.

La spectrométrie de masse (MALDI-TOF) est largement appliquée pour l'identification et le typage des micro-organismes (**Dušková et al., 2012**). De nombreuses études ont démontré la fiabilité de cette technique pour l'identification des espèces bactériennes (**Nacef et al., 2017; Kim et al., 2022; Ammar et al., 2023**).

Les bactéries lactiques sont connues pour coloniser les fruits crus. Les genres BL les plus couramment isolés sont *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Lactococcus* (**Felis et Dellaglio, 2007; Sánchez et al., 2019**). A noter que l'espèce *L. plantarum* est la souche la plus fréquemment retrouvé dans la flore bactérienne des fruits (**Sánchez et al., 2019**).

II.3. Criblage des souches sur la base de leurs propriétés physiologiques et fonctionnelles

II.3.1. Auto-agrégation et hydrophobicité de la surface cellulaire

Les 10 souches de *Lactobacillus* sélectionnées ont montré les pourcentages d'auto-agrégation les plus élevés après 4 heures d'incubation (**Figure 3**). Les résultats montrent que les pourcentages d'auto-agrégation obtenus varient de $26,533 \pm 2,059$ % à $82,1 \pm 0,755$ %. Le pourcentage le plus élevé a été enregistré par la souche *L. plantarum* M1 isolée du mûrier blanc,

avec un taux de $82,1 \pm 0,755$ % après 4 h d'incubation, ce qui était significativement plus élevé ($p < 0,05$) que pour les autres souches. Comme pour les autres souches, la souche *L. plantarum* D21 a montré un taux d'auto-agrégation de $71,733 \pm 1,986$ %.

Dans cette étude, l'hydrophobicité de la surface cellulaire a été estimée en utilisant le xylène, un solvant apolaire, sur des cellules vivantes intactes (**Figure 4**) les pourcentages d'hydrophobicité des souches varient de $52,5 \pm 4,229$ % à $89,567 \pm 1,358$ %.

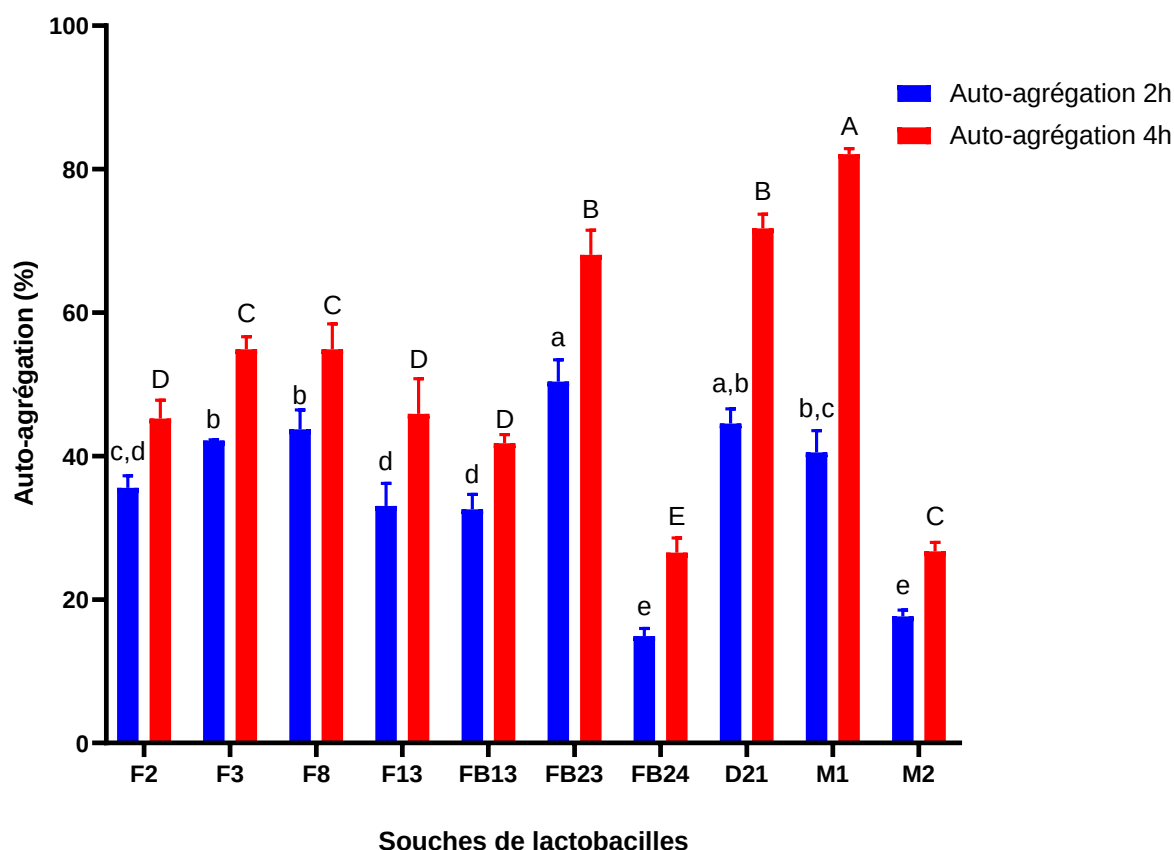


Figure 3. Pourcentage d'auto-agrégation après 2 et 4 heures d'incubation. Chaque essai a été réalisé en trois exemplaires. Les moyennes et les barres d'erreur standard sont présentées. Les moyennes à l'intérieur d'une colonne avec des lettres différentes (minuscules et majuscules) sont significativement différentes ($p < 0,05$) en utilisant l'ANOVA unidirectionnelle avec le test de Tukey pour les comparaisons par paires.

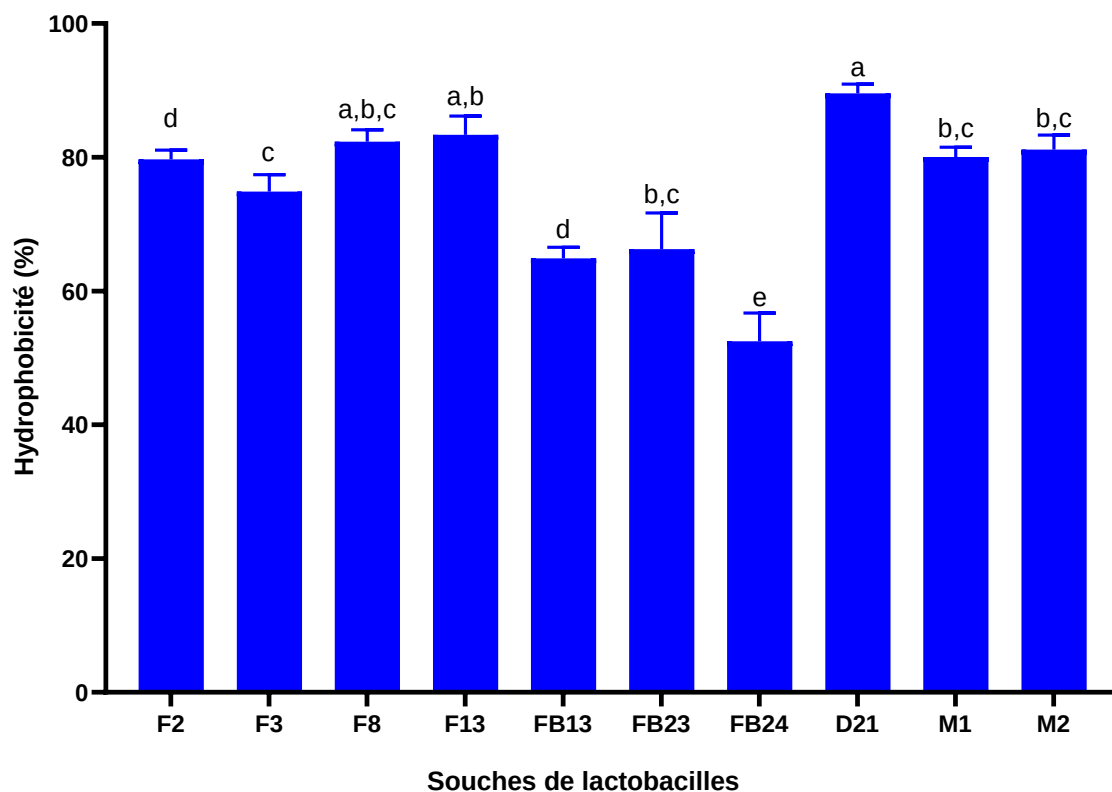


Figure 4. Pourcentage d'hydrophobicité de la surface cellulaire des souches de *L. plantarum*. Chaque essai a été réalisé en trois exemplaires. Les moyennes et les barres d'erreurs standard sont présentées. Les moyennes à l'intérieur d'une colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) en utilisant l'ANOVA unidirectionnelle avec le test de Tukey pour les comparaisons par paires.

L'auto-agrégation et les propriétés hydrophobes de la surface cellulaire ont été associées à l'adhésion. En effet, il est connu que ces propriétés sont des critères nécessaires pour qu'un probiotique puisse mieux se lier aux cellules épithéliales et ainsi coloniser le tractus gastro-intestinal (**Pan et al., 2017; Darmastuti et al., 2021**). Nos résultats sont similaires à ceux de **Vanitha et al. (2023)** qui ont rapporté que *L. plantarum* MYSN7 a montré un pourcentage d'auto-agrégation de 80,62% après 4h d'incubation. En termes d'hydrophobicité, **Buntin et al. (2017)** ont rapporté que *L. plantarum* CIF17A4 a montré un pourcentage élevé de $80,9 \pm 6,8\%$ avec le xylène.

II.3.2. Formation de biofilm sur des microplaques en polystyrène

Les résultats présentés dans la **figure 5** démontrent la capacité de toutes les souches (10) à adhérer et à former des biofilms. L'absorbance mesurée à 630 nm varie de $0,488 \pm 0,094$ à $0,927$

$\pm 0,084$, ce qui montre que 9 des 10 souches de *L. plantarum* ont une capacité d'adhésion élevée selon la classification de **Stepanovic et al. (2000)** avec une capacité d'adhésion maximale de $0,927 \pm 0,084$ pour *L. plantarum* FB23, suivie par la souche *L. plantarum* D21 avec une absorbance de $0,916 \pm 0,167$. Cependant, la souche *L. plantarum* F2 a montré une capacité d'adhésion modérée avec une absorbance de $0,488 \pm 0,094$.

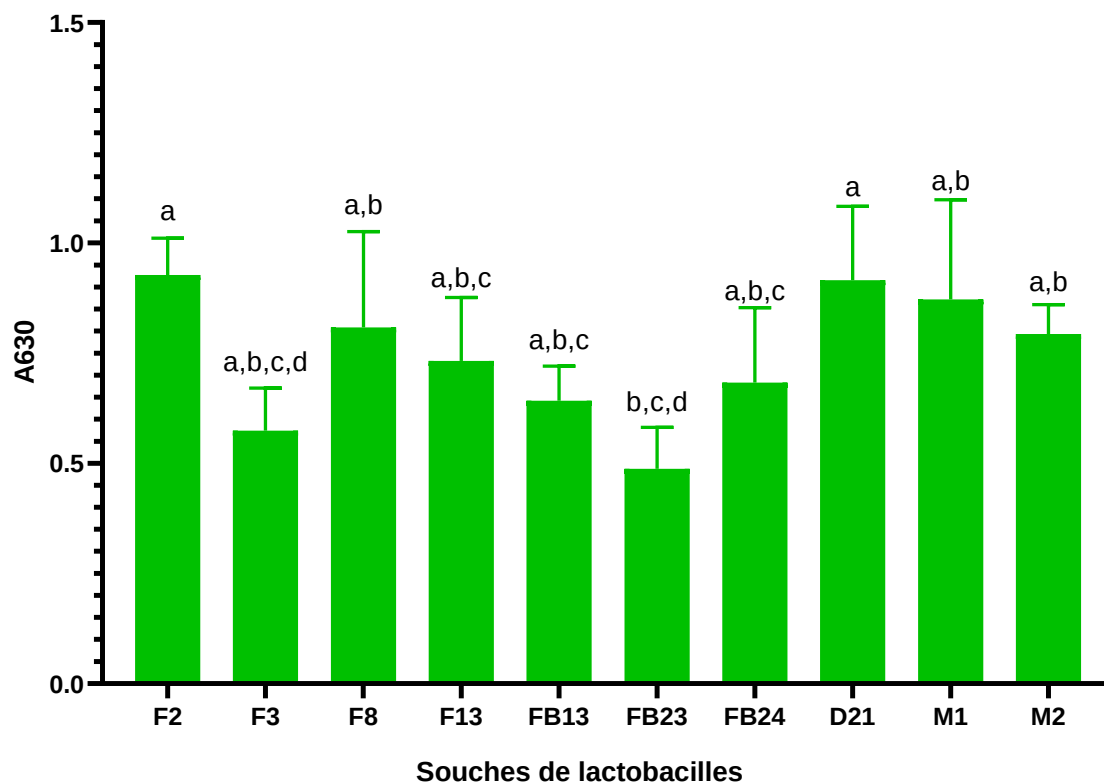


Figure 5. Adhésion de *L. plantarum* à des microplaques de polystyrène à 96 puits. Chaque essai a été réalisé en trois exemplaires. Les moyennes et les barres d'erreurs standard sont présentées. Les moyennes à l'intérieur d'une colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) en utilisant l'ANOVA unidirectionnelle avec le test de Tukey pour les comparaisons par paires.

II.3.3. Traitement des résultats par analyse en composante principale (ACP)

Les résultats de l'ACP réalisée sur les dix souches de lactobacilles à 7 variables montrent que 98,98% de la variation totale se répartit sur 5 dimensions. Les deux dimensions les plus représentatives sont Dim 1 (55,44%) et Dim 2 (24,42%) (**Figure 6A**).

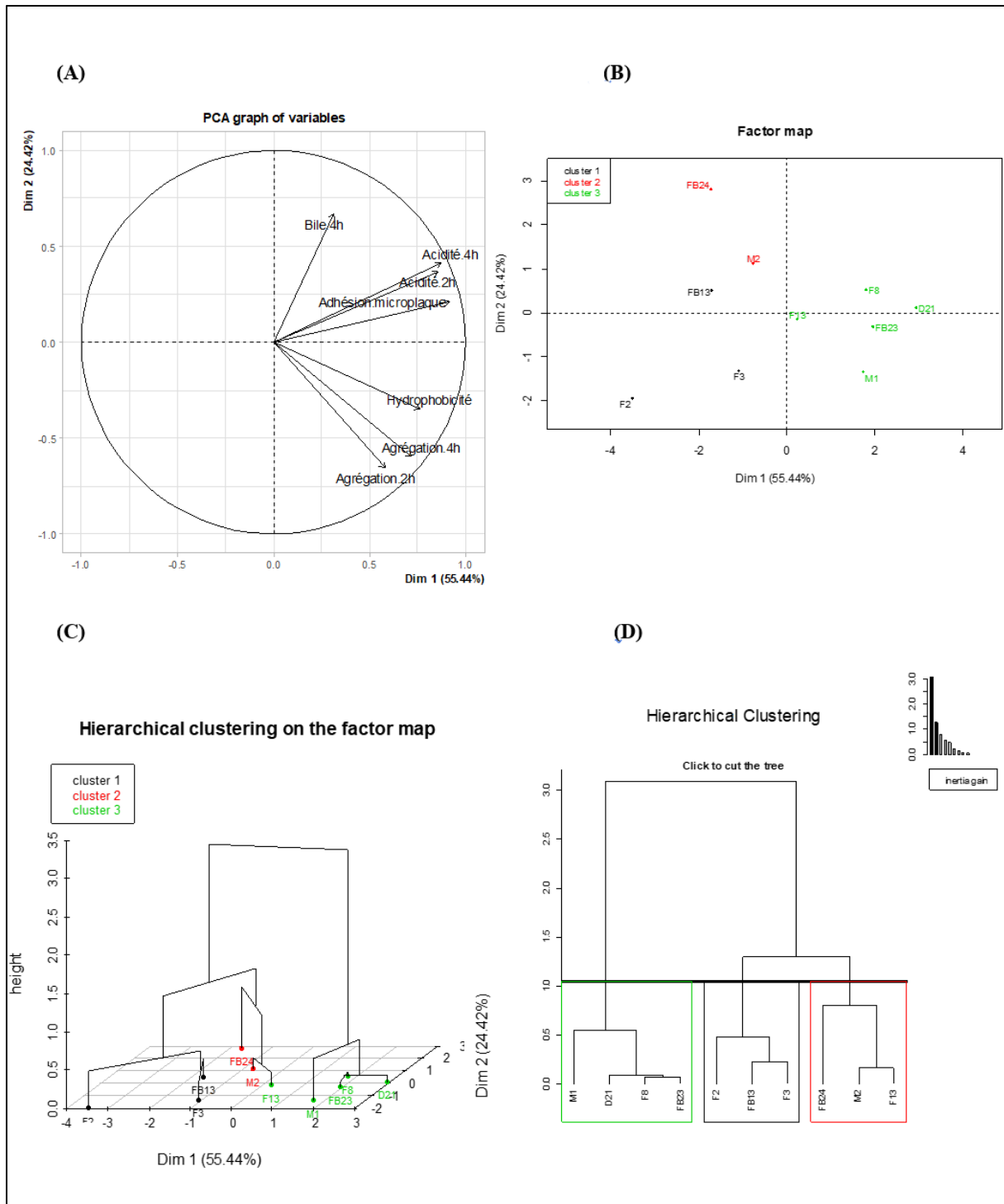


Figure 6. Analyse en composantes principales (ACP) basée sur les propriétés probiotiques des souches de *L. plantarum* sélectionnées, réalisée sur FactoMineR. **A.** Projection des 7 variables dans l'espace bidimensionnel de Dim 1 et Dim 2. 1) Résistance au pH acide après 2h, 2) Résistance au pH acide après 4h, 3) Résistance à la bile, 4) Hydrophobicité de surface, 5) Auto-agrégation après 2h, 6) Auto-agrégation après 4h, 7) Adhésion à la microplaque **B.** Projection des dix souches de *L. plantarum* dans l'espace bidimensionnel de Dim 1 et Dim 2 **C.** Regroupement hiérarchique des souches de *L. plantarum* dans un espace tridimensionnel **D.**

Classification hiérarchique des dix souches de *L. plantarum* en fonction de leurs propriétés probiotiques testées.

Les variables ayant la contribution la plus significative à la construction de la première dimension (Dim 1) et ayant des coefficients représentatifs de variables de meilleure qualité (Cos 2) et qui sont fortement et positivement corrélées avec Dim 1 sont l'adhérence sur les microplaques, l'hydrophobie et l'acidité (2h et 4h). En revanche, des variables comme la bile et l'auto-agrégation (2h et 4h) contribuent à créer le Dim 2. La méthode de classification hiérarchique (HCPC) a été utilisée pour regrouper les souches apparentées de telle sorte qu'un critère probiotique aboutisse au même groupe. Les individus sont répartis en trois groupes (**figure 4C**). Le premier groupe est composé de 3 souches (F2, F3 et FB13). Ces souches ont les scores les plus faibles pour l'adhésion aux microplaques et la résistance à l'acidité et à la bile. D'autre part, le deuxième groupe contient deux souches (FB24 et M2) et enregistre les taux d'auto-agrégation les plus faibles. Par contre, le troisième cluster était composé de cinq souches de *L. plantarum* (F8, F13, FB23, D21 et M1) qui, en plus d'enregistrer les meilleurs taux de résistance à l'acidité et à la bile, présentaient une hydrophobie de surface, une adhésion aux microplaques et une auto-agrégation significativement ($p < 0,05$) plus élevées. L'analyse PCA nous a donc permis de sélectionner les cinq souches (F8, F13, FB23, D21 et M1) pour la suite des travaux.

La capacité d'adhésion de nos souches est similaire à celle des souches *L. plantarum* Lp81 et Lp90 isolées de la pulpe de cupuaçu (**das Neves Selis et al., 2021**). Les probiotiques ayant une forte capacité à former des biofilms peuvent empêcher les bactéries nocives de coloniser l'épithélium intestinal (**Aoudia et al., 2016**). Il a été rapporté que la maturation du biofilm dépend fortement des capacités d'auto-agrégation des bactéries probiotiques, qui aident à la formation de micro-colonies, qui sécrètent des exopolysaccharides et provoquent la maturation du biofilm (**Kaur et al., 2018**).

Pour améliorer l'efficacité du contrôle, certaines études ont utilisé des outils informatiques tels que l'analyse multivariée en composantes principales (ACP), qui doit être introduite dans une matrice de données multivariées (**Bhushan et al., 2021**). De même, l'utilisation de l'ACP pour cribler les bactéries lactiques pour la résistance aux conditions gastro-intestinales a été rapportée (**Sharma et al., 2017; Barache et al., 2020**). D'autres études ont rapporté l'utilisation de l'ACP pour cribler les bactéries lactiques sur la base des résultats de l'hydrophobicité et de l'auto-agrégation (**Ait Seddik et al., 2017**). Dans notre étude, nous avons choisi de combiner les résultats de la résistance aux conditions gastro-intestinales avec ceux des propriétés de surface, de ce fait l'hydrophobie, l'auto-agrégation et l'adhésion aux microplaques.

II.3.4. Adhésion sur cellules épithéliales Caco-2

Les 5 souches sélectionnées après l'analyse ACP ont été testées pour leur capacité à adhérer aux cellules épithéliales intestinales humaines. Dans la présente étude, l'adhésion a été évaluée après 2 heures d'incubation à un ratio de 1:10 (Caco-2 : lactobacilles). Les taux d'adhésion des 5 souches sont présentés dans la **figure 7**. Les taux d'adhésion vont de $2,467 \pm 0,454$ % à $3,633 \pm 0,621$ % pour la souche *L. plantarum* D21, qui présente également des taux d'auto-agrégation et d'hydrophobicité particulièrement élevés.

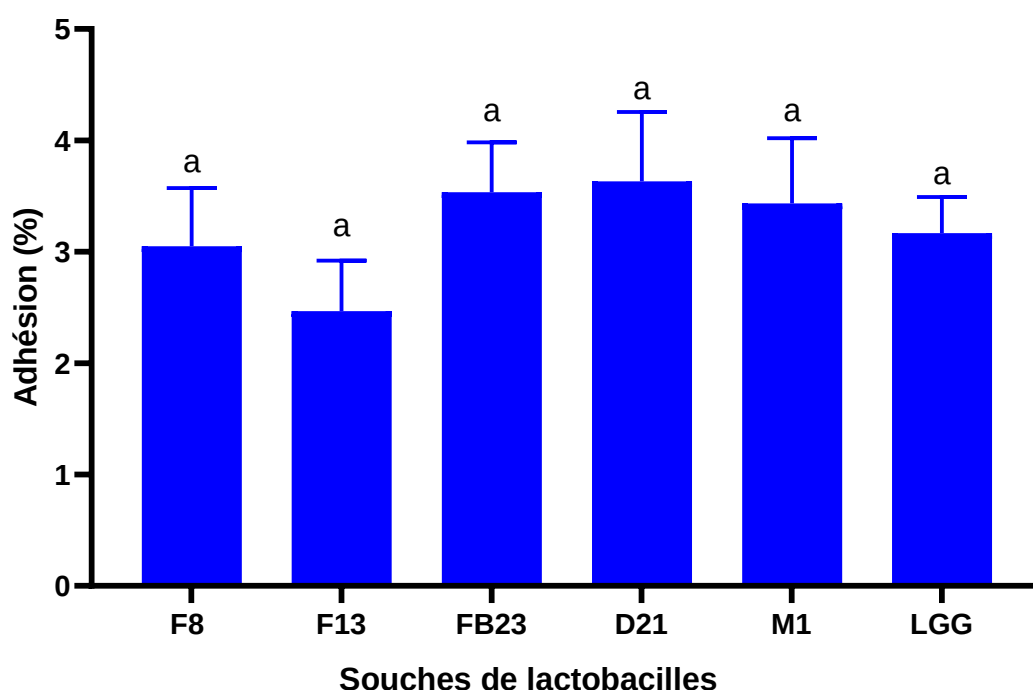


Figure 7. Pourcentage d'adhésion des souches sélectionnées aux cellules Caco-2. Les données sont les moyennes de trois expériences indépendantes. Les colonnes qui ne partagent pas les mêmes lettres sont significativement différentes ($p < 0,05$) en utilisant l'ANOVA unidirectionnelle avec le test de Tukey pour les comparaisons par paires.

Néanmoins, ces deux facteurs ne reflètent pas fortement une bonne adhésion (**Wang et al., 2018**). Concernant l'évaluation de l'adhésion sur microplaque de polystyrène, ce test a révélé que la souche la plus adhérente sur microplaque n'est pas systématiquement la plus adhérente sur les cellules Caco-2. En effet, **Haddaji et al. (2015)** a indiqué que l'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques dépend étroitement de la surface cellulaire et de la nature de la surface d'adhésion. En effet, il existe un lien entre les caractéristiques de surface des lactobacilles et leur capacité d'adhésion. De nombreux éléments de surface, tels que les polysaccharides, les

protéines et les acides (lipo) téichoïques, sont impliqués dans l'adhésion aux cellules épithéliales (Yadav et al., 2017).

II.4. Activité hémolytique et cytotoxicité sur cellules Caco-2

L'innocuité des 5 souches de *L. plantarum* a été évaluée par l'étude de leur effet cytotoxique sur les cellules épithéliales Caco-2 et leur activité hémolytique.

Les cinq souches de *L. plantarum* testées étaient dépourvues de toute activité hémolytique. En outre, les résultats de la **figure 8**, exprimés en taux de mortalité des cellules Caco-2 en présence de souches de *L. plantarum* par rapport au contrôle (cellules Caco-2 seules), ont montré que les taux de mortalité variaient de $23,687 \pm 7,062$ % à $38,093 \pm 13,731$ %. Le taux de mortalité le plus faible a été attribué à la souche *L. plantarum* F8, suivie par la souche *L. plantarum* D21 avec un taux de mortalité de $(28,635 \pm 2,74$ %).

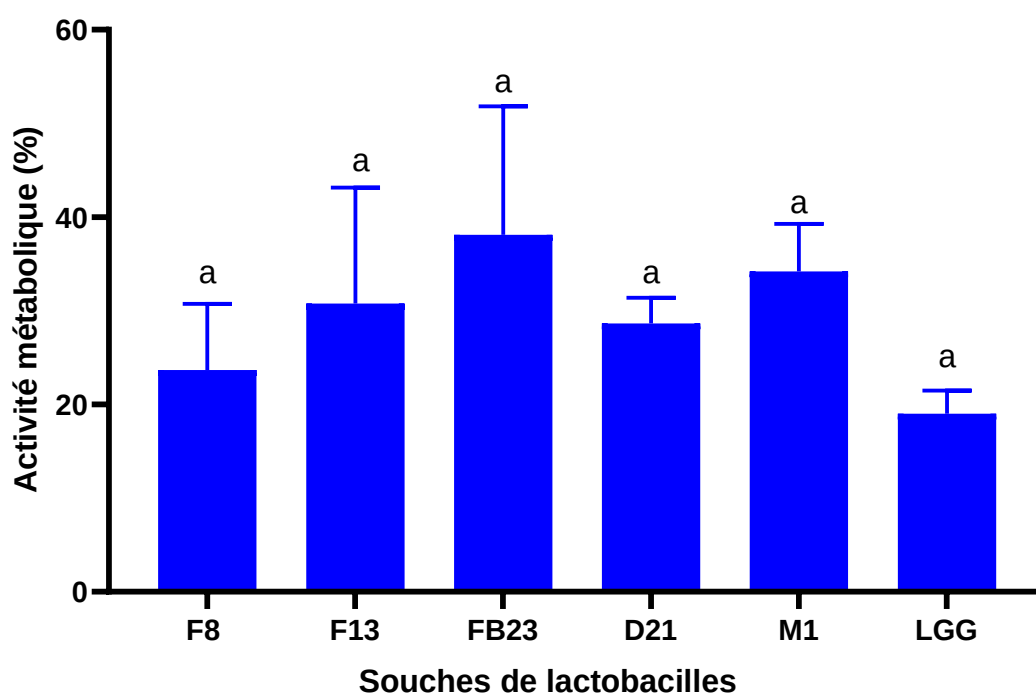


Figure 8. Effet des souches sélectionnées sur l'activité métabolique des cellules Caco-2. Les données sont les moyennes de trois expériences indépendantes. Les colonnes qui ne partagent pas les mêmes lettres sont significativement différentes ($p < 0,05$) en utilisant l'ANOVA unidirectionnelle avec le test de Tukey pour les comparaisons par paires.

Il est important que les souches microbiennes utilisées comme probiotiques soient sans danger pour l'hôte, conformément aux lignes directrices de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et de l'Organisation mondiale de la santé (FAO/WHO 2006). Dans l'ensemble, les souches de lactobacilles sont considérées comme des bactéries sûres. Selon

des rapports récents, il n'y a pas eu d'effet cytotoxique sur les cellules Caco-2 au cours d'études *in vitro*, ce qui indique l'innocuité des lactobacilles (Belguesmia et al., 2016; Yadav et al., 2017). Par ailleurs, le choix et l'utilisation de souches dépourvues d'activité hémolytique en tant que probiotiques illustrent leurs caractéristiques non virulentes. L'activité hémolytique des 5 souches de lactobacilles sélectionnées a été étudiée sur gélose au sang et aucune d'entre elles n'a montré d'activité hémolytique. Des résultats similaires ont été publiés, montrant que la majorité des souches BL ne sont pas hémolytiques (Oyewole et al., 2018).

II.5. Mise en évidence des mécanismes antagonistes des souches

II.5.1. Activité antibactérienne

Les cinq souches testées ont montré une activité inhibitrice contre les deux souches pathogènes cibles *E. coli* ATCC 8739 et *S. aureus* ATCC 6538 en utilisant la méthode des spots. En outre, leurs surnageants de culture ont été testés à l'aide de la technique de diffusion par puits avant et après neutralisation. Le **tableau 5** présente les résultats de l'activité antibactérienne, indiquant que les surnageants natifs (pH 3,37-5,12) étaient actifs. Les diamètres des zones d'inhibition autour des colonies des souches de *L. plantarum* varient de $11,33 \pm 1,15$ à $50,33 \pm 0,58$ mm (méthode des spots) et de $12,0 \pm 0$ à $15,33 \pm 1,15$ mm pour les surnageants acellulaires non neutralisés (méthode de diffusion en puits). Cette activité a complètement disparu après la neutralisation de ces surnageants (pH=6,5).

Tableau 5. Diamètre des zones d'inhibition des tests d'activité antibactérienne des souches de *L. plantarum*. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type $n = 3$, les moyennes avec des lettres minuscules et majuscules différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) selon le test de Tukey.

Souche	Diamètre des zones d'inhibition (mm)				pH du surnageant
	Méthode des spots		Méthode des puits		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
F8	40,0 ± 2,0 ^c	33,33 ± 0,58 ^c	12,0 ± 0 ^a	13,33 ± 1,15 ^a	3,47
F13	50,33 ± 0,57 ^e	44,67 ± 1,15 ^e	12,67 ± 2,31 ^a	15,33 ± 1,15 ^a	3,12
FB23	45,0 ± 1,0 ^d	36,0 ± 2,0 ^d	15,33 ± 1,15 ^a	14,0 ± 2,0 ^a	3,49

D21	$35,0 \pm 1,0^b$	$24,67 \pm 0,58^b$	$14,67 \pm 1,15^a$	$13,33 \pm 1,15^a$	3,65
M1	$20,0 \pm 0^a$	$11,33 \pm 1,15^a$	$12,67 \pm 1,15^a$	$14,67 \pm 0,58^a$	3,37

Les bactéries lactiques, en particulier les lactobacilles, sont connues pour avoir un effet antagoniste sur les bactéries pathogènes et d'altération. La recherche a démontré que les bactéries lactiques utilisent l'inhibition compétitive et le métabolisme de produits extracellulaires bactériostatiques pour empêcher la croissance des bactéries pathogènes (**Fan et al., 2022**). Cette activité antibactérienne est due à la production d'acides organiques (acide lactique, citrique, acétique, fumarique et malique), de peroxyde d'hydrogène, de dioxyde de carbone, de diacétyle, d'éthanol, d'acétoïne et de bactériocines (**Agriopoulou et al., 2020; Rocchetti et al., 2021**). Le test des spots révèle une activité antimicrobienne impliquant divers mécanismes, notamment la compétition nutritionnelle et la synthèse de différents métabolites antimicrobiens. Le test des puits, quant à lui, révèle l'implication de ces derniers et permet de mieux caractériser les molécules impliquées dans l'antagonisme en effectuant différents traitements sur les surnageants actifs (neutralisation, traitement à la catalase ou aux protéases). Dans cette optique, les surnageants de culture natifs et neutralisés ont été examinés afin de vérifier si l'activité antibactérienne observée chez les cinq souches à l'aide du test de spots était uniquement attribuable à l'effet d'un pH acide ou à une combinaison de plusieurs molécules. Comme aucune activité n'est observée après neutralisation du pH de surnageants, les résultats obtenus indiquent que le mécanisme principal de l'antagonisme observé chez les cinq souches est la production d'acides organiques. Cependant, il est à noter que ces dernières pourraient manifester une activité après concentration du surnageant de culture, ce qui n'a pas été vérifié dans cette étude. Ainsi, la mesure de la quantité d'acide lactique (le principal sous-produit de la fermentation lactique) produite par chacune des cinq souches s'est avérée importante.

II.5.2. Quantification de l'acide lactique

Le test antimicrobien a montré qu'il n'y avait pas d'inhibition avec le surnageant acellulaire neutralisé, ce qui suggère que l'activité antibactérienne est principalement due à l'abaissement du pH et probablement à la production élevée d'acide lactique. En effet, la quantification de l'acide lactique (**tableau 6**) a montré que la souche *L. plantarum* F8 produisait une grande quantité d'acide lactique, atteignant $20,029 \pm 0,432 \text{ g.l}^{-1}$ après 24 heures d'incubation à 37°C dans un bouillon MRS (Conda, Madrid, Espagne). En revanche, la production la plus faible a

été enregistrée par la souche *L. plantarum* M1 ($8,782 \pm 0,01 \text{ g.l}^{-1}$) après 24 heures d'incubation à 37°C.

Tableau 6. Production d'acide lactique par les souches de *L. plantarum*. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type $n = 3$, les moyennes avec des lettres minuscules et majuscules différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) selon le test de Tukey.

Souche	Quantification de l'acide lactique (g.l^{-1})		
	8h	18h	24h
F8	$12,88 \pm 0,33^D$	$13,18 \pm 0,03^B$	$20,03 \pm 0,43^C$
F13	$0,26 \pm 0,01^A$	$12,44 \pm 0,52^B$	$14,48 \pm 0,12^B$
FB23	$1,12 \pm 0,01^B$	$12,54 \pm 0,44^B$	$14,62 \pm 0,07^B$
D21	$1,77 \pm 0,11^C$	$7,35 \pm 0,003^A$	$9,11 \pm 0,01^A$
M1	$1,77 \pm 0,03^C$	$7,28 \pm 0,09^A$	$8,78 \pm 0,01^A$

Au niveau moléculaire, les acides organiques abaissent le pH de l'environnement, ce qui entraîne l'inhibition de divers micro-organismes. La forme non dissociée de l'acide organique diffuse à travers la membrane cellulaire et se dissocie en anions et protons, entraînant une diminution du pH interne, ce qui a pour conséquence de perturber la force motrice des protons, provoquant la bactériostase et finalement la mort cellulaire (**Saelim et al., 2017**). L'activité antibactérienne de ces souches, notamment via la production d'acides organiques, en fait des candidats viables pour la biopréservation des aliments. En effet, ces souches pourraient être incorporées dans des matrices alimentaires compatibles afin d'améliorer la durée de conservation et la sécurité de ces produits en inhibant la croissance des bactéries d'altération et pathogènes comme démontré par l'étude menée par **Mohellebi et al. (2024)** qui indique l'utilisation d'une souche *L. plantarum* OV50 dans la bioconservation de sardines fraîches.

II.5.3. Séquençage du génome complet et recherche des bactériocines

La recherche de gènes codant pour des bactériocines, effectuée par le logiciel BAGEL4, a permis de localiser des gènes codant pour plusieurs bactériocines connues dans la souche F13. Cette souche possède plusieurs gènes dans la même région d'intérêt, codant pour pas moins de six plantaricines, dont les plantaricines E, F, A, N, J et K (**Figure 9a**). De manière surprenante, le logiciel a également permis d'identifier des gènes supplémentaires codant pour la sous-unité lacticine F lafX, l'entéroline A, l'entéroline P et l'entérolisine A (**Figure 9b,c,d**), que l'on

retrouve généralement chez d'autres espèces de bactéries lactiques, en particulier celles appartenant aux genres *Enterococcus*.

Dans la plupart des cas, des gènes codant pour l'immunité et le transport de ces bactériocines ont également été identifiés. L'analyse du génome des autres souches de lactobacilles isolées dans cette étude n'a pas permis d'identifier des gènes potentiels codant pour des bactériocines. Quant à l'analyse du logiciel AntiSmash, aucun autre composé antimicrobien potentiel n'a été trouvé dans l'ensemble du génome des souches. Il convient de noter que la souche M1 n'a pas été retenue pour cette analyse en raison de ses performances moindres lors des expériences précédentes notamment lors de l'évaluation de l'antagonisme des souches.

De plus, le diagramme OrthoVenn obtenu a permis de distinguer les gènes de base orthologues communs aux souches D21, F8, F13 et FB23, avec 1739 éléments communs (**Figure 9e**). Il est intéressant de noter que les souches D21, F8 et FB23 sont très similaires avec un faible niveau d'éléments spécifiques, contrairement à la souche F13 qui possède 356 éléments spécifiques, impliqués dans divers processus biologiques, tels que la liaison de lipides ou de protéines.



e

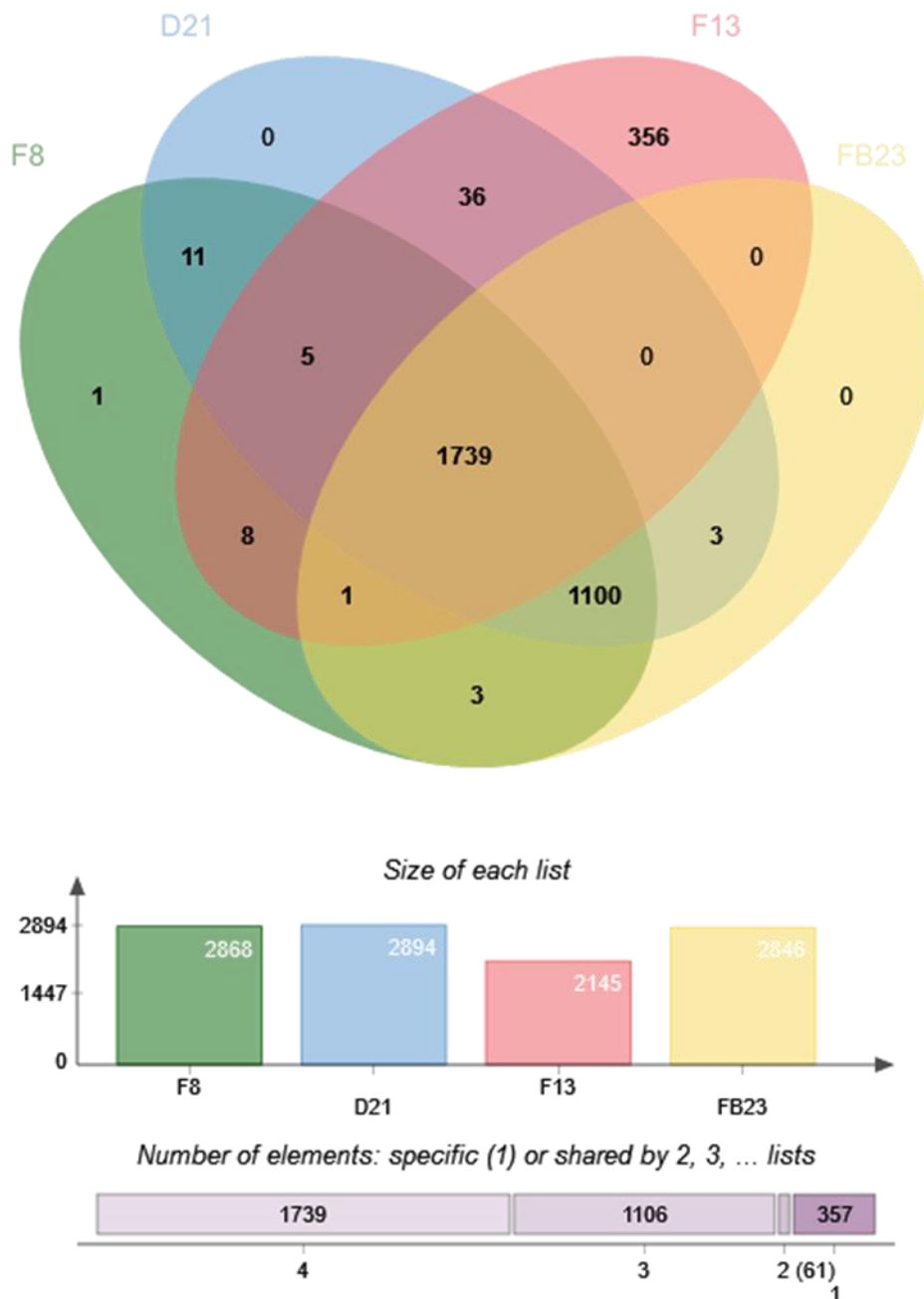


Figure 9. Organisation génétique des clusters de gènes de bactériocines dans la souche *L. plantarum* F13 à l'aide du serveur web BAGEL4, permettant l'identification des contigs hébergeant les gènes des plantaricines E, F, A, N, J et K **A.** entérocyne A et lacticine F **B.** entérocyne P **C.** entérolysine A **D.** gènes. **E.** Diagramme de Venn montrant les gènes ou pseudogènes codant pour des protéines communes et uniques dans les génomes des souches *L. plantarum* D21 (bleu), F8 (vert), F13 (rouge) et FB23 (jaune).

L'analyse du génome, en particulier celui de la souche F13, à l'aide du logiciel Bagel 4, nous a permis de localiser des gènes codant potentiellement pour des bactériocines connues sous le nom de plantaricine, entéroline et entérolysine. L'absence d'activité détectable après neutralisation du pH du surnageant suggère que la production ou l'activité de ces bactériocines pourrait être pH dépendante, consolidant ainsi les résultats rapportés par **Zacharof et Lovitt (2012)** et **Madi-Moussa et al. (2021)**

II.6. Activité antioxydante des souches

Le potentiel antioxydant des surnageants de culture des souches de *L. plantarum* a été étudié à l'aide des méthodes DPPH et ABTS⁺. Les surnageants de culture des cinq souches de *L. plantarum* ont montré des capacités antioxydantes élevées. Les résultats sont présentés dans la **figure 10**. Les taux d'activité de piégeage du radical ABTS⁺ varient de $32,9 \pm 2,38$ % (D21) à $50,06 \pm 6,47$ % (FB23). Pour la méthode DPPH, les taux d'activité varient de $37,16 \pm 1,37$ % (M1) à $78,93 \pm 1,18$ % (F8). L'activité antioxydante a également été évaluée sur des cellules intactes à l'aide de la méthode DPPH (**figure 10**). La majorité des souches ont montré des pourcentages de piégeage des radicaux DPPH inférieurs à ceux obtenus avec le surnageant de culture. Les taux d'activité étaient compris entre $19,8 \pm 0,17$ % (FB23) et $40,3 \pm 2,59$ (F13).

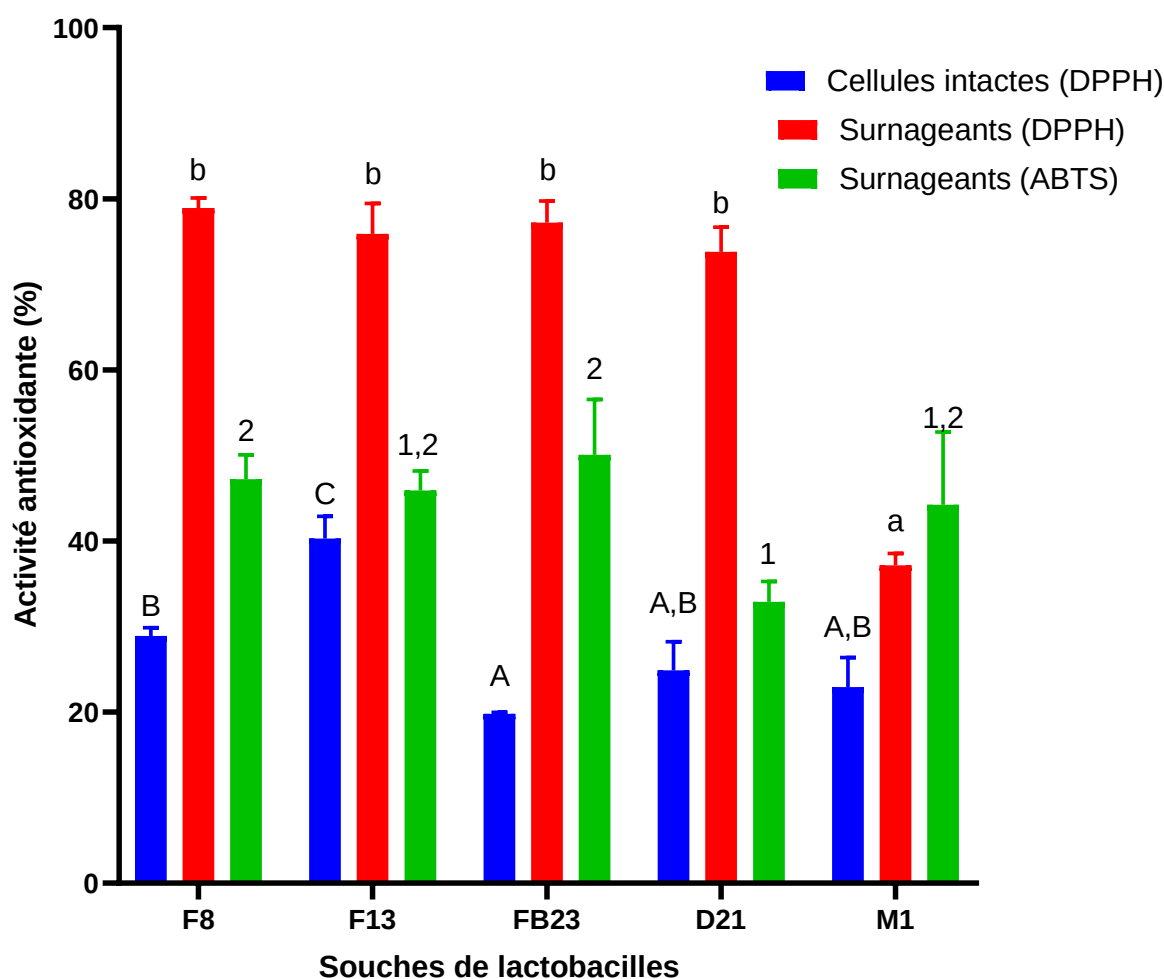


Figure 10. Activités antioxydantes des surnageants de culture et des cellules intactes des souches de *L. plantarum* déterminées par la méthode du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et des surnageants de culture déterminées par la méthode de l'acide 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS+)). Les moyennes à l'intérieur d'une colonne avec des lettres différentes (nombre, minuscules et majuscules) sont significativement différentes ($p < 0,05$) en utilisant l'ANOVA unidirectionnelle avec le test de Tukey pour les comparaisons par paires.

Les propriétés antioxydantes des souches de *L. plantarum* pourraient aider à prévenir plusieurs maladies, y compris, par exemple, les maladies cardiovasculaires, les ulcères gastro-intestinaux et le diabète (**Behera et al., 2018**). Dans l'ensemble, les 5 souches sélectionnées, à savoir F8, F13, FB23, D21 et M1, ont montré des différences dans les activités de piégeage des deux radicaux libres. Les taux de piégeage de DPPH obtenus étaient très similaires à ceux rapportés par **Bhushan et al. (2021)**, tandis que les taux de piégeage du radical ABTS+ étaient

comparables à ceux obtenus pour les souches de lactobacilles isolées de lait de chamelle (**Mahmoudi et al., 2017**). Il convient de noter que cette activité antioxydante n'est pas seulement présente dans le surnageant de culture, mais qu'elle est également retrouvée lorsque des cellules intactes sont testées. En effet, **Ahire et al. (2013)**, puis **Barache et al. (2020)** ont signalé la capacité des surnageants acellulaires des souches de lactobacilles à posséder une forte activité de piégeage de la DPPH, alors que les cellules intactes ont une activité DPPH plus faible. Ce phénomène pourrait être lié à la sécrétion ou à la libération de produits fonctionnels tels que les exopolysaccharides et l'acide lipotéichoïque à la surface des cellules, ainsi que d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la NADH oxydase (NOX) et la NADPH peroxydase (**Li et al., 2012; Kim et al., 2022; Zhao et al., 2023**).

III. Production d'exopolysaccharides

III.1. Production et extraction d'EPS

Les cinq souches probiotiques de *L. plantarum* ont été testées pour leur capacité à produire des EPS dans un milieu MRS supplémenté avec du saccharose comme substrat. Les cinq souches ont présenté un phénotype mucoïde plus marqué sur un milieu gélosé MRS contenant 5 % (w/v) de saccharose que sur un milieu MRS contenant du glucose au lieu du saccharose (**figure 11**). Les résultats ont révélé que les rendements de production d'EPS les plus élevés ont été obtenus avec les souches F8 et FB23 cultivées sur un milieu MRS supplémenté en saccharose. Les souches F8 et FB23 ont généré un rendement de production d'EPS de 1,284 et 1,085 g/L respectivement après 72h d'incubation à 37°C. En conséquence, les deux souches ont été sélectionnées et maintenues pour des études ultérieures.

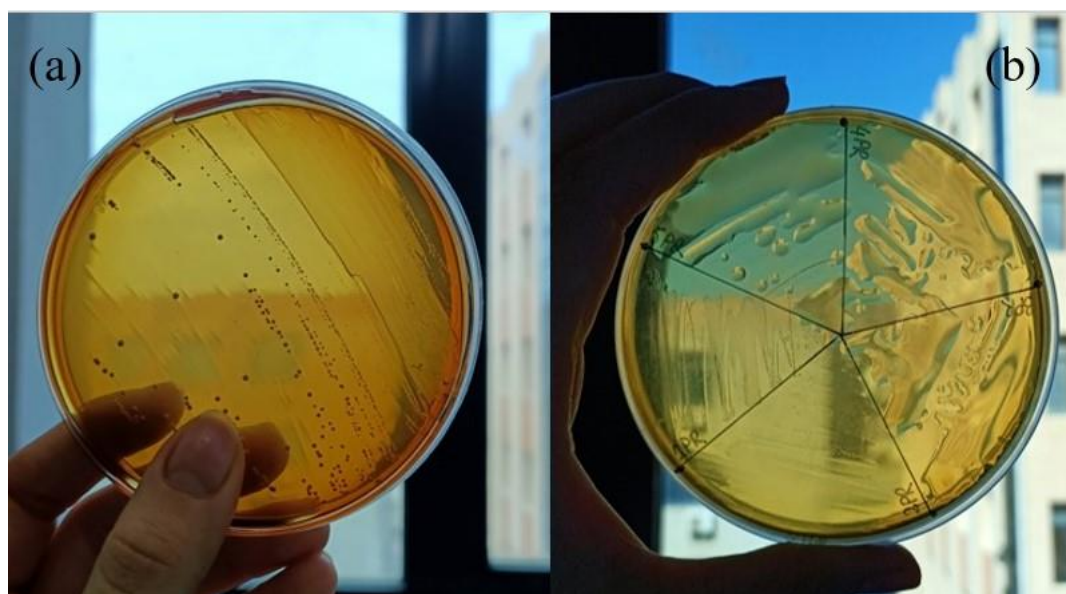


Figure 11. Aspects des colonies de *L. plantarum* sur de la MRS supplémentée en saccharose. *L. plantarum* cultivé sur gélose MRS contenant 5% de saccharose (a) ou 2% de glucose (b) à 37°C après 48h d'incubation.

La production et l'extraction d'EPS ont été réalisées sur un milieu MRS enrichi en saccharose, ce qui a permis de montrer que les souches F8 et FB23 de *L. plantarum* étaient capables de produire plus de 1 g d'EPS. Les conditions utilisées ici pour la production d'EPS sont apparues favorables et probablement optimales. En effet, lorsque ces conditions ne sont pas optimales, les rendements de production d'EPS sont inférieurs à 1g/L pour la plupart des souches de BL (**Prete et al., 2024**). C'est le cas pour *L. rhamnosus* (210,28 mg/L) (**Polak-Berecka et al., 2014**), *L. plantarum* SP8 (280,105 mg/L) (**Zhang et al., 2020**), *L. plantarum* GD2 (397 mg/L), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 (449 mg/L) (**Tukenmez et al., 2019**), et *L. fermentum* (84,5 mg/L) (**Wei et al., 2019**). En revanche, certaines études ont montré que la production d'EPS permettait d'atteindre des niveaux de production élevés. C'est le cas pour *L. plantarum* BR2 (2 800 mg/L) (**Sasikumar et al., 2017**), de *Streptococcus thermophilus* CC30 (1 950 mg/L) (**Kanamarlapudi et Muddada, 2017**) et de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2214 (1 880 mg/L) (**Bancalari et al., 2020**).

III.2. Caractérisation physicochimique des EPS

La composition chimique des EPS est présentée dans le **tableau 7**. Les résultats ont montré que les hydrates de carbone représentaient la partie la plus intéressante de l'extrait ($68,22 \pm 3,14\%$) pour l'EPS-FB23 et $60,44 \pm 1,41\%$ pour l'EPS-F8. Les teneurs en cendres et en matières grasses calculées pour l'EPS-FB23 étaient respectivement de $10,02 \pm 0,9 \%$ et 0% et de $11,04 \pm 0,9 \%$ et $0,06 \pm 0,01 \%$ pour l'EPS-F8. Les teneurs en humidité et en protéines étaient respectivement de $21,2 \pm 0,29 \%$ et $0,79 \pm 0,05 \%$ pour l'EPS-FB23 et de $26,9 \pm 0,31 \%$ et $0,855 \pm 0,0025 \%$ pour l'EPS-F8.

Tableau 7. Analyse physicochimique des EPS produits par *L. plantarum* F8 et FB23

Paramètres	EPS-F8	EPS-FB23
Hydrates de carbone (%)	60,44±1,41	68,22±3,14
Protéines (%)	0,855±0,0025	0,79±0,05
Humidité (%)	26,9±0,31	21,2±0,29
Cendres (%)	11,04±0,9	10,02±0,9
Matière grasse (%)	0,06±0.01	0

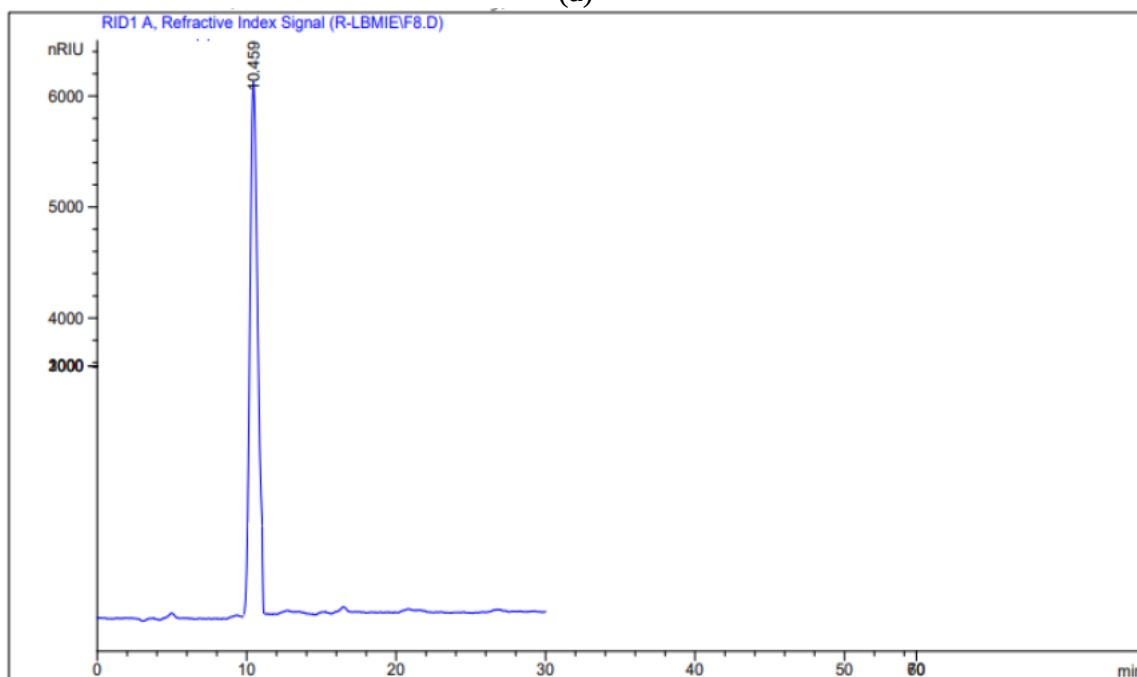
Les analyses physicochimiques des EPS extraits des souches F8 et FB23 montrent qu'elles sont essentiellement composées d'hydrates de carbone et, dans une moindre mesure, de protéines. En ligne directe, les EPS ont également été rapportés comme un mélange de biomolécules, contenant des glucides et d'autres composés tels que l'acétate ou le phosphate (Al-Nabulsi et al., 2022). Des rendements élevés en glucides dans les EPS de bactéries lactiques ont été rapportés (Li et al., 2014; Adesulu-Dahunsi et al., 2018; Elmansy et al., 2022). Nos résultats sont en accord avec ceux de (Adesulu-Dahunsi et al., 2018) qui ont rapporté que les EPS de *L. plantarum* YO175 isolées à partir de céréales fermentées présentaient un faible taux de protéines.

III.3. Composition en monosaccharides des EPS

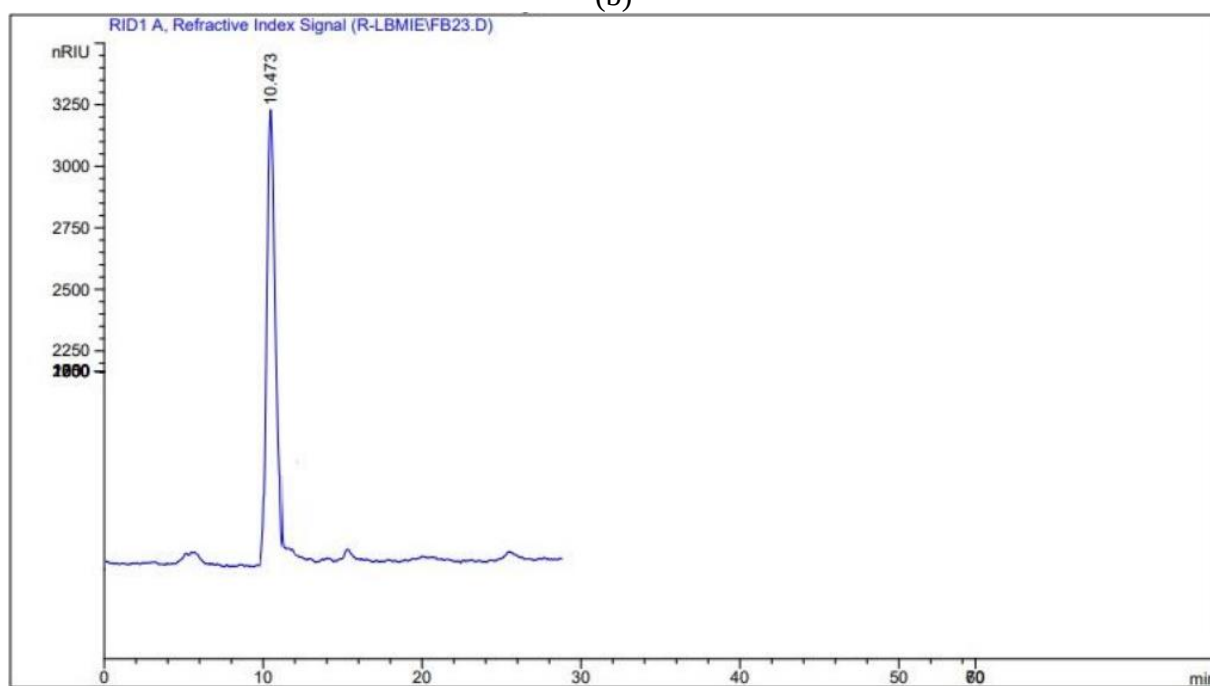
L'analyse de l'hydrolyse des EPS-F8 et EPS-FB23 obtenue par CCM a montré la présence d'une bande compacte avec un facteur de rétention de 0,73 similaire aux standards monosaccharides glucose, fructose et arabinose (Figure 12A). Les résultats obtenus montrent que les EPS-F8 et EPS-FB23 sont des homopolysaccharides composés de glucose, fructose ou d'arabinose. La composition en monosaccharides de l'EPS a également été évaluée par analyse HPLC. Le chromatogramme a montré un pic avec un temps de rétention de 10,459 min pour l'EPS-F8 (Figure 12B) et un pic avec un temps de rétention de 10,473 pour l'EPS-FB23 (Figure 12C) dont le temps de rétention était similaire à celui du glucose (Figure 12D). Ainsi, l'analyse a permis de confirmer que l'EPS-F8 et l'EPS-FB23 étaient des polymères du glucose.



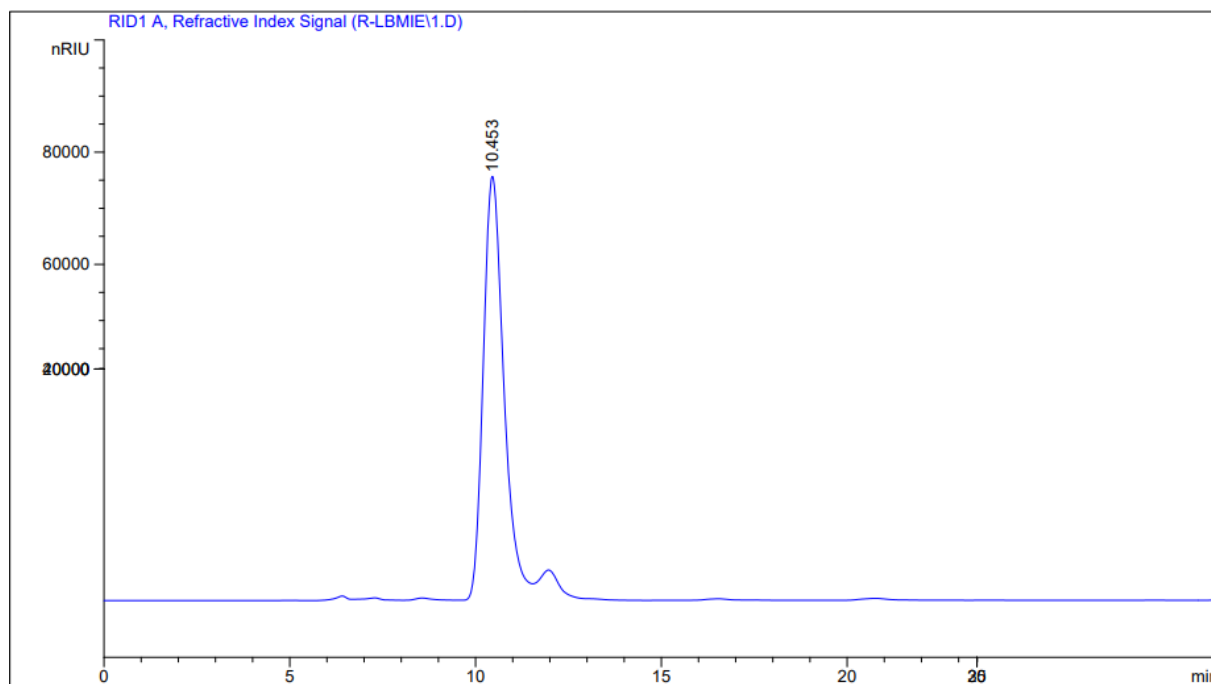
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 12. A. Analyse CCM de l'EPS (1) EPS-F8 hydrolysé, (2) glucose, (3) galactose, (4) fructose, (5) arabinose, (6) rhamnose, (7) mannose, (8) xylose, (9) EPS-FB23 hydrolysé. **B.** Analyse HPLC de l'EPS-F8 hydrolysé par TFA. **C.** Analyse HPLC de l'EPS-FB23 hydrolysé par TFA. **D.** Analyse HPLC du glucose.

Il convient de noter que les EPS obtenus à partir de bactéries lactiques peuvent être divisés en homopolysaccharides (HoPS), composés des mêmes monosaccharides, et en hétéropolysaccharides (HePS), composés de différents monosaccharides (**Zhou et al., 2019**). À cet égard, l'analyse de la composition en monosaccharides de l'EPS a révélé un monomère de glucose, ce qui indique que l'EPS-F8 et l'EPS-FB23 sont des homopolysaccharides. Ensuite, **Trabelsi et al. (2015)** ont rapporté que *Lactobacillus* sp. Ca6 produisait un homopolysaccharide constitué d'un arrangement polymérique de glucose, ce qui a été confirmé par CCM et HPLC. **Kwon et al. (2020)** ont également signalé que l'hydrolysât d'EPS de *L. plantarum* L-14 était composé de glucose.

III.4. Analyse structurale des EPS

La caractérisation de la structure et des groupes fonctionnels des polysaccharides a été réalisée par spectroscopie FT-IR. Comme le montre la **figure 13**, l'EPS-F8 présente des pics typiques à 3275,53, 2939,61, 1634,63, 1415,61, 1330,64, 1215,05 et 1037,98 cm^{-1} (**figure 13A**). Le spectre FT-IR de l'EPS-FB23 présente des pics à 3303,09, 2933,21, 1635,14, 1414,79, 1215,42 et 1030,78 cm^{-1} (**figure 13B**). Les bandes à 3275,53 et 3303,09 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'étirement de O-H (**Howe et al., 2002**). Les bandes 2939,61 et 2933,21 cm^{-1} peuvent être attribuées aux vibrations d'étirement de C-H (**Slima et al., 2022**). Les absorptions autour

de 1634,63 et 1635,14 cm^{-1} sont dues aux vibrations d'étirement du groupe carbonyle ($\text{C}=\text{O}$) (Adesulu-Dahunsi et al., 2018). L'absorbance entre 1415,61 et 1215,05 cm^{-1} est caractéristique des vibrations d'étirement C-O (Li et al., 2014). Alors que les bandes à 1037,98 et 1037,78 cm^{-1} suggèrent que les modes squelettiques de ces EPS correspondent à des cycles pyranoses (Hamzaoui et al., 2020).

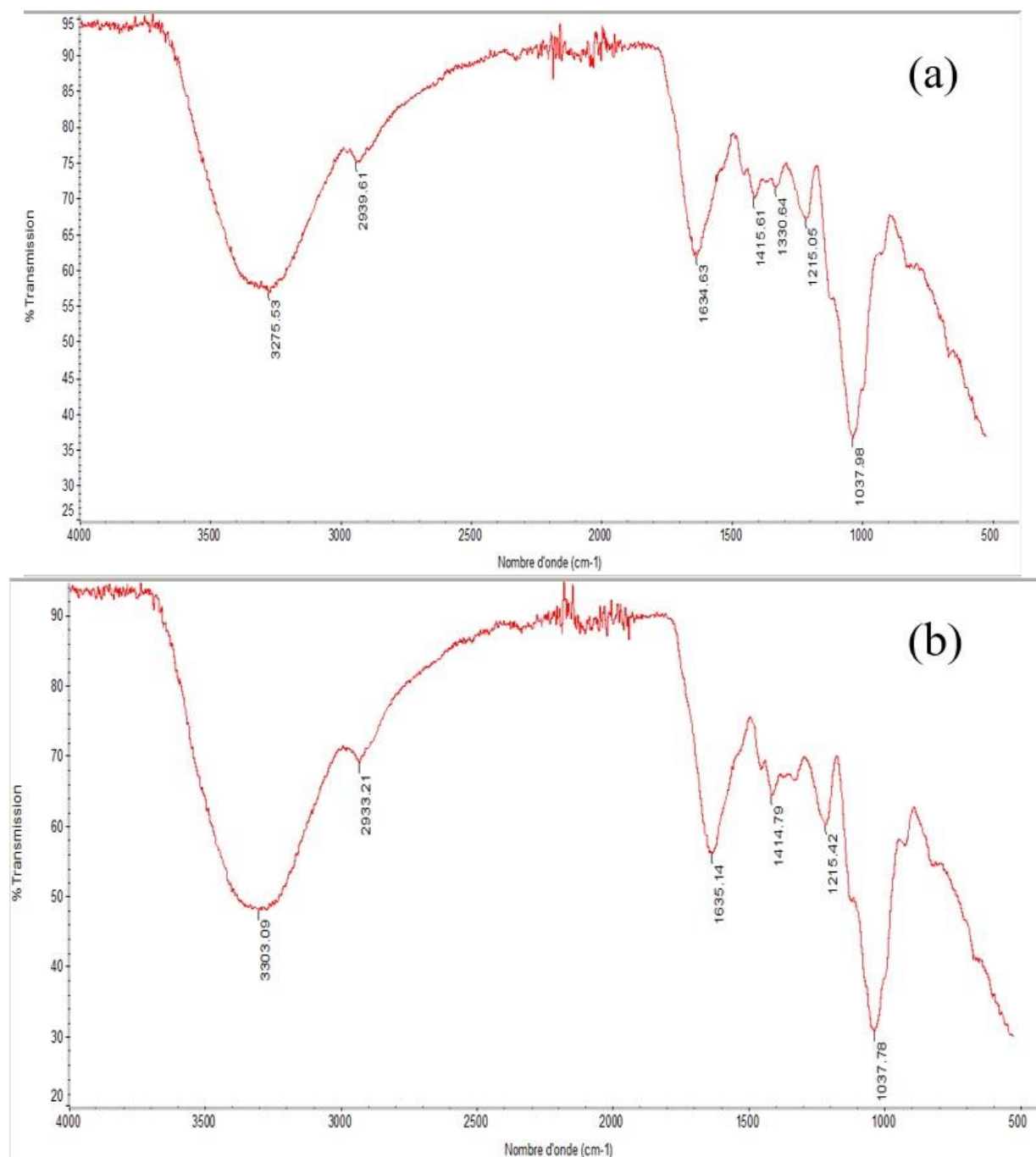


Figure.13. A. Spectre FT-IR de l'EPS-F8 **B.** de l'EPS-FB23 dans la gamme de 400-4000 cm^{-1} .

L'EPS a été enregistré dans la gamme 200 à 800 du spectre UV-visible. Comme le montre la **figure 14**. L'EPS-F8 et l'EPS-FB23 ont présenté un pic d'absorption maximal allant de 200 à 240 nm. L'absorption maximale a été observée à 210 nm.

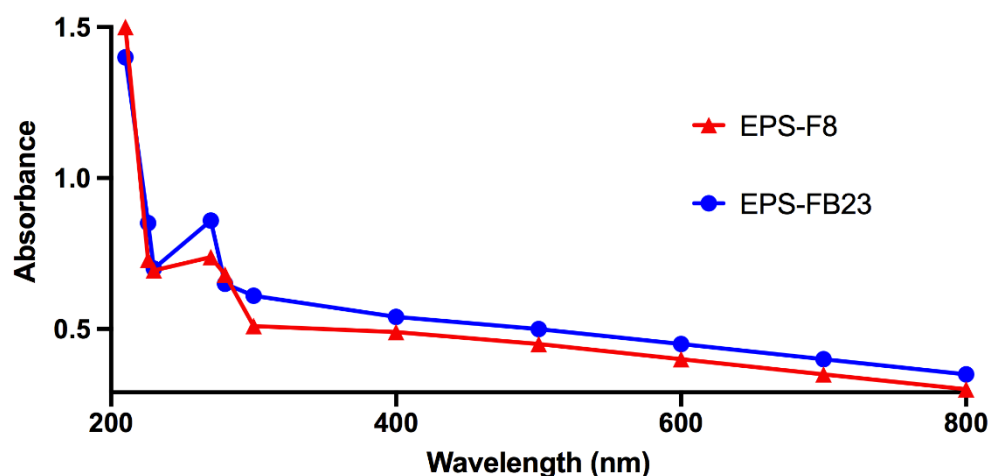


Figure 14. Absorbance de l'EPS-F8 et de l'EPS-FB23 dans la gamme de longueurs d'onde 200-800 nm.

La caractérisation des échantillons d'EPS de *L. plantarum* F8 et FB23 par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) a révélé la présence de pics d'absorption caractéristiques de la plupart des polysaccharides. Par conséquent, tous les résultats étaient cohérents avec l'analyse de la composition en monosaccharides. Alors que l'absorption UV a montré un pic d'absorption maximal dans la gamme de 200 à 240 nm et l'absence de toute absorption dans la gamme de 250 et 280 nm, ces deux EPS ont finalement été identifiés comme des polysaccharides et non comme des protéines ou des acides nucléiques.

III.5. Activité antioxydante des EPS de *L. plantarum*

Les propriétés antioxydantes des échantillons d'EPS ont été évaluées à l'aide des capacités de piégeage des radicaux DPPH et ABTS et du pouvoir réducteur, qui ont été comparés à ceux du contrôle positif, le BHT.

Différentes concentrations (0,5, 2, 4, 7 et 10 mg/ml) des échantillons d'EPS ont été utilisées pour analyser les propriétés de piégeage à l'aide de la méthode décrite par **Bersuder et al. (1998)**. La capacité de piégeage du radical DPPH des échantillons d'EPS et du BHT a augmenté de manière significative avec l'augmentation de leurs concentrations (**figure 15**), ce qui peut s'expliquer par une activité dépendante de la concentration. À 10 mg/ml, l'EPS-FB23 a exprimé la plus forte activité de piégeage du radical DPPH ($87,285 \pm 2,815$ %), tandis que le BHT a exprimé $99,89 \pm 0,21$ % à la même concentration.

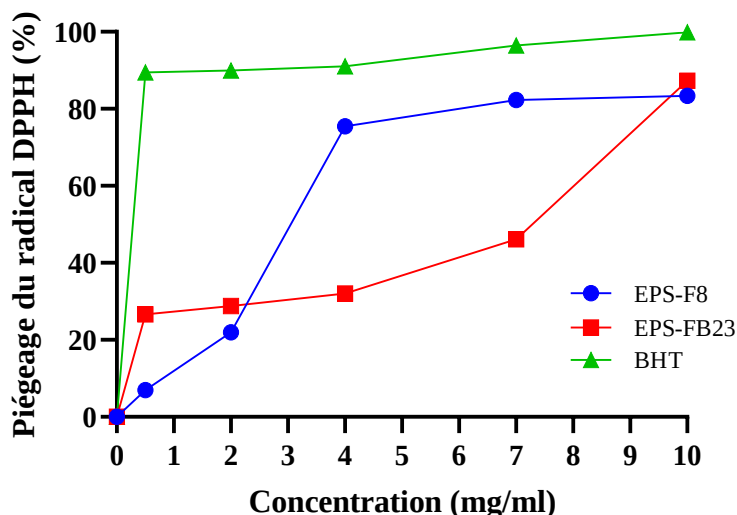


Figure 15. Activité antioxydante des EPS-F8 et EPS-FB23 des souches de *L. plantarum* détectées par la méthode du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)

L'activité de piégeage du radical ABTS des échantillons d'EPS est illustrée à la **figure 16**. Les résultats dépendent de la concentration et sont inférieurs à ceux du BHT aux mêmes concentrations. Le pourcentage maximal de piégeage de l'EPS-F8 ($77,43 \pm 2,07$ %) a été obtenu à 10 mg/ml. Cependant, le BHT a atteint $76,87 \pm 0,738$ % à une concentration de seulement 2 mg/ml. Ces résultats indiquent que les échantillons d'EPS ont une activité de piégeage du radical ABTS.

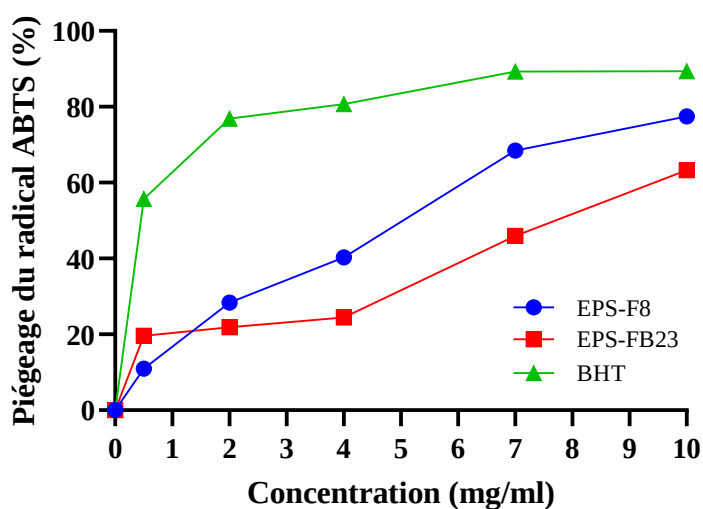


Figure 16. Activité antioxydante des EPS-F8 et EPS-FB23 des souches de *L. plantarum* détectées par la méthode de 2,2 azino-bis (3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS +)).

La capacité des échantillons d'EPS à réduire la forme d'oxydation de la forme ferreuse du fer (Fe^{3+}) a été étudiée. La **figure 17** montre que le pouvoir réducteur des échantillons d'EPS semble dépendre de la concentration et atteint un maximum de $0,903 \pm 0,074$ pour l'EPS-F8 à 20 mg/ml, tandis que le BHT exprime $0,972 \pm 0,005$ à la même concentration.

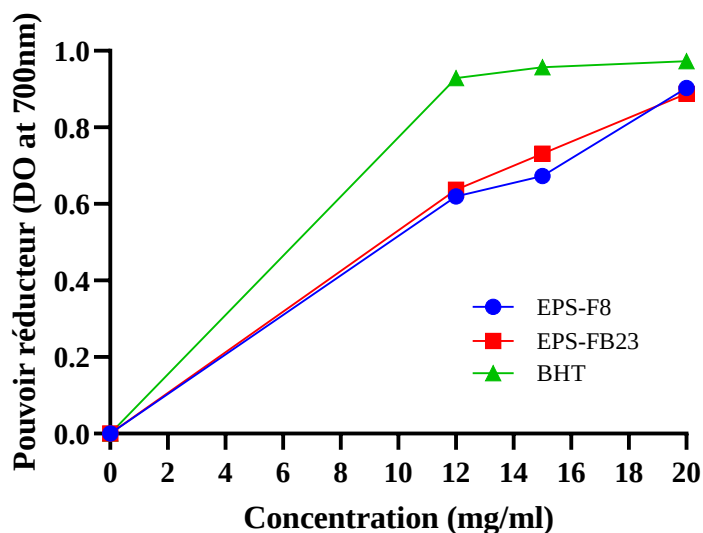


Figure 17. Activité antioxydante des EPS-F8 et EPS-FB23 des souches de *L. plantarum* détectées par le pouvoir réducteur déterminé à A 700nm.

Après la production et la caractérisation des EPS des souches F8 et FB23 de *L. plantarum*, nous avons étudié leur activité antioxydante, une propriété qui peut être déterminée par différents mécanismes et réactions, y compris le piégeage des radicaux, la capacité de réduction et la chélation des métaux (**Frankel et Meyer, 2000**). À cette fin, nous avons utilisé le BHT comme contrôle positif dans toutes les expériences, car il s'agit d'un antioxydant puissant utilisé dans l'industrie alimentaire et qui a la capacité de piéger les radicaux libres excessifs (**Soares et al., 2003; Wang et al., 2023**).

Dans nos essais, les échantillons d'EPS des souches F8 et FB23 de *L. plantarum* ont montré une bonne activité antioxydante DPPH et ABTS. Nous suggérons que l'activité antioxydante obtenue pourrait être attribuée au groupe hydroxyle et à d'autres groupes fonctionnels de l'EPS qui convertissent le radical libre en une forme plus stable ou réagissent avec le radical libre pour mettre fin à la réaction en chaîne du radical, comme cela a été rapporté précédemment par **Shen et al. (2013)**. Il est intéressant de noter que les résultats obtenus ici sont en accord avec ceux rapportés par **Wang et al. (2017)**, qui ont indiqué une activité antioxydante de 82% pour un EPS produit par *L. plantarum* KX041. En outre, les interactions et les effets synergiques avec d'autres composants antioxydants, notamment les protéines, les peptides, les acides aminés

et les micro-éléments contenus dans les EPS brutes, peuvent renforcer l'efficacité antioxydante. La supériorité de l'effet de piégeage des EPS de E1K2R2, puis de E2AT5, par rapport à E1K1R2 à la même concentration peut être due à des différences dans leurs caractéristiques chimiques, en particulier la composition en monosaccharides et le poids moléculaire, qui sont des facteurs critiques influençant les activités antioxydantes des EPS (**Li et al., 2014**).

De plus, le pouvoir réducteur de nos EPS est proche de celui du BHT à 20 mg/ml, ce qui est en bon accord avec les travaux de **Zhao et Liang, (2023)**, qui ont rapporté un fort pouvoir réducteur des EPS produits par *L. plantarum* MC5 isolées à partir de lait de yak fermenté. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que les échantillons d'EPS de *L. plantarum* F8 et F23 agissent comme des donneurs d'électrons avec les radicaux libres et diffèrent également dans leur activité antioxydante par d'autres mécanismes tels que le blocage de l'initiation de la chaîne et la liaison aux catalyseurs d'ions métalliques de transition, comme cela a été récemment décrit par (**Wang et al., 2017; Zhao et Liang, 2023**).

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette thèse était d'isoler et de caractériser des souches potentiellement probiotiques productrices d'exopolysaccharides. Les souches candidates ont été isolées à partir de fruits très consommés en Kabylie. De nombreuses expériences *in vitro* ont été réalisées afin de sélectionner les souches probiotiques montrant une production d'exopolysaccharides.

A partir de 21 isolats de bactéries lactiques provenant de huit échantillons de fruits récoltés dans des champs agricoles à Ath Yenni (Tizi Ouzou, Algérie), dans la vallée de la Soummam (Bejaia, Algérie) et dans la région de Ouargla (Algérie). Il s'agit de mûrier blanc (*Morus alba* L.), de figue de barbarie (*Opuntia ficus-indica*), de figue (*Ficus carica*), de raisin (*Vitis vinifera*) et de datte (*Phoenix dactylifera* L.). Un premier test de criblage des isolats a été effectué en évaluant leur résistance au pH acide (pH= 2) et à la bile en présence d'enzymes digestives. Ce test permettant de mimer les conditions gastro-intestinales nous a permis de sélectionner 10 isolats. L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF et le séquençage de l'ADNr 16S ont révélé la présence d'une seule espèce dominante, à savoir *Lactiplantibacillus plantarum*.

Les souches identifiées ont été caractérisées pour leurs propriétés de surface à savoir l'autoaggrégation, l'hydrophobicité de surface et la formation de biofilm sur microplaque. Tous les résultats obtenus ont été sujet à une Analyse en Composante Principale (ACP) qui nous a permis de réaliser un deuxième criblage. A ce stade, cinq souches ont été sélectionnées dont *L. plantarum* F8, *L. plantarum* F13, *L. plantarum* FB23, *L. plantarum* D21 et *L. plantarum* M1 pour la suite de nos travaux de recherche.

L'innocuité des souches *L. plantarum* F8, *L. plantarum* F13, *L. plantarum* FB23, *L. plantarum* D21 et *L. plantarum* M1 a été évaluée par le test d'hémolyse sur gélose au sang, ainsi que le test de cytotoxicité sur cellules épithéliales Caco-2. Les résultats ont montré une absence de cytotoxicité pour les cinq souches.

La capacité d'adhésion des souches a également été évaluée. Cette propriété systématiquement recherchée dans la qualification d'un probiotique permet de prolonger le temps de séjour de ce dernier afin d'exprimer ses effets bénéfiques chez l'hôte. Les souches sélectionnées ont présenté une adhésion entre 2,4 et 3,6 %.

Le potentiel antagoniste à l'égard de *E. coli* et *S. aureus* a été évalué par le test des spots et des puits. L'antagonisme révélé est essentiellement attribué à la production d'acide lactique avec une production supérieure à 12 g/l. Par ailleurs, l'analyse *in silico* des génomes des souches *L.*

plantarum F8, *L. plantarum* F13, *L. plantarum* FB23 et *L. plantarum* D21 portant sur la recherche de gènes codant pour des bactériocines, a permis de localiser des gènes codant pour six plantaricines E, F, A, N, J et K dans la souche F13. De plus, les cinq souches sélectionnées ont montré une activité antioxydante importante à l'égard des radicaux libres 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) et 2,2-azino-bis: 3-éthyl-benzothiazoline-6-sulphonique acid (ABTS+).

La capacité des cinq souches probiotiques à produire des exopolysaccharides a notamment été étudiée. En premier lieu, le criblage des souches productrices d'EPS a été réalisé sur milieu MRS contenant 5% (w/v) de saccharose suivi d'une extraction à l'éthanol qui nous a permis de sélectionner deux souches (*L. plantarum* F8 et *L. plantarum* FB23) ayant les rendements de production les plus importants. Par la suite l'étude des propriétés physicochimiques (humidité, cendres, matières grasses, protéines et hydrates de carbone) a été évaluée.

Il est important à noter que la fonctionnalité des EPS est étroitement liée à leur composition chimique, par conséquent, la structure des EPS a été analysée. Les EPS des souches *L. plantarum* F8 et *L. plantarum* FB23 ont été identifiés comme des homopolysaccharides après CCM et HPLC. Les résultats ont montré que ces derniers étaient des polymères de glucose. La caractérisation de la structure et des groupes fonctionnels des EPS par FT-IR ont confirmé les résultats obtenus par la présence de pics correspondants aux composants des polysaccharides. De plus, l'absence de pic d'absorption dans la gamme 250 et 280 nm du spectre UV-visible a finalement aidé à identifier nos échantillons comme des polysaccharides.

Enfin, la détermination du pouvoir antioxydant des EPS-F8 et EPS-FB23 a été réalisée suivant trois tests : le piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS et la détermination du pouvoir réducteur en utilisant le BHT comme témoin. Nos résultats ont prouvé la présence d'un fort potentiel antioxydant de nos échantillons.

A l'issue de ce travail et au regard des résultats obtenus, les perspectives suivantes nous semblent intéressantes à envisager :

- Faire une étude *in vivo* sur un modèle animal pour confirmer certaines propriétés probiotiques.
- Etudier les aptitudes technologiques des souches les plus pertinentes afin de mettre au point un aliment fonctionnel.
- Caractériser les bactériocines produites par la souche *L. plantarum* F13.
- Etudier *in vitro* d'autres propriétés des EPS.

- Faire une étude *in vivo* afin d'étudier les propriétés antioxydantes des EPS.

Références bibliographiques

Abarquero, D., Renes, E., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2022). Study of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their industrial applications: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(1), 16-26. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15227>

Abdalla, A. K., Ayyash, M. M., Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Shah, N. P., & Holley, R. (2021). Exopolysaccharides as Antimicrobial Agents : Mechanism and Spectrum of Activity. *Frontiers in Microbiology*, 12, 664395. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664395>

Abdulmumeen, H. A., Risikat, A. N., & Sururah, A. R. (2012). Food : Its preservatives, additives and applications. Kumari A, Joshua R, Kumar R, Setlhoka MD (2022) Biopreservation of pineapple wine using immobilized and freeze dried microcapsules of bacteriocin producing *L. plantarum*. *Journal of Food Science and Technology* 59, 745–753.

Abid, Y., Casillo, A., Gharsallah, H., Joulak, I., Lanzetta, R., Corsaro, M. M., Attia, H., & Azabou, S. (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 719-728. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.155>

Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K., Sanni, A. I., & Banwo, K. (2018). Production of exopolysaccharide by strains of *Lactobacillus plantarum* YO175 and OF101 isolated from traditional fermented cereal beverage. *PeerJ*, 6, e5326. <https://doi.org/10.7717/peerj.5326>

Aggarwal, S., Sabharwal, V., Kaushik, P., Joshi, A., Aayushi, A., & Suri, M. (2022). Postbiotics : From emerging concept to application. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.887642>

Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachadyn-Król, M., & Varzakas, T. (2020). Lactic Acid Bacteria as Antibacterial Agents to Extend the Shelf Life of Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables: Quality and Safety Aspects. *Microorganisms*, 8(6), 952. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952>

Ahire, J. J., Mokashe, N. U., Patil, H. J., & Chaudhari, B. L. (2013). Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6. *Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 26-34. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0244-0>

Ait Ouali, F., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D., Chihib, N.-E., & Drider, D. (2014). Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 116-124. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.011>

Ait Seddik, H., Bendali, F., Cudennec, B., & Drider, D. (2017). Anti-pathogenic and probiotic attributes of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum* strains isolated from feces

of Algerian infants and adults. *Research in Microbiology*, 168(3), 244-254.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.12.003>

Alegbeleye, O., Odeyemi, O., Strateva, M., & Stratev, D. (2022). Microbial spoilage of vegetables, fruits and cereals.
https://figshare.utas.edu.au/articles/journal_contribution/Microbial_spoilage_of_vegetables_fruits_and_cereals/23072438/1

Al-Nabulsi, A., Jaradat, Z., Al Qudsi, F., Elsalem, L., Osaili, T., Olaimat, A., Esposito, G., Liu, S.-Q., & Ayyash, M. (2022). Characterization and bioactive properties of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* isolated from labaneh. *LWT*, 167, 113817. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113817>

Alyami, A., Al-Mousa, A., Al-Otaibi, S., & Khalifa, A. (2022). *Lactobacillus* Species as Probiotics : Isolation Sources and Health Benefits. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.4.19>

Amalaradjou, M. A. R., & Bhunia, A. K. (2012). Modern approaches in probiotics research to control foodborne pathogens. *Advances in Food and Nutrition Research*, 67, 185-239.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394598-3.00005-8>

Amer, M. N., Elgammal, E. W., Atwa, N. A., Eldiwany, A. I., Dawoud, I. E., & Rashad, F. M. (2021). Structure elucidation and in vitro biological evaluation of sulfated exopolysaccharide from LAB *Weissella paramesenteroides* MN2C2. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 11,(5), 022-031. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.110504>

Amin, M., Odeyemi, O. A., Dewi, F. R., & Burke, C. M. (2023). Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Enterococcus faecium* MA115 and its potential use as a seafood biopreservative. *Open Agriculture*, 8(1). <https://doi.org/10.1515/opag-2022-0170>

Ammar, A. B., Bouassida, M., Bouallegue, A., Fourati, N., Gerardi, G., Muñiz, P., Benito, J. M., & Ghribi, D. (2023). Isolation and characterization of two glycolipopeptids biosurfactants produced by a *Lactiplantibacillus plantarum* OL5 strain isolated from green olive curing water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(11), 308.
<https://doi.org/10.1007/s11274-023-03744-8>

Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., & Valdivia, E. (2005). Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Science*, 71(3), 549-556.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.04.039>

Angelin, J., & Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853-865.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190>

Anwar, M. A., Kralj, S., Piqué, A. V., Leemhuis, H., van der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2010). Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains : characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology* (Reading, England), 156(Pt 4), 1264–1274. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036616-0>

Anwer, M., & Wei, M. Q. (2024). Harnessing the power of probiotic strains in functional foods : Nutritive, therapeutic, and next-generation challenges. *Food Science and Biotechnology*, 33(9), 2081-2095. <https://doi.org/10.1007/s10068-024-01630-z>

AOAC (2000) Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Methods 925.10, 65.17, 974.24, 992.16.

Aoudia, N., Rieu, A., Briandet, R., Deschamps, J., Chluba, J., Jegu, G., Garrido, C., & Guzzo, J. (2016). Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* : Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiology*, 53(Pt A), 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.009>

Arayas, M. A., Mabrouk, M. E. M., Sabry, S. A., & Abdella, B. (2023). Exopolysaccharide production from *Alkalibacillus* sp. w3 : Statistical optimization and biological activity. *Biologia*, 78(1), 229-240. <https://doi.org/10.1007/s11756-022-01233-1>

Archer, A. C., Kurrey, N. K., & Halami, P. M. (2018). In vitro adhesion and anti-inflammatory properties of native *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 125(1), 243-256. <https://doi.org/10.1111/jam.13757>

Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.-A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, 33(2), 282-291. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>

Authority (EFSA), E. F. S. (2007). Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal*, 5(12), 587. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.587>

Bachtarzi, N., Kharroub, K., & Ruas-Madiedo, P. (2019). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria isolated from traditional Algerian dairy products and their application for skim-milk fermentations. *LWT*, 107, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.005>

Bancalari, E., Alinovi, M., Bottari, B., Caligiani, A., Mucchetti, G., & Gatti, M. (2020). Ability of a Wild *Weissella* Strain to Modify Viscosity of Fermented Milk. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3086. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03086>

Barache, N., Belguesmia, Y., Ladjouzi, R., Bendali, F., & Drider, D. (2020). Clusters of *Lactobacillus* Strains from Vegetal Origins Are Associated with Beneficial Functions : Experimental Data and Statistical Interpretations. *Foods*, 9(8), 985. <https://doi.org/10.3390/foods9080985>

Barache, N., Belguesmia, Y., Martinez, B., Seal, B. S., & Drider, D. (2024). Bacteriocins and Bacteriophages as Dual Biological Players for Food Safety Applications. *Encyclopedia*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia4010007>

Barache, N., Ladjouzi, R., Belguesmia, Y., Bendali, F., & Drider, D. (2020). Abundance of *Lactobacillus plantarum* Strains with Beneficial Attributes in Blackberries (*Rubus* sp.), Fresh Figs (*Ficus carica*), and Prickly Pears (*Opuntia ficus-indica*) Grown and Harvested in Algeria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09632-z>

Barefoot, S. F., & Klaenhammer, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(6), 1808-1815. <https://doi.org/10.1128/aem.45.6.1808-1815.1983>

Barros, C. P., Guimarães, J. T., Esmerino, E. A., Duarte, M. C. K., Silva, M. C., Silva, R., Ferreira, B. M., Sant'Ana, A. S., Freitas, M. Q., & Cruz, A. G. (2020). Paraprobiotics and postbiotics : Concepts and potential applications in dairy products. *Food Microbiology • Functional Foods and Nutrition*, 32, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.003>

Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties : An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *BioMed Research International*, 2018, 9361614. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>

Belguesmia, Y., Domenger, D., Caron, J., Dhulster, P., Ravallec, R., Drider, D., & Cudennec, B. (2016). Novel probiotic evidence of lactobacilli on immunomodulation and regulation of satiety hormones release in intestinal cells. *Journal of Functional Foods*, 24, 276-286.

Belguesmia, Y., Madi, A., Sperandio, D., Merieau, A., Feuilleley, M., Prévost, H., Drider, D., & Connil, N. (2011). Growing insights into the safety of bacteriocins : The case of enterocin S37. *Research in Microbiology*, 162(2), 159-163. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2010.09.019>

Bersuder, P., Hole, M., & Smith, G. (1998). Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. I : Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 181-187. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0030-y>

Berthold-Pluta, A. M., Pluta, A. S., Garbowska, M., & Stasiak-Róžańska, L. (2019). Sciendo. *Advancements of Microbiology*, 58(2), 191-204. <https://doi.org/10.21307/PM-2019.58.2.191>

Bhagat, N., Raghav, M., Dubey, S., & Bedi, N. (2021). Bacterial Exopolysaccharides : Insight into Their Role in Plant Abiotic Stress Tolerance. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 1045-1059. <https://doi.org/10.4014/jmb.2105.05009>

Bhushan, B., Sakhare, S. M., Narayan, K. S., Kumari, M., Mishra, V., & Dicks, L. M. T. (2021). Characterization of Riboflavin-Producing Strains of *Lactobacillus plantarum* as Potential Probiotic Candidate through in vitro Assessment and Principal Component Analysis. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(2), 453-467. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09696-x>

Bibi, A., Xiong, Y., Rajoka, M. S. R., Mehwish, H. M., Radicetti, E., Umair, M., Shoukat, M., Khan, M. K. I., & Aadil, R. M. (2021). Recent Advances in the Production of Exopolysaccharide (EPS) from *Lactobacillus* spp. and Its Application in the Food Industry : A Review. *Sustainability*, 13(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/su132212429>

Biki, S. P., Mahmud, S., Akhter, S., Rahman, Md. H., & Ahmed, M. (2023). Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* LL-HSTU-FPP strain isolated from fermented rice and evaluation of the biopreservation potentiality of bacteriocin on shrimp. *Journal of Food Safety*, 43(3), e13042. <https://doi.org/10.1111/jfs.13042>

Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A., & Ouwehand, A. C. (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>

Biswasroy, P., Pradhan, D., Sahu, D. K., Sahu, A., Ghosh, G., & Rath, G. (2021). Recent Advances in Clinical Utility of Probiotics in Gastrointestinal Tract Disorders. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 22(12), 1559-1573. <https://doi.org/10.2174/1389201021666201029154239>

Bizani, D., Morrissy, J. A. C., Dominguez, A. P. M., & Brandelli, A. (2008). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 229-233. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.016>

Bourdichon, F. (2018). Inventory of Microbial Food Cultures with Safety Demonstration in Fermented Food Products : Update of the Bulletin of the IDF No. 455, 2012. *International Dairy Federation (I.N.P.A.)*.

Britton, R. A., Hoffmann, D. E., & Khoruts, A. (2021). Probiotics and the Microbiome—How Can We Help Patients Make Sense of Probiotics? *Gastroenterology*, 160(2), 614-623. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.11.047>

Buntin, N., de Vos, W. M., & Hongpattarakere, T. (2017). Variation of mucin adhesion, cell surface characteristics, and molecular mechanisms among *Lactobacillus plantarum* isolated

from different habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(20), 7663-7674. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8482-3>

Bustos, A. Y., Font de Valdez, G., Fadda, S., & Taranto, M. P. (2018). New insights into bacterial bile resistance mechanisms : The role of bile salt hydrolase and its impact on human health. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 112, 250-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.035>

Bustos, A. Y., Taranto, M. P., Gerez, C. L., Agriopoulou, S., Smaoui, S., Varzakas, T., & Enshasy, H. A. E. (2024). Recent Advances in the Understanding of Stress Resistance Mechanisms in Probiotics : Relevance for the Design of Functional Food Systems. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10273-9>

Caggianiello, G., Kleerebezem, M., & Spano, G. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria : From health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9), 3877-3886. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7471-2>

Campos-Perez, W., & Martinez-Lopez, E. (2021). Effects of short chain fatty acids on metabolic and inflammatory processes in human health. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1866(5), 158900. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158900>

Castillo, N. A., De Moreno De LeBlanc, A., Galdeano, C. M., & Perdigón, G. (2012). Probiotics : An alternative strategy for combating salmonellosis. *Food Research International*, 45(2), 831-841. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.031>

Castro, S. M., Silva, J., Casquete, R., Queirós, R., Saraiva, J. A., & Teixeira, P. (2018). Combined effect of pediocin bacHA-6111-2 and high hydrostatic pressure to control *Listeria innocua* in fermented meat sausage. *International Food Research Journal*, 25(2), 553-560.

Castro-López, C., Romero-Luna, H. E., García, H. S., Vallejo-Cordoba, B., González-Córdova, A. F., & Hernández-Mendoza, A. (2023). Key Stress Response Mechanisms of Probiotics During Their Journey Through the Digestive System : A Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(5), 1250-1270. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09981-x>

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M., & Desmazeaud, M. (1992). Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 75(3), 692-699. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77805-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77805-9)

Chai, L.-N., Wu, H., Wang, X.-J., He, L.-J., & Guo, C.-F. (2023). The Mechanism of Antimicrobial Activity of Conjugated Bile Acids against Lactic Acid Bacilli. *Microorganisms*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071823>

Chandrasekaran, A., Idelchik, M. D. P. S., & Melendez, J. A. (2017). Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biology*, 11, 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.005>

Chauhan, K., & Rao, A. (2024). Clean-label alternatives for food preservation : An emerging trend. *Heliyon*, 10(16), e35815. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35815>

Chen, R., Skeens, J. W., Wiedmann, M., & Guariglia-Oropeza, V. (2022). The efficacy of nisin against *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon at natural contamination levels is concentration-dependent and varies by serotype. *Frontiers in Microbiology*, 13, 930400. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.930400>

Choeisoongnern, T., Chaiyasut, C., Sivamaruthi, B. S., Makhamrueang, N., Peerajan, S., Sirilun, S., & Sittiprapaporn, P. (2023). Bacteriocin-Producing *Enterococcus faecium* OV3-6 as a Bio-Preservative Agent to Produce Fermented *Houttuynia cordata* Thunb. Beverages : A Preliminary Study. *Foods*, 12(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/foods12193520>

Coelho, M. C., Malcata, F. X., & Silva, C. C. G. (2022). Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses : From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods* (Basel, Switzerland), 11(15), 2276. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>

Cohen, P. A. (2018). Probiotic Safety—No Guarantees. *JAMA Internal Medicine*, 178(12), 1577-1578. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2018.5403>

Costa, O. Y. A., Raaijmakers, J. M., & Kuramae, E. E. (2018). Microbial Extracellular Polymeric Substances : Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636>

Côté, G. L., & Skory, C. D. (2012). Cloning, expression, and characterization of an insoluble glucan-producing glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1118. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(6), 2387–2394. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3562-2>

Cui, Y., Miao, K., Niyaphorn, S., & Qu, X. (2020). Production of Gamma-Aminobutyric Acid from Lactic Acid Bacteria : A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 995. <https://doi.org/10.3390/ijms21030995>

da Costa, W. K. A., de Souza, G. T., Brandão, L. R., de Lima, R. C., Garcia, E. F., dos Santos Lima, M., de Souza, E. L., Saarela, M., & Magnani, M. (2018). Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. *Food Research International*, 108, 172-182. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.045>

Daba, G. M., Elnahas, M. O., & Elkhateeb, W. A. (2021). Contributions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria as biotechnological tools in food, pharmaceutical, and medical

applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.110>

Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Darb Emamie, A., Ghanavati, R., & Kakanj, M. (2022). Bacteriocins : Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1), e24093. <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>

Darmastuti, A., Hasan, P. N., Wikandari, R., Utami, T., Rahayu, E. S., & Suroto, D. A. (2021). Adhesion Properties of *Lactobacillus plantarum* Dad-13 and *Lactobacillus plantarum* Mut-7 on Sprague Dawley Rat Intestine. *Microorganisms*, 9(11), 2336. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112336>

das Neves Selis, N., de Oliveira, H. B. M., dos Anjos, Y. B., Leão, H. F., Sampaio, B. A., Correia, T. M. L., Reis, M. M., Brito, T. L. S., Almeida, C. F., Pena, L. S. C., Brito, L. F., Ornelas, R. M., Santos, T. T., Campos, G. B., Timenetsky, J., Cruz, M. P., da Costa, A. M., Yatsuda, R., Uetanabaro, A. P. T., & Marques, L. M. (2021). *Gardnerella vaginalis* and *Neisseria gonorrhoeae* Are Effectively Inhibited by Lactobacilli with Probiotic Properties Isolated from Brazilian Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) Fruit. *BioMed Research International*, 2021, 6626249. <https://doi.org/10.1155/2021/6626249>

de Albuquerque, T. M. R., Garcia, E. F., de Oliveira Araújo, A., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2018). In Vitro Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(4), 704-716. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>

de Melo Pereira, G. V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A. I., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2060-2076. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>

De Simone, N., López, L., Ciudad, C. S., Scauro, A., Russo, P., Álvarez-Buylla, J. R., Spano, G., & Martínez Fernández, B. (2024). Antifungal activity of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from fruit and vegetables and detection of novel antifungal VOCs from fungal-LAB co-cultures. <https://doi.org/10.13039/501100011033>

Djenane, D., Aboudaou, M., Djenane, F., García-Gonzalo, D., & Pagán, R. (2020). Improvement of the Shelf-Life Status of Modified Atmosphere Packaged Camel Meat Using Nisin and *Olea europaea* Subsp. *Laperrinei* Leaf Extract. *Foods*, 9(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/foods9091336>

Dong, Q., Zhang, W., Guo, L., Niu, H., Liu, Q., & Wang, X. (2020). Influence of *Lactobacillus plantarum* individually and in combination with low O₂-MAP on the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* in cabbage. *Food Control*, 107, 106765. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106765>

DuBois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F., & Collins, J. K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin : Correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2 Suppl), 386S-392S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.386s>

Dušková, M., Šedo, O., Kšicová, K., Zdráhal, Z., & Karpíšková, R. (2012). Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International Journal of Food Microbiology*, 159(2), 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029>

Dwivedi, S., Prajapati, P., Vyas, N., Malviya, S., and Kharia, A. A Review on Food Preservation : Methods , harmful effects and better alternatives. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(6), 193-199, 2017.

Ejtahed, H. S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., & Mofid, V. (2012). Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 28(5), 539-543. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.013>

Elbanna, K., El Hadad, S., Assaeedi, A., Aldahlawi, A., Khider, M., & Alhebshi, A. (2018). In vitro and in vivo evidences for innate immune stimulators lactic acid bacterial starters isolated from fermented camel dairy products. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31006-3>

Elmansy, E. A., Elkady, E. M., Asker, M. S., Abdou, A. M., Abdallah, N. A., & Amer, S. K. (2022). Exopolysaccharide produced by *Lactiplantibacillus plantarum* RO30 isolated from Romi cheese : Characterization, antioxidant and burn healing activity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 38(12), 245. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03439-6>

Ercolini, D., Ferrocino, I., La Storia, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., & Villani, F. (2010). Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiology*, 27(1), 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.09.006>

Fagundes, P. C., Farias, F. M., Santos, O. C. S., de Oliveira, N. E. M., da Paz, J. A. S., Ceotto-Vigoder, H., Alviano, D. S., Romanos, M. T. V., & Bastos, M. C. F. (2016). The antimicrobial peptide aureocin A53 as an alternative agent for biopreservation of dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, 121(2), 435-444. <https://doi.org/10.1111/jam.13189>

Fan, S., Xue, T., Bai, B., Bo, T., & Zhang, J. (2022). Probiotic Properties Including the Antioxidant and Hypoglycemic Ability of Lactic Acid Bacteria from Fermented Grains of Chinese Baijiu. *Foods* (Basel, Switzerland), 11(21), 3476. <https://doi.org/10.3390/foods11213476>

Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 8(2), 44-61.

Feng, T., & Wang, J. (2020). Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: A systematic review. *Gut Microbes*, 12(1), 1801944. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1801944>

Filannino, P., De Angelis, M., Di Cagno, R., Gozzi, G., Riciputi, Y., & Gobbetti, M. (2018). How *Lactobacillus plantarum* shapes its transcriptome in response to contrasting habitats. *Environmental Microbiology*, 20(10), 3700-3716. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14372>

Fleming, H. P., Etchells, J. L., & Costilow, R. N. (1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Applied Microbiology*, 30(6), 1040-1042. <https://doi.org/10.1128/am.30.6.1040-1042.1975>

Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization (Éds.). (2006). Probiotics in food : Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization.

FAO/WHO (2002). Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation: Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, 30 April -1 May 2002. Rome [Italy]: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, World Health Organization.

Franco, W. (2024). Postbiotics and parabiotics derived from bacteria and yeast : Current trends and future perspectives. *CyTA - Journal of Food*, 22(1), 2425838. <https://doi.org/10.1080/19476337.2024.2425838>

Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200010\)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4)

Freedman, S. B., Schnadower, D., & Tarr, P. I. (2020). The Probiotic Conundrum : Regulatory Confusion, Conflicting Studies, and Safety Concerns. *JAMA*, 323(9), 823-824. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22268>

Fuller, R. (1989) Probiotics in Man and Animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>

Fuso, A., Bancalari, E., Castellone, V., Caligiani, A., Gatti, M., & Bottari, B. (2023). Feeding Lactic Acid Bacteria with Different Sugars : Effect on Exopolysaccharides (EPS) Production and Their Molecular Characteristics. *Foods*, 12(1), 215. <https://doi.org/10.3390/foods12010215>

Gangoiti, J., Pijning, T., & Dijkhuizen, L. (2018). Biotechnological potential of novel glycoside hydrolase family 70 enzymes synthesizing α -glucans from starch and sucrose. *Biotechnology Advances*, 36(1), 196-207. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.001>

Garcia, E. F., Luciano, W. A., Xavier, D. E., da Costa, W. C. A., de Sousa Oliveira, K., Franco, O. L., de Moraes Júnior, M. A., Lucena, B. T. L., Picão, R. C., Magnani, M., Saarela, M., & de Souza, E. L. (2016). Identification of Lactic Acid Bacteria in Fruit Pulp Processing Byproducts and Potential Probiotic Properties of Selected *Lactobacillus* Strains. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1371. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>

Gaspar, C., Donders, G. G., Palmeira-de-Oliveira, R., Queiroz, J. A., Tomaz, C., Martinez-de-Oliveira, J., & Palmeira-de-Oliveira, A. (2018). Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Express*, 8(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0679-z>

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota : Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document : The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>

Gogineni, V. K. (2013). Probiotics : History and Evolution. *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies*, 01(02). <https://doi.org/10.4172/2329-8731.1000107>

Guan, N., & Liu, L. (2020). Microbial response to acid stress : Mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(1), 51-65. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1>

Guarner, F. and Schaafsma, G.J. (1998) Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 237-238. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00136-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00136-0)

Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202>

Guérin, M., Silva, C. R.-D., Garcia, C., & Remize, F. (2020). Lactic Acid Bacterial Production of Exopolysaccharides from Fruit and Vegetables and Associated Benefits. *Fermentation*, 6(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040115>

Gul, S., & Durante-Mangoni, E. (2024). Unraveling the Puzzle : Health Benefits of Probiotics—A Comprehensive Review. *Journal of Clinical Medicine*, 13(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/jcm13051436>

Guo, Q., Li, F., Duan, Y., Wen, C., Wang, W., Zhang, L., Huang, R., & Yin, Y. (2020). Oxidative stress, nutritional antioxidants and beyond. *Science China Life Sciences*, 63(6), 866-874. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-9591-5>

Haddaji, N., Mahdhi, A. K., Krifi, B., Ismail, M. B., & Bakhrouf, A. (2015). Change in cell surface properties of *Lactobacillus casei* under heat shock treatment. *FEMS Microbiology Letters*, 362(9), fnv047. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv047>

Hammad, A. M., & Shimamoto, T. (2010). Towards a compatible probiotic–antibiotic combination therapy: Assessment of antimicrobial resistance in the Japanese probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1349-1360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04762.x>

Hamzaoui, A., Ghariani, M., Sellem, I., Hamdi, M., Feki, A., Jaballi, I., Nasri, M., & Amara, I. B. (2020). Extraction, characterization and biological properties of polysaccharide derived from green seaweed “*Chaetomorpha linum*” and its potential application in Tunisian beef sausages. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 1156-1168. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.009>

Hasheminya, S.-M., & Dehghannya, J. (2020). Novel ultrasound-assisted extraction of kefiran biomaterial, a prebiotic exopolysaccharide, and investigation of its physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties. *Materials Chemistry and Physics*, 243, 122645. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.122645>

Hazards (BIOHAZ), E. P. on B., Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Fernández Escámez, P. S., Herman, L. (2020). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 11 : Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2019. *EFSA Journal*, 18(2), e05965. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5965>

He, R., Zhao, Y., Zhao, R., & Sun, P. (2015). Antioxidant and antitumor activities in vitro of polysaccharides from *E. sipunculoides*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.030>

Heir, E., Jensen, M. R., Aasli, A. W., Berget, I., & Holck, A. L. (2023). Reduction and Growth Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Use of Anti-Listerial Nisin, P100 Phages and Buffered Dry Vinegar Fermentates in Standard and Sodium-Reduced Cold-Smoked Salmon. *Foods*, 12(24), 4391. <https://doi.org/10.3390/foods12244391>

Hertzler, S. R., & Clancy, S. M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(5), 582-587. <https://doi.org/10.1053/jada.2003.50111>

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

Howe, K. J., Ishida, K. P., & Clark, M. M. (2002). Use of ATR/FTIR spectrometry to study fouling of microfiltration membranes by natural waters. *Desalination*, 147(1), 251-255. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00545-3](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00545-3)

Hwanhlem N, H-Kittikun A (2015) Biopreservation of Seafood by Using Bacteriocins and Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria as Potential Bio-control Agents. In: Liong M-T (ed) *Beneficial Microorganisms in Agriculture, Aquaculture and Other Areas*, pp. 183–213. *Springer International Publishing*, Cham. https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-23183-9_9.

Iqbal, Z., Ahmed, S., Tabassum, N., Bhattacharya, R., & Bose, D. (2021). Role of probiotics in prevention and treatment of enteric infections : A comprehensive review. *3 Biotech*, 11(5), 242. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02796-7>

Jabeen, M., Murtaza, I., Zafar, A. M., Aslam, N., & Hassan, S. U. (2023). A mini review on food preservatives. *International Journal of Natural Medicine and Health Sciences*, 2(4), Article 4.

Jacobsen, T., Budde, B. B., & Koch, A. G. (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2), 242-249. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01970.x>

Jang, W. J., Lee, J. M., Hasan, M. T., Lee, B.-J., Lim, S. G., & Kong, I.-S. (2019). Effects of probiotic supplementation of a plant-based protein diet on intestinal microbial diversity, digestive enzyme activity, intestinal structure, and immunity in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 719-727. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.056>

Jeong, D., Kim, D.-H., Kang, I.-B., Kim, H., Song, K.-Y., Kim, H.-S., & Seo, K.-H. (2017). Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control*, C(78), 436-442. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.033>

Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants : Chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 97(10), 2499-2574. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03562-9>

Ju, Y., Shan, K., Liu, W., Xi, C., Zhang, Y., Wang, W., Wang, C., Cao, R., Zhu, W., Wang, H., Zhao, Y., & Hao, L. (2022). Effect of Different Initial Fermentation pH on Exopolysaccharides Produced by *Pseudoalteromonas agarivorans* Hao 2018 and Identification of Key Genes Involved in Exopolysaccharide Synthesis via Transcriptome Analysis. *Marine Drugs*, 20(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/md20020089>

Junges da Costa, R., Pereira da Silva, A., Nobre da Fonseca, R., de Oliveira Hübner, S., Nalério, E. S., de Lima Marques, J., Soares Vitola, H. R., Padilha da Silva, W., Duval, E. H., & Fiorentini, Â. M. (2021). Characterization of *Enterococcus faecium* EO1 isolated from mutton and activity of bacteriocin-like substances in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh mutton sausage. *LWT*, 141, 110954. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110954>

Jurášková, D., Ribeiro, S. C., & Silva, C. C. G. (2022). Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria : From Biosynthesis to Health-Promoting Properties. *Foods*, 11(2), 156. <https://doi.org/10.3390/foods11020156>

Kanamarlapudi, S. L. R. K., & Muddada, S. (2017). Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. *BioMed Research International*, 2017, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2017/4201809>

Kariyawasam, K. M. G. M. M., Lee, N.-K., & Paik, H.-D. (2021). Fermented dairy products as delivery vehicles of novel probiotic strains isolated from traditional fermented Asian foods. *Journal of Food Science and Technology*, 58(7), 2467-2478. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04857-w>

Kaur, S., Sharma, P., Kalia, N., Singh, J., & Kaur, S. (2018). Anti-biofilm Properties of the Fecal Probiotic Lactobacilli Against *Vibrio* spp. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 120. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00120>

Khaneghah, A. M., Abhari, K., Eş, I., Soares, M. B., Oliveira, R. B. A., Hosseini, H., Rezaei, M., Balthazar, C. F., Silva, R., Cruz, A. G., Ranadheera, C. S., & Sant'Ana, A. S. (2020). Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods : A review. *Trends in Food Science and Technology*, 95.

<https://findanexpert.unimelb.edu.au/scholarlywork/1427100-interactions-between-probiotics-and-pathogenic-microorganisms-in-hosts-and-foods--a-review>

Khushboo, null, Karnwal, A., & Malik, T. (2023). Characterization and selection of probiotic lactic acid bacteria from different dietary sources for development of functional foods. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1170725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1170725>

Khusro, A., Arasu, M. V., Sahibzada, M. U. K., Salem, A. Z. M., Al-Dhabi, N. A., Rivas-Caceres, R. R., Seidel, V., & Choi, K. C. (2021). Assessment on In Vitro Probiotic Attributes of *Lactobacillus plantarum* Isolated From Horse Feces. *Journal of Equine Veterinary Science*, 107, 103769. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103769>

Kim, S.-Y., Park, S. Y., Jin, J.-E., Hong, K.-S., Kim, D.-J., Kim, Y.-K., Shin, H.-C., Cho, S.-K., & Kang, D.-H. (2022). Comparing the VITEK 2 ANC card, species-specific PCR, and MALDI-TOF mass spectrometry methods for identification of lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, 87(11), 5099-5106. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16343>

Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 : adhesion of *L. acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94(6), 981-987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>

Kumari, A., Joshua, R., Kumar, R., & Setlhoka, M. D. (2022). Biopreservation of pineapple wine using immobilized and freeze dried microcapsules of bacteriocin producing *L. plantarum*. *Journal of Food Science and Technology*, 59(2), 745-753. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05069-6>

Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins : Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>

Kwon, M., Lee, J., Park, S., Kwon, O.-H., Seo, J., & Roh, S. (2020). Exopolysaccharide Isolated from *Lactobacillus plantarum* L-14 Has Anti-Inflammatory Effects via the Toll-Like Receptor 4 Pathway in LPS-Induced RAW 264.7 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9283. <https://doi.org/10.3390/ijms21239283>

Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., Rehman, A., Riaz, T., Aadil, R. M., Khan, I. M., Özogul, F., Rocha, J. M., Esatbeyoglu, T., & Korma, S. A. (2023). Probiotics : Mechanism of action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1216674. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1216674>

Le, B., & Yang, S. H. (2018). Probiotic potential of novel *Lactobacillus* strains isolated from salted-fermented shrimp as antagonists for *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Microbiology* (Seoul, Korea), 56(2), 138-144. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7407-x>

Lee, E.-S., Song, E.-J., Nam, Y.-D., & Lee, S.-Y. (2018). Probiotics in human health and disease : From nutribiotics to pharmabiotics. *Journal of Microbiology* (Seoul, Korea), 56(11), 773-782. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8293-y>

Leroy, F., & Vuyst, L. D. (2016). Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 3229-3238. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9936>

Li, D., Li, J., Zhao, F., Wang, G., Qin, Q., & Hao, Y. (2016). The influence of fermentation condition on production and molecular mass of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 in milk-based medium. *Food Chemistry*, 197, 367-372. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.129>

Li, S., Huang, R., Shah, N. P., Tao, X., Xiong, Y., & Wei, H. (2014). Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. *Journal of Dairy Science*, 97(12), 7334-7343. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7912>

Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., Niu, C., Yang, Z., & Wang, Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry*, 135(3), 1914-1919. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.048>

Li, W., Ji, J., Rui, X., Yu, J., Tang, W., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2014). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics in vitro. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2, Part 1), 732-739. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.063>

Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics : Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748. <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>

Liu, Q., Yu, Z., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2020). Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1289-4>

Liu, Y., Tran, D. Q., & Rhoads, J. M. (2018). Probiotics in Disease Prevention and Treatment. *Journal of Clinical Pharmacology*, 58 (10), S164-S179. <https://doi.org/10.1002/jcph.1121>

Lobo, R., Gómez, M. I., Font de Valdez, G., & Torino, M. (2019). Physicochemical and antioxidant properties of a gastroprotective exopolysaccharide produced by *Streptococcus*

Lynch, K. M., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2018). Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria : Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. *Food Research International*, 110, 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.012>

Ma'unatin, A., Harijono, H., Zubaidah, E., & Rifa'i, M. (2020). The isolation of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from lontar (*Borassus flabellifer* L.) sap. *Iranian Journal of Microbiology*, 12(5), 437-444. <https://doi.org/10.18502/ijm.v12i5.4605>

Madi-Moussa, D., Coucheney, F., & Drider, D. (2021). Expression of five class II bacteriocins with activity against *Escherichia coli* in *Lacticaseibacillus paracasei* CNCM I-5369, and in a heterologous host. *Biotechnology Reports* (Amsterdam, Netherlands), 30, e00632. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00632>

Majeed, Muhammed, Shaheen Majeed, Kalyanam Nagabhushanam, Sivakumar Arumugam, Kirankumar Beede, et Furqan Ali. 2019. « Evaluation of the in Vitro Cholesterol-Lowering Activity of the Probiotic Strain *Bacillus coagulans* MTCC 5856 ». *International Journal of Food Science & Technology* 54 (1): 212-20. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13926>.

Mahalak, K. K., Firman, J., Bobokalonov, J., Narrowe, A. B., Bittinger, K., Daniel, S., Tanes, C., Mattei, L. M., Zeng, W.-B., Soares, J. W., Kobori, M., Lemons, J. M. S., Tomasula, P. M., & Liu, L. (2022). Persistence of the Probiotic *Lacticaseibacillus rhamnosus* Strain GG (LGG) in an In Vitro Model of the Gut Microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/ijms232112973>

Mahmoudi, I., Moussa, O. B., & Hassouna, M. (2017). Symbiotic, Hypocholesterolemic and Antioxidant Effects of Potential Probiotic Lactobacilli Strains Isolated from Tunisian Camel Milk. *Advances in Microbiology*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.4236/aim.2017.74027>

Mao, B., Yin, R., Li, X., Cui, S., Zhang, H., Zhao, J., & Chen, W. (2021). Comparative Genomic Analysis of *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated from Different Niches. *Genes*, 12(2), 241. <https://doi.org/10.3390/genes12020241>

Margalho, L. P., Jorge, G. P., Noleto, D. A. P., Silva, C. E., Abreu, J. S., Piran, M. V. F., Brocchi, M., & Sant'Ana, A. S. (2021). Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses : From screening to in product approach. *Microbiological Research*, 242, 126622. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126622>

Mattarelli, P., Holzapfel, W., Franz, C. M. A. P., Endo, A., Felis, G. E., Hammes, W., Pot, B., Dicks, L., & Dellaglio, F. (2014). Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *International Journal of*

Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(Pt 4), 1434-1451.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.060046-0>

Mbye, M., Baig, M. A., AbuQamar, S. F., El-Tarabily, K. A., Obaid, R. S., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Turner, M. S., Shah, N. P., & Ayyash, M. M. (2020). Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(3), 1110-1124.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12554>

Mei, J., Shen, Y., Liu, W., Lan, W., Li, N., & Xie, J. (2020). Effectiveness of Sodium Alginate Active Coatings Containing Bacteriocin EFL4 for the Quality Improvement of Ready-to-Eat Fresh Salmon Fillets during Cold Storage. *Coatings*, 10(6), Article 6.
<https://doi.org/10.3390/coatings10060506>

Merenstein, D., Pot, B., Leyer, G., Ouwehand, A. C., Preidis, G. A., Elkins, C. A., Hill, C., Lewis, Z. T., Shane, A. L., Zmora, N., Petrova, M. I., Collado, M. C., Morelli, L., Montoya, G. A., Szajewska, H., Tancredi, D. J., & Sanders, M. E. (2023). Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. *Gut Microbes*, 15(1), 2185034.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2185034>

Mikkili, I., Vekateswarulu, T. C., Vidya Prabhakar, K., Peele, A., & Krupanidhi, S. (2018). Isolation and characterization of bacteriocin producing *Enterococcus casseliflavus* and its antagonistic effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *Karbala International Journal of Modern Science*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2018.09.002>

Minari, G. D., Piazza, R. D., Sass, D. C., & Contiero, J. (2024). EPS Production by *Lactocaseibacillus casei* Using Glycerol, Glucose, and Molasses as Carbon Sources. *Microorganisms*, 12(6), 1159. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061159>

Mohellebi, N (2024) Isolement et caractérisation de souches de *Lactiplantibacillus* à pouvoir antibactérien : Etude de l'effet bioconservateur de *Lactiplantibacillus plantarum* OV50 sur la sardine fraîche "*Sardina pilchardus*".

Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, 22(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>

Monteagudo-Mera, A., Rastall, R. A., Gibson, G. R., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6463-6472.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-09978-7>

Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., & López-Gómez, J. P. (2020).

Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations : A Review. *Fermentation*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>

Mtibaa, A. C., Smaoui, S., Ben Hlima, H., Sellem, I., Ennouri, K., & Mellouli, L. (2019). Enterocin BacFL31 from a Safety *Enterococcus faecium* FL31 : Natural Preservative Agent Used Alone and in Combination with Aqueous Peel Onion (*Allium cepa*) Extract in Ground Beef Meat Storage. *BioMed Research International*, 2019, 4094890. <https://doi.org/10.1155/2019/4094890>

Musazadeh, V., Faghfour, A. H., Zarezadeh, M., Pakmehr, A., Moghaddam, P. T., Hamed-Kalajahi, F., Jahandideh, A., & Ghoreishi, Z. (2023). Remarkable impacts of probiotics supplementation in enhancing of the antioxidant status : Results of an umbrella meta-analysis. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1117387>

Nabot, M., Guérin, M., Sivakumar, D., Remize, F., & Garcia, C. (2022). Variability of Bacterial Homopolysaccharide Production and Properties during Food Processing. *Biology*, 11(2), 171. <https://doi.org/10.3390/biology11020171>

Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D., & Flahaut, C. (2017). MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese : The Maroilles. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>

Naeem, M., Ilyas, M., Haider, S., Baig, S., & Saleem, M. (2012). Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from fruit juices and their efficacy against antibiotics. *Pakistan Journal of Botany*, 44, 323-328.

Neetoo, H. (2008). Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.043>

Neffe-Skocińska, K., Rzepkowska, A., Szydłowska, A., & Kołożyn-Krajewska, D. (2018). Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production.

Nematollahia, A., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., & Jazaeri, S. (2016). Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19(3), 49-53. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.03.001>

Nguyen, P.-T., Nguyen, T.-T., Bui, D.-C., Hong, P.-T., Hoang, Q.-K., & Nguyen, H.-T. (2020). Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria : The manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(4), 451-469. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020027>

Nicolescu, C. M., Bumbac, M., Buruleanu, C. L., Popescu, E. C., Stanescu, S. G., Georgescu, A. A., & Toma, S. M. (2023). Biopolymers Produced by Lactic Acid Bacteria : Characterization and Food Application. *Polymers*, 15(6), 1539. <https://doi.org/10.3390/polym15061539>

O'Connor, P. M., Kuniyoshi, T. M., Oliveira, R. P., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2020). Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.023>

Oren, A., Arahal, D. R., Göker, M., Moore, E. R. B., Rossello-Mora, R., & Sutcliffe, I. C. (2023). International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Prokaryotic Code (2022 Revision). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(5a). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005585>

Ouwehand, A. c., Tölkö, S., & Salminen, S. (2001). The Effect of Digestive Enzymes on the Adhesion of Probiotic Bacteria In Vitro. *Journal of Food Science*, 66(6), 856-859. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15186.x>

Oyewole, O. F., Maria, C. O., Tope, P. S., & Funmi, O. O. (2018). In vitro Study of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated From The Gut Of Chickens In Abeokuta, Nigeria. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 58(1), 73-73. <https://doi.org/10.5455/ajvs.290499>

Padmavathi, T., Bhargavi, R., Priyanka, P. R., Niranjana, N. R., & Pavitra, P. V. (2018). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 357-362. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.005>

Palanivelu, J., Thanigaivel, S., Vickram, S., Dey, N., Mihaylova, D., & Desseva, I. (2022). Probiotics in Functional Foods : Survival Assessment and Approaches for Improved Viability. *Applied Sciences*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/app12010455>

Paliwoda, A., & Nowak, A. (2019). Factors determining the adhesive capacity of *Lactobacillus* bacteria. *Advancements of Microbiology*, 56(2), 196-204. <https://doi.org/10.21307/PM-2017.56.2.196>

Pan, M., Kumaree, K. K., & Shah, N. P. (2017). Physiological Changes of Surface Membrane in *Lactobacillus* with Prebiotics. *Journal of Food Science*, 82(3), 744-750. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13608>

Panchal, R., Prajapati, K., Prajapati, M., Sharma, S., & Saraf, M. (2022). Bacterial Exopolysaccharides : Types, its Biosynthesis and their Application in Different Fields. 3, 03-11. Parker, R.B. (1974) Probiotics, the Other Half of Antibiotic Story. *Animal Nutrition & Health*, 29, 4-8.

Patel, S., Majumder, A., & Goyal, A. (2012). Potentials of exopolysaccharides from lactic Acid bacteria. *Indian Journal of Microbiology*, 52(1), 3-12. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0148-8>

Paynich, M. L., Jones-Burrage, S. E., & Knight, K. L. (2017). Exopolysaccharide from *Bacillus subtilis* Induces Anti-Inflammatory M2 Macrophages That Prevent T Cell-Mediated Disease. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 198(7), 2689-2698. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601641>

Peetermans, A., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2021). Mechanisms underlying lactic acid tolerance and its influence on lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell* (Graz, Austria), 8(6), 111-130. <https://doi.org/10.15698/mic2021.06.751>

Pieniz, S., Andreadza, R., Anghinoni, T., Camargo, F., & Brandelli, A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37, 251-256. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.055>

Pintado, A., Barbosa, C., Pintado, M., Malcata, F., & Gomes, A. (2024). Efficient Screening and Enhanced Exopolysaccharide Production by Functional Lactic Acid Bacteria (LAB) in Lactose Supplemented Media. *Applied Microbiology Theory & Technology*, 37-50. <https://doi.org/10.37256/amtt.5120243374>

Pinto, M. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47, pp.323-330.

Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N. K., & Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 922-935. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>

Poindexter, B. & Committee on fetus and newborn. (2021). Use of Probiotics in Preterm Infants. *Pediatrics*, 147(6), e2021051485. <https://doi.org/10.1542/peds.2021-051485>

Polak-Berecka, M., Waśko, A., Szwajgier, D., & Chomaz, A. (2013). Bifidogenic and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N cultivated on different carbon sources. *Polish Journal of Microbiology*, 62(2), 181-188.

Prete, R., Dell'Orco, F., Sabatini, G., Montagano, F., Battista, N., & Corsetti, A. (2024). Improving the Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Fermented Milks with Exopolysaccharides-Producing *Lactiplantibacillus plantarum* Strains. *Foods*, 13, 1663. <https://doi.org/10.3390/foods13111663>

Quinto, E. J., Caro, I., Villalobos-Delgado, L. H., Mateo, J., De-Mateo-Silleras, B., & Redondo-Del-Río, M. P. (2019). Food Safety through Natural Antimicrobials. *Antibiotics*, 8(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040208>

Rahbar Saadat, Y., Yari Khosroushahi, A., & Pourghassem Gargari, B. (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 217, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.025>

Ramos, B., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. (2020). Biopreservation approaches to reduce *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. *Food Microbiology*, 85, 103282. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103282>

Randazzo, C. L., Pitino, I., Scifò, G. O., & Caggia, C. (2009). Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* wild strain. *Food Control*, 20(8), 756-763. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.09.020>

Rani, R. P., Anandharaj, M., & David Ravindran, A. (2018). Characterization of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus gasseri* FR4 and demonstration of its in vitro biological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 772-783. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.062>

Riaz Rajoka, M. S., Wu, Y., Mehwish, H. M., Bansal, M., & Zhao, L. (2020). *Lactobacillus* exopolysaccharides : New perspectives on engineering strategies, physiochemical functions, and immunomodulatory effects on host health. *Trends in Food Science & Technology*, 103. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.003>

Richard, C., Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., & Drider, D. (2003). Evidence on inhibition of *Listeria monocytogenes* by divercin V41 action. *Letters in Applied Microbiology*, 36 (5), 288–292. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01310.x>

Rocchetti, M. T., Russo, P., Capozzi, V., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D. (2021). Bioprospecting Antimicrobials from *Lactiplantibacillus plantarum* : Key Factors Underlying Its Probiotic Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 12076. <https://doi.org/10.3390/ijms222112076>

Roobab, U., Batool, Z., Manzoor, M. F., Shabbir, M. A., Khan, M. R., & Aadil, R. M. (2020). Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. *Current Opinion in Food Science*, 32, 17-28. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.01.003>

Rosenberg, M., Gutnick, D., & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons : A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9(1), 29-33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x>

Rousseaux, A., Brosseau, C., & Bodinier, M. (2023). Immunomodulation of B Lymphocytes by Prebiotics, Probiotics and Synbiotics : Application in Pathologies. *Nutrients*, 15(2), 269. <https://doi.org/10.3390/nu15020269>

Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z., & Yari Khosroushahi, A. (2017). Cellular and molecular effects of yeast probiotics on cancer. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(1), 96-115. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1179622>

Saelim, K., Jampaphaeng, K., & Maneerat, S. (2017). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* S0/7 isolated fermented stinky bean (Sa Taw Dong) and its use as a starter culture. *Journal of Functional Foods*, 38, 370-377. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.035>

Sahiner, M., Yilmaz, A. S., Gungor, B., Ayoubi, Y., & Sahiner, N. (2022). Therapeutic and Nutraceutical Effects of Polyphenolics from Natural Sources. *Molecules*, 27(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/molecules27196225>

Salimi, F., & Farrokh, P. (2023). Recent advances in the biological activities of microbial exopolysaccharides. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 39(8), 213. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03660-x>

Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E., & Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2), 93-106. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00128-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00128-7)

Sánchez, J., Vegas, C., Zavaleta, A. I., & Esteve-Zarzoso, B. (2019). Predominance of *Lactobacillus plantarum* Strains in Peruvian Amazonian Fruits. *Polish Journal of Microbiology*, 68(1), 127-137. <https://doi.org/10.21307/pjm-2019-015>

Sanders, M. E., Akkermans, L. M. A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hörmannspurger, G., Huys, G., Levy, D. D., Lutgendorff, F., Mack, D., Phothirath, P., Solano-Aguilar, G., & Vaughan, E. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*, 1(3), 164-185. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>

Santiago-Silva, P., Soares, N. F. F., Nóbrega, J. E., Júnior, M. A. W., Barbosa, K. B. F., Volp, A. C. P., Zerdas, E. R. M. A., & Würlitzer, N. J. (2009). Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, 20(1), 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.02.006>

Sarika AR, Lipton AP, Aishwarya MS (2019) Biopreservative Efficacy of Bacteriocin GP1 of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 on Stored Fish Filets. *Frontiers in Nutrition*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2019.00029>.

Sasikumar, K., Kozhummal Vaikkath, D., Devendra, L., & Nampoothiri, K. M. (2017). An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresource Technology*, 241, 1152-1156. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.075>

Sensoy, I. (2021). A review on the food digestion in the digestive tract and the used in vitro models. *Current Research in Food Science*, 4, 308-319. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.004>

Shahverdi, E. (2016). Probiotics and Gastrointestinal Diseases. *International Journal of Digestive Diseases*, 2. <https://doi.org/10.4172/2472-1891.100022>

Sharafi, H., Divsalar, E., Rezaei, Z., Liu, S.-Q., & Moradi, M. (2024). The potential of postbiotics as a novel approach in food packaging and biopreservation : A systematic review of the latest developments. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(33), 12524-12554. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2253909>

Sharma, K., Mahajan, R., Attri, S., & Goel, G. (2017). Selection of indigenous *Lactobacillus paracasei* CD4 and *Lactobacillus gastricus* BTM 7 as probiotic : Assessment of traits combined with principal component analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 122(5), 1310-1320. <https://doi.org/10.1111/jam.13426>

Shehata, A. A., Yalçın, S., Latorre, J. D., Basiouni, S., Attia, Y. A., Abd El-Wahab, A., Visscher, C., El-Seedi, H. R., Huber, C., Hafez, H. M., Eisenreich, W., & Tellez-Isaias, G. (2022). Probiotics, Prebiotics, and Phytogetic Substances for Optimizing Gut Health in Poultry. *Microorganisms*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020395>

Shehata, M. G., Alsulami, T., El-Aziz, N. M. A., Abd-Rabou, H. S., El Sohaimy, S. A., Darwish, A. M. G., Hoppe, K., Ali, H. S., & Badr, A. N. (2024). Biopreservative and Anti-Mycotoxigenic Potentials of *Lactobacillus paracasei* MG847589 and Its Bacteriocin in Soft White Cheese. *Toxins*, 16(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/toxins16020093>

Shen, J.-W., Shi, C.-W., & Xu, C. (2013). Exopolysaccharides from *Pleurotus pulmonarius* : Fermentation Optimization, Characterization and Antioxidant Activity. *Food Technology and Biotechnology*, 51, 520-527.

Shewale, R. N., Sawale, P., Khedkar, C., & Singh, A. (2014). Selection criteria for probiotics : A review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 9, 17-22.

Shi, C., & Maktabdar, M. (2022). Lactic Acid Bacteria as Biopreservation Against Spoilage Molds in Dairy Products – A Review. *Frontiers in Microbiology*, 12, 819684. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.819684>

Shigwedha, N., Sichel, L., Jia, li, & Zhang, L. (2014). Probiotical Cell Fragments (PCFs) as " Novel Nutraceutical Ingredients ". *Journal of Biosciences and Medicines*, 2, 43-55. <https://doi.org/10.4236/jbm.2014.23007>

Sidhu, P. K., Nehra, K., Sidhu, P. K., & Nehra, K. (2021). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria as Potent Antimicrobial Peptides against Food Pathogens. In *Biomimetics*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95747>

Simons, L. A., Amansec, S. G., & Conway, P. (2006). Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 16(8), 531-535. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.10.009>

Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation—A review. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 104-111. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>

Sivasankar, P., Seedeve, P., Poongodi, S., Sivakumar, M., Murugan, T., Sivakumar, L., Sivakumar, K., & Balasubramanian, T. (2018). Characterization, antimicrobial and antioxidant property of exopolysaccharide mediated silver nanoparticles synthesized by *Streptomyces violaceus* MM72. *Carbohydrate Polymers*, 181, 752-759. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.082>

Skoufou, M., Tsigalou, C., Vradelis, S., & Bezirtzoglou, E. (2024). The Networked Interaction between Probiotics and Intestine in Health and Disease: A Promising Success Story. *Microorganisms*, 12(1), 194. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010194>

Slima, S., Ktari, N., Chouikhi, A., Hzami, A., Bardaa, S., Trabelsi, I., Salah, B., & ben salah, R. (2022). Extraction, Characterization, and Structure of a Novel Heteropolysaccharide from *Lepidium sativum* and Its Effects on Wound Healing in Diabetic Rats. *BioMed Research International*, 2022, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2022/7858865>

Soares, D. G., Andreazza, A. C., & Salvador, M. (2003). Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH, and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 1077-1080. <https://doi.org/10.1021/jf020864z>

Sornplang, P., & Piyadeatsoontorn, S. (2016). Probiotic isolates from unconventional sources : A review. *Journal of Animal Science and Technology*, 58, 26. <https://doi.org/10.1186/s40781-016-0108-2>

Spanò, A., Laganà, P., Visalli, G., Maugeri, T. L., & Gugliandolo, C. (2016). In Vitro Antibiofilm Activity of an Exopolysaccharide from the Marine Thermophilic *Bacillus licheniformis* T14. *Current Microbiology*, 72(5), 518-528. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0981-9>

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-179. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6)

Su, S.-C., Chang, L.-C., Huang, H.-D., Peng, C.-Y., Chuang, C.-Y., Chen, Y.-T., Lu, M.-Y., Chiu, Y.-W., Chen, P.-Y., & Yang, S.-F. (2021). Oral microbial dysbiosis and its performance in predicting oral cancer. *Carcinogenesis*, 42(1), 127-135. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa062>

Tang, H., Huang, W., & Yao, Y.-F. (2023). The metabolites of lactic acid bacteria : Classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. *Microbial Cell*, 10(3), 49-62. <https://doi.org/10.15698/mic2023.03.792>

Tang, Y., Dai, X., Dong, B., Guo, Y., & Dai, L. (2020). Humification in extracellular polymeric substances (EPS) dominates methane release and EPS reconstruction during the sludge stabilization of high-solid anaerobic digestion. *Water Research*, 175, 115686. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115686>

Thompson, H. O., Önning, G., Holmgren, K., Strandler, H. S., & Hultberg, M. (2020). Fermentation of Cauliflower and White Beans with *Lactobacillus plantarum*—Impact on Levels of Riboflavin, Folate, Vitamin B12, and Amino Acid Composition. *Plant Foods for Human Nutrition* (Dordrecht, Netherlands), 75(2), 236-242. <https://doi.org/10.1007/s11130-020-00806-2>

Thorakkattu, P., Khanashyam, A. C., Shah, K., Babu, K. S., Mundanat, A. S., Deliephan, A., Deokar, G. S., Santivarangkna, C., & Nirmal, N. P. (2022). Postbiotics : Current Trends in Food and Pharmaceutical Industry. *Foods* (Basel, Switzerland), 11(19), 3094. <https://doi.org/10.3390/foods11193094>

Tomar, S.K., Anand, S., Sharma, P., Sangwan, V. and Mandal, S. (2015) Role of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics and Postbiotics in Inhibition of Pathogens. *Formatex*, 717-732.

Tomé, A. R., Carvalho, F. M., Teixeira-Santos, R., Burmølle, M., Mergulhão, F. J. M., & Gomes, L. C. (2023). Use of Probiotics to Control Biofilm Formation in Food Industries. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 12(4), 754. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040754>

Torino, M. I., Font de Valdez, G., & Mozzi, F. (2015). Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00834>

Trabelsi, I., Ktari, N., Ben Slima, S., Triki, M., Bardaa, S., Mnif, H., & Ben Salah, R. (2017). Evaluation of dermal wound healing activity and in vitro antibacterial and antioxidant activities of a new exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp.Ca6. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.017>

- Trabelsi, I., Slima, S. B., Chaabane, H., & Riadh, B. S. (2015). Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 541-546. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.045>
- Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., & Montesinos, E. (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2), 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.065>
- Trindade, D., Pereira Barbosa, J., Martins, E., & Tette, P. (2022). Isolation and identification of lactic acid bacteria in fruit processing residues from the Brazilian Cerrado and its probiotic potential. *Food Bioscience*, 48, 101739. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101739>
- Tukenmez, U., Aktas, B., Aslim, B., & Yavuz, S. (2019). The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells in vitro. *Scientific Reports*, 9(1), 8268. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44753-8>
- Ucar, Y., Özogul, Y., Özogul, F., Durmuş, M., & Köşker, A. R. (2020). Effect of nisin on the shelf life of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fillets stored at chilled temperature (4 ± 2 °C). *Aquaculture International*, 28(2), 851-863. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00512-5>
- Valero-Cases, E., Cerdá-Bernad, D., Pastor, J.-J., & Frutos, M.-J. (2020). Non-Dairy Fermented Beverages as Potential Carriers to Ensure Probiotics, Prebiotics, and Bioactive Compounds Arrival to the Gut and Their Health Benefits. *Nutrients*, 12(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/nu12061666>
- van Hijum, S. A. F. T., Kralj, S., Ozimek, L. K., Dijkhuizen, L., & van Geel-Schutten, I. G. H. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. *MMBR*, 70(1), 157-176. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.157-176.2006>
- Vanitha, P. R., Somashekaraiah, R., Divyashree, S., Pan, I., & Sreenivasa, M. Y. (2023). Antifungal activity of probiotic strain *Lactiplantibacillus plantarum* MYSN7 against *Trichophyton tonsurans*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1192449. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1192449>
- Vitali, B., Minervini, G., Rizzello, C. G., Spisni, E., Maccaferri, S., Brigidi, P., Gobbetti, M., & Di Cagno, R. (2012). Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiology*, 31(1), 116-125. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.027>
- Wang Y, Sun Y, Zhang X et al. (2015) Bacteriocin-producing probiotics enhance the safety and functionality of sturgeon sausage. *Food Control* 50, 729–735.

Wang, C., Cui, Y., & Qu, X. (2018). Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Archives of Microbiology*, 200(2), 195-201. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1446-2>

Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3 : The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087-1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>

Wang, G., Zhang, M., Zhao, J., Xia, Y., Lai, P. F.-H., & Ai, L. (2018). A Surface Protein From *Lactobacillus plantarum* Increases the Adhesion of *Lactobacillus* Strains to Human Epithelial Cells. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02858>

Wang, J., Zhang, J., Guo, H., Qiang, C., Abbas, Z., Tong, Y., Yang, T., Zhou, Y., Zhang, H., Wei, X., Si, D., & Zhang, R. (2023). Optimization of Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus plantarum* R301 and Its Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities. *Foods*, 12, 2481. <https://doi.org/10.3390/foods12132481>

Wang, K., Niu, M., Song, D., Song, X., Zhao, J., Wu, Y., Lu, B., & Niu, G. (2020). Preparation, partial characterization and biological activity of exopolysaccharides produced from *Lactobacillus fermentum* S1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(2), 206-214. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.07.009>

Wang, X., Shao, C., Liu, L., Guo, X., Xu, Y., & Lü, X. (2017). Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1173-1184. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.118>

Wang, Y., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, Z., Song, J., Gui, M., & Li, P. (2015). Bacteriocin-producing probiotics enhance the safety and functionality of sturgeon sausage. *Food Control*, 50, 729-735. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.045>

Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

Wayah, S. B., & Philip, K. (2018). Characterization, yield optimization, scale up and biopreservative potential of fermencin SA715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* GA715 of goat milk origin. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0972-1>

Wei, Y., Li, F., Li, L., Huang, L., & Li, Q. (2019). Genetic and Biochemical Characterization of an Exopolysaccharide With in vitro Antitumoral Activity Produced by *Lactobacillus*

fermentum YL-11. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2898.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02898>

Werning, M. L., Hernández-Alcántara, A. M., Ruiz, M. J., Soto, L. P., Dueñas, M. T., López, P., & Frizzo, L. S. (2022). Biological Functions of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria and Their Potential Benefits for Humans and Farmed Animals. *Foods*, 11(9), 1284. <https://doi.org/10.3390/foods11091284>

Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 965-974. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4>

Winkelströter, L. K., Bezirtzoglou, E., & Tulini, F. L. (2022). Editorial : Natural Compounds and Novel Sources of Antimicrobial Agents for Food Preservation and Biofilm Control. *Frontiers in Microbiology*, 13, 856858. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.856858>

Wu, S., Chen, Y., Chen, Z., Zhou, Q., Wei, F., Li, P., & Gu, Q. (2023). Antioxidant properties and molecular mechanisms of *Lactiplantibacillus plantarum* ZJ316 : A potential probiotic resource. *LWT*, 187, 115269. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115269>

Xiao, M., Ren, X., Yu, Y., Gao, W., Zhu, C., Sun, H., Kong, Q., Fu, X., & Mou, H. (2022). Fucose-containing bacterial exopolysaccharides : Sources, biological activities, and food applications. *Food Chemistry: X*, 13, 100233. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100233>

Yadav, A. K., Tyagi, A., Kumar, A., Panwar, S., Grover, S., Saklani, A. C., Hemalatha, R., & Batish, V. K. (2017). Adhesion of Lactobacilli and their anti-infectivity potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(10), 2042-2056. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.918533>

Yang, S., Xu, X., Peng, Q., Ma, L., Qiao, Y., & Shi, B. (2023). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, as an alternative to antibiotics, on regulation of intestinal health and the immune system. *Animal Nutrition*, 13, 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.02.004>

Yildirim, A., Mavi, A., & Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4083-4089. <https://doi.org/10.1021/jf0103572>

Zacharof, M.-P., & Lovitt, R. B. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria A Review Article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>

Zalán, Z., Hudáček, J., Štětina, J., Chumchalová, J., & Halász, A. (2010). Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *European Food Research and Technology*, 230(3), 395-404. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1179-9>

Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(3), 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>

Zavišić, G., Ristić, S., Petričević, S., Janković, D., & Petković, B. (2024). Microbial Contamination of Food: Probiotics and Postbiotics as Potential Biopreservatives. *Foods*, 13(16), 2487. <https://doi.org/10.3390/foods13162487>

Zeidan, A. A., Poulsen, V. K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P. M. F., Øregaard, G., & Neves, A. R. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: From genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp_1), S168-S200. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux017>

Zhang, J., Xiao, Y., Wang, H., Zhang, H., Chen, W., & Lu, W. (2023). Lactic acid bacteria-derived exopolysaccharide: Formation, immunomodulatory ability, health effects, and structure-function relationship. *Microbiological Research*, 274, 127432. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127432>

Zhang, K., Liu, S., Liang, S., Xiang, F., Wang, X., Lian, H., Li, B., & Liu, F. (2024). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, biological activity, structure-activity relationship, and application in the food industry: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 257(Pt 2), 128733. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128733>

Zhang, L., Zhao, B., Liu, C.-J., & Yang, E. (2020). Optimization of Biosynthesis Conditions for the Production of Exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* SP8 and the Exopolysaccharides Antioxidant Activity Test. *Indian Journal of Microbiology*, 60(3), 334-345. <https://doi.org/10.1007/s12088-020-00865-8>

Zhao, D., Wang, Q., Lu, F., Bie, X., Zhao, H., Lu, Z., & Lu, Y. (2022). A Novel Class IIb Bacteriocin-Plantaricin EmF Effectively Inhibits *Listeria monocytogenes* and Extends the Shelf Life of Beef in Combination with Chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(7), 2187-2196. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06269>

Zhao, Q., Zhao, Q., Li, J., & Yi, L. (2024). Antibacterial Activity and Action Mechanism of Bacteriocin Paracin wx7 as a Selective Biopreservative against Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* in Fresh-Cut Lettuce. *Foods*, 13(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/foods13101448>

Zhao, T., Wang, H., Liu, Z., Liu, Y., DeJi, Li, B., & Huang, X. (2023). Recent Perspective of *Lactobacillus* in Reducing Oxidative Stress to Prevent Disease. *Antioxidants*, 12(3), 769. <https://doi.org/10.3390/antiox12030769>

Zhao, X., & Liang, Q. (2023). Optimization, Probiotic Characteristics, and Rheological Properties of Exopolysaccharides from *Lactiplantibacillus plantarum* MC5. *Molecules*, 28, 2463. <https://doi.org/10.3390/molecules28062463>

Zhao, X., Chen, L., Zhao, L., He, Y., & Yang, H. (2020). Antimicrobial kinetics of nisin and grape seed extract against inoculated *Listeria monocytogenes* on cooked shrimps : Survival and residual effects. *Food Control*, 115, 107278. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107278>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus* : Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zheng, Z., Cao, F.-W., Wang, W., Yu, J., Chen, C., Chen, B., Liu, J., Firman, J., Renye, J., & Ren, D. (2020). Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* E680 and its effect on Hypercholesterolemic mice. *BMC Microbiology*, 20, 239. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01922-4>

Zhou, Y., Cui, Y., & Qu, X. (2019). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria : Structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydrate Polymers*, 207, 317-332. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.093>

Annexe

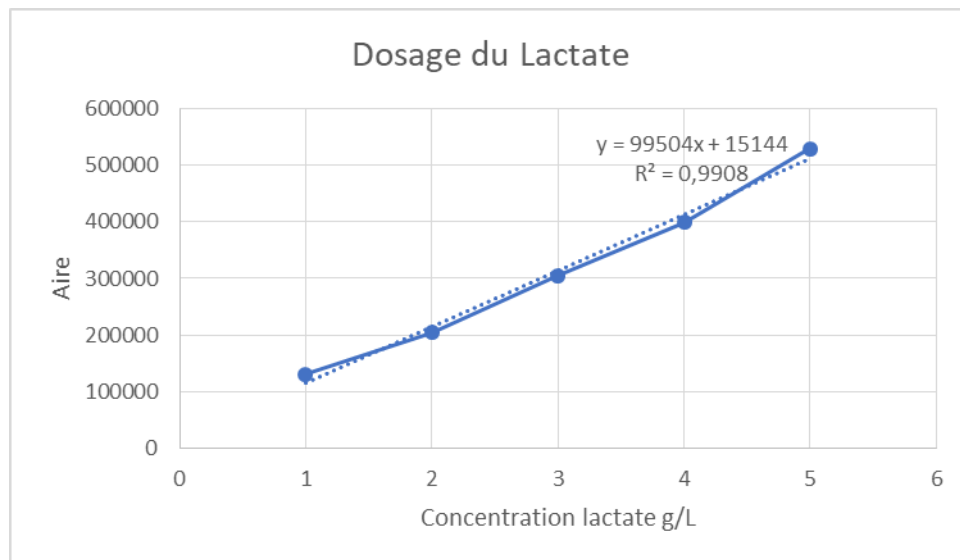


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide lactique

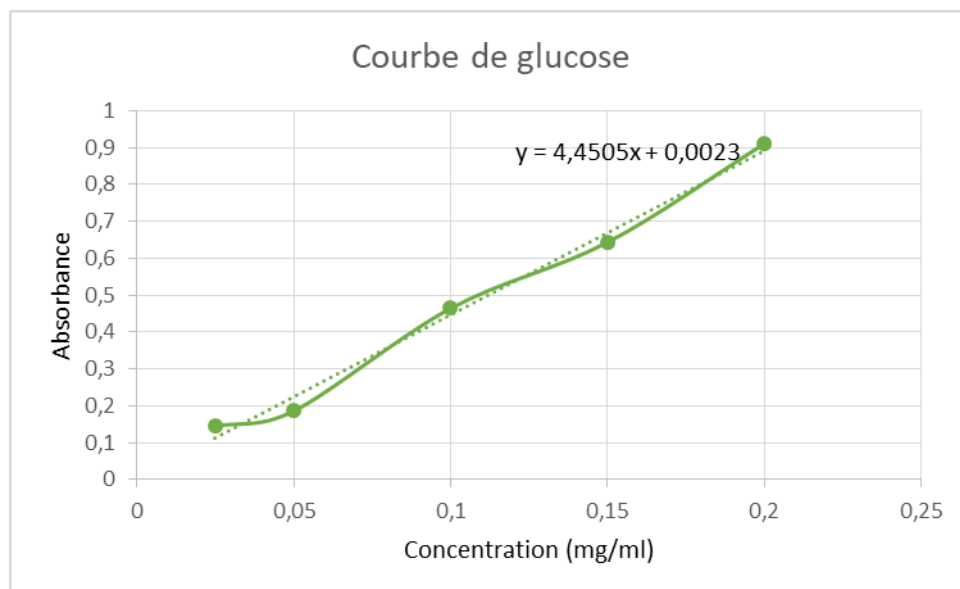


Figure 2 : Courbe standard de glucose

Production scientifique

Publications internationales

Ouarabi, L., Hamma-Faradji, S., Barache, N. *et al.* Characterization of *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from Algerian fruits for probiotic and biotechnological applications. *Antonie van Leeuwenhoek* 118, 65 (2025). <https://doi.org/10.1007/s10482-025-02074-z>

Ouarabi, L., Hamma-Faradji, S., Ouarabi, L., Barache, N., Trabelsi, I., Ben Salah, R., & Drider, D. Characterization and antioxidant activities of exopolysaccharides produced by *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from algerian fruits. **Article soumis.**

Ouarabi, L., Ouarabi, L., Hamma-Faradji, S., Mohedano, ML., López, P., Drider, D. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria : structure, biosynthesis, and health benefits. **Article soumis.**

Communications internationales

31eme congrès international de l'association tunisienne des sciences biologiques (ATSB), Hotel Blue Marine Hammamet, Tunisie, du 21 au 24 Mars 2022; OUARABI. L, ZIDI. G, HAMMA-FARADJI. S : « Screening of lactobacilli strains with probiotic effect isolated from mediterranean fruits ».

32ème Congrès International des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB, Hotel El Mouradi Palace - Kantaoui à Sousse du 18 au 20 mars 2023; OUARABI. L, HAMMA-FARAADJI. S, DRIDER. D : « Antagonistic effect of probiotic strains of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from local fruits ».

The first international conference on applied microbiology and biotechnology (ICAMB-2024), Bejaia (Algeria), 16th and 17th of October 2024 ; OUARABI. L, HAMMA-FARADJI. S, ZIDI. G, BARACHE. N, TRABELSI. I, BEN SALAH. R, DRIDER. D : « Isolation and

characterization of probiotic lactic acid bacteria strains producing exopolysaccharides from algerian fruits for potential use in food preservation and health enhancement ».

The first international one health seminar « IOHS 2024 », November 27-28, 2024 Annaba, Algeria); OUARABI. L, HAMMA-FARAADJI. S, DRIDER. D : « Utilization of *Lactiplantibacillus plantarum* Strains as Probiotics for the Prevention of Antibiotic Resistance: A One Health Approach ».

Communications nationales

1ère journée doctorale de Microbiologie Appliquée (JD-LMA), université de Bejaia, le 05 Décembre 2021; OUARABI. L, HAMMA-FARADJI. S, BENDJEDDOU. K, AIT MEDDOUR. A, ZIDI. G : « Fruits locaux de la région de Bejaia : source de bactéries lactiques productrices d'exopolysaccharides ».

The 4th conference on the Biology of Microbial systems (JBMS-2022), organized by the LBSM laboratory and the Ecole Normale Supérieure Cheikh Mohamed Bachir Al Ibrahimi de Kouba, Algérie, le 03 Décembre 2022 ; OUARABI. L, FARADJI-HAMMA. S and DRIDER. D : « Etude de propriétés probiotiques de souches de bactéries lactiques ayant des effets antagoniste et antioxydant ».

5emes journées des sciences de la nature et de la vie, université de Bejaia, Algérie, les 06 et 07 Décembre 2022; OUARABI. L, HAMMA-FARADJI. S, DRIDER. D : « Activités biologiques de souches probiotiques de *Lactiplantibacillus plantarum* isolées à partir d'une matrice végétale».

The national seminar on « Valorization of microbial origin products », 2-3th November 2024, Constantine (Algeria) ; OUARABI. L, HAMMA-FARADJI. S, TRABELSI. I, BEN SALAH. R, DRIDER : « Characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from fruits ».



Characterization of *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from Algerian fruits for probiotic and biotechnological applications

Lyliya Ouarabi · Samia Hamma-Faradji · Nacim Barache · Ghania Zidi · Yanath Belguesmia · Djamel Drider

Received: 23 December 2024 / Accepted: 10 March 2025 / Published online: 28 March 2025
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2025

Abstract Twenty-one lactic acid bacteria (LAB) strains were isolated from Algerian fruits such as white mulberry (*Morus alba* L.), prickly pear (*Opuntia ficus-indica*), date (*Phoenix dactylifera* L.), grape (*Vitis vinifera*) and fig (*Ficus carica*). The initial screening showed that ten out of twenty-one strains were tolerant to acid pH and bile salts and were further identified as *Lactiplantibacillus (L.) plantarum* strains by MALDI-TOF mass spectrometry and 16S rDNA sequencing. The identified strains were then characterized for their surface properties such as self-aggregation, hydrophobicity and biofilm formation. The resulting data were then statistically processed using Principal Component Analysis (PCA), after which only 5 strains were selected for further analysis. These five strains, designated *L. plantarum* F8, F13, FB23, D21 and M1, were found to be safe and able to adhere to human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells. In particular, all these strains were active against *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 through the

production of lactic acid (up to 12 g.l⁻¹) or bacteriocins, namely plantaricins, or their combination. In addition, these strains showed high antioxidant activity against the synthetic free radicals 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS+)) radical. These results demonstrate the importance of these *L. plantarum* strains for the development of new functional foods and probiotics and as biopreservatives. This study deepens and enriches the knowledge of *lactobacilli* from plant raw materials by focusing on the functional properties of new strains of *L. plantarum* isolated from Algerian fruits. In fact, with the growing interest in natural preservatives and probiotics, the results of this study could contribute to the development of new biotechnological products aimed at improving gut health, reducing food-borne illnesses and extending the shelf life of food by preventing spoilage.

Keywords Antagonism · Antioxidant · Caco-2 cells · Lactic acid production · *Lactiplantibacillus plantarum* · Probiotic

L. Ouarabi · S. Hamma-Faradji · N. Barache · G. Zidi
Université de Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature
et de la Vie, Laboratoire de Microbiologie Appliquée,
06000 Bejaia, Algeria

Y. Belguesmia (✉) · D. Drider
Unité Mixte de Recherche (UMR) Transfrontalière
BioEcoAgro1158, Univ. Lille, INRAE, Univ. Liège, UPJV,
YNCREA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte D'Opale,
ICV—Institut Charles Viollette, 59000 Lille, France
e-mail: yanath.belguesmia@univ-lille.fr

Introduction

Probiotics are defined as “live microorganisms that, when administered in adequate quantities, confer health benefits on the host” (FAO/WHO, 2002). Lactic acid bacteria (LAB) are widely used as probiotics

(Zhang et al. 2020). In particular, these microorganisms are generally recognized as safe (GRAS) by the United States Food and Drug Administration (FDA) and have a qualified presumption of safety (QPS) as assessed by the European Food Safety Authority (EFSA) (Hazards et al. 2020). Probiotics are commonly found in fermented foods such as yogurt, kefir, sauerkraut and kimchi, and are also available as supplements (Khushboo et al. 2023). Although fermented dairy and plant products have historically been the source of live active cultures (LACs), fruits may also be an increasingly be a source of these beneficial microorganisms (de Albuquerque et al. 2018). In contrast to vegetables, fruits are generally considered to be more beneficial from a public health perspective due to their ability to confer natural protection against harmful microorganisms (Alegbeleye et al. 2022). This is attributed to the presence of organic acids in sufficient quantities to maintain a pH of 4.6 or less. The acid itself and the low pH of the fruit play a critical role in selecting of the dominant microbiota. The combination of high nutrient content 'carbohydrates, minerals, and nitrogen compounds' and low fruit pH create optimal conditions for the growth of LAB (Naeem et al. 2012) making this food group as a good source for such beneficial microbes. The selection of a potential probiotic strain must meet several criteria, such as resistance to acidic environments, bile tolerance, cell surface hydrophobicity and self-aggregation (Khusro et al. 2021). Moreover, probiotics are known to be associated with various health-promoting effects, such as reduction of cholesterol levels (Simons et al. 2006), enhancement of antioxidant activity (Ejtahed et al. 2012), improvement of lactose digestion (Hertzler and Clancy 2003), immunomodulatory effects (Rousseaux et al. 2023) and antimicrobial activities against pathogens (Mikkili et al. 2018). Notably, the most common species known for their probiotic properties belong to *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. (El Hage et al. 2017). *Lactiplantibacillus* (*L.*) *plantarum* is a LAB with a long history of use in the food industry, both in fermentation processes and in the development of protective cultures (Čanak et al. 2018; Cruz et al. 2021). This versatile LAB is widely distributed in a variety of environments. Indeed, it can be found in the gastrointestinal tract of humans and animals, and in various foods, including meat, fish, fermented vegetables and dairy products (Mao et al. 2021). In addition, some studies

indicate the essential role of *L. plantarum* in food biopreservation (Du et al. 2023; Hashemi et al. 2023) and its ability to inhibit the growth of spoilage microorganisms and pathogens by producing organic acids and lowering pH, hydrogen peroxide (H₂O₂) and bacteriocins (Agriopoulou et al. 2020; De Simone et al. 2024). LAB produced bacteriocins have attracted considerable interest due to their ability to safely and effectively prevent spoilage of minimally processed foods, thereby extending shelf life and reducing economic losses (Mokoena et al. 2021). There is few studies on the isolation of *L. plantarum* from fruits in the Kabylie region of Algeria. This work highlights some of the properties of *L. plantarum* strains from native Kabylie fruits by evaluating their probiotic and biopreservative potential in vitro, including acid and bile tolerance, cell adhesion, antioxidant activity, acid production and antibacterial activity. This study explores the application of *L. plantarum* as a probiotic and biotechnological agent in the food industry.

Material and methods

Isolation of LAB strains and screening for acid pH and bile tolerance

Eight fruit samples were collected from agricultural fields in Ath Yenni (Tizi Ouzou, Algeria) and the Soummam Valley (Bejaia, Algeria). They consisted of white mulberry (*Morus alba* L.), prickly pear (*Opuntia ficus-indica*), date (*Phoenix dactylifera* L.), figs (*Ficus carica*) and grape (*Vitis vinifera*) in order to isolate LAB strains. The isolation procedure was carried out according to the instructions reported by Barache et al. (2020b). The samples were placed in airtight bags and transported to the laboratory. Then, 100 g of each fruit was mixed with 100 ml of sterile saline water (8.5 g NaCl l⁻¹) using a blender. After fermentation of the fruit mixture at 37 °C for 24 h, 100 µl of each fruit mash was inoculated into 10 ml of de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth (pH 6.5) (Conda, Madrid, Spain) and incubated at 37 °C for 24 h. The resulting cultures were plated on MRS agar plates and incubated again at 37 °C for another 48 h. The colonies obtained were subjected to a preliminary identification based on their macroscopic appearance on an agar plate, microscopic observation after Gram staining and catalase revelation assay.

Gram-positive and catalase-negative isolates were retained and stored at -80°C in MRS broth containing 30% (v/v) glycerol (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) until further characterization.

Isolates were tested for resistance to bile and acidic stress. This test was performed to mimic the survival of the strains during passage through the human gastrointestinal tract (GIT), using the method described by Ait Seddik et al. (2017). For acid tolerance, LAB isolates were grown in 5 ml of de MRS broth (Conda, Madrid, Spain) for 18 h at 37°C . The cells were then harvested by centrifugation (8000 g, 4°C , 10 min), washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and resuspended in 5 ml of MRS broth adjusted to pH 2.0 with hydrogen chloride (HCl) in the presence of pepsin (Loba Chemie, India) at $3\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Aliquots of $100\text{ }\mu\text{l}$ were taken after 0 and 2 h incubation at 37°C , serially diluted and plated on MRS agar to determine the number of viable cells, expressed as $\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$. For bile tolerance, 5 ml of PBS pH 8.0 containing 0.3% (w/v) bile salts (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was inoculated with LAB isolates at $10^8\text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ and then incubated at 37°C for 4 h. After incubation, the survival rate was determined as previously described for the acid tolerance assay as reported by Ait Seddik et al. (2017).

Molecular identification of selected isolates

MALDI-TOF spectrometry identification

MALDI-TOF spectrometry was used for strain identification (Nacef et al. 2017). For this purpose, the strains were grown on MRS agar (Conda, Madrid, Spain) for 48 h and pure colonies were spotted on a ground steel MALDI target. The spots (three spots for each isolate) were covered with 1 ml of 70% formic acid solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), dried at room temperature, then covered again with 1 ml of matrix solution (a-cyano-4-hydroxycinnamic acid [HCCA]; Bruker Daltonics) dissolved in 50% (v/v) acetonitrile (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 47.5% (v/v) water and 2.5% (v/v) trifluoroacetic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and allowed to dry before analysis using the MALDI Biotyper. The target was analysed using the MALDI-TOF MS spectrometer Autoflex speed TM (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) in linear positive mode. Mass spectra were analysed in the m/z range

of 2000 to 20,000 and a bacterial test standard (BTS, Bruker Daltonics) was used for instrument calibration according to Bruker recommendations. The m/z ratios of the detected ions in each MALDI-TOF MS profile were determined using Flex Analysis 3.4 for comparison with the database. The identification scores recommended by the manufacturer were used: 2.00–3.00, high confidence identification; 1.70–1.99, low confidence identification; 0.00–1.69, no organism identification possible.

16S rDNA sequencing of *Lactobacillus* strains

Total genomic DNA was extracted from each selected strain using the NucleoSpin Microbial DNA Mini Kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany) and amplified with primers S1: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC AT-3' and S2: 5'-GGMTACCTTGTTACGAYTTC-3' using the following PCR program: $94^{\circ}\text{C}/3\text{ min}$, 29 cycles of $94^{\circ}\text{C}/40\text{ s}$, $55^{\circ}\text{C}/50\text{ s}$ and $72^{\circ}\text{C}/2\text{ min}$ and finally $72^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$. The amplicons were purified using NucleoSpin® gel and PCR clean-up (Macherey–Nagel, Düren, Germany) and sequenced (Eurofins, Ebersberg, Germany), and the resulting sequences were analysed using the NCBI standard nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) as previously described by Altschul et al. (1990).

Characterisation of the surface properties of strains

Self-aggregation and cell surface hydrophobicity properties

Aggregation assays were performed as described by Kos et al. (2003). Briefly, *Lactobacillus* strains were grown for 18 h at 37°C in MRS broth (Conda, Madrid, Spain). After centrifugation (8000 g, 4°C , 10 min), the pellets were collected, washed twice with sterile 0.01 M PBS (pH 7.2) and resuspended at $10^8\text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ in the same buffer. Cell suspensions were mixed by vortexing and autoaggregation was determined after 2 h and 4 h incubation at 37°C . An aliquot (1 ml) of these suspensions was then carefully removed from the upper suspension and its absorbance was read at 600 nm on a spectrophotometer (Specord®, Shimadzu, Germany). The percentage of self-aggregation was calculated using the following formula: $\text{selfaggregation}(\%) = 1 - (A_t/A_0) \times 100$, where A_t is the absorbance at time $t=2$ or 4 h and

A₀ is the absorbance at time t=0 h. The hydrophobicity of the cell surface was determined using the microbial adhesion to hydrocarbon (MATH) method described by Rosenberg et al. (1980). Bacteria from the overnight culture were harvested by centrifugation (8000 g, 4 °C, 10 min), washed twice with sterile 0.01 M PBS (pH 7.2), and resuspended in the same buffer at 10⁸ CFU.ml⁻¹. The absorbance of the cell suspension was measured at 600 nm (A₀). One milliliter of xylene was added to 3 ml of cell suspension and mixed by vortexing for 2 min. The suspension was incubated at room temperature to allow phase separation. The aqueous phase was removed and its absorbance at 600 nm (A_t) was read. The percentage of bacterial adhesion to the solvent was calculated using the following formula: $Hydrophobicity(\%) = 1 - (A_t/A_0) \times 100$, where A_t is the absorbance of the aqueous phase after separation of the two-phase system and A₀ is the absorbance of the initial bacterial suspension.

Biofilm formation on polystyrene microplates

To evaluate the biofilm formation of the studied strains on polystyrene plates, a semi-quantitative method was used as previously described by Ait Ouali et al. (2014). Briefly, 100 µl of each culture of *Lactobacillus* at 10⁸ CFU.ml⁻¹ grown in MRS broth (Conda, Madrid, Spain) were added to the wells of sterile 96-well microplates already filled with 100 µl of tryptic soy broth (TSB) (Difco, Detroit, MI, USA). The microplates were allowed to stand for 15 min with gentle agitation before incubation at 37 °C. After 24 h, the cultures were aspirated and non-adherent cells were removed by washing the wells twice with PBS (10 mM, pH 7.2). Then 200 µl of 96% ethanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to each well to fix the adherent cells. After 15 min of fixation, the wells were drained, dried and then stained with 0.1% (w/v) crystal violet (Biochem Chemopharma, Québec Canada) for 30 min. The stained cells were washed twice with 200 µl of PBS before the dye was extracted with 200 µl of 96% ethanol. The number of cells was quantified using a microplate reader (ELX800, BioTek, Winooski, VT, USA) by measuring the absorbance (A) at 630 nm. These strains were classified into four categories according to the recommendations of Stepanovic et al. (2000). Considering Ac as the absorbance of the control

(sterile TSB), the following interpretations were applied: A ≤ Ac: non-adherent (non-biofilm producer), 2Ac ≥ A > Ac: weakly adherent (weak biofilm producer), 4Ac ≥ A > 2Ac: moderately adherent (moderate biofilm producer) and strongly adherent (strong biofilm producer): A > 4Ac.

Adhesion to human intestinal cells

The cell line used for the adhesion assay was the human colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells (Pinto 1983) grown in a controlled atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C in DMEM containing 4.5 g glucose l⁻¹, 2 mM L-glutamine, 100 U penicillin ml⁻¹, 100 U streptomycin ml⁻¹, 1% (v/v) nonessential amino acids, and 10% (v/v) foetal calf serum (FCS). All reagents were purchased from PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Germany). This assay was performed according to the protocol as previously described by Bendali et al. (2011). Briefly, to assess adhesion ability, monolayers of Caco-2 cells were prepared in 24-well tissue culture plates by seeding 4.10⁴ cells per well and incubated for 7 days. Overnight cultures of the selected *Lactobacillus* strains grown on MRS broth were harvested by centrifugation (8,000 × g, 4 °C, 10 min), resuspended again in DMEM without FCS and antibiotics, and then applied to confluent Caco-2 cell monolayers (10⁶ CFU per well). After 2 h of incubation at 37 °C (5%, CO₂ and 95% air), cell monolayers were washed twice with 500 µl of PBS (10 mM, pH 7.2) to remove nonadherent bacteria and lysed by incubation at room temperature for 15 min in the presence of 200 µl trypsin/EDTA Gibco® (Thermo Fisher Scientific). Lysates were serially diluted and plated on MRS agar (pH 6.5) (Conda, Madrid, Spain) to determine the number of adherent bacteria.

Safety characteristics: hemolytic activity and cytotoxicity on Caco-2 cells

Lactobacillus strains were characterized for their hemolytic activity. For this purpose, aliquots of 5 µl obtained from each *Lactobacillus* strain, grown anaerobically for 18 h at 37 °C on MRS broth (pH 6.5) (Conda, Madrid, Spain) were plated directly on Columbia blood agar and incubated at 37 °C for 48 h. After this period, the blood agar plates were examined for the presence of signs of β-hemolysis (clear zones around colonies), α-hemolysis (greenish zones

around colonies), or γ -hemolysis (no zones around colonies) (Argyri et al. 2013).

To evaluate the effect of *Lactobacillus* strains on human cells, Caco-2 intestinal cells were used as an in vitro model. This cell line is derived from a human colon adenocarcinoma. These cells are cultured at 37 °C in a modified atmosphere of 5% CO₂ in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 5 mM L-glutamine, 100 U penicillin ml⁻¹, 100 U streptomycin ml⁻¹ and 10% (v/v) FCS. All cell culture reagents were provided by PAN-Biotech (Aidenbach, Germany). For cytotoxicity assays, Caco-2 cells were seeded in 96-well microplates at a load of 8.10³ cells per well and incubated for 7 days. The culture medium was changed after 3 days of incubation. Fresh cultures of *lactobacilli* were centrifuged (8,000×g, 4 °C, 10 min). The pellets were washed with sterile 0.01 M PBS (pH 7.2) and resuspended in DMEM without FCS or antibiotics. Caco-2 monolayers were washed with DMEM medium without FCS or antibiotics, then bacteria were added to the wells at a ratio or MOI (multiplicity of infection) of 1:10 (Caco-2/*Lactobacillus*). Wells containing only DMEM medium was added were used as controls. The microplates were incubated for 24 h at 37 °C under 5% CO₂. After incubation, the medium was removed and the Caco-2 cell monolayers were washed twice with FCS and antibiotic-free DMEM medium. The metabolic activity of Caco-2 cells was determined after 24 h of incubation at a ratio of 1:10 (Caco-2/*Lactobacillus*). After 24 h of contact with *lactobacilli* strains. The wells were washed with PBS and cytotoxicity was measured using propidium iodide. After incubation in the dark, absorbance was measured using a SpetraMax reader (excitation 535 nm/emission 617 nm). Results are expressed as percentage of Caco-2 cell death.

Antibacterial activity

The inhibitory properties of five selected *Lactobacillus* strains were evaluated against *S. aureus* ATCC 6538 and *E. coli* ATCC 8739 were evaluated using both the well diffusion and spot-on-lawn methods (Bendali et al. 2011). For the well method, 10 ml of Mueller Hinton (MH) agar (Conda, Madrid, Spain), previously inoculated with the target strain at 10⁶ CFU.ml⁻¹, was added to Petri dishes. When the medium solidified, wells were made and filled

with 100 µl of neutralized or non-neutralized cell-free supernatants (CFS) obtained from *Lactobacillus* cultures. CFS neutralization was performed using 3 M NaOH to adjust the pH to 6.5. For the spot-on lawn test, 5 µl of *Lactobacillus* cultures were plated on MRS (Conda, Madrid, Spain) plates and incubated for 18 h at 37 °C. Then, 10 ml of MH (Conda, Madrid, Spain) agar (8 g.l⁻¹), previously inoculated with the target strain at 10⁶ CFU.ml⁻¹, was added and incubated again for 18 h at 37 °C. After incubation, the plates were inspected, any inhibition zone around the wells or spots was recorded, and the diameters were measured.

Quantification of lactic acid

Quantification of lactic acid produced by *Lactobacillus* strains was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a spectra system P1000XR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a fast fruit juice column (50 mm×7.8 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) (Ait Seddik et al. 2017). The mobile phase used was H₃PO₄ (0.05%, w/w) at a flow rate of 0.6 ml.min⁻¹ and a temperature of 55 °C. Supernatants from *Lactobacillus* cultures were collected after 8, 18, and 24 h of incubation at 37 °C in MRS broth (Conda, Madrid, Spain), then centrifuged (8000 g, 4 °C, 10 min) and filtered through a 0.2 µm/pore filter. A calibration curve of pure lactic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with concentrations of 1, 5, 10, 15, and 20 g.l⁻¹ was performed to establish the correlation between the data obtained from the chromatographic peak area and the concentration of lactic acid produced. The peak corresponding to lactic acid eluted at 5.32 min was identified using Azur software.

Genome sequencing and analysis

Genome sequencing of the strains expressing antagonistic properties against the tested target microorganisms was performed by Eurofins (Ebersberg, Germany). The whole genome draft sequences of D21, F8, F13 and FB23 strains were analysed using RAST, which allows the analysis of open reading frames (ORFs). Then they were searched using the SEED database. In addition to 16S rDNA analysis, the identification of the strains was also confirmed by *recA* gene sequence analysis, which was obtained after

whole genome sequencing. The genome sequences of the strains considered suitable were searched in bacteriocin databases such as BAGEL4 (<https://bagel4.molgenrug.nl>) and Antismash (<https://antismash.secondarymetabolites.org>) to reveal the presence of putative genetic determinants of antimicrobial compounds including bacteriocins.

Antioxidant activity

Determination of antioxidant activity by DPPH radical scavenging

Cultures of *Lactobacillus* strains were inoculated into MRS broth (Conda, Madrid, Spain) and incubated at 30 °C for 18 h. The overnight culture was centrifuged (8000 g, 4 °C, 10 min). The CFS were subjected to 2,2-di-phényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) free radical scavenging assay, as described by Sharma et al. (2017). A volume of 500 µl of CFS was added to 3 ml of freshly prepared DPPH (5 mg/100 ml of methanol), mixed by vortexing and incubated for 30 min in the dark. For the preparation of intact cells, *Lactobacillus* cells were harvested by centrifugation (8000 g, 4 °C, 10 min) after 18 h of incubation at 37 °C, then they were washed three times with PBS (10 mM, pH 7.2) and resuspended at 10^8 CFU. ml⁻¹ in this same buffer. Absorbance was measured at 515 nm with non-inoculated MRS broth (Conda, Madrid, Spain) as blank. Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Switzerland) was used as the synthetic and natural standard. The percentage of radical scavenging activity was calculated according to the equation:

$$\text{Scavenging(\%)} = [1 - A515(\text{sample})/A515(\text{blank})]100\%$$

Antioxidant capacity using the ABTS + method

Antioxidant activity was determined using the ABTS + (2,2-Azino-bis: 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation method previously described by Rossini et al. (2009) and Pieniz et al. (2014). ABTS + was prepared by reacting ABTS stock solution with potassium persulfate (2.45 mM) (final concentration) and allowing the mixture to stand for 16 h at room temperature before use. The radical was dissolved in water (7 mM). The solution was then used for a maximum of three days. Prior to analysis, the ABTS + solution was diluted with ethanol (Honeywell Riedel-de Haën™, Germany) to

an absorbance of 0.700–0.020 at 734 nm. Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Switzerland) was used as a standard in the range of 0–9 mg.ml⁻¹. Then, 1 ml of ABTS + solution was added to 10 ml of each sample (or standard). The absorbance was determined after 5 min. In another hand, ultrapure water was used as a control. The percentage (%) inhibition of the absorbance at 734 nm was determined from the ascorbic acid standard curve.

Statistical analyses

Data are expressed as the mean ± standard error calculated from three independent experiments. Analysis of statistical significance was performed by one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey test ($p < 0.05$). Data obtained for acid resistance and bile salt tolerance, auto-aggregation, hydrophobicity and biofilm formation ability of all LAB isolates were analysed by principal component analysis (PCA) using the FactoMineR package. Principal component analysis was performed using R version 3.5.2 (r-project.org, R foundation for statistical computing). Graphs were generated using GraphPad Prism 8.

GenBank accession number of the strains

All strains used in this study have been deposited in GenBank under the following accession numbers: F2 (PP382194), F3 (PP382838), F8 (PP383758), F13 (PP383941), FB13 (PP383940), FB23 (PP383982), FB24 (PP384000), D21 (PP384145), M1 (PP384174), and M2 (PP384178). These deposits ensure that the strains are publicly available for further research and validation.

Results

The isolated LAB strains showed good to high tolerance to acid pH and bile conditions tested

Twenty-one isolates were obtained from five fruits (prickly pear, fresh fig, white mulberry, grape and date) harvested in the Kabylie region of Algeria. These isolates were assigned to the LAB group on the basis of their Gram-positive staining and the absence of catalase. After 24 h of fermentation, 5 isolates were obtained from prickly pear puree, 10 isolates

from fresh fig puree, 2 isolates from white mulberry puree, 1 isolate from date puree, and 3 isolates from grape puree.

The survival of all the LAB isolates was evaluated under acidic pH and in the presence of bile salt. However, only 10 strains were able to tolerate both bile and acid stress. The strains were isolated from figs (F2, F3, F8), prickly pears (F13, FB13, FB23 and FB24), dates (strain D21), mulberries (strains M1 and M2) (Fig. 1).

Resistance to acidity in MRS broth (pH 2) containing $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ of pepsin after 2 h incubation at 37°C showed a survival rate between $70.653 \pm 0.592\%$ and $98.71 \pm 1.27\%$, which was similar for all the isolates. However, when the incubation time was increased to 4 h, the survival rates of these isolates decreased. Isolate D21 had a survival rate of $94.72 \pm 1.554\%$, followed by isolates F8, M1, FB23 and F1. Regarding to bile resistance, survival rates of more than 50% were recorded for isolates F8, FB23, FB24, FB13 and D21 had survival rates greater than 50%, with a maximum survival rate of $58.803 \pm 0.179\%$ for isolate D21. The less resistant isolates were strains FB3 and M1 with survival rates of $25.55 \pm 3.156\%$ and $25.337 \pm 0.299\%$, respectively (Fig. 1).

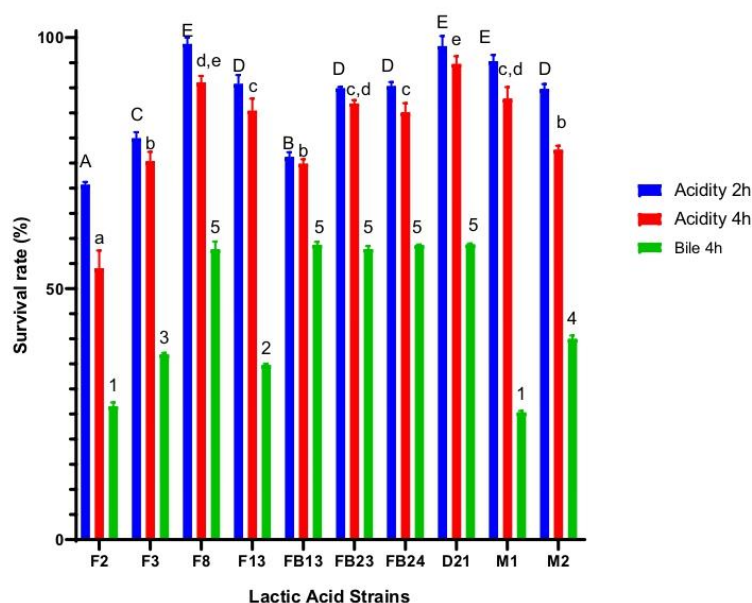
Molecular identification of LAB isolated from Algerian fruits showed predominance of *Lactiplantibacillus plantarum* species

The 10 isolates were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. This identification revealed the presence of a single dominant species, namely *L. plantarum*. The identification of these strains was confirmed by 16S rDNA sequencing, which corroborated the mass spectrometry identifications. A phylogenetic tree was constructed based on their 16S rDNA sequences compared to related species obtained from the NCBI database and generated using MEGA XI software (Fig. 2). These ten strains were then selected and analysed for their probiotic properties.

The isolated *L. plantarum* strains have remarkable self-aggregation and cell surface hydrophobicity properties

The 10 selected *Lactobacillus* strains showed the highest auto-aggregation percentages after 4 h of incubation (Fig. 3). The results showed that the obtained auto-aggregation percentages ranged from $26.533 \pm 2.059\%$ to $82.1 \pm 0.755\%$. The highest

Fig. 1 Percentage survival of LAB isolates under acidic conditions or in the presence of bile salts. Each assay was performed in triplicate. Means and standard errors are presented. Means within a column with different (number, lowercase and uppercase) letters are significantly different ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey test for pairwise comparisons



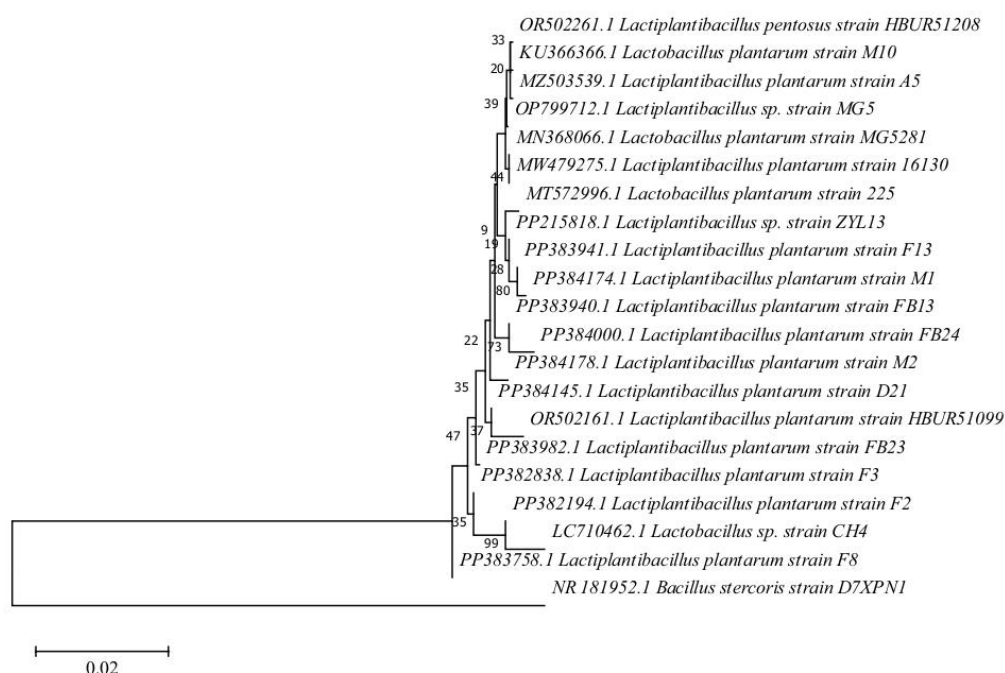


Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA gene sequences of the isolates and related standard strains generated by the MEGA XI software

percentage was recorded by *L. plantarum* M1 strain isolated from white mulberry, with a rate of $82.1 \pm 0.755\%$ after 4 h of incubation, which was significantly higher ($p < 0.05$) than for the other strains. As for the other strains, the *L. plantarum* D21 strain showed an auto-aggregation rate of $71.733 \pm 1.986\%$. Similarly, the hydrophobicity percentages of the strains ranged from $52.5 \pm 4.229\%$ to $89.567 \pm 1.358\%$ (Fig. 3).

Lactobacillus strains form biofilm on polystyrene tissue culture plates (TCP) in a strain dependent-manner

The results shown in Fig. 3 demonstrate the ability of all strains (10) to adhere and form biofilms. The measured absorbance at 630 nm ranged from 0.488 ± 0.094 to 0.927 ± 0.084 , showing that 9 from 10 of the *L. plantarum* strains have a high adhesion capacity according to the classification of Stepanovic

et al. (2000) with a maximum adhesion capacity of 0.927 ± 0.084 for *L. plantarum* FB23 followed by strain *L. plantarum* D21 with an absorbance of 0.916 ± 0.167 . However, strain *L. plantarum* F2 showed a moderate adhesion capacity with an absorbance of 0.488 ± 0.094 .

Principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering showed three clusters of *L. plantarum* strains

The results of the PCA performed on the ten strains of *L. plantarum* with 7 variables showed that 98.98% of the total variation was distributed in 5 dimensions. The two most representative dimensions are Dim 1 (55.44%) and Dim 2 (24.42%) (Fig. 4a).

The variables that have the most significant contribution to the construction of the first dimension (Dim 1) and have higher quality representative coefficients of variables (Cos 2) and are strongly and positively

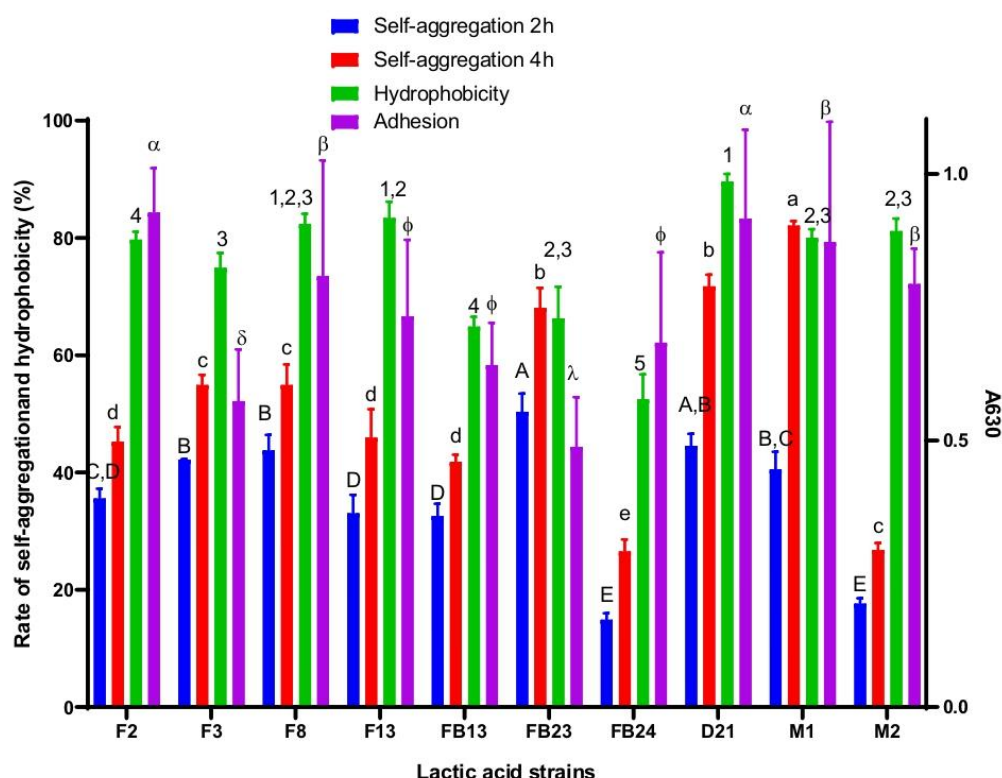


Fig. 3 Percentage of self-aggregation after 2 and 4 h of incubation, hydrophobicity of the cell surface and adhesion to 96-well polystyrene microplates of *L. plantarum*. Each assay was performed in triplicate. Means and standard errors are pre-

sented. Means within a column with different (number, lower-case and uppercase) letters are significantly different ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey test for pairwise comparisons

correlated with Dim 1 are adhesion on microplates, hydrophobicity and acidity (2 h and 4 h). On the other hand, variables such as bile and auto-aggregation (2 h and 4 h) contribute to the formation of Dim 2. Hierarchical Clustering (HCPC) was used to group related strains so that a probiotic criterion results in the same cluster. The individuals are grouped into three clusters (Fig. 4b, c). The first cluster consists of 3 strains (F2, F3 and FB13). These strains have the lowest scores for adhesion to microplates and resistance to acid and bile. On the other hand, the second cluster contained two strains (FB24 and M2) and recorded the lowest auto-aggregation rates. However, the third cluster was composed of five strains of *L. plantarum* (F8, F13, FB23, D21 and M1), which, in addition to

having the best rates of resistance to acid and bile, had significantly ($p < 0.05$) higher surface hydrophobicity, adhesion to microplates and auto-aggregation. The PCA analysis allowed us to select the five strains (F8, F13, FB23, D21 and M1) for further work.

The selected *L. plantarum* strains adhere remarkably to human colon cells (Caco-2)

The five strains (F8, F13, FB23, D21 and M1) selected after the PCA analysis were tested for their ability to adhere to human intestinal epithelial cells (Fig. 5). Adhesion rates ranged from $2.467 \pm 0.454\%$ to $3.633 \pm 0.621\%$ for strain *L. plantarum* D21, which

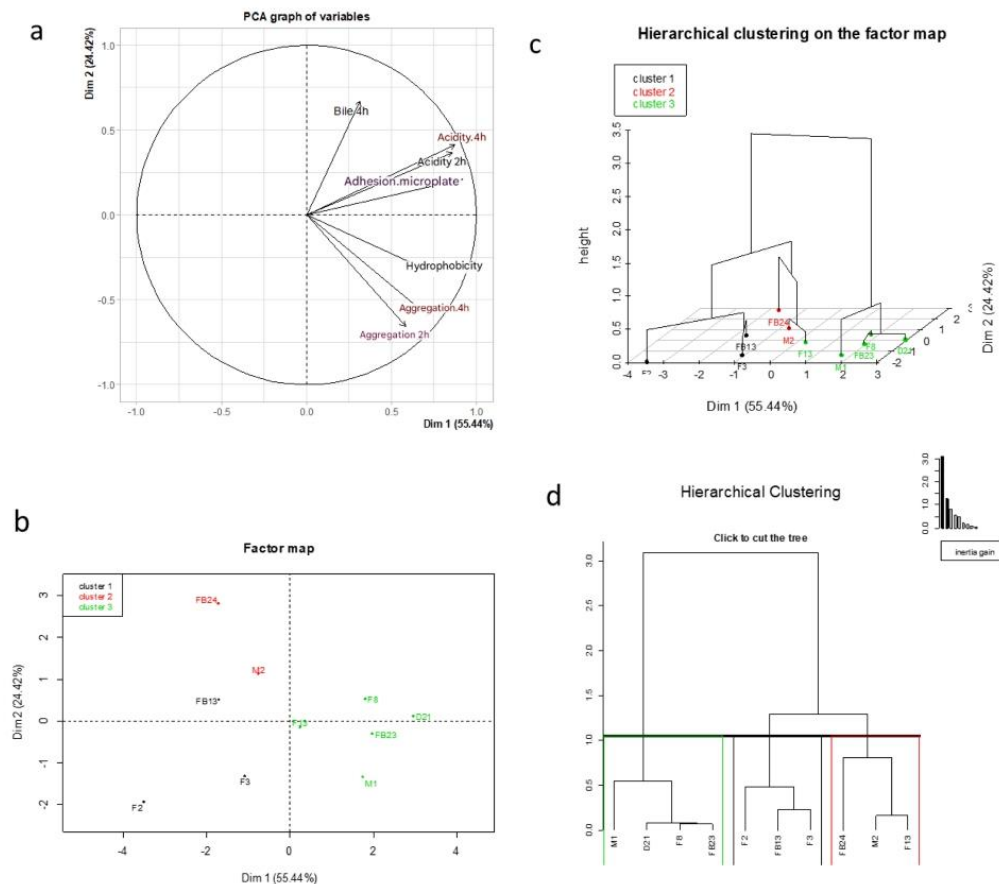


Fig. 4 Principal component analysis (PCA) based on the probiotic properties of selected *L. plantarum* strains performed on FactoMineR. **a.** Projection of the 7 variables in the two-dimensional space of Dim 1 and Dim 2. (1) Resistance to acid pH after 2 h, (2) Resistance to acid pH after 4 h, (3) Resistance to bile, (4) Surface hydrophobicity, (5) Self-aggregation after

2 h, (6) Self-aggregation after 4 h, (7) Adhesion to microplate. **b.** Projection of the ten *Lactobacillus* strains in the two-dimensional space of Dim 1 and Dim 2. **c.** Hierarchical grouping of the *Lactiplantibacillus plantarum* strains in a three-dimensional space. **d.** Hierarchical classification of the ten *L. plantarum* strains based on their tested probiotic properties

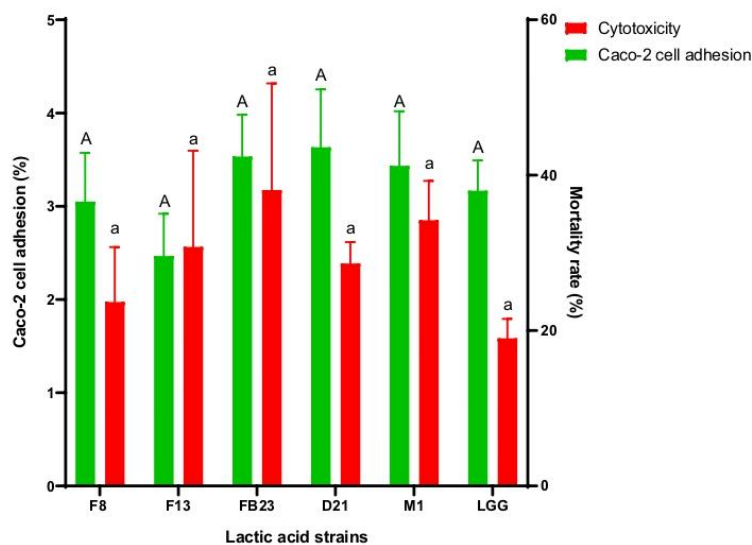
also showed particularly high rates of self-aggregation and hydrophobicity.

The *L. plantarum* strains are safe, γ -hemolytic and non-cytotoxicity

The five *L. plantarum* strains tested were devoid of any hemolytic activity (data not shown). In addition

the results shown in Fig. 5, expressed as the mortality rate of Caco-2 cells in the presence of *L. plantarum* strains compared to the control (Caco-2 cells alone), showed that the mortality rates ranged from $23.687 \pm 7.062\%$ to $38.093 \pm 13.731\%$. The lowest mortality rate was attributed to strain *L. plantarum* F8, followed by strain *L. plantarum* D21 with a mortality rate of $(28.635 \pm 2.74\%)$.

Fig. 5 Percentage of adhesion and cytotoxicity of selected strains on Caco-2 cells. Data are means of at least three independent experiments. Means and standard are shown. All columns are statistically similar to control ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey test for pairwise comparisons



The inhibitory properties of selected *Lactobacillus* strains are due to the production of lactic acid and probably bacteriocins

The five strains tested showed inhibitory activity against the two pathogenic target strains *E. coli* ATCC 8739 and *S. aureus* ATCC 6538 using the spot-in-lawn method. In addition, their culture supernatants were tested using the well diffusion technique before and after neutralization. Table 1 shows the results of the antibacterial activity, indicating that the native supernatants (pH 3.37–5.12) were active.

The diameters of the inhibition zones around the *L. plantarum* strains colonies varied from 11.33 ± 1.15 to 50.33 ± 0.58 mm (spot method) and from 12.0 ± 0 to 15.33 ± 1.15 mm for the non-neutralized CFS (well diffusion method). This activity disappeared completely after neutralisation of these CFS (pH=6.5).

The antimicrobial assay showed that there was no inhibition with the neutralized CFS, suggesting that the antibacterial activity was mainly due to the lowering of pH and probably to the high production of lactic acid. Indeed, the quantification of lactic acid (Table 1) showed that the *L. plantarum* F8

Table 1 Diameter of inhibition zones of the antibacterial activity assays and Lactic acid production by *Lactiplantibacillus plantarum* strains. Results are expressed as mean $\pm$ standard

Strain	Diameter of inhibition zones in millimeters (mm)				Supernatants pH	Lactic Acid Quantification (g.ℓ ⁻¹)		
	Spot-on-lawn method		Well-diffusion method			8 h	18 h	24 h
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>				
F8	40.0±2.0 ^c	33.33±0.58 ^c	12.0±0 ^a	13.33±1.15 ^a	3.47	12.88±0.33 ^D	13.18±0.03 ^B	20.03±0.43 ^C
F13	50.33±0.57 ^e	44.67±1.15 ^e	12.67±2.31 ^a	15.33±1.15 ^a	3.12	0.26±0.01 ^A	12.44±0.52 ^B	14.48±0.12 ^B
FB23	45.0±1.0 ^d	36.0±2.0 ^d	15.33±1.15 ^a	14.0±2.0 ^a	3.49	1.12±0.01 ^B	12.54±0.44 ^B	14.62±0.07 ^B
D21	35.0±1.0 ^b	24.67±0.58 ^b	14.67±1.15 ^a	13.33±1.15 ^a	3.65	1.77±0.11 ^C	7.35±0.003 ^A	9.11±0.01 ^A
M1	20.0±0 ^a	11.33±1.15 ^a	12.67±1.15 ^a	14.67±0.58 ^a	3.37	1.77±0.03 ^C	7.28±0.09 ^A	8.78±0.01 ^A

deviation n=3, means with different lowercase and uppercase letters were significantly different ($p < 0.05$) based on Tukey's test

strain produced a high amount of lactic acid, reaching 20.029 ± 0.432 g.l⁻¹ after 24 h of incubation at 37 °C in MRS broth (Conda, Madrid, Spain). On the other hand, the lowest production was recorded by the *L. plantarum* M1 strain (8.782 ± 0.01 g.l⁻¹) after 24 h of incubation at 37 °C.

The search for genes encoding bacteriocins, as performed by the BAGEL4 software, allowed the localization of genes encoding several known bacteriocins in strain F13. This strain harbours several

genes in the same region of interest, encoding no less than six plantaricins, including plantaricin E, F, A, N, J and K (Fig. 6a). Surprisingly, the software also allowed the identification of additional genes encoding the lactacin F subunit *lafX*, enterocin A, enterocin P and enterolysin A (Fig. 6b,c,d), which are generally found in other LAB species, especially those belonging to the *Enterococcus* genera. In most cases, genes encoding immunity and transport of these bacteriocins were also identified. The genome analysis of the

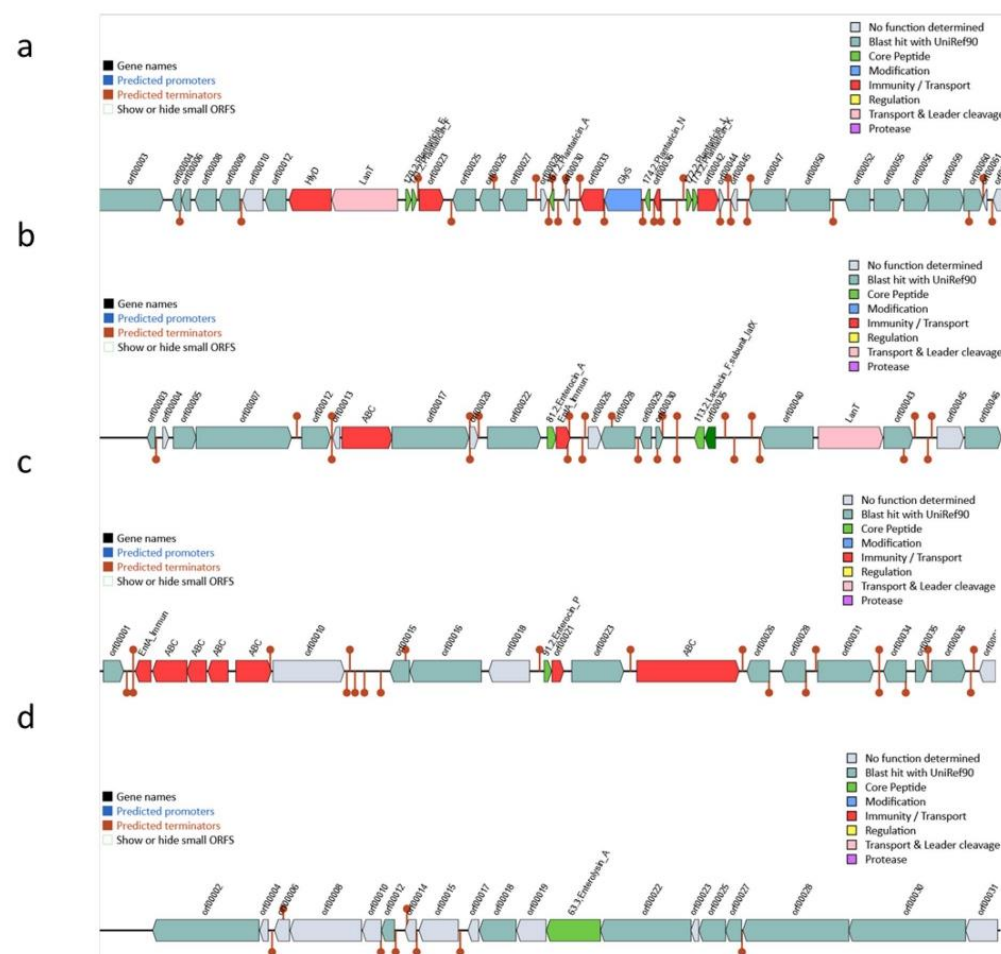


Fig. 6 Genetic organisation of bacteriocin gene clusters in *L. plantarum* F13 strain using the BAGEL4 web server, allowing identification of contigs harboring plantaricin E, F, A, N, J and K **a**. enterocin A and lactacin F **b**. enterocin P **c**. enterolysin A **d**. genes

other lactobacilli strains isolated in this study did not allow the identification of potential genes encoding bacteriocins (data not shown). As for the AntiSmash software analysis, no other potential antimicrobial compounds were found in the genomes of any of the strains (data not shown). Of note, the M1 strain was not retained for this analysis due to its lower performance in the previous experiments.

Potential antioxidant activity of selected *L. plantarum* strains

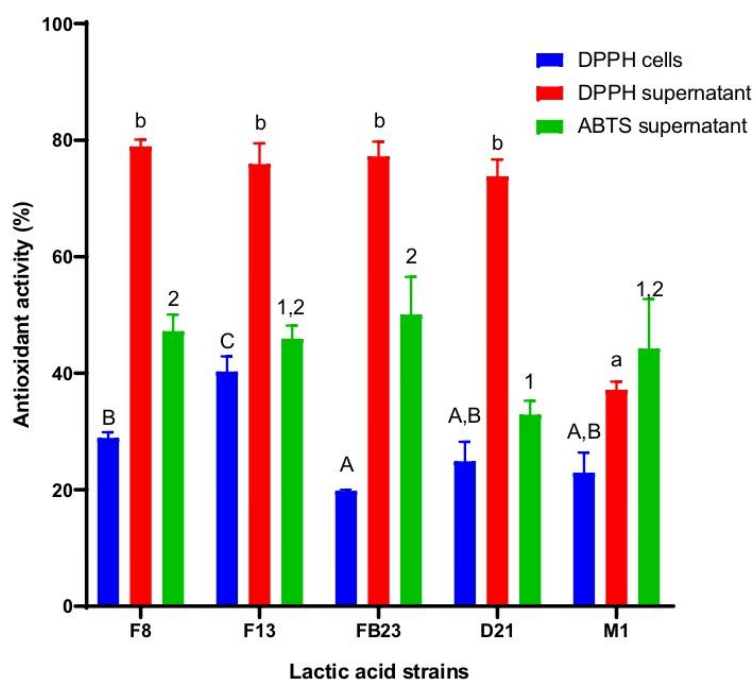
The antioxidant potential of the culture supernatants of *L. plantarum* strains was investigated using DPPH and ABTS+radical methods. The culture supernatants of the five *L. plantarum* strains showed high antioxidant capacities. The results are shown in Fig. 7. The ABTS+radical scavenging activity rates varied from $32.9 \pm 2.38\%$ (D21) to $50.06 \pm 6.47\%$ (FB23). For the DPPH method, the activity rates ranged from $37.16 \pm 1.37\%$ (M1) to $78.93 \pm 1.18\%$ (F8). The antioxidant activity was also evaluated with intact cells using the DPPH method (Fig. 7). The

majority of the strains showed lower DPPH radical scavenging percentages than those obtained with the culture supernatant. The activity rates ranged from $19.8 \pm 0.17\%$ (FB23) to $40.3 \pm 2.59\%$ (F13).

Discussion

This study aimed to provide new insights into the probiotic effects and biotechnological potential of LAB from fruits widely consumed in Kabylie, a mountainous region in northern Algeria. Survival percentage under acidic and bile salts conditions was used here as the first criterion to qualify selected strains for probiotic grade. Indeed, gastric fluid is known to be highly acidic and the pH of the stomach is known to fluctuate between 2 and 3 and can be as low as 1.5 during fasting (Dunne et al. 2001; Le and Yang 2018). Tolerance to bile salts is thought to be a requirement for bacterial colonization and metabolic activity in the host small intestine, which is weakly basic with a concentration of 0.3% bile salts (Elbanna et al. 2018). In light of this, the strains studied here,

Fig. 7 Antioxidant activities of culture supernatants and intact cells of *Lactobacillus* strains as determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and of culture supernatants as determined by the 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS+) method. Means within a column with different (number, lowercase and uppercase) letters are significantly different ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey test for pairwise comparisons



named F2, F3, F8, F13, FB13, FB23, FB24, D21, M1 and M2, showed a good level of resistance to acid and bile, which is in good agreement with results for other *L. plantarum* strains of plants origin (Vitali et al. 2012; Barache et al. 2020a,b). At the molecular level, it has been reported that the resistance of *L. plantarum* strains to low pH may be due to the proton motive force (PMF)-dependent proton pump, which is the major acid tolerance system for maintaining pH homeostasis (Guan et Liu 2020; Wang et al. 2018). Cell surface hydrophobicity and self-aggregation are also important factors that allow probiotics to tightly bind to epithelial cells and induce GIT colonization (Darmastuti et al. 2021; Pan et al. 2017). In this study, strain D21 was the one with the highest scores for autoaggregation and hydrophobicity, which is in accordance with the results obtained by Vanitha et al. (2023), Buntin et al. (2017) on other *L. plantarum* strains. Moreover, the results obtained in this study in terms of resistance to acid pH and bile conditions, as well as those related to surface properties such as hydrophobicity, self-aggregation and adhesion to microplates were combined, analysed using the PCA method and allowed us to select only five strains F8, F13, FB23, D21 and M1. Indeed, and considering these interesting results in terms of acid and bile tolerance, as well as the high levels of hydrophobicity and self-aggregation, the selected *L. plantarum* strains could be good candidates for the formulation of probiotics for gastrointestinal health. Their ability to withstand acidic pH and bile allowing their use as oral probiotic supplements or in fermented foods. Thereof, strain D21 showed the best percentage of adhesion to Caco-2 cells ($3.633 \pm 0.621\%$), but also good percentages of hydrophobicity ($89.567 \pm 1.358\%$) and autoaggregation ($71.733 \pm 1.986\%$), which overall can reach those of the golden control *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG. Thus, all *L. plantarum* strains isolated here were γ -hemolytic and non-cytotoxic, which is a characteristic of LAB and does not preclude further study of this strain. In addition, LAB, especially *Lactobacillus*, are known to exert inhibitory activities against pathogenic and spoilage bacteria via competitive inhibition, production of bacteriostatic or bactericidal extracellular compounds (Fan et al. 2022). These extracellular compounds include organic acids mainly lactic acid but also hydrogen peroxide (H_2O_2), carbon dioxide (CO_2), diacetyl, ethanol, acetoin and bacteriocins (Agriopoulou et al. 2020; Rocchetti

et al. 2021). To elucidate the inhibitory properties of the strains we have studied here, we investigate for looking to bacteriocin-type molecules. However, the results obtained suggest that the inhibitory properties observed are linked to the lowering of pH and therefore to the production of lactic acid in the five strains tested (F8, F13, FB23, D21 and M1). Measurement of the amount of lactic acid as the primary by-product of lactic acid fermentation produced by strains F8, F13, FB23, D21 and M1 showed that these strains were capable of producing up to 12 g.l^{-1} of lactic acid, with the exception of strains D21 and M1, which produced less than 9.20 g.l^{-1} . In this context and at the molecular level, organic acids lower the pH of the environment, which leads to the inhibition of various microorganisms. The undissociated form of the organic acid diffuses through the cell membrane and dissociates into anions and protons, causing the internal pH to decrease, resulting in the disruption of the proton motive force, causing bacteriostasis and ultimately cell death (Saelim et al. 2017). The antibacterial activity of these strains, particularly through organic acid production, makes them viable candidates for food biopreservation. Indeed, these strains could be incorporated into compatible food matrices to improve the shelf life and safety of such products by inhibiting the growth of spoilage and pathogenic bacteria. We could focus solely on the role of organic acids in the inhibitory properties of the strains we have selected. However, analysis of the genome, in particular that of strain F13, using Bagel 4 software, enabled us to locate genes potentially coding for bacteriocins known as plantaricin, enterocin and enterolysin. The lack of detectable activity after neutralizing the pH of the supernatant suggests that the production or activity of these bacteriocins could be pH dependent, thus consolidating the results reported by Zacharof and Lovitt (2012).

The benefits of *L. plantarum* strains are numerous. For example, their antioxidant properties could help to prevent several diseases, including e.g., cardiovascular disease, gastrointestinal ulcers and diabetes (Behera et al. 2018). Overall, the 5 selected strains, namely F8, F13, FB23, D21 and M1, showed differences in the scavenging activities of the two free radicals. The obtained DPPH scavenging rates were very similar to those reported by Bhushan et al. (2021), while the ABTS+ radical scavenging rates were comparable to those obtained for *Lactobacillus* strains

from camel's milk (Mahmoudi et al. 2017). It should be noted that this antioxidant activity is not only present in the culture supernatant, but is also found when intact cells are tested. In light of this, Ahire et al. (2013) and then Barache et al. (2020a) reported the ability of CFS of the *Lactobacilli* strains to possess high DPPH scavenging activity, while intact cells have lower DPPH activity. This could be related to secretion or release of functional products such as exopolysaccharides and lipoteichoic acid on the cell surface, as well as antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), NADH oxidase (NOX), and NADPH peroxidase (Zhao et al. 2023; Kim et al. 2022; Li et al. 2012).

Despite the interesting results obtained from the in vitro assays performed in this study, there is a need to strengthen them, especially regarding the probiotic aspects. While the characterized strains showed promising properties in terms of acid and bile tolerance, adhesion and antimicrobial activity, further studies in animal models are needed to assess their survival, colonization and health benefits. In addition, in vivo studies would allow to assess potential adverse effects and the overall impact on the gut microbiota composition.

Conclusion

In this work, twenty-one LAB strains isolated from Algerian fruits (white mulberry, prickly pear, dates and figs) were tested for their probiotic activity and biotechnological potential. Ten strains were selected based on their resistance to acid and bile environments. Five strains (F8, F13, FB23, D21, and M1) were further evaluated for hydrophobicity, autoaggregation, adherence to human Caco-2 cells, and antibacterial and antioxidant activity. The results obtained demonstrated the potential use of the isolated *L. plantarum* strains for probiotic formulations, biopreservation and biotechnological applications. The strains' resistance to acid pH and bile, their antibacterial capabilities and their ability to produce antioxidant compounds make them interesting candidates for use in the food industry and for health applications. However, further in vivo validation and scale-up studies are required to establish their efficacy and practical applicability in real-world contexts, such as in fermented foods or dietary supplements. This

work paves the way for the development of locally sourced probiotics that can improve human health while contributing to the preservation of food quality in Algeria.

Acknowledgements Djamel Drider and Yanath Belguesmia would like to thank CPER BiHauts Eco de France for supporting this project. Lylia Ouarabi, Samia Faradji-Hamma, Nacim Barache and Ghania Zidi would like to thank the "Direction Générale de la Recherche Scientifique et Technologique" (DGRSDT) and the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (Algeria) for their support. The authors would like to thank Dr. Mohamed Maky (Egypt) and Pr. Giuseppe Spano (Italy) for critical reading of the manuscript.

Author contribution SHF and DD conceived and designed the study. LO performed the research. LO, NB, GZ, and YB analysed the data. DD and SHF contributed new methods and models. LO and YB wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Funding The authors acknowledge the financial support of "Direction Générale de la Recherche Scientifique et Technologique" (DGRSDT) and Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (Algeria).

Data availability No datasets were generated or analysed during the current study.

Declarations

Conflicts of interest The authors declare no conflicts of interest.

References

- Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Sachadyn-Król M, Varzakas T (2020) Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: quality and safety aspects. *Microorganisms* 8(6):952. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952>
- Ahire JJ, Mokashe NU, Patil HJ, Chaudhari BL (2013) Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6. *J Food Sci Technol* 50(1):26–34. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0244-0>
- Ait Ouali F, Al Kassaa I, Cudennec B, Abdallah M, Bendali F, Sadoun D, Chihib N-E, Drider D (2014) Identification of *Lactobacilli* with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *Int J Food Microbiol* 191:116–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.011>
- Ait Seddik H, Bendali F, Cudennec B, Drider D (2017) Antipathogenic and probiotic attributes of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum* strains isolated from feces of Algerian infants and adults. *Res Microbiol* 168(3):244–254. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.12.003>

- Alegbeleye O, Odeyemi OA, Strateva M, Stratev D (2022) Microbial spoilage of vegetables, fruits and cereals. *Appl Food Res* 2(1):100122. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100122>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3):403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KAG, Tsakalidou E, Nychas GJE, Panagou EZ, Tassou CC (2013) Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiol* 33(2):282–291. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.005>
- Barache N, Belguesmia Y, Ladjouzi R, Bendali F, Drider D (2020a) Clusters of *Lactobacillus* strains from vegetal origins are associated with beneficial functions: experimental data and statistical interpretations. *Foods* 9(8):985. <https://doi.org/10.3390/foods9080985>
- Barache N, Ladjouzi R, Belguesmia Y, Bendali F, Drider D (2020b) Abundance of *Lactobacillus plantarum* strains with beneficial attributes in blackberries (*Rubus* sp.), Fresh Figs (*Ficus carica*), and Prickly Pears (*Opuntia ficus-indica*) grown and harvested in Algeria. *Probiotics Antimicrobial Proteins* 12(4):1514–1523. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09632-z>
- Behara SS, Ray RC, Zdolec N (2018) *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of Fermented Foods. *Biomed Res Int* 2018:9361614. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>
- Bendali F, Durand A, Hébraud M, Sadoun D (2011) *Lactobacillus paracasei* subsp *Paracasei*: An Algerian isolate with antibacterial activity against enteric pathogens and probiotic fitness. *J Food Nutr Res* 50(3):139
- Bhushan B, Sakhare SM, Narayan KS, Kumari M, Mishra V, Dicks LMT (2021) Characterization of Riboflavin-Producing Strains of *Lactobacillus plantarum* as Potential Probiotic Candidate through in Vitro Assessment and Principal Component Analysis. *Probiotics Antimicrobial Proteins* 13(2):453–467. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09696-x>
- Buntin N, de Vos WM, Hongpattarakere T (2017) Variation of mucin adhesion, cell surface characteristics, and molecular mechanisms among *Lactobacillus plantarum* isolated from different habitats. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(20):7663–7674. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8482-3>
- Čanak I, Markov K, Melvan E, Starčević A, Živković M, Zadavec M, Pleadin J, Jakopović Ž, Kostelac D, Frece J (2018) Isolation and Characterisation of *L. plantarum* O1 Producer of Plantaricin as Potential Starter Culture for the Biopreservation of Aquatic Food Products. *Food Technol Biotechnol*. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.04.18.5707>
- Darmastuti A, Hasan PN, Wikandari R, Utami T, Rahayu ES, Anggraini Suroto D (2021) Adhesion Properties of *Lactobacillus plantarum* Dad-13 and *Lactobacillus plantarum* Mut-7 on Sprague Dawley Rat Intestine. *Microorganisms* 9(11):2336. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112336>
- de Albuquerque TMR, Fernandes Garcia E, de Oliveira AA, Magnani M, Saarela M, Leite de Souza E (2018) In Vitro Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. *Probiotics Antimicrob Proteins* 10(4):704–716. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>
- De Simone N, López L, Ciudad CS, Scauro A, Russo P, Álvarez-Buylla JR, Spano G, Martínez Fernández B (2024) Antifungal activity of *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated from fruit and vegetables and detection of novel antifungal VOCs from fungal-LAB co-cultures. *Food Biosci*. <https://doi.org/10.13039/501100011033>
- Du G, Guo Q, Qiang L, Chang S, Yan X, Chen H, Yuan Y, Yue T (2023) Influence of encapsulated *Lactobacillus plantarum* and eugenol on the physicochemical properties and microbial community of fresh-cut apples. *Food Chem: X* 17:100563. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100563>
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 73(2 Suppl):386S–392S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.386S>
- Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V (2012) Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition* 28(5):539–543. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.013>
- El Hage R, Hernandez-Sanabria E, Van de Wiele T (2017) Emerging trends in “smart probiotics”: functional consideration for the development of novel health and industrial applications. *Front Microbiol* 8:1889. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01889>
- Elbanna K, El Hadad S, Assaeedi A, Aldahlawi A, Khider M, Alhebshi A (2018) In vitro and in vivo evidences for innate immune stimulators lactic acid bacterial starters isolated from fermented camel dairy products. *Sci Rep* 8(1):1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31006-3>
- Fan S, Xue T, Bai B, Bo T, Zhang J (2022) Probiotic Properties Including the Antioxidant and Hypoglycemic Ability of Lactic Acid Bacteria from Fermented Grains of Chinese Baijiu. *Foods (Basel, Switzerland)* 11(21):3476. <https://doi.org/10.3390/foods11213476>
- FAO/WHO (2002) Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
- Guan N, Liu L (2020) Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 104(1):51–65. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1>
- Hashemi SMB, Roohi R, Akbari M, Di Natale A, Conte F (2023) Inactivation of Foodborne Pathogens by *Lactiplantibacillus* Strains during Meat Fermentation: Kinetics and Mathematical Modelling. *Foods* 12(17):3150. <https://doi.org/10.3390/foods12173150>
- Hazards (BIOHAZ), EFSA Panel on Biological, Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Hilbert F, Lindqvist R, Nauta M, Peixe L, Ru G, Simmons M, Skandamis P, Suffredini E, Cocconcini PS, Fernández Escámez PS, Prieto Maradona M, Querol A, Suarez JE, Sundh I, Vlak J, Barizzzone F, Correia S, Herman L

- (2020) Update of the List of QPS-Recommended Biological Agents Intentionally Added to Food or Feed as Notified to EFSA 11: Suitability of Taxonomic Units Notified to EFSA until September 2019. EFSA J 18(2):e05965. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5965>
- Hertzler SR, Clancy SM (2003) Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. J Am Diet Assoc 103(5):582–587. <https://doi.org/10.1053/jada.2003.50111>
- Khushboo, Karnwal A, Malik T (2023) Characterization and selection of probiotic lactic acid bacteria from different dietary sources for development of functional foods. Front Microbiol 14:1170725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1170725>
- Khusro A, Arasu MV, Sahibzada MUK, Salem AZM, Al-Dhabi NA, Rivas-Caceres RR, Seidel V, Choi KC (2021) Assessment on in vitro probiotic attributes of *Lactobacillus plantarum* isolated from horse feces. J Equine Vet 107:103769. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103769>
- Kim S, Lee JY, Jeong Y, Kang CH (2022) Antioxidant activity and probiotic properties of lactic acid bacteria. Fermentation 8(1):29. <https://doi.org/10.3390/fermentation8010029>
- Kos B, Šušković J, Vuković S, Šimpraga M, Frece J, Matošić S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. J Appl Microbiol 94(6):981–987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>
- Le B, Yang SH (2018) Probiotic potential of novel *Lactobacillus* strains isolated from salted-fermented shrimp as antagonists for *Vibrio parahaemolyticus*. J Microbiol 56(2):138–144. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7407-x>
- Li S, Zhao Y, Zhang L, Zhang X, Huang L, Li D, Niu C, Yang Z, Wang Q (2012) Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. Food Chem 135(3):1914–1919. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.048>
- Mahmoudi I, Ben Moussa O, Hassouna M (2017) Symbiotic, hypocholesterolemic and antioxidant effects of potential probiotic *Lactobacilli* strains isolated from tunisian camel milk. Adv Microbiol 7(4):328–342. <https://doi.org/10.4236/aim.2017.74027>
- Mao B, Yin R, Li X, Cui S, Zhang H, Zhao J, Chen W (2021) Comparative Genomic Analysis of *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated from Different Niches. Genes 12(2):241. <https://doi.org/10.3390/genes12020241>
- Mikkilä I, Vekateswarulu TC, Prabhakar KV, Peele A, Krupanidhi S (2018) Isolation and characterization of bacteriocin producing *Enterococcus casseliflavus* and its antagonistic effect on *Pseudomonas aeruginosa*. Karbala Int J Mod Sci 4:361–368. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2018.09.002>
- Mokoena MP, Omatola CA, Olaniran AO (2021) Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens. Molecules 26(22):7055. <https://doi.org/10.3390/molecules26227055>
- Nacef M, Chevalier M, Chollet S, Drider D, Flahaut C (2017) MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: the maroilles. Int J Food Microbiol 247:2–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>
- Naeem M, Ilyas M, Haider S, Baig S, Saleem M (2012) Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from fruit juices and their efficacy against antibiotics. Pak J Bot 44:323–328
- Oliveira P, da Cruz C, de Matos J, Nascimento YM, Tavares JF, Leite E, de Souza H, Magalhães IF (2020) Efficacy of Potentially Probiotic Fruit-Derived *Lactobacillus fermentum*, *L. paracasei* and *L. plantarum* to Remove Aflatoxin M1 In Vitro. Toxins 13(1):4. <https://doi.org/10.3390/toxins13010004>
- Pan M, Kumaree KK, Shah NP (2017) Physiological Changes of Surface Membrane in *Lactobacillus* with Prebiotics. J Food Sci 82(3):744–750. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13608>
- Pieniz S, Andreadza R, Anghinoni T, Camargo F, Brandelli A (2014) Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. Food Control 37:251–256. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.055>
- Pinto M (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. Biol Cell 47:323–330
- Rocchetti MT, Russo P, Capozzi V, Drider D, Spano G, Fiocco D (2021) Bioprospecting Antimicrobials from *Lactiplantibacillus plantarum*: Key Factors Underlying Its Probiotic Action. Int J Mol Sci 22(21):12076. <https://doi.org/10.3390/ijms222112076>
- Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett 9(1):29–33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x>
- Rossini K, Noreña C, Cladera-Olivera F, Brandelli A (2009) Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. LWT Food Sci Technol 42:862–867. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.11.002>
- Rousseaux A, Brosseau C, Bodinier M (2023) Immunomodulation of B lymphocytes by prebiotics, probiotics and synbiotics: application in pathologies. Nutrients 15(2):269. <https://doi.org/10.3390/nu15020269>
- Saelim K, Jampaphaeng K, Maneerat S (2017) Functional properties of *Lactobacillus plantarum* S07 isolated fermented stinky bean (Sa Taw Dong) and its use as a starter culture. J Funct Foods 38:370–377. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.035>
- Sharma K, Mahajan R, Attri S, Goel G (2017) Selection of indigenous *Lactobacillus paracasei* CD4 and *Lactobacillus gastricus* BTM 7 as probiotic: assessment of traits combined with principal component analysis. J Appl Microbiol 122(5):1310–1320. <https://doi.org/10.1111/jam.13426>
- Simons LA, Amansec SG, Conway P (2006) Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. Nutr Metab Cardiovasc Dis 16(8):531–535. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.10.009>
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods 40(2):175–179. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(00)00122-6)

- Vanitha PR, Somashekaraiah R, Divyashree S, Pan I, Sreenivasa MY (2023) Antifungal activity of probiotic strain *Lactiplantibacillus plantarum* MYSN7 against *Trichophyton tonsurans*. *Front Microbiol* 14:1192449. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1192449>
- Vitali B, Minervini G, Rizzello CG, Spisni E, Maccaferri S, Brigidi P, Gobbetti M, Di Cagno R (2012) Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiol* 31(1):116–125. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.027>
- Wang C, Cui Y, Qu X (2018) Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Arch Microbiol* 200(2):195–201. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1446-2>
- Zacharof M-P, Lovitt RB (2012) Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Proc* 2:50–56. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>
- Zhang X, Esmail GA, Alzeer AF, Arasu MV, Vijayaraghavan P, Choi KC, Al-Dhabi NA (2020) Probiotic characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from cheese and their antibacterial properties against gastrointestinal tract pathogens. *Saudi J Biol Sci* 27(12):3505–3513. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.022>
- Zhao T, Wang H, Liu Z, Liu Y, Li DB, Huang X (2023) Recent Perspective of *Lactobacillus* in Reducing Oxidative Stress to Prevent Disease. *Antioxidants* 12(3):769. <https://doi.org/10.3390/antiox12030769>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Résumé

L'objectif de cette étude était d'isoler des bactéries lactiques de différents fruits algériens : le mûrier blanc (*Morus alba* L.), la figue de barbarie (*Opuntia ficus-indica*), la datte (*Phoenix dactylifera* L.), le raisin (*Vitis vinifera*) et le figuier (*Ficus carica*). Au total, 21 souches de bactéries lactiques Gram positifs et catalase négative ont été obtenus. Le criblage initial a montré que dix des vingt-et-une souches étaient tolérantes au pH acide et aux sels biliaires et ont été identifiées comme des souches de *Lactiplantibacillus* (L.) *plantarum* par spectrométrie de masse MALDI-TOF et séquençage de l'ADNr 16S. Les souches identifiées ont ensuite été caractérisées pour leurs propriétés de surface telles que l'auto-agrégation, l'hydrophobicité et la formation de biofilms. Les données obtenues ont ensuite été traitées statistiquement à l'aide de l'analyse en composantes principales (ACP), après quoi seules cinq souches ont été sélectionnées pour une analyse plus approfondie. Ces cinq souches, désignées *L. plantarum* F8, F13, FB23, D21 et M1, se sont révélées sûres et capables d'adhérer aux cellules épithéliales humaines de l'adénocarcinome colorectal Caco-2. En particulier, toutes ces souches étaient actives contre *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 grâce à la production d'acide lactique (jusqu'à 12 g.l⁻¹) ou de bactériocines, à savoir les plantaricines, ou leur combinaison. En outre, ces souches ont montré une forte activité antioxydante contre les radicaux libres synthétiques 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) et 2,2-azino-bis : 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique acide (ABTS⁺). La capacité des cinq souches probiotiques à produire des exopolysaccharides a notamment été étudiée. Dans un premier temps, les propriétés physicochimiques (humidité, cendres, lipides, glucides et protéines) des EPS ont été déterminées. Ensuite, la composition en monosaccharides de ces EPS a été déterminée par chromatographie sur couche mince (CCM) et par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les résultats ont montré que l'EPS était un polymère de glucose. La caractérisation de la structure et des groupes fonctionnels de l'EPS a été réalisée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR). Les résultats ont révélé la présence de pics d'absorption caractéristiques de la plupart des polysaccharides. L'absorption UV a également montré l'absence d'absorption dans la plage de 250 et 280 nm. Les activités antioxydantes ont également été étudiées. L'activité de piégeage du radical libre 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) des EPS s'est avérée être de $87,285 \pm 2,815$ % à 10 mg/ml pour l'EPS-FB23. Le pourcentage maximal de piégeage de l'EPS-F8 était d'environ $77,43 \pm 2,07$ % à 10 mg/ml pour l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS). Pour l'analyse du pouvoir réducteur, l'EPS-F8 a atteint une absorbance maximale de $0,903 \pm 0,074$ à 20 mg/ml. Nos résultats ont prouvé que les EPS des souches *L. plantarum* F8 et *L. plantarum* FB23 présentent de fortes activités antioxydantes, ce qui suggère leur utilisation potentielle en tant qu'antioxydants naturels dans des applications de promotion de la santé. Ces résultats démontrent l'importance de ces souches de *L. plantarum* pour le développement de nouveaux aliments fonctionnels, de probiotiques et de biopréservateurs. Cette étude approfondit et enrichit les connaissances sur les lactobacilles issus de matrices végétales en se concentrant sur les propriétés fonctionnelles de nouvelles souches de *L. plantarum* isolées à partir de fruits algériens. Avec l'intérêt croissant pour les conservateurs naturels et les probiotiques, les résultats de cette étude pourraient contribuer au développement de nouveaux produits biotechnologiques visant à améliorer la santé intestinale, à réduire les maladies d'origine alimentaire et à prolonger la durée de conservation des aliments en empêchant leur détérioration.

Mots clés : Bactéries lactiques, activité antibactérienne, exopolysaccharide, fruits, biopréservation, *Lactiplantibacillus*.

Abstract

The aim of this study was to isolate lactic acid bacteria from various Algerian fruits: white mulberry (*Morus alba* L.), prickly pear (*Opuntia ficus-indica*), date (*Phoenix dactylifera* L.), grape (*Vitis vinifera*) and fig (*Ficus carica*). A total of 21 Gram-positive and catalase-negative lactic acid bacteria strains were obtained. Initial screening showed that ten of the twenty-one strains were tolerant to acid pH and bile salts and were identified as *Lactiplantibacillus* (*L.*) *plantarum* strains by MALDI-TOF mass spectrometry and 16S rDNA sequencing. The strains identified were then characterised for their surface properties such as self-aggregation, hydrophobicity and biofilm formation. The data obtained was then statistically processed using principal component analysis (PCA), after which only five strains were selected for further analysis. These five strains, designated *L. plantarum* F8, F13, FB23, D21 and M1, were found to be safe and able to adhere to human Caco-2 colorectal adenocarcinoma epithelial cells. In particular, all these strains were active against *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 through the production of lactic acid (up to 12 g.l⁻¹) or bacteriocins, namely plantaricins, or their combination. In addition, these strains showed strong antioxidant activity against the synthetic free radicals 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino-bis: 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS⁺). In particular, the ability of the five probiotic strains to produce exopolysaccharides was studied. Firstly, the physicochemical properties (moisture, ash, lipids, carbohydrates and proteins) of the EPS were determined. Next, the monosaccharide composition of these EPS was determined by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the EPS was a glucose polymer. Characterisation of the structure and functional groups of the EPS was carried out by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The results revealed the presence of absorption peaks characteristic of most polysaccharides. UV absorption also showed the absence of absorption in the 250 and 280 nm range. Antioxidant activities were also studied. The 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity of the EPSs was found to be $87.285 \pm 2.815\%$ at 10 mg/ml for EPS-FB23. The maximum trapping percentage of EPS-F8 was approximately $77.43 \pm 2.07\%$ at 10 mg/ml for 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). For the reducing power analysis, EPS-F8 reached a maximum absorbance of 0.903 ± 0.074 at 20 mg/ml. Our results showed that EPS from *L. plantarum* F8 and *L. plantarum* FB23 strains exhibit strong antioxidant activities, suggesting their potential use as natural antioxidants in health-promoting applications. These results demonstrate the importance of these *L. plantarum* strains for the development of new functional foods, probiotics and biopreservatives. This study extends and enriches our knowledge of lactobacilli derived from plant matrices by focusing on the functional properties of new strains of *L. plantarum* isolated from Algerian fruit. With the growing interest in natural preservatives and probiotics, the results of this study could contribute to the development of new biotechnological products aimed at improving intestinal health, reducing food-borne diseases and extending the shelf life of foods by preventing spoilage.

Key-words : Lactic acid bacteria, antibacterial activity, exopolysaccharide, fruit, biopreservation, *Lactiplantibacillus*.

Résumé

L'objectif de cette étude était d'isoler des bactéries lactiques de différents fruits algériens : le mûrier blanc (*Morus alba* L.), la figue de barbarie (*Opuntia ficus-indica*), la datte (*Phoenix dactylifera* L.), le raisin (*Vitis vinifera*) et le figuier (*Ficus carica*). Au total, 21 souches de bactéries lactiques Gram positifs et catalase négative ont été obtenus. Le criblage initial a montré que dix des vingt-et-une souches étaient tolérantes au pH acide et aux sels biliaires et ont été identifiées comme des souches de *Lactiplantibacillus* (L.) *plantarum* par spectrométrie de masse MALDI-TOF et séquençage de l'ADNr 16S. Les souches identifiées ont ensuite été caractérisées pour leurs propriétés de surface telles que l'auto-agrégation, l'hydrophobicité et la formation de biofilms. Les données obtenues ont ensuite été traitées statistiquement à l'aide de l'analyse en composantes principales (ACP), après quoi seules cinq souches ont été sélectionnées pour une analyse plus approfondie. Ces cinq souches, désignées *L. plantarum* F8, F13, FB23, D21 et M1, se sont révélées sûres et capables d'adhérer aux cellules épithéliales humaines de l'adénocarcinome colorectal Caco-2. En particulier, toutes ces souches étaient actives contre *Escherichia coli* ATCC 8739 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 grâce à la production d'acide lactique (jusqu'à 12 g.l-1) ou de bactériocines, à savoir les plantaricines, ou leur combinaison. En outre, ces souches ont montré une forte activité antioxydante contre les radicaux libres synthétiques 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) et 2,2-azino-bis : 3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonique acide (ABTS+). La capacité des cinq souches probiotiques à produire des exopolysaccharides a notamment été étudiée. Dans un premier temps, les propriétés physicochimiques (humidité, cendres, lipides, glucides et protéines) des EPS ont été déterminées. Ensuite, la composition en monosaccharides de ces EPS a été déterminée par chromatographie sur couche mince (CCM) et par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les résultats ont montré que l'EPS était un polymère de glucose. La caractérisation de la structure et des groupes fonctionnels de l'EPS a été réalisée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR). Les résultats ont révélé la présence de pics d'absorption caractéristiques de la plupart des polysaccharides. L'absorption UV a également montré l'absence d'absorption dans la plage de 250 et 280 nm. Les activités antioxydantes ont également été étudiées. L'activité de piégeage du radical libre 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) des EPS s'est avérée être de $87,285 \pm 2,815$ % à 10 mg/ml pour l'EPS-FB23. Le pourcentage maximal de piégeage de l'EPS-F8 était d'environ $77,43 \pm 2,07$ % à 10 mg/ml pour l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS). Pour l'analyse du pouvoir réducteur, l'EPS-F8 a atteint une absorbance maximale de $0,903 \pm 0,074$ à 20 mg/ml. Nos résultats ont prouvé que les EPS des souches *L. plantarum* F8 et *L. plantarum* FB23 présentent de fortes activités antioxydantes, ce qui suggère leur utilisation potentielle en tant qu'antioxydants naturels dans des applications de promotion de la santé. Ces résultats démontrent l'importance de ces souches de *L. plantarum* pour le développement de nouveaux aliments fonctionnels, de probiotiques et de biopréservateurs. Cette étude approfondit et enrichit les connaissances sur les lactobacilles issus de matrices végétales en se concentrant sur les propriétés fonctionnelles de nouvelles souches de *L. plantarum* isolées à partir de fruits algériens. Avec l'intérêt croissant pour les conservateurs naturels et les probiotiques, les résultats de cette étude pourraient contribuer au développement de nouveaux produits biotechnologiques visant à améliorer la santé intestinale, à réduire les maladies d'origine alimentaire et à prolonger la durée de conservation des aliments en empêchant leur détérioration.

Mots clés : Bactéries lactiques, activité antibactérienne, exopolysaccharide, fruits, biopréservation, *Lactiplantibacillus*.

Abstract

The aim of this study was to isolate lactic acid bacteria from various Algerian fruits: white mulberry (*Morus alba* L.), prickly pear (*Opuntia ficus-indica*), date (*Phoenix dactylifera* L.), grape (*Vitis vinifera*) and fig (*Ficus carica*). A total of 21 Gram-positive and catalase-negative lactic acid bacteria strains were obtained. Initial screening showed that ten of the twenty-one strains were tolerant to acid pH and bile salts and were identified as *Lactiplantibacillus* (L.) *plantarum* strains by MALDI-TOF mass spectrometry and 16S rDNA sequencing. The strains identified were then characterised for their surface properties such as self-aggregation, hydrophobicity and biofilm formation. The data obtained was then statistically processed using principal component analysis (PCA), after which only five strains were selected for further analysis. These five strains, designated *L. plantarum* F8, F13, FB23, D21 and M1, were found to be safe and able to adhere to human Caco-2 colorectal adenocarcinoma epithelial cells. In particular, all these strains were active against *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 through the production of lactic acid (up to 12 g.l-1) or bacteriocins, namely plantaricins, or their combination. In addition, these strains showed strong antioxidant activity against the synthetic free radicals 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino-bis: 3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS+). In particular, the ability of the five probiotic strains to produce exopolysaccharides was studied. Firstly, the physicochemical properties (moisture, ash, lipids, carbohydrates and proteins) of the EPS were determined. Next, the monosaccharide composition of these EPS was determined by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the EPS was a glucose polymer. Characterisation of the structure and functional groups of the EPS was carried out by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The results revealed the presence of absorption peaks characteristic of most polysaccharides. UV absorption also showed the absence of absorption in the 250 and 280 nm range. Antioxidant activities were also studied. The 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity of the EPSs was found to be 87.285 ± 2.815 % at 10 mg/ml for EPS-FB23. The maximum trapping percentage of EPS-F8 was approximately 77.43 ± 2.07 % at 10 mg/ml for 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS). For the reducing power analysis, EPS-F8 reached a maximum absorbance of 0.903 ± 0.074 at 20 mg/ml. Our results showed that EPS from *L. plantarum* F8 and *L. plantarum* FB23 strains exhibit strong antioxidant activities, suggesting their potential use as natural antioxidants in health-promoting applications. These results demonstrate the importance of these *L. plantarum* strains for the development of new functional foods, probiotics and biopreservatives. This study extends and enriches our knowledge of lactobacilli derived from plant matrices by focusing on the functional properties of new strains of *L. plantarum* isolated from Algerian fruit. With the growing interest in natural preservatives and probiotics, the results of this study could contribute to the development of new biotechnological products aimed at improving intestinal health, reducing food-borne diseases and extending the shelf life of foods by preventing spoilage.

Key-words : Lactic acid bacteria, antibacterial activity, exopolysaccharide, fruit, biopreservation, *Lactiplantibacillus*.