



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

# MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :

**Haouli Bouziani Hocine et Charif Soundes**

Le : [Click here to enter a date.](#)

Thème

## **Application de quelques extraits de plantes medicinales dans la conservation des denrées alimentaires**

---

Jury :

Mr	<b>DGHIMA Amirouche</b>	<b>MAA</b>	Université de Biskra	Présidente
Mr	<b>ZEROUAL Samir</b>	<b>MCB</b>	Université de Biskra	Examineur
Mme	<b>BENABDALLAH Fatima zohra</b>	<b>MAA</b>	Université de Biskra	Promoteur

Année universitaire : 2020 - 2021

## Remerciements

Nous remercions ALLAH le tout puissant d'avoir nous donner le courage, la volonté et la patience de mener à terminer le présent travail.

Notre plus grande gratitude va à notre encadreur Madame : **BENABDALLAH FATIMA ZOHRA** pour leur soutien, leurs conseils judicieux et leur grande bien vaillance durant l'élaboration de ce travail.

Nos remerciements également au chef département Madame Mokrani Djamilla

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants  
durant les années des études

Enfin, afin de n'oublier personne, nos vifs remerciements s'adressent à tous ceux qui nous ont aidée à la réalisation de ce modeste mémoire

## Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À mes très chers **Parents** et précisément **ma cher mère**.

Qui ont toujours été là pour moi, m'ont donné un magnifique modèle de persévérance et qu'ils sont très fières de ce que je suis aujourd'hui.

À mes chers frères : **Mohamed, Zin el abidine**, et leur familles.

Un grand dédicace a ma grande famille: **Bouziani** et précisément la famille **Haouli Bouziani** et ma grandfamille **Aouiche**.

À mes chers oncles: **Youcef** et **Nabile** et mon cousin **Djeber** .

À mes amies (de biologie) : **B. Djafer, A. Abderrahim, K. Aymen, K. Omar, C. Abdel kader, R. Ziad, A. Ziad, B. kadour, M. Emer, H. Akram, K. Yaakoub, C. Mefteh, D. Zin el abidine, E. Abd el moumen, Z. Abd el ghani** et un grand dédicace a mes chers amies **M. Nadjeh, M. Aya** et **B. Sara** et **D. Aicha, B. Rihem, N. Kenza** et à tout mes chers amie.

À mon cher ami: **Ben moussa Feress**.

À mon cher binôme : **C. Soundouce** de ces efforts énormes de réaliser ce travail, je le souhaite une bonne continuation et le succès dans sa vie.

À tous mes enseignants de la filière de biologie de l'université de Biskra.

À tous mes collègues de promotion **2021**.

À toutes les personnes m'ayant consacré un moment pour m'aider et me conseiller.

***Hocine***

## **Dédicaces**

Au nom du dieu le clément et le miséricordieux louange à **ALLAH** le tout puissant.

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement :

A mes chers **parents**, qui m'ont aidé de près et de loin. Je vous dédie ce travail pour vos attentions particulières, vos prières et votre amour inconditionnel. Merci pour tout et que Dieu vous donne bonne santé et longue vie parmi nous.

A mes chers frères : **Rami et Ibrahim-El Khalil**

A toutes mes chères sœurs : **Salsabil, Atika et Loudjin** sans oublier ma nièce **Dorsaf**

A toute ma famille, qui porte le nom **Charif** et surtout mes oncles **Abdelhalim, Mohamed Sadek et Farouk**.

A toutes mes tantes et surtout **Leila, Faïda et Moufida**.

Un grand dédicace à mes chères amis : **Hanina, Khalida, Khaoula, Imen, Safia, Amira, Salima, Djahida, Maroua, Amel, Assala, Chourouk, Biba, Amine, Nassim et Moussa**.

A mon binôme : **H. Hocine**

A tout ceux qui ont participé à l'élaboration de ce modeste travail et tous ceux qui nous sont chers.

A la mémoire de **ma grande mère maternelle** Puisse Dieu vous avoir en sa sainte miséricorde et que ce travail soit une prière pour votre âme.

*Soundes*

# Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Table des matières	
Introduction.....	1
<b>Chapitre 01: Partie Bibliographique</b>	
<b>1. Présentations des plantes</b> .....	<b>3</b>
1.1. <i>Ocimum gratissimum</i> .....	3
1.1.1. Classification.....	3
1.1.2. Description botanique.....	3
1.1.3. Composition chimique.....	4
1.2. <i>Olea europea</i> L. ....	4
1.2.1. Classification.....	4
1.2.2. Description botanique.....	4
1.2.3. Composition chimique.....	5
1.3. <i>Lavandula stoechas</i> L.....	5
1.3.1. Classification.....	5
1.3.2. Description botanique.....	5
1.3.3. Composition chimique.....	6
1.4. <i>Mentha piperita</i> .....	6
1.4.1. Classification.....	6
1.4.2. Description botanique.....	7
1.4.3. Composition chimique.....	7
<b>2. Altération alimentaire</b> .....	<b>7</b>
2.1. Définition.....	7
2.2. Types d'altération.....	7
2.2.1. Altération physique.....	7
2.2.2. Altération chimique ou biologique.....	7
2.2.2.1. Oxydation des lipides.....	7
2.2.2.2. Brunissement non enzymatique.....	8
2.2.2.3. Brunissement enzymatique.....	8
2.2.3. Altération microbiennes.....	8
<b>3. Conservation alimentaire</b> .....	<b>8</b>
3.1. Définition.....	8
3.2. Types de conservation.....	9
3.2.1. Conservation par l'effet de la chaleur et le froid.....	9
3.2.2. Conservation par des molécules chimiques.....	9

3.2.3. Conservation par des huiles naturelles .....	9
---	---

## **Chapitre 02: Matériel et méthodes**

<b>1. Matériel végétal et la collecte</b> .....	10
1.1. <i>Ocimum gratissimum</i> .....	10
1.2. <i>Olea europea</i> L. ....	10
1.3. <i>Lavandula stoechas</i> L. ....	10
1.4. <i>Mentha piperita</i> .....	10
<b>2. Préparation des extraits et des huiles essentielles</b> .....	10
2.1. Hydrodistillation .....	10
<b>2.2. Extrait brut des feuilles d'olivier</b> .....	11
2.3. Extrait des Polyphénols .....	11
2.4. Entraînement à la vapeur d'eau .....	12
<b>3. Tests microbiologiques</b> .....	13
3.1. Tests bactériologiques .....	13
3.1.1. Méthode de l'aromatogramme (diffusion en phase solide) .....	14
3.1.2. Méthode de microatmosphère (diffusion en phase vapeur) .....	15
3.2. Tests antifongiques .....	15
<b>4. Application des extraits et des huiles essentielles dans la conservation des aliments</b> .....	16
4.1. <i>Ocimum gratissimum</i> .....	16
4.2. <i>Olea europea</i> L. ....	16
4.3. <i>Lavandula stoechas</i> L. ....	17
4.4. <i>Mentha piperita</i> .....	18

## **Chapitre 03: Résultats et discussion**

<b>1. Rendement d'extraction</b> .....	19
<b>2. Propriétés organoleptiques et composition chimique des huiles essentielles</b> .....	19
2.1. <i>Lavandula stoechas</i> .....	19
2.2. <i>Mentha piperita</i> .....	19
<b>3. Tests microbiologiques</b> .....	20
3.1. Tests antibactériologiques .....	20
3.2. Tests antifongiques .....	25
<b>4. Résultats des applications des extraits et des huiles essentielles dans la conservation des aliments</b> .....	26
4.1. <i>Ocimum gratissimum</i> .....	26
4.2. <i>Olea europea</i> L. ....	26
4.3. <i>Lavandula stoechas</i> .....	27
4.4. <i>Mentha piperita</i> .....	27
Conclusion et perspectives .....	30

Références bibliographiques ..... 32

**Résumés**

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Rendement en huile essentielle d' <i>Ocimum gratissimum</i> et <i>Mentha piperita</i> .....	21
<b>Tableau 2.</b> Propriétés organoleptiques de l'essence aromatique de <i>Lavandula stoechas</i> .....	21
<b>Tableau 3.</b> Activité Antibactérienne de l'extrait brut aqueux et des polyphénols des feuilles d'olivier <i>Olea europea</i> L.....	22
<b>Tableau 4.</b> Les concentrations minimales inhibitrices des extraits de feuilles d'olivier <i>Olea europea</i> L.....	23
<b>Tableau 5.</b> Activité antibactérienne <i>in vitro</i> de l'huile essentielle de <i>Lavandula stoechas</i> .....	25
<b>Tableau 6.</b> Pourcentage d'inhibition des souches fongiques en présence de l'huile essentielle de plante d' <i>Ocimum gratissimum</i> .....	27
<b>Tableau 7.</b> Effet antibactérienne de l'huile essentielle de <i>Mentha piperita</i> sur l'évolution de la flore totale et les coliformes totaux du lait.....	30
<b>Tableau 8.</b> Effet antifongique de l'huile essentielle de <i>Mentha piperita</i> sur l'évolution des Lactobacilles, les levures et moisissures du lait .....	30

## Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> <i>Ocimum gratissimum</i> .....	3
<b>Figure 2.</b> <i>Olea europea</i> L. ....	4
<b>Figure 3.</b> <i>Lavandula stoechas</i> L. ....	5
<b>Figure 4.</b> <i>Mentha piperita</i> .....	6
<b>Figure 5.</b> Protocole de l'extraction des huiles essentielles.....	12
<b>Figure 6.</b> Protocole d'extraction des polyphénols .....	13
<b>Figure 7.</b> Illustration de la méthode de l'aromatogramme .....	15
<b>Figure 8.</b> Illustration de la méthode de microatmosphère.....	16

## Liste des abréviations

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**DZI** : Diamètre de la zone d'inhibition

**HE** : Huile Essentielle

**MH** : Muller Hinton

**PI** : Pourcentage d'inhibition

**pH** : Potentiel d'Hydrogène

**RL** : Radicaux Libres

**TBHQ** : Tert-Butyl Hydroquinone

# **Introduction**

## Introduction

Étant donné que nous vivons en une période difficile, celle de corona virus covide 19. Nous avons présenté et analysé des travaux réalisés par différents chercheurs.

Depuis l'antiquité les produits naturels notamment ceux d'origines végétale ont été toujours une source importante d'agents cosmétiques, thérapeutiques et alimentaires. Les plantes produisent des substances actives permettant de se protéger des insectes, de maladies ou d'attaques extérieures (Mayer, 2012). Les plantes aromatiques sont traditionnellement utilisées pour assaisonner et prolonger la durée de conservation des denrées alimentaires. La plupart de leurs propriétés sont dues aux huiles essentielles (HE) (Boniface *et al.*, 2012).

En dépit de cela, dans les derniers décennies , principalement en raison de l'avancée de la chimie de synthèse, l'industrialisation de l'alimentation et les nouvelles connaissances en microbiologie à conduit progressivement à l'utilisation d'additifs alimentaires chimiquement identifiés, destinés notamment à prévenir les dégradations microbiologiques des aliments, mais aussi à en moduler de nombreux aspects, la couleur en particulier. Une opposition critique à l'addition de ces additifs, notamment les colorants et les agents conservateurs, s'est immédiatement manifestée, mais n'a pas empêché la généralisation de leur utilisation au cours du siècle dernier. Cependant, des études récentes ont remis en question l'innocuité de certains de ces additifs, notamment en relation avec le syndrome de déficit de l'attention / hyperactivité (Diezi *et al.*, 2011).

Aujourd'hui , l'utilisation des huiles essentielles est de plus en plus répandue que ce soit dans les pharmacies, ou dans divers commerces (Mayer, 2012). Plusieurs travaux de recherche ont démontré les propriétés antifongiques et antibactériennes des huiles essentielles, il existe un grand intérêt pour trouver de nouvelles méthodes de conservation des aliments à l'aide de composés naturels. À cette fin, les huiles essentielles sont de bons candidats comme additifs antibactériens .Plusieurs études *in vitro* ont montré une grande efficacité des huiles essentielles contre les agents pathogènes d'origine alimentaire et les bactéries d'altération Elles sont connues à la fois pour leurs propriétés aromatisantes et antimicrobiennes et leur faible toxicité comparée à celle des additifs alimentaires synthétiques (Bassolé *et al.*, 2010).

Pour cela dans une première partie on abordé une étude bibliographique sur les généralités sur les espèces *Ocimum gratissimum* , *Olea europaea* L. *Lavandula stoechas* L. et *Mentha piperita* et l'altération et la conservation alimentaire .

Une deuxième partie a décrit le matériel et les méthodes utilisés dans les études que nous avons consulté, résultat et discussion sur :

L'application des extraits bruts et polyphénoliques de feuilles d'olivier *Olea europea*

L. Et les huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum*, *Lavandula stoechas* L. Et *Mentha piperita* sur la viande, les poissons fumés, boisson gazeuse sucrée, et fruitée de type Orangina et lait, et leur activité antibactérienne et antifongique.

# **Chapitre 01: Partie Bibliographique**

## 1. Présentations des plantes

### 1.1. *Ocimum gratissimum*

La figure 1 représente une plante aromatique vivacée, d'espèce d'*Ocimum gratissimum*



**Figure 1.** *Ocimum gratissimum* (Bhavani *et al.*, 2019)

#### 1.1.1. Classification

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordre: Lamiales

Famille: Lamiaceae

Genre: *Ocimum*

Espèce: *Ocimum gratissimum* (Bhavani *et al.*, 2019)

#### 1.1.2. Description botanique

*Ocimum gratissimum* est une plante aromatique vivace d'une hauteur de 1 à 3 m; la tige est dressée, quadrilatère ronde, multi branche, glabre ou pubescente, ligneuse à la base, généralement à peau exfoliée. Les feuilles sont opposées. Pétiole de 2-4,5 cm de long, élané. Limbe elliptique à ovale, 1,5-16 cm x 1-8,5 cm, membraneux, parfois glandulaire ponctué, base cunéiforme, entier, bords ailleurs avec des dentelures rugueuses, apex aigu. Les inflorescences sont brun jaunâtre, disposées en grappes terminales, simples ou ramifiées, de 5 à 30 cm de long; épine lâche, pubescente molle; sessile, ovale, 3-12 mm x 1-7 mm, acuminé, début de l'automne; pédicelle 1-4 mm long, étalé ou ascendant, légèrement courbé.(Bhavani *et al.*, 2019) .

### 1.1.3. Composition chimique

En Afrique de l'Ouest et au Nigerial '*Ocimum gratissimum* est utilisé pour le traitement des infections bactériennes, aussi pour la diarrhée et comme épice (Aguiyi *et al.*, 2000). Elle est riche en métabolites secondaire tells que le thymol, l'eugénol, le méthyl chavel, les alcaloïdes, les tanins, les flavonoïdes, le para-cymène, le terpène, le 1,8 cinéole, le linalol, le méthyl citronellol et le méthyl eugénol *ect.* On trouve également dans leurf euilles les composés suivants l'eugénol, l'eugénol, le maleadiène, le pinène, le camphre, le butriène- D, le trans-phyllopodophyllène, le farnésène, le 1-bisabolène, le syringa phénol, la bis aboline, le thymol, le citral, le cinnamate d'éthyle, le linalol, le terpinène, p-isopropyl, limonène, terpinolène, 1,8-cinéole et acide oléanolique (Bhavani *et al.*, 2019)

### 1.2. *Olea europea* L.

La figure 2 représente l'arbre d'olivier d'espèce d'*Olea europea* L.



**Figure 2.** *Olea europea* L. (Haouari, 2013)

#### 1.2.1. Classification

Règne: Plantae

Embranchement: Spermaphytes

Classe: Eudicotes

Ordre: Igustrales

Famille: Oleacées

Genre: *Olea*

Espèce: *Olea europaea* L. (Site web 1)

#### 1.2.2. Description botanique

L'olivier est un arbre distribue surtout dans les pays méditerranés, descend de régions de climat subtropical sec. Il résiste bien a des conditions environnementales très dures, comme la sécheresse, la salinité, la chaleur et des basses températures. Il craint le gèle, il

absorbe d'environ 220 mm par an de pluviométrie, cet arbre est capable d'être adapté à différents types de sols. L'anatomie spéciale de ses feuilles, de son système racinaire et de son haut niveau de régénération morphologique favorisent son pouvoir d'adaptation (Dahbia, 2009).

### 1.2.3. Composition chimique

*Olea europea* L. est un arbre qui appartient à la famille des Oléacées. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie (Himour *et al.*, 2016) qui contient plusieurs molécules, parmi ces molécules on trouve les flavonoïdes, les tanins, les stérols et les triterpènes et les alcaloïdes, en quantités importantes, et les coumarines, de quinones libres, aussi les saponosides et les composés réducteurs (Himour, 2016).

### 1.3. *Lavandula stoechas* L.

La figure 3 représente une plante des lamiacées, d'espèce *Lavandula stoechas* L.



Figure 3. *Lavandula stoechas* L. (Lim, 2014).

#### 1.3.1 Classification

Règne : plantae

Embranchement : spermatophytes

Ordre : lamiacea

Famille : lamiacea

Tribu : olimeace

Genre: *Lavandula*

Espèce: *Lavandula stoech* (Benabdelkader, 2014)

#### 1.3.2. Description botanique

C'est un arbuste vivace à faible croissance, érigé, à feuilles persistantes, de 0,3-1 m de haut, aux tiges quadrangulaires, pubescentes, devenant ligneuses et rugueuses avec l'âge. Les

feuilles sont sessiles, opposées, vert grisâtre, pubescentes, petites, linéaires ou lancéolées de 11-30 mm sur 2-5 mm avec des extrémités obtuses ou aiguës, un bord entier et recourbé. Ses fleurs sont parfumées, discrètes, et arrangé d'une manière tubulaire en grappes cylindriques denses (2-5 cm de long) à l'extrémité des tiges de feuilles et sont surmontées de jusqu'à cinq bractées distinctives, de couleur violette, ressemblant à des pétales (10-50 mm de long). Les petites fleurs tubulaires (5-8 mm de long) sont violet foncé et sont opposées par des flocons violet bleu foncé (Lim, 2014).

### 1.3.3. Composition chimique

*Lavandula stoechas* est une plante riche en métabolites secondaires tels que: le linalol, Borneol, 1,8-Cineole, camphor, 4-terpineol,  $\alpha$ -Bisabolol, et le cis Ocimene, autre part l'extrait des fleurs du *Lavandula stoechas* contient le monoterènes, 14 oxygenated monoterpenes, 8 sesquiterpenes et 5 oxygenatedsesquiterpenes, oxygenated monoterpene , l'esters, alcools, aldehydes, ketones et diterpenes (Khavarpour *et al.*, 2019).

### 1.4. *Mentha piperita*

La figure 4 représente la plante de *Mentha piperita*



Figure 4. *Mentha piperita* (Goudjil , 2016)

#### 1.4.1. Classification

- Règne : plantae
- Embranchement : Spermaphytes
- Class: Dicotylédones
- Ordre: Sympetales
- Famille: Lamiaceae
- Genre: *Mentha*
- Espèce: *Mentha x piperita*. (Goudjil , 2016)

## 1. Description botanique

Il s'agit d'une plante vivace à rhizome long, rampant, traçant, chevelu. La tige, de 50 à 80 cm, dressée ou ascendante, se divise en rameaux opposés. Ses feuilles mesurent de 4 à 10 cm de long, elles sont ovales, opposées, courtement pétiolées, lancéolées, aiguës, dentées, sont d'un très beau vert et se teignent de nuances rougeâtres au soleil et de rouge cuivré à l'ombre, elles sont recouvertes de gros poils sécréteurs arrondis dans lesquels s'accumulent les substances volatiles odorantes. Les fleurs, violacées, forment des épis très courts, ovoïdes, à l'extrémité des rameaux. Le fruit, divisé en quatre parties, est entouré d'un calice persistant. Son odeur est puissante, sa saveur piquante et rafraîchissante. (Goudjil, 2016)

### 1.4.3. Composition chimique

*Mentha piperita* est une plante aromatique qui a une composition chimique complexe, le p-cymène, le thymol, le  $\beta$ -caryophyllène, le carvacrol et la carvone, le menthol et l'isomenthone sont les principaux composants chimiques qui ont une forte activité antimicrobienne, les huiles essentielles de *Mentha piperita* ont été largement utilisées dans les industries de l'alimentation, des boissons, des cosmétiques et du tabac. (Bassolé *et al.*, 2010)

## 2. Altération alimentaire

### 2.1. Définition

L'altération des aliments est considérée comme toute modification qui rend un produit inacceptable pour la consommation humaine (In't veld, 1996) elle peut être causée par des agents externes, telles que la température, l'humidité relative de milieu, CO<sub>2</sub>, et O<sub>2</sub> ou par des causes internes de l'aliment lui-même, par exemple, l'activité de l'eau, l'acidité, pH, le potentiel redox, structure physique de l'aliment. (Becila, 2009)

### 2.2. Types d'altération

#### 2.2.1. Altération physique

L'altération physique est principalement causée par les chocs, blessures, changements d'état, variation de la teneur en eau, et changement de couleur...*ect* (Becila, 2009)

#### 2.2.2. Altération chimique ou biologique

##### 2.2.2.1. Oxydation des lipides

Les graisses insaturées sont oxydées par des radicaux libres (RL), un processus de réaction en chaîne catalysé par les produits de la réaction. Il s'agit d'un enchaînement des réactions radicalaires, se déroulant en 3 étapes, puis les réactions s'enchaînent pour produire plusieurs RL qui se combinent pour former des composés non radicalaires :

- Réaction d'initiation : à partir d'un acide gras insaturé donnant des radicaux libres

- Propagation des radicaux (interaction avec les vitamines A, C, et protéine) donnant de peroxydes lipidiques.

- L'association des RL entre eux pour donner des composés non radicalaires tels que polymères, époxydes, furanes, acides, aldéhydes et cétones *ect* (Dilmi-Bouras, 2004).

#### **2.2.2.2. Brunissement non enzymatique**

C'est le résultat des réactions entre un sucre réducteur et un groupement amine (acide aminé, peptide, protéine) conduisant la production des odeurs, des arômes et des pigments. Le brunissement non enzymatique se produit en deux étapes:

- Formation et accumulation des composés intermédiaires dicarbonylés réactifs. Elle a lieu à partir d'un sucre réducteur ou tout autre composé carbonyle (aldéhyde, cétone insaturés)

- Formation de polymère résulte de la condensation des aldo amines ou cetosamines, ou bien par les composés intermédiaires issus des cetosamines et aldo amines (Dilmi-Bouras, 2004).

#### **2.2.2.3. Brunissement enzymatique**

C'est la transformation des composés phénoliques en polymères bruns ou noirs quelques fois rose, rouge ou bleu-noir. Il affecte la qualité des fruits et légumes par coloration due aux polymères et intervient particulièrement chez les fruits et légumes endommagés, notamment par les traitements, soit par pelage, découpage, broyage (Dilmi-Bouras, 2004).

#### **2.2.3. Altération microbiennes**

En générale c'est la forme la plus connue ( la fermentation ). Les modifications induites par l'altération des levures et des moisissures peuvent être de nature sensorielle, reconnaissables à l'aspect du produit par la production de bave, assez souvent pigmentée à la surface, la fermentation des sucres pour produire de l'acide, du gaz ou de l'alcool ou le développement de mauvaises odeurs et de mauvais goûts (In't veld, 1996).

### **3. Conservation alimentaire**

#### **3.1. Définition**

La conservation des aliments est une action ou une méthode permettant de maintenir les aliments à un niveau souhaité de propriétés ou de nature pour en tirer le maximum de bénéfices. En général, chaque étape de la manipulation, de la transformation, du stockage et de la distribution affecte les caractéristiques des aliments, qui peuvent être souhaitables ou indésirables (Rahman, 2007).

### **3.2. Types de conservation**

#### **3.2.1. Conservation par l'effet de la chaleur et le froid**

La conservation des aliments se fait par plusieurs méthodes et sous l'effet de différents agents comme la chaleur et le froid dont le but a toujours été d'obtenir un produit léger et stable. Le séchage est la méthode la plus ancienne et très utilisée, consiste à sécher par la radiation solaire (Boeckel *et al.*, 2003). Après, la technique de pasteurisation utilisée pour conserver un aliment une température de 85°C à 100°C pendant un certain temps et à le refroidir brusquement dont le but de détruire les microorganismes pathogènes et d'altération (Site web 2). D'autre part, L'emploi de la réfrigération dans le domaine des plats cuisinés a été important, en utilisant une température plus basse qui n'induit pas de modification organoleptique des produits alimentaires comparativement aux autres procédés physiques (Bornert, 2000 ; Heldman, 2011). Les produits alimentaires peuvent aussi conservés à -30°C (congélation) de façon rapide en ralentissant l'évolution des processus enzymatiques et assurant ainsi une durée de conservation plus longue (Mahieddine, 2005).

#### **3.2.2. Conservation par des molécules chimiques**

Divers produits chimiques ou additifs sont utilisés comm conservateurs alimentaires pour contrôler le pH (en tant qu'agents antimicrobiens et antioxydants) et fournir une fonctionnalité alimentaire et des effets conservateurs. Certains additifs sont complètement synthétiques, comme l'antioxydant phénolique tert-butyl hydroquinone (TBHQ) (Rahman, 2007). On peut classer les produit chimiques de conservation selon leurs modes d'action et les effets qu'ils causent dans les aliments comme suit : Les produits chimiques causant un changement de gout par diminution de l'activité d'eau par l'addition du sel (NaCl ou KNO<sub>3</sub>), des sucrés etde l'alcool et diminution de pH s'effectue par l'addition d'acide acétique, citrique, tartrique, lactique et propionique, ou la formation d'acide par des micro-organismes .Les produits chimiques ne causant pas de changement de gout, les produits qui ont une action de freinage des métabolismes des micro-organismes comme le blocage des enzymes responsable de métabolisme car les enzymes exercent leurs action a des concentrations basses aussi les inhibiteurs c'est pour cette raison qu'ils ne sont pas capables de changer le gout des aliments (Boeckel *et al.*, 2003).

#### **3.2.3. Conservation par des huiles naturelles**

Les huiles essentielles sont des liquides naturels, volatils et aromatiques extraits de certaines plantes. Elles contiennent des métabolites secondaires (terpènes, composés phénoliques, alcool) qui possèdent des activités antioxydants et antimicrobiennes. De nombreuses HE peuvent être utilisées comme conservateurs alimentaires pour la viande, les légumes et les fruits, ainsi que les produits laitiers (Falleh *et al.*, 2020).

# **Chapitre 02:**

## **Matériel et méthodes**

## **1. Matériel végétal et la collecte**

### **1.1. *Ocimum gratissimum***

Les feuilles fraîches *Ocimum gratissimum* ont été collectées dans la région de Abomey-calavi (Sud du Bénin) (Degnon *et al.*, 2013).

### **1.2. *Olea europea* L.**

Le matériel végétal utilisé est constitué des feuilles fraîches de l'olivier qui ont été récoltées dans la région de Tizi-Ouzou Cueilli pendant la période de floraison (3-4 mois 2010) dans la zone de Boghni (Tizi-Ouzou). L'altitude est de 400 m (Djenane *et al.*, 2012)

### **1.3. *Lavandula stoechas* L.**

Les parties aériennes fraîches de la plante de *Lavandula stoechas* (tige, feuilles et fleurs) ont été collecté en juin 2015 (Amara *et al.*, 2017).

### **1.4. *Mentha piperita***

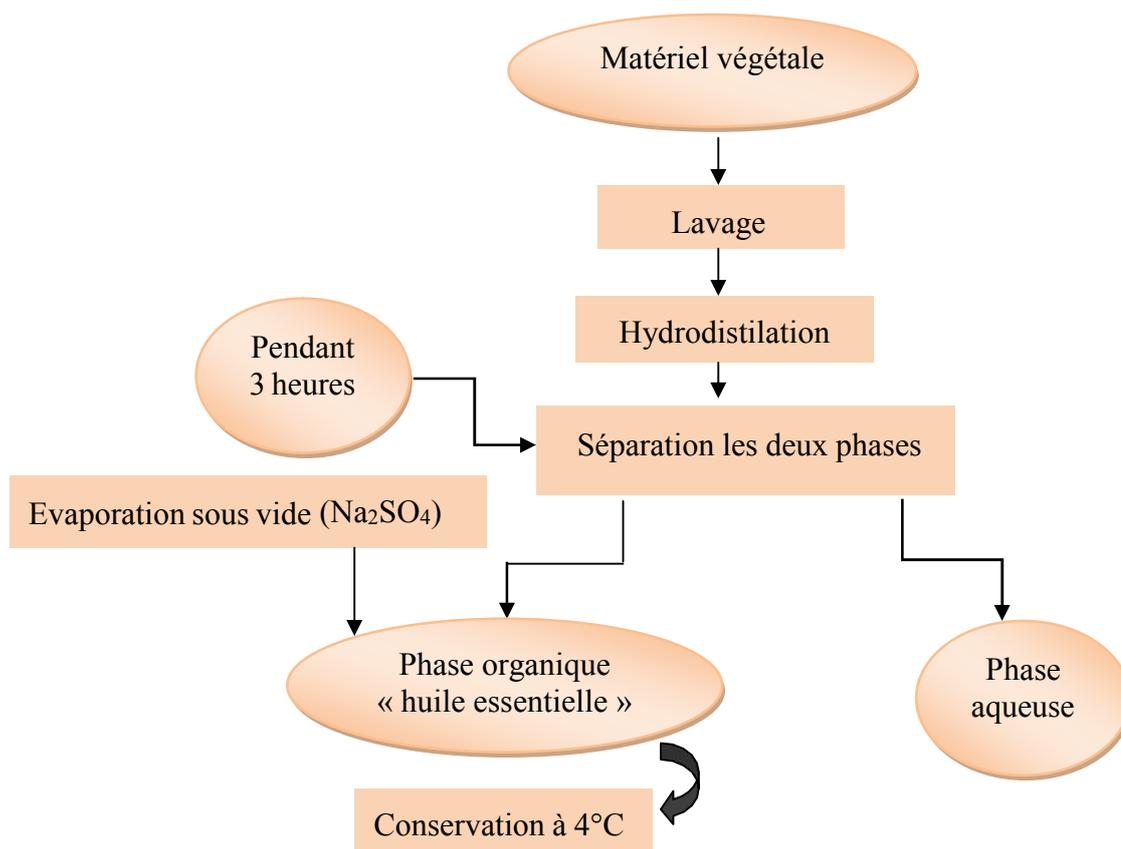
Le matériel végétal utilisé est constitué des feuilles fraîches de *Mentha piperita* collectées à Abomey-calavi (Sud du Bénin) (Degnon *et al.*, 2016).

## **2. Préparation des extraits et des huiles essentielles**

### **2.1. Hydrodistillation**

L'extraction des huiles essentielles de l'*Ocimum gratissimum* et *Mentha piperita* a été effectuée par la méthode de hydrodistillation (Degnon *et al.*, 2013 ; Degnon *et al.*, 2016) .

Les matières végétales fraîchement récoltées ont été hydro-distillées pendant 3 heures dans un appareil Clevenger qui est composé d'une chauffe ballon de capacité de 2L où les échantillons sont immergés, d'une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) et une ampoule à décanter qui reçoit les extraits de la distillation. Le recyclage de distillat a été arrêté afin que l'huile essentielle puisse être collectée directement puis, il a été déshydraté par du sodium anhydresulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pour éliminer toute trace d'eau, puis conservées à l'abri de l'air et de la lumière à une température de + 4 °C dans une bouteille sombre (Singh *et al.*, 2011 ; Goudjil, 2016).



**Figure 5.** Protocole de l'extraction des huiles essentielles (Goudjil, 2016)

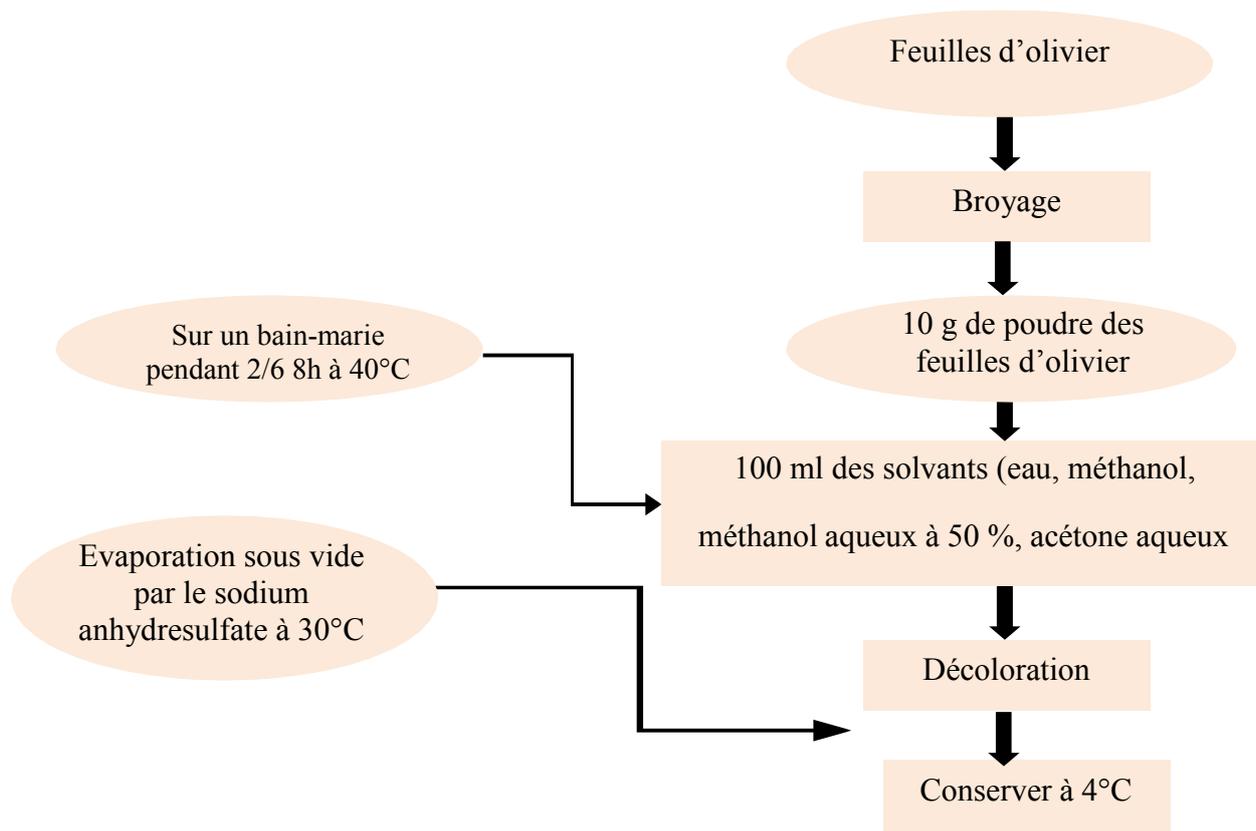
## 2.2. Extrait brut des feuilles d'olivier

Après la récolte les feuilles d'olivier ont été séchées à l'abri de la lumière et de l'humidité et à température ambiante. Une fois Séchée, les feuilles sont broyées à l'aide d'un mixeur (Blender 8011E, Model 38 BL 41). Une masse de 100 g de broyat est ajoutée à 900 ml d'eau chaude (45°C) pour obtenir une concentration de 10% (p/v) , laissée reposer le mélange pendant 24h dans l'obscurité et à température ambiante, après une agitation à l'aide d'un agitateur magnétique puis deux filtrations successives à travers un papier Wattman n°1 dans un réfrigérateur les extraits bruts obtenus ont été stockés dans des flacons stériles hermétique à l'abri de la lumière et de l'O<sub>2</sub> (Djenane *et al.*, 2012).

## 2.3. Extrait des Polyphénols

La préparation des extraits polyphénolique des feuilles d'olivier est réalisée selon Akowuah *et al.* (2005), après la première étape d'extraction pour obtenir un extrait brut de feuille d'olivier, et la deuxième étape d'extraction est pour obtenir un extrait polyphénolique. Dix grammes de poudre de feuilles ont été extraits avec 100 ml des solvants suivants : eau, méthanol, méthanol aqueux à 50 %, acétone aqueux à 70 % et chloroforme, pendant 2, 4 et 8

heures, à 40 °C sur un bain-marie. Pour cette raison, l'étape de décoloration procéder à l'élimination des traces de pigment. La solution décolorante résultante est purifiée. L'eau et les solvants utilisés à différentes étapes sont éliminés par une évaporation sous vide à 30°C et à l'aide de sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). L'extrait phénolique ainsi obtenu est conservé dans les mêmes conditions que l'extrait brut précité.(Djenane *et al.*, 2012)



**Figure 6.** Protocole d'extraction phénolique (Djenane *et al.*, 2012)

#### 2.4. Entraînement à la vapeur d'eau

Amara *et al.* (2017) on utilisé l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* L. extraite par la méthode de l'entraînement à la vapeur ,Dans ce système d'extraction le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération, différents organes ariens fraîche de la plante (tige, feuilles et fleurs) préalablement pesé, sont introduits dans l'extracteur et subissent un entraînement à la vapeur d'eau pendant 2 heures. Au cours de l'extraction, le débit de vapeur est contrôlé, en mesurant le volume des eaux de distillation, récupéré dans le décanteur, en unité de temps. L'huile essentielle est séparée des eaux de distillation par décantation (Boukhatem *et al.*, 2019).

### 3. Tests microbiologiques

#### 3.1. Tests bactériologiques

L'effet antibactérien des extraits de feuilles d'olivier est déterminé par la méthode de diffusion sur gélose (Djenane *et al.*, 2003 ; Hazzit *et al.*, 2009) vis-à-vis de trois souches bactériennes: *Staphylococcus aureus* (*S. Aureus* : Gram positive), *Salmonella entericasérotype Enteritidis* (*S. Enteritidis* : Gram négative) et *Pseudomonas aeruginosa* (*P. Aeruginosa* : Gram négative). (Djenane *et al.*, 2012)

Les souches bactériennes sont cultivées pendant 12 h à 37°C dans un milieu gélosé Mueller Hinton. Deux ensemencements successifs sont réalisés pendant 24 h à 37±1°C dans des tubes contenant 9 ml de Bouillon Infusion Cœur-Cerveau. Après 24 h, 100 µl de la suspension bactérienne sont ensemencés dans un bouillon BHI puis incubés à 37±1°C pendant 12 heures pour obtenir une suspension bactérienne fraîche contenant approximativement une concentration de 2-3×10<sup>5</sup> ufc/ml, déterminée à l'aide de la mesure de transmittance à 600 nm. Les souches étaient conservées dans un milieu cryoprotecteur à -80°C. (Djenane *et al.*, 2012)

Verser 0,1 ml de la solution standardisée d'inoculum (2-3×10<sup>5</sup> ufc/ml) dans des boîtes de pétri contenant milieu gélosé Mueller Hinton, puis uniformément réparti et séché pendant 5 minutes. Des disques stériles en papier sont imprégnés respectivement avec 5 µl des deux extraits à l'aide d'une micropipette capillaire et les boîtes de Pétri étaient maintenues pendant 15 min à une température de 25°C puis incubées à 37°C/24h. L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure à l'aide d'un pied à coulisse des diamètres des zones d'inhibition (mm) formées autour des disques. La sensibilité des bactéries cibles est classée selon les diamètres des halos d'inhibition (Ponce *et al.* 2003) :

-Ø < 8 mm: bactérie non sensible

-9 < Ø < 14 mm: bactérie sensible

-15 < Ø < 19 mm: bactérie très sensible et Ø > 20 mm: bactérie extrêmement sensible.

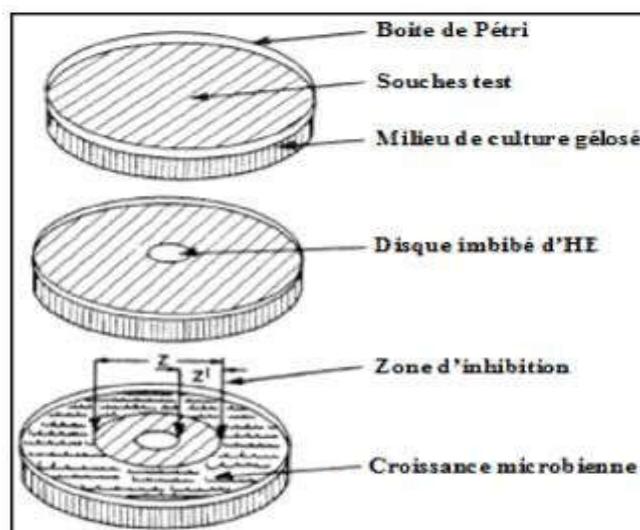
Un traitement avec l'eau utilisé comme témoin négatif un antibiotique de référence, le chloramphénicol (10 µg/disque), est utilisé comme témoin positif. Chaque essai est répété trois fois. L'activité antimicrobienne de ces extraits est confirmée par la méthode de microdilution. Des plaques sont préparées en distribuant dans chaque puits 95 µl de bouillon MH et 5 µl d'inoculum. 100 µl de chaque solution d'extrait préparé préalablement à des concentrations de 32–0,3125 µl/ml sont versés dans les premiers puits de chaque plaque. 100 µl de chaque dilution en séries sont transférés dans les puits successifs. Les derniers puits

contenant uniquement 195  $\mu\text{l}$  de bouillon MH et 5  $\mu\text{l}$  d'inoculum étaient utilisés comme témoins négatifs. Le volume final de chaque puits était de 200  $\mu\text{l}$ . Le chloramphénicol, un antibiotique standard, est utilisé comme témoin positif. Tous les contenus des puits sont homogénéisés (300 rpm/20s). Les plaques sont incubées sous agitation à 37°C/18–24h. Après incubation, tous les puits sont examinés et la CMI (%: v/v) est déterminée en prenant en compte la plus faible concentration en extrait qui inhibe tout développement bactérien. L'H<sub>2</sub>O distillée stérile est utilisée comme témoin négatif. Chaque test est répété deux fois. (Djenane *et al.*, 2012)

L'activité antibactérienne de *Lavandula stoechas* L. a été effectuée *in vitro* par deux méthodes qui sont : Méthode de l'aromatogramme (diffusion en phase liquide) et la méthode de microatmosphère (diffusion en phase vapeur) (Amara *et al.*, 2017)

### 3.1.1. Méthode de l'aromatogramme (diffusion en phase solide)

Le principe de cette technique repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur la surface d'un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Petri (Tyagi et Malik, 2011).



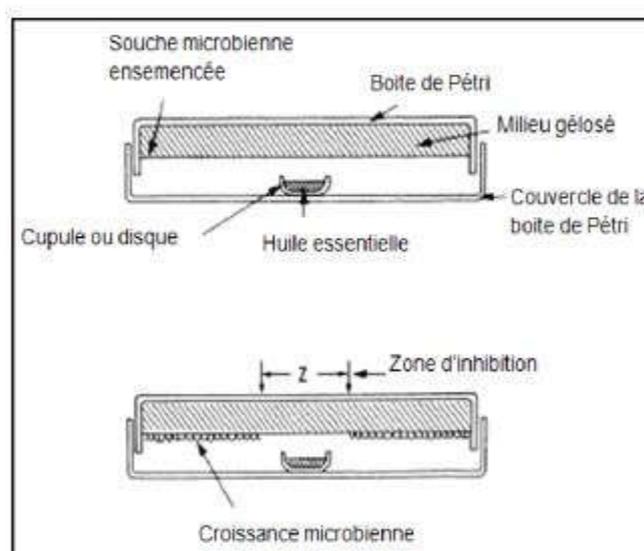
**Figure 7.** Illustration de la méthode de l'aromatogramme (Amara *et al.*, 2017).

Des disques de 9 mm ont été utilisés dans cette méthode. Ils ont été imprégnés d'une quantité de l'huile essentielle (20 et 60  $\mu\text{l}$ /disque) et déposés au centre d'une boîte de Petri contenant un milieu gélosé préalablementensemencé par une souche microbienne (gélose Muller-Hinton). Chaque boîte de Petri est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à température adéquate (37 °C pendant 24 heures). L'huile essentielle diffuse à partir du disque au sein de la gélose. À la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètres. (Amara *et*

*al.*, 2017)

### 3.1.2. Méthode de microatmosphère (diffusion en phase vapeur)

Cette technique permet de mettre en évidence la diffusion des composants volatils des HE à l'intérieur d'une boîte de Petri, deux doses croissantes de l'huile essentielle (20 et 60  $\mu\text{l}$ /disque) ont été appliquées. La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats sont les mêmes que la méthode précédente. La différence entre celle-ci et l'aromatogramme réside principalement dans la position du disque imprégné. Ce dernier est déposé au centre du couvercle de la boîte de Petri fermée, renversée et mise à l'étuve à température adéquate. Il se produit alors une évaporation des substances qui, en contact avec les germes ensemencés, va inhiber leur croissance. À la sortie de l'étuve, l'absence de croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose, de contours plus ou moins nets et à tendance circulaire (Amara *et al.*, 2017)



**Figure 8** . Illustration de la méthode de microatmosphère (Amara *et al.*, 2017)

### 3.2. Tests antifongiques

L'activité antifongique des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* a été évaluée *in vitro* et a pour but de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de ces huiles à partir de laquelle aucune croissance fongique n'est observée. Ces tests ont été effectués en milieu solide sur les différents types de champions isolés des poissons fumés collectés. (Degnon *et al.*, 2013).

La détermination de la CMI a été réalisée par la méthode décrite par de Billerbeck *et al.*(2001) dans laquelle, des boîtes de petri de 9 cm de diamètre, contenant chacun 20 ml du

milieu de culture Sabouraud au Chloramphénicol, stérilisé pendant 15 min à 121°C et refroidi à 45°C, l'ajoute aseptiquement des quantités décroissantes de l'huiles essentielles (10 µL, 7,5 µL, et 5 µL).(Degnon *et al.*, 2013).

Des disques mycéliens de 6 mm de la souche fongique à tester sont déposés au centre de chaque boîte de pétri. Des témoins sans extraits ont été réalisés. L'incubation est réalisée à 28°C pendant 5 jours. Les diamètres de la croissance mycélienne sont mesurés et comparés à celui de témoin (Degnon *et al.*, 2013).. Le pourcentage d'inhibition (PI) est déterminé par la relation :  $PI(\%) = [1 - (d/dc)] \times 100$  (Kumar *et al.* 2007) avec :

dc: diamètre de la croissance mycélienne dans un milieu sans huile essentielle.d: diamètre de la croissance mycélienne en présence de l'huile essentielle.

#### **4. Application des extraits et des huiles essentielles dans la conservation des aliments**

##### **4.1. *Ocimum gratissimum***

L'efficacité des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* a été évaluée sur laconservation des poissons fumés, deux méthodes ont été utilisées : une incorporation par adjonction et une incorporationpar injection. L'injection des huiles a été réalisée à l'aide de seringues stériles au niveau de quater parties du corps des poissons fumés à savoir : la zone branchiale, chacune des deux faces latérales et au niveau de la zone caudale des poissons. Quant à la méthode d'adjonction, elle a consisté au passage des huiles essentielles sur tout le corps des poissons. Les analyses de contrôle de qualité sont réalisées au cours de la conservation avec une périodicité de 5 jours.(Degnon *et al.*, 2013).

##### **4.2. *Olea europea L.***

L'efficacité des extraits de feuilles d'olivier a été appliqué sur la viande de dindePectoralis major : pH initial 5,7; 24 h post-mortem sont achetées chez un boucher local dans la ville de Tizi-Ouzou (Algérie), (puis transportées dans une enceinte réfrigérée (3±1°C) au Laboratoire Régional Vétérinaire de Draâ Ben Khedda (Tizi-Ouzou) dans les 30 mn qui ont suivi l'achat. (Djenane *et al.*, 2012)

Les escalopes de dinde sont inoculer par des différentes souches bactériennes après l'addition des différents extraits de feuilles d'olivier, les escalopes sont aussi préalablement analysées pour déterminer une éventuelle présence de bactéries testées ainsi que la détermination de la charge bactérienne initiale (flore aérobie totale) . (Djenane *et al.*, 2012)

Pour évaluer l'effet antimicrobien des différents composés de feuilles d'olivier,

plusieurs escalopes de dinde sont préparées selon les bonnes pratiques de manipulation. Au total, 54 escalopes sont préparées en 3 groupes (2 escalopes/échantillon). Les escalopes du premier groupe ( $18 \times 50 \pm 5$ g) étaient placées dans des sachets stériles individuels Stomacher, puis inoculées avec *S. Aureus* ( $5 \times 10^3$ ufc/g). Le deuxième et le troisième groupe  $2 \times (18 \times 50 \pm 5$ g) d'échantillons d'escalopes sont préparées de la même manière, puis inoculées respectivement avec *Pseudomonas aeruginosa* et *S. Enteritidis* ( $5 \times 10^3$ ufc/g). (Djenane *et al.*, 2012)

Six échantillons de chaque groupe sont additionnés d'extrait brut de feuilles d'olivier, les 06 autres échantillons sont additionnés d'extrait polyphénolique et enfin les 06 derniers échantillons de chaque groupe sont traités avec l' $H_2O$  distillée stérile (témoins). Ces échantillons étaient placés dans des barquettes en polystyrène puis recouverts avec des sachets en plastique (polyéthylène/polyamide; Sidlaw Packaging- Soplaril, Barcelona, Espagne), puis ils étaient stockés à l'air libre et à l'obscurité pendant 7 jours à  $8 \pm 2^\circ C$ , simulant les mêmes conditions pratiques appliquées en Algérie. Les analyses microbiologiques sont réalisées pour un intervalle de 3 jours sur une durée de stockage de 7 jours. (Djenane *et al.*, 2012)

### 4.3. *Lavandula stoechas* L.

L'activité antifongique de *Lavandula stoechas* L. a été effectuée comme un test de biocontrôle dans un matrice alimentaire « boisson gazeuse sucrée et fruitée de type (Orangina®) ». Ce type de boisson constitue un milieu défavorable pour la croissance bactérienne par son pH et la présence de deux conservateurs alimentaires (E202 : sorbate de potassium ; E211 : benzoate de sodium). Cependant, sa qualité organoleptique peut être altérée du fait de la possibilité d'une croissance fongique apte à résister aux conditions d'osmophilie et d'acidophilie. C'est la raison pour laquelle une contamination par *Saccharomyces cerevisiae* a été choisie. (Amara *et al.*, 2017)

À cet effet, deux lots de jus ont été testés : un lot de boisson, contenant les conservateurs de synthèse, a été pris comme contrôle positif, alors que l'autre lot de boisson pasteurisée a été utilisé pour apprécier l'efficacité antifongique de l'huile essentielle. Ces deux lots ont été contaminés par une suspension fongique de *Saccharomyces cerevisiae*. Par la suite, des dilutions décimales ont été préparées dans de l'eau physiologique (NaCl : 0,9 %). Ces dilutions vont être analysées par ensemencement en nappe sur milieu gélosé (gélose Sabouraud–chloramphénicol ou gélose glucosée à l'oxytétracycline) et seront incubées à  $25^\circ C$  pendant 48–72 heures. Le dénombrement des colonies levuriformes a été fait tous les deux jours (j0, j2, j4 et j6) pour les différentes boissons conservées, entre-temps, dans un

réfrigérateur à 4 °C. (Amara *et al.*, 2017)

#### 4.4. *Mentha piperita*

Afin d'évaluer l'efficacité des huiles essentielles de *Mentha piperita* dans la stabilisation du lait frais de vache au Sud du Bénin, des essais de conservation du lait frais ont été réalisés par incorporation directe d'huile au lait frais et à des doses variables : 3,33 µl/ml, 5 µl/ml et 6,66 µl/ml . Un témoin a été réalisé sans addition l'huile essentielle.(Degnon *et al.*, 2016).

Des analyses sont effectués périodiquement pour suivre l'évolution de la qualité des échantillon des laits mis en conservation parmi lesquels la détermination de l'acidité, paramètres microbiologiques de qualité qui ont été évalués en utilisant les méthodes standards d'analyses microbiologiques qui incluent : la flore mésophile totale à 30 °C (germes totaux; NFV08-051), des coliformes totaux, des coliformes thermotolérants et *Escherichia coli* (NF ISO 4831), des Staphylocoques(*Staphylococcus aureus*) à 37 °C (NF EN ISO6888-1) et des levures et moisissures (ISO 7954).(Degnon *et al.*, 2016).

# **Chapitre 03:**

## **Résultats et discussion**

## 1. Rendement d'extraction

Les résultats du rendement d'extraction ont représentés dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Rendement en huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* et *Mentha piperita*.(Degnon et al., 2013 ; Degnon et al., 2016).

Plantes	Rendement (%)
<i>Ocimum gratissimum</i>	1,24±0,36
<i>Mentha piperita</i>	0,45±0,02

## 2. Propriétés organoleptiques et composition chimique des huiles essentielles

### 2.1. *Lavandula stoechas*

Les résultats du contrôle des paramètres organoleptiques de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* sont colligés dans le Tableau 2. Ces paramètres sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes.(Amara et al., 2017)

**Tableau 2.** Propriétés organoleptiques de l'essence aromatique de *Lavandula stoechas*.

Caractéristiques organoleptiques	Résultats	Normes AFNOR
Aspect	Liquide mobile	Liquide mobile, limpide
Couleur	Jaune	Jaune clair
Odeur	Caractéristique agréable, rappelant l'odeur des sommités fleuries, légèrement camphrée	Odeur caractéristique de la lavande, très légèrement camphrée

L'analyse de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Lavandula stoechas*, par chromatographe en phase gazeuse (CG-SM) , a permis l'identification de 28 composés volatils où le fenchone a été trouvé comme composé majoritaire, avec un taux de 39,2 %, suivi par le camphre (18 %) et le 1,8-cinéole (17,6 %) encore appelé eucalyptol . D'un point de vue biochimique la famille des monoterpènes oxygénés, représentée par les alcools et leurs esters, est la plus abondante, avec un taux supérieur à 70 %.(Amara et al., 2017)

### 2.2. *Mentha piperita*

La détermination de la composition chimique des huiles essentielles par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/CPG-SM) , a

montré que l'huile essentielle de *Mentha piperita* est majoritairement composée de menthol (46,7%) et de néomenthol (8,28%), avec une teneur en monoterpènes hydrogénés de 5,1%, en monoterpènes oxygénés de 87,0% et en sesquiterpènes hydrogénés 2,1% . (Degnon *et al.*, 2016).

### 3. Tests microbiologiques

#### 3.1. Tests antibactériologiques

L'activité antimicrobienne des extraits de feuilles d'olivier vis-à-vis les trois souches pathogènes : *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Salmonella enterica sérotype Enteritidis* (*S. Enteritidis*) et *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) est révélés une forte activité de l'extrait polyphénolique vis-à-vis de *S. aureus* (diamètre d'inhibition=30,18 mm) est enregistrée (**Tab. 3**). (Djenane *et al.*, 2012)

**Tableau 3.** Activité Antibactérienne de l'extrait brut aqueux et des polyphénols desfeuilles d'olivier *Olea europea* L(méthode de diffusion sur gélose).

	φ (mm)		
	Polyphénols	Extrait brut	chloramphénicol
<i>S. Enteritidis</i>	16,15±1,2a	13,70±2,10b	15,25±0,8a,b
<i>S. aureus</i>	30,18±2,10a	16,33±1,8b	16,35±1,8b
<i>P. aeruginosa</i>	15,57±2,15a	15,29±1,9a	16,15±0,7a

φ: zone d'inhibition exprimée selon le diamètre autour des disques imprégnés avec les deux composés. Les valeurs suivies par la même lettre dans la même ligne, ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ ).

La forte activité antimicrobienne des extraits de feuilles d'olivier est confirmée par la méthode de microdilution (Concentrations Minimales Inhibitrices:CMIs) qui ressort que les polyphénols sont plus performants par rapport à l'extrait brut en termes de valeurs de CMIs. Les polyphénols ont exhibé une valeur de CMI (0,05%) inférieure de 18 fois à celle obtenue avec l'extrait brut (0,9%) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Cependant, vis-à-vis de *S. Enteritidis* et *P. aeruginosa*, l'extrait polyphénolique est 12 fois plus performant que l'extrait

brut ( **Tab.4** ). (Djenane *et al.*, 2012)

**Tableau 4.** Les concentrations minimales inhibitrices des extraits de feuilles d'olivier

*Olea europea* L. exprimées en pourcentage (v/v)

	CMI%	
	Polyphénols	Extrait brut
<i>S. Enteritidis</i>	0,1	1,2
<i>S. aureus</i>	0,05	0,9
<i>P. aeruginosa</i>	0,1	1,2

D'après différentes études, les feuilles d'olivier pourraient être considérées comme un agent antimicrobien où le composant habituellement associé à cette propriété est l'oleuropéine. Hydroxytyrosol a également été démontré plus large activité antimicrobienne que l'oleuropéine et est comparable à ampicilline et érythromycine dans le spectre et la puissance (Khan *et al.*, 2007).

Selon certains d'autres auteurs, les secoiridoïdes (oleuropéine et dérivés), un des principales classes de polyphénols contenus dans olives, qui ont des propriétés antimicrobiennes, peu sont actifs contre les bactéries Gram négatives. L'activité antimicrobienne élevée des dérivés de catéchol d'olive (comme l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol) contre les bactéries à Gram-négatifs et les Gram-positifs ont été observées aussi et confirment également la haute activité des phénols d'olive contre *Staphylococcus aureus*, un micro-organisme largement étudié en raison de sa capacité à produire des entérotoxines et sa résistance exceptionnelle (chez les bactéries à Gram positif) aux composés phénoliques naturels.

En ce qui concerne le mécanisme d'action de l'activité antimicrobienne des polyphénols d'olive, les résultats montrent clairement qu'ils pénètrent les membranes cellulaires structurellement différentes des deux bactéries Gram négatives et positives. Les composés phénoliques sont donc connus pour causer des perturbations des peptidoglycane cellulaires ou endommager la membrane cellulaire, ou les deux cependant, bien que ces deux biophénols aient le système o-diphénol (responsable de l'activité antibactérienne de polyphénols d'olive) sur leur structure dorsale, l'oleuropéine était nettement moins toxique pour les bactéries que

l'hydroxytyrosol. (Giuseoppe *et al.*, 1999).

D'après l'étude de Lee et Lee (2010), l'effet antimicrobien des feuilles d'olivier est du à sa composition phénolique, comme il a été reporté. En effet ont testé l'effet antimicrobien de l'un des composés phénoliques propres aux feuilles d'olivier (Oleuropéine) où il constate que l'oleuropéine est plus efficace vis-à-vis de *S. Enteritidis* (23,5±0,8mm).Cependant, l'oleuropéine n'a exercé aucune action antimicrobienne vis-à-vis de *S. aureus*.

Confirmant les rapports précédents, il a été constaté que la force et le spectre d'activité antimicrobienne varient selon le type d'extrait et le Gram des bactéries. Cependant, les bactéries à Gram positif sont généralement les plus sensibles aux effets de ces extraits polyphénoliques. La résistance générale plus élevée chez les bactéries à Gram négatif est attribuée à la présence d'une membrane externe imperméable aux composés lipophiles. L'absence de cette barrière chez les bactéries à Gram positif permet le contact direct des constituants hydrophobes des extraits avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne, entraînant une augmentation de la perméabilité aux ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux ou l'altération des systèmes enzymatiques bactériens (Wendakoom et Sakagauchi , 1995).

Les résultats de pouvoir antibactérien des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* sur les tests d'aromatogramme et microatmosphère qui sont évalués par mesure des zones d'inhibition autour des disques révèlent que cet huile a présenté une activité antibactérienne majeure sur les souches de *Staphylococcus aureus* avec une inhibition totale (90 mm) en aromatoigramme pour la dose de 60 µl par disque. D'après ces résultats des deux méthodes utilisées, il montrent également la présence d'un pouvoir antibactérien de la phase vapeur de l'huile essentielle chez les bactéries à Gram+ qui sont plus sensibles à l'action inhibitrice où les DZI obtenus, en microatmosphère, sont deux fois plus supérieurs que ceux de l'aromatogramme, en particulier pour la plus forte dose d'huile essentielle utilisée. (Amara *et al.*, 2017)

**Tableau 5.** Activité antibactérienne *in vitro* de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* (Amara *et al.*, 2017)

	Méthodes utilisées			
	Aromatogramme		Microatmosphère	
	Quantité d'huile essentielle (µl/disque)			
	20	60	20	60
<b>Souches Gram-</b>				
<i>Escherichia coli (Ec1)</i>	15 a	26	-	30
<i>Escherichia coli (Ec2)</i>	20	35	12	35
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30	65	30	55
<i>Proteus mirabilis</i>	18	35	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	25	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	20	30	45	90
<i>Citrobacterfreundii</i>	-	-	20	48
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	24	-	45
<i>Salmonella typhi</i>	-	16	-	-
<b>Souches Gram+</b>				
<i>Bacillus cereus</i>	28	60	15	36
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa1)	22	45	20	65
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa2)	20	80	55	90
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	80	50	90

<i>(Sa3)</i>				
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	14	24	-	-
<i>Streptococcus spp.</i>	-	25	-	30

(-) : aucune zone d'inhibition a Diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul de la zone d'inhibition.

Les extraits de la lavande présentent une composition très complexe. Le criblage phytochimique a révélé des taux élevés en composés terpéniques ce qui concorde avec les données bibliographiques dont les constituants majoritaires sont de nature terpénique et principalement monoterpénique. Par sa composition chimique, l'huile de la lavande présente un mode d'action qui implique plusieurs cibles dans la cellule bactérienne. La structure de groupement fonctionnel des huiles essentielles joue un rôle important dans la détermination du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Cependant, il apparait que le pouvoir antibactérien contre les bactéries à Gram positifs est plus important que les bactéries à Gram négatifs (Benyagoub *et al.*, 2014).

Les composants des huiles essentielles sont hydrophobes, ce qui leur permet de séparer les lipides des membranes cellulaires bactériennes, les rendant ainsi plus perméables et par conséquence, les Gram- sont plus résistantes aux antiseptiques que les Gram+ car leur membrane extérieure agit comme une barrière.

Les bactéries à Gram négatifs apparaissent plus résistantes comparées à celle de Gram positifs, cela est dû principalement à la différence de structure de leur paroi externe, ainsi que la membrane des bactéries à Gram négatifs est plus riche en lipopolysaccharides et en protéine par rapport de celles à Gram positifs qui rendent ces bactéries plus hydrophiles, et empêche les terpènes de s'adhérer la structure en cause. L'absence de cette barrière chez les bactéries à Gram positif permet alors le contact direct des constituants hydrophobes des extraits avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne, entraînant une augmentation de la perméabilité aux ions et la fuite des constituants intracellulaires vitaux ou l'altération des systèmes enzymatiques bactériens.

Cette activité est attribuée principalement aux composants de Linalylacetate et linalol qui ontarole dans l'inhibition de certaines souches bactériennes (Gram positifs et négatifs), champignons microscopiques. Ainsi, le linalol et l' $\alpha$ -terpinéol sont très actifs sur les

bactéries à Gram positifs et même sur celles antibio-résistants (Maud , 2013 ; Benyagoub et *al.*, 2014 ).

D'autres études ont montré que l'action antifongique des substances terpéniques est due à une rupture de la membrane plasmique qui par la suite conduit une augmentation de la perméabilité membranaire, entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure (Cox *et al.*, 2002).

Le nombre limité des études publiées sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *L. stochas*, tel que celui de la Turquie (Kirmizibekmez *et al.*, 2009) et de la Tunisie (Bouzouita *et al.*, 2005) confirment l'action bactérienne de cette huile essentielle (Cherrat, 2013).

### 3.2. Tests antifongiques

**Tableau 6.** Pourcentage d'inhibition des souches fongiques en présence de l'huile essentielle de plante d'*Ocimum gratissimum* (Degnon *et al.*, 2013).

Concentrations en huiles essentielles	Pourcentage d'Inhibition	
	<i>Aspergillus candidus</i>	<i>Penicillium camemberti</i>
5 µl/ml	81, 66 ± 0,1a	89, 43 ± 0,1a
7,5 µl/ml	100 ± 0,00b	100 ± 0,00b
10 µl/ml	100 ± 0,00b	100 ± 0,00b

La bioefficacité de l'huile d'*Ocimum gratissimum* peut être due à la présence de certains composants hautement fongitoxiques dans l'huile comme les terpénoïdes. En effet, l'huile d'*Ocimum gratissimum* des compositions chimiques caractérisées par des terpènes (p-cymène et  $\gamma$ -terpinène) et les terpénoïdes (thymol) comme principaux groupes chimiques, d'autres composés tels que l'eugénol et le cis-ocimène, fenchone, de camphre, et de 1,8-cinéole ont été détectés ( Lemos *et al.*, 2005 ; Anand *et al.*, 2011 ; Adjou *et al.*, 2013).

En effet, Plusieurs études ont montré les terpénoïdes constituent un grand groupe de composés à activité antimicrobienne à large spectre, leur propriété antimicrobienne est liée à leur groupe fonctionnel et il a été aussi rapporté que le groupe hydroxyle des terpénoïdes phénolique ainsi que la présence d'électrons délocalisés sont liés à leur potentiel antimicrobien, les monoterpénoïdes les plus actifs identifiés à ce jour sont le carvacrol et le thymol (Dorman et Deans 2000 ; Hyldgaard *et al.*, 2012).

#### **4. Résultats des applications des extraits et des huiles essentielles dans la conservation des aliments**

##### **4.1. *Ocimum gratissimum***

L'application des huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum* sur les poissons fumés a permis de conserver ces derniers pendant une durée moyenne de 10 jours avec la méthode d'adjonction comparativement aux poissons fumés témoins, dans lesquels des signes prononcées d'altération ont été notés. Cependant, seule la concentration en huile essentielle de 1ml/70g de poissons fumés a empêché toute croissance microbienne au niveau des poissons fumés et conservés avec la même huile essentielle par la méthode d'injection, ces résultats ont montrés que la méthode de conservation par adjonction d'huile essentielle est plus efficace que la méthode de conservation par injection, lorsqu'elle s'applique aux poissons fumés. Cette efficacité résulterait de l'effet protecteur des substances bioactives contenues dans cette huile essentielle qui constitue une barrière efficace lorsqu'elle est enduite sur toute la surface du poisson (Degnon *et al.*, 2013).

##### **4.2. *Olea europea L***

En effets, l'application de l'huile essentielle sont donc confirmées les résultats d'activités antimicrobiennes le fait que leur effet apparait clairement dans l'inhibition de la croissance microbienne. Ainsi que, plusieurs études ont été montré les propriétés antifongiques et antibactériennes des huiles essentielles (Burt, 2004 ; Soumanou et Adjou, 2016) et suscitent de plus en plus leur utilisation dans la conservation des aliments dans nombreux domaines de la science alimentaire.

Les résultats d'application des extraits des feuilles d'olives sur la viande ont montré que ces extraits ont exercé une remarquable activité antimicrobienne durant toute la phase de stockage du produit.

Les résultats de développement des bactéries et moisissures sur les escalopes de dinde traitées par des extraits des feuilles d'olives montrent la diminution du nombre des bactéries chez les groupes traitées avec des extraits comparativement au témoin.

D'autres, les résultats obtenus indiquent aussi que l'extrait polyphénolique a un effet antibactérien qui apparait dans le premier jour de stockage avec une diminution de croissance fongique, ces activités antimicrobiennes des extraits pourraient être attribuées à la présence des groupes phénoliques principalement d'oleuropéine, hydroxytyrosol et verbascosides qui sont considérés par certains auteurs comme des antibactériens et antifongiques potentiels (Aziz *et al.*, 1998 ; Bisignano *et al.*, 1999 ; Sudjana *et al.*, 2009).

Le pH d'un aliment est aussi un facteur important affectant l'activité d'une substance antimicrobienne. En générale, la sensibilité des bactéries aux substances antibactériennes semble aussi augmenter avec la diminution du pH de l'aliment.

#### **4.3. *Lavandula stoechas***

Les résultats d'application de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* sur un jus de fruits de type Orangina® montrent une diminution dans le nombre des colonies à partir de deuxième jours, tandis que un contact de trois jours avec l'huile essentielle a été suffisant pour abaisser le nombre de colonies (Amara *et al.*, 2017)

Donc, ces résultats de l'activité antifongique indiquent que l'huile essentielle a une importante capacité inhibitrice sur la croissance fongique (*Saccharomyces cerevisiae*) en comparaison avec les conservateurs de synthèse (Amara *et al.*, 2017)

Dans une autre étude similaire, le traitement thermique des aliments qui est combinée avec l'utilisation des huiles essentielles reste l'une des méthodes d'inactivation microbienne totale dans le jus de fruit, Cependant, l'absence de traitement thermique avec une grande concentration d'huile était nécessaire pour aboutir au même résultat (Tyagi et Malik , 2013).

Ainsi, le cas des boissons sucrées et fruitées de type Orangina®, il est établi que l'efficacité de l'huile augmente avec la diminution du pH du jus, de la température de stockage ou encore la quantité d'oxygène dans l'emballage. Cela est d'autant plus intéressant que les quantités d'huiles nécessaires pour le contrôle de la croissance fongique dans les aliments conservés à basse température pourraient être réduites (Bevilaqua *et al.*, 2011 ; Hyldgaard *et al.*, 2012).

#### **4.4. *Mentha piperita***

Les résultats de l'évolution de la flore totale, des coliformes totaux, des lactobacilles, des levures et des moisissures dans le lait frais de vache additionné respectivement d'huile essentielle de *Mentha piperita* au cours de la conservation montrent que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles, dépend de la nature de l'huile essentielle et de la dose utilisée (Degnon *et al.*, 2016).

**Tableau 7.** Effet antibactérienne de l'huile essentielle de *Mentha piperita* sur l'évolution de la flore totale et les coliformes totaux du lait (Degnon *et al.*, 2016).

Durée (Jours)	Paramètres microbiologiques (log ufc/ml)							
	flore totale				Coliformes totaux			
	0	0 3,33 µl/ml	5 µl/ml	6,66 µl/ml	0	0 3,33 µl/ml	5 µl/ml	6,66 µl/ml
<b>1</b>	3,477	3,477	3,477	3,477	3	3	3	3
<b>3</b>	3,698	3,278	3,176	2,176	3,698	2	2,301	1,7
<b>6</b>	4,041	3,477	3,477	2,477	3,778	1,5	2,477	1,6
<b>9</b>	4,477	3,477	3,079	2,079	4,477	1,5	2,113	1,5
<b>12</b>	4,477	3,477	3,477	2,477	4,477	1,3	2,602	1
<b>15</b>	4,477	2,7	2	0	4,477	0	2,477	0

**Tableau 8.** Effet antifongique de l'huile essentielle de *Mentha piperita* sur l'évolution des Lactobacilles, les levures et moisissures du lait (Degnon *et al.*, 2016).

Durée (Jours)	Paramètres microbiologiques (log ufc/ml)							
	Lactobacilles				Levures et Moisissures			
	0	0 3,33 µl/	ml 5 µl/ml	6,66 µl/ml	0	0 3,33 µl/ml	5 µl/ml	6,66 µl/ml
<b>1</b>	1,778	1,778	1,778	1,778	1,602	1,602	1,602	1,602
<b>3</b>	3,903	3,698	1	0	2,93	1,3	1,3	1
<b>6</b>	5,477	3,301	0,8	0	3	1,3	0	0
<b>9</b>	4,477	3,20	0,6	0	3	1	0	0
<b>12</b>	4,477	0,313	0,6	0	3	0,9	0	0
<b>15</b>	5,054	0	0	0	3	0,4	0	0

Ces résultats obtenus soulignent l'efficacité de cette huile essentielle, qui se traduit par une baisse progressive des différents microbes, notamment au niveau des coliformes totaux, des lactobacilles, des levures et moisissures au cours de la conservation aux doses d'huile essentielles de 5 µl/ml et 6,66 µl/ml, où cet effet antibactérien est proportionnel à la

concentration de l'huile essentielle (Degnon *et al.*, 2016).

Sokovic *et al.* (2009) ont montré que l'huile essentielle de *Mentha piperita* a exhibé de fortes activités antimicrobiennes contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium* avec des concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) comprises entre 1,0 et 3,0 µg/mL et des concentrations Minimales Bactéricides (CMB) comprises entre 1,5 et 5,0 µg/mL et montrant aussi les mêmes potentialités antibiotiques que la streptomycine détenant les mêmes CMI et les mêmes CMB.

La forte action antimicrobienne d'huile essentielle de *Mentha piperita* peut être facilement attribuée à sa richesse en monoterpènes oxygénés telque 1,8-cineole qui a montré son pouvoir antibactérien à lutter contre plusieurs souches bactériennes testées (Alitonou, 2006).

En effet, Iúsücanet *al.* (2002) indiqué également que le menthol et menthone sont les composés principales de l'activité antibactérienne des huiles de *Mentha piperita*, contre le standard « agent antimicrobien Chloramphénicol », il a été aussi montré que ces huiles inhibaient fortement les micro-organismes phytopathogènes.

Ainsi, l'avantage des huiles essentielles est leur bioactivité (antibactériennes, antifongiques, et antioxydantes) dans la phase vapeur, une caractéristique qui les rend utiles pour la protection des produits stockés et d'après ces résultats, l'utilisation des huiles essentielles de *Mentha piperita* comme un conservateur peuvent prendre une place dans différents domaines de sciences des aliments et peut remplacer les antimicrobiennes chimiques de synthèse qui sont parfois néfastes pour la santé du consommateur et pour l'environnement.

# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

Cette étude a été portée sur l'analyse des différents travaux de recherche qui ont été choisis afin de résoudre la problématique de l'application de quelques extraits naturels dans la conservation des denrées alimentaires.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que les huiles essentielles d'*Ocimum gratissimum*, *Lavandula stoechas*, et d'*Mentha piperita* ainsi que les extraits bruts et phénoliques des feuilles d'olivier ont la capacité de conserver lorsqu'on les applique sur des produits alimentaires pendant leurs stockage, le fait que ces huiles essentielles et extraits naturels possèdent des activités biologiques importantes telles que antibactérienne et antifongique. Ces capacités empêchent telles croissance des microorganismes et qui contribue à l'altération biologique des aliments.

La bioefficacité de la conservation est corrélée à la forte teneur en polyphénols y compris l'oleuropéine et ses dérivés qui sont présents majoritairement chez l'espèce *Olea europea* L. Ainsi, le contenu terpénique de la lavande a un rôle dans l'inhibition de certaines souches bactériennes. Le carvacrol et le thymol de la *Mentha piperita* ont un potentiel antimicrobien important, tandis que l'effet protecteur de l'huile essentielle d'*Ocimum gratissimum* peut être due à la présence de certaines substances bioactives hautement fongitoxiques comme les terpénoïdes.

A travers ces résultats nous pouvons dire aussi que les huiles essentielles utilisés dans cette étude peuvent prendre leur place dans le domaine de conservation des denrées alimentaires car ils les protègent contre les agents de la détérioration alimentaire présente dans le milieu de stockage.

Afin d'approfondir ces résultats et d'établir de nouvelles approches, il serait intéressant de proposer certaines perspectives telles que :

- Faire une étude approfondie sur les composants bioactifs des huiles essentielles des plantes *Ocimum gratissimum*, *Lavandula stoechas*, d'*Mentha piperita* et les extraits de feuilles d'olivier dans le but de remplacer les conservateurs chimiques qui ont un effet néfaste sur la santé humaine par ces huiles qui ont prouvé leur efficacité contre les différents agents qui provoquent l'altération des aliments.
- D'autres tests ont été proposés comme les tests de l'activité antioxydante.

- Des études supplémentaires assurent le contrôle de la stabilité des conservateurs naturels pour éviter les interactions non souhaitable entre les aliments et les composés.

# **Références bibliographiques**

### Références bibliographique

1. Adjou ES., Kouton S., Dahouenon-Ahoussi E., Soumanou MM., Sohounhloue DCK. 2013. Effect of essential oil from fresh leaves of *Ocimum gratissimum* L. On mycoflora during storage of peanuts in Benin. *Mycot. Res.*, 29, pp.29–38.
2. Aguiyi, J., Obi, C., Gang, S., Igweh, A. 2000. Hypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. *Fitoterapia*, 71(4), pp.444-446.
3. Alitonou GA. 2006. Huiles essentielles extraites de plantes aromatiques acclimatées au Bénin: étude chimique, évaluation biologique et applications potentielles. Thèse de Doctorat en cotutelle, Université d'Abomey-Calavi et Université de Montpellier II, 282 p.
4. Amara A., Boukhatem M.N., Ferhat M.A., Kaibouche N., Laissaoui O., Boufridi A. 2017. Applications potentielles de l'huile essentielle de lavande papillon (*Lavandula stoechas* L.) comme conservateur alimentaire naturel. *Phytothérapie*. DOI 10.1007/s10298-017-1158-4.
5. Anand A.K., Mohan M., Haider S. Z.,sharma A.2011.Essential oil composition and antimicrobial activity of three *ocimum* species from uttarakhand (india). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 3 Suppl 3, 2011.
6. Aziz NH., Farag SE., Mousa LA., Abo-Zaid MA. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*. Vol. 93. (1998). pp. 43-54.
7. Bassolé, I. H. N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R. C., Dicko, M. H. 2010. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*, 15(11), pp.7825-7839.
8. Becila, A. 2009. Préventions des altérations et des contaminations microbiennes des aliments.memoire de stage, université Mentouri, Constantine.
9. Benabdelkader, T. 2014. Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, *Lavandula stoechas* sensu lato, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Pour l'obtention du grade de Docteur, Ecole normale supérieure de Kouba , Alger,204p.
10. Benyagoub E., Nabbou N., Sirat M., et Dahlis Z. 2014. Propriétés antibactériennes et constituants phytochimiques des extraits de la lavande de la region de tlemcen et leur effet sur quelques especes bacteriennes responsables d'infection alimentaire.

*Revue des BioRessources* Vol 4 N° 2 Décembre 2014.

11. Bevilacqua A., Corbo MR., Campaniello D., et al. 2011. Shelf life prolongation of fruit juices through essential oils and technological advances. *Formatex3*:1115–66.
12. Bhavani T., Mohan R.R., Mounica C., Nyamisha J., Krishna A.G, Prabhavathi P., Raja Dr. R.R., Baba Dr.KH. 2019. Phytochemical screening antimicrobial activity of *Ocimum gratissimum* review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2019; 8(2): 76-79.
13. Billerbeck VG., Roques CG., Bessière JM., Envieille JL., Dargent R. 2001. Effet of *Cymbopogon nardus* (L) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can J Microbial* 47 : 9-17.
14. Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A. 1999. On the in- vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J PharmPharmacol.* Vol. 51. (1999). pp. 971-974.
15. Boeckel, T. P. van, Hounhouigan, J. D., Nout, R. 2003. Les aliments : Transformation, conservation et qualité. CTA
16. Boniface, Y., Edwige, A., Philippe, S., Alain, A. G., Fatiou, T., Dominique, S. 2012. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils (EO) extracted from leaves of *Lippia rugosa* A. Chev against foods pathogenic and adulterated microorganisms. *African Journal of Microbiology Research*, 6(26), 5496-5505
17. Bornert, G. 2000. Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue Méd. Vét*, 151(11), 1003-1010
18. Bouzouita N, Kachouri F., Hamdi M. , M. M. Chaabouni M. M., Ben Aissa R., Zgoulli S., Thonart P., Carlier A., Marlier M., et Lognay G.C. 2005. Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of *Lavandula stoechas* L. Oil from Tunisia. *J. Essent. Oil Res.*, 17, 584-586 .
19. Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology* 94 (2004) 223– 253.
20. Cherrat L . 2013. Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles de 5 plantes aromatiques et médicinales du Maroc et évaluation de leurs effets combinés avec des méthodes de conservation alimentaire. Thèse de doctorat. Université Abdelmalek Essaadi – Tanger. 174 p.

21. Cox SD., Mann CM., Markham JL., et al . 2002. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J ApplMicrobiol*88:170–175.
22. Dahbia, S. 2009. Etude des endomycorhizes de la variété sigose d'olivier. Faculté de science Département de biotechnologie, Mémoire de MAGISTER, Université d'ORAN, ORAN, 98p.
23. Degnon G.R., ADJOU E.S., Metome G., Dahouenon-ahoussi E. 2016. Efficacité des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* et de *Mentha piperita* dans la stabilisation du lait frais de vache au Sud du Bénin. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 10(4): 1894-1902, August 2016.
24. Degnon R.G., Faton A.N., Adjou E.S., Tchobo F.P., Edwige D.A., Soumanou M.M., Sohounhlou DC.K. 2013. Efficacité comparée des huiles essentielles de deux plantes aromatiques dans la conservation post-fumage du Chinchard (*Trachurus trachurus*). *Journal of Animal & Plant Sciences*, 2013. Vol.19, Issue 1: 2831-2839, <http://www.m.elewa.org/JAPS>;
25. Diezi, M., Buclin, T., Diezi, J. 2011. Additifs alimentaires et troubles de l'attention/hyperactivité chez l'enfant. *Paediatrica*, 22(5), 12–15
26. Dilmi-Bouras A .2004. Biochimie alimentaire, Edition 4329, Alger, 128p
27. Djenane D., Sánchez-Escalante A., Beltrán JA et Roncalés P. 2003. The shelf-life of beef steaks treated with dL-lactic acid and antioxidants and stored under modified atmospheres. *Food Microbiol.* Vol. 20. (2003). pp. 1-7.
28. Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L., Roncales P. 2012. Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. *Revue « Nature & Technologie »*. n° 07/Juin 2012. Pages 53 à 61.
29. Falleh, H., Jemaa, M. B., Saada, M., Ksouri, R. 2020. Essential oils : A promising eco- friendly food preservative. *Food Chemistry*, 127268.
30. Giuseppe B., Antonio T., Rossella LC., Giuseppe C., Nicola U. And Antonella S. 1999. On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999, 51: 971±974.
31. Goudjil M. B. 2016. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques. Thèse de doctorat. Université Kasdi Merbah – Ouargla. 173 p.

32. Haouari A. 2013. Influence des modifications de l'équilibre source-puits sur les paramètres physiologiques et biochimiques chez l'Olivier (*Olea europaea* L.), sous bioclimat semi-aride de Tunisie. Thèse de Doctorat. Faculté des sciences en bio-ingénierie, Université de Gand, Belgique et Faculté des Sciences de Sfax, Tunisie. p186.
33. Hazzit M., Baaliouamer A., Veríssimo AR., Faleiro ML et Miguel MG. 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. Food Chem. Vol. 116. (2009). pp.714-721.
34. Heldman, D. R. 2011. Food preservation process design. Academic Press , pp.714-721.
35. Heldman, D. R. 2011. Food preservation process design. Academic Press.
36. Himour S., Yahia A., Belattar H., Bellebcir L. 2016. Etude phytochimique de feuilles d'*Olea europaea* L. var Chemlel d'Algérie. Journal of Bioresources Valorization, 2016. Vol. 1 (1), pp (34-38).
37. Hyldgaard M., Mygind T., Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation : mode of action synergies and interactions with food matrix components. Front Microbiol 3:1–12.
38. In't Veld, J. H. H. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. International journal of food microbiology, 33(1), 1-18.
39. ISSN 2071-7024.
40. Iúsücan G., KIúRIúMER N., Kurkcuoğylu M., BASüER K.HC ., Demiúrciú F. 2002. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, pp.3943-3946.
41. James A. Duke, P.-A. K. 2008. Medicinal Plants of the Bible Vol. 554. CRC Press Taylor Francis Group.
42. Khan.Md.Y, Panchal S., Vyas N., Butani A., Kumar V. 2007. *Olea europaea*: A Phyto- Pharmacological Review. Vol 1, Issue 1, Jan- May, 2007.
43. Khavarpour M., Vahdatb S.M., Kazemic S., Moghadamniad A. A., Hasanzadeha O., Salimia Z., Rahmanpoura N. 2019. Chemical Composition, Antibacterial and Analgesic Activity of *Lavandula stoechas* Flowers from North of Iran. IJE TRANSACTIONS B: Applications Vol. 32, No. 8, (August 2019) 1065-1073.

44. Kırmızıbekmeza H., Demircib B., Yeşiladaa E., Can Başerb K.H., and Demircib F. 2009. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* Growing Wild in Turkey. *Natural Product Communications* Vol. 4 (7) 2009.
45. Kumar R., Dubey K., Tiwari OP., Tripathi YB., Sinha KK. 2007. Evaluation of some essential oils as botanical fungi toxicants for the protection of stored food commodities from fungal infestat. *J.Sci. Food Agric*, 87,1737-1742.
46. L.K. e Souza, Lemos A.A., Rodrigues Silva/+ M. DR. 2005. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. Towards *Cryptococcus neoformans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 100(1): 55-58, February 2005.
47. Lee O.H., Lee B.Y. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology* 101 (2010) 3751–3754.
48. Lemos J. A., Passos X. S., Fernandes O.FL., José Realino de Paula, Ferri P. H., Hasimoto
49. Lim T.K . 2014. Edible Medicinal and Non Medicinal Plants. Volume 8, Flowers. DOI 10.1007/978-94-017-8748-2\_1, © Springer Science+Business Media Dordrecht 2014.
50. Mahieddine, B. 2005. Conservation des denrées alimentaires. Centre universitaire d'El-Tarf.
51. Maud B. 2013. *Lavandula angustifolia* M., *Lavandula latifolia* M., *Lavandula x intermedia* E: études botaniques, chimiques et thérapeutiques. Sciences pharmaceutiques. Thèse de doctorat. 144 p.
52. Mayer, F. 2012. Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite.
53. Ponce AG., Fritz R., del Valle C., Roura SI. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LW u.-Technol.* Vol. 36. (2003). pp. 679-684.
54. Rahman MS. 2007. Handbook of Food Preservation. 2nd ed. Taylor Francis Group, an informa business.

55. Singh R., Shushni M.A.A., Asma Belkheir A. 2011. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. Arabian Journal of Chemistry.
56. Site web 1 : <https://agronomie.info/fr/classification-botanique-de-lolivier/>.-
57. Site web 2: <https://sante.lefigaro.fr/mieux-etre/nutrition-pratique/conserver-aliments/quoi-ca-sert>.
58. Site web 3: <https://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Publications/Vie-pratique/Fichespratiques/Conservation-des-aliment>.
59. Sokovic MD., Vukojević J., Marin PD., Brkić DD., Vajs V., van Griensven L JLD. 2009. Chemical Composition of Essential Oils of *Thymus* and *Mentha* Species and Their Antifungal Activities. *Molecules*, 14: 238-249.
60. Soumanou M.M., Adjou E.S. 2016. Sweet Fennel (*Ocimumgratissimum*) Oils.
61. Sudjana AN., D’Orazio C., Ryan V., Rasool N. Ng J., Islam N., Riley TV., Hammer KA. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. I. J. Antimicrob. Agents. Vol. 33.(2009). pp. 461-463.
62. Tyagi AK., Malik A. 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Contr* 22:1707–14.
63. Tyagi AK., Malik A. 2013. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*. microscopic observations and chemical Characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complement Alternat Med* 10:65.
64. Wendakoon CN., Sakaguchi M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of Enterobacter aerogenes by active components in spices.1995. *J. Food Prot.* Vol. 58. (1995). pp. 280-283.

### Liste des documents analysés

#### 1) Liste de référence des articles du chapitre matériels et méthodes

1. Akowuah, G., Ismail, Z., Norhayati, I., Sadikun, A. 2005. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*, 93(2), pp.311-317.
2. Amara A., Boukhatem M.N., Ferhat M.A., Kaibouche N., Laissaoui O., Boufridi A. 2017. Applications potentielles de l’huile essentielle de lavande papillon (*Lavandula stoechas*

L.) comme conservateur alimentaire naturel. Phytothérapie.

3. Boukhatem, M. N., Fethat, A., Kameli, A. 2019. Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : Revue de littérature. Une, 3, 4
4. Degnon G.R., ADJOU E.S., Metome G., Dahouenon-ahoussi E. 2016. Efficacité des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* et de *Mentha piperita* dans la stabilisation du lait frais devache au Sud du Bénin. Int. J. Biol. Chem. Sci. 10(4): 1894-1902, August 2016.
5. Degnon R.G., Faton A.N., Adjou E.S., Tchobo F.P., Edwige D.A., Soumanou M.M., Sohounhloue DC.K. 2013. Efficacité comparée des huiles essentielles de deux plantes aromatiques dans la conservation post-fumage du Chinchard (*Trachurus trachurus*). Journal of Animal Plant Sciences, 2013. Vol.19, Issue 1: 2831-2839.
6. Djenane D., Sánchez-Escalante A., Beltrán JA et Roncalés P. 2003. The shelf-life of beef steaks treated with dL-lactic acid and antioxidants and stored under modified atmospheres. Food Microbiol. Vol. 20. 2003. pp. 1-7.
7. Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L., Roncales P. 2012. Utilisation des composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens; application pour la conservation de la viande fraîche de dinde. Revue « Nature & Technologie ». n° 07/Juin 2012. pp. 53-61.
8. Goudjil M. B. 2016. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de trois plantes aromatiques. Thèse de doctorat. Université Kasdi Merbah – Ouargla. 173 p.
9. Hazzit M., Baaliouamer A., Veríssimo AR., Faleiro ML et Miguel MG. 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian Thymus oils. Food Chem. Vol. 116. (2009). pp. 714-721.
10. Khan.Md.Y, Panchal S., Vyas N., Butani A., Kumar V. 2007. *Olea europaea*: A Phyto-Pharmacological Review. Vol 1, Issue 1, Jan- May, 2007.
11. Ponce AG., Fritz R., del Valle C., Roura SI. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. LW u.-Technol. Vol. 36. 2003. pp. 679-684.
12. Singh R., Shushni M.A.A., Asma Belkheir A. 2011. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. Arabian Journal of Chemistry.
13. Tyagi AK., Malik A. 2013. Liquid and vapour-phase antifungal activities of

selected essential oils against *Candida albicans*. microscopic observations and chemical Characterization of *Cymbopogon citratus*. BMC Complement Alternat Med 10:65.

## 2) Liste des références des articles de la partie résultats et discussions

1. Adjou ES., Kouton S., Dahouenon-Ahoussi E., Soumanou MM., Sohounhloue DCK. 2013. Effect of essential oil from fresh leaves of *Ocimum gratissimum* L. On mycoflora during storage of peanuts in Benin. Mycot. Res., 29, pp.29–38.
2. Alitonou GA. 2006. Huiles essentielles extraites de plantes aromatiques acclimatées au Bénin: étude chimique, évaluation biologique et applications potentielles. Thèse de Doctorat en cotutelle, Université d'Abomey-Calavi et Université de Montpellier II, 282p.
3. Anand A.K., Mohan M., Haider S. Z.,sharma A.2011.Essential oil composition and antimicrobial activity of three *ocimum* species from uttarakhand (india). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol 3 Suppl 3, 2011.
4. Aziz NH., Farag SE., Mousa LA., Abo-Zaid MA. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. Microbios. Vol. 93. (1998). pp. 43-54.
5. Benyagoub E., Nabbou N., Sirat M., et Dahlis Z. 2014. Propriétés antibactériennes et constituants phytochimiques des extraits de la lavande de la région de tlemcen et leur effet sur quelques espèces bactériennes responsables d'infection alimentaire. *Revue des BioRessources* Vol 4 N° 2 Décembre 2014.
6. Bevilacqua A., Corbo MR., Campaniello D., et al. 2011. Shelf life prolongation of fruit juices through essential oils and technological advances. *Formatex3*:1157–1166.
7. Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A. 1999. On the in- vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol*. Vol. 51. (1999). pp. 971-974.
8. Bouzouita N, Kachouri F., Hamdi M. , M. M. Chaabouni M. M., Ben Aissa R., Zgoulli S., Thonart P., Carlier A., Marlier M., et Lognay G.C. 2005.Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of *Lavandula stoechas* L. Oil from Tunisia. *J. Essent. Oil Res.*, 17, 584-586 .
9. Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology* 94 (2004),pp.223– 253.

10. Cherrat L . 2013. Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles de 5 plantes aromatiques et médicinales du Maroc et évaluation de leurs effets combinés avec des méthodes de conservation alimentaire. Thèse de doctorat. Université Abdelmalek Essaadi– Tanger.174 p.
11. Cox SD., Mann CM., Markham JL., et al . 2002. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*88:170-175.
12. Dorman HJD, Deans SG .2000. Antimicrobial agents from plants antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*88:308–16.
13. Giuseppe B., Antonio T., Rossella LC., Giuseppe C., Nicola U. And Antonella S. 1999. On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999, 51: 971-974.
14. Hyldgaard M., Mygind T., Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation : mode of action synergies and interactions with food matrix components. *Front Microbiol*3:1–12.
15. Iúsücan G., KIÚRIÚMER N., Kurkcuoğylu M., BASÜER K.HC ., Demiúrciú F. 2002. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, pp.3943-3946.
16. Khan.Md.Y, Panchal S., Vyas N.,Butani A., Kumar V. 2007. *Olea europaea*: A Phyto- Pharmacological Review.Vol 1, Issue 1, Jan- May, 2007.
17. Kırmızıbekmeza H., Demircib B., Yeşiladaa E., Can Başerb K.H., and Demircib F. 2009. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Lavandula stoechas*L. ssp. *Stoechas* Growing Wild in Turkey. *Natural Product Communications* Vol. 4 (7) 2009.
18. L.K. e Souza, Lemos A.A., Rodrigues Silva/+ M. DR. 2005. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. Towards *Cryptococcus neoformans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 100(1): 55-58, February 2005.
19. Lee O.H., Lee B.Y. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technology* 101 (2010),pp3751–3754
20. Lemos J. A., Passos X. S., Fernandes O.FL., José Realino de Paula, Ferri P. H., Hasimoto

21. Maud B. 2013. *Lavandula angustifolia* M., *Lavandula latifolia* M., *Lavandula x intermedia* E: études botaniques, chimiques et thérapeutiques. Sciences pharmaceutiques. Thèse de doctorat. 144 p.
22. Sokovic MD., Vukojević J., Marin PD., Brkić DD., Vajs V., van Griensven L JLD. 2009. Chemical Composition of Essential Oils of *Thymus* and *Mentha* Species and Their Antifungal Activities. *Molecules*, 14: 238-249.
23. Soumanou M.M., Adjou E.S. 2016. Sweet Fennel (*Ocimum gratissimum*) Oils.
24. Sudjana AN., D'Orazio C., Ryan V., Rasool N. Ng J., Islam N., Riley TV., Hammer KA. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *I. J. Antimicrob. Agents*. Vol. 33.(2009). pp. 461-463.
25. Tyagi AK., Malik A. 2013. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*. microscopic observations and chemical Characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complement Alternat Med* 10:65.
26. Wendakoon CN., Sakaguchi M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices.1995. *J. Food Prot.* Vol. 58. (1995). pp. 280-283.

### ملخص

هذا العمل عبارة عن بحث بيليوغرافي يهدف إلى تقييم التأثير الوقائي لمستخلصات من أربعة نباتات طبية: (أوكسيم قراتيسيم، اوليا اوروبيا، لافوندولا ستواش ومنتا بيبيريتا) على مواد غذائية مختلفة. تم إجراء العديد من الاختبارات في المختبر بما في ذلك الاختبارات المضادة للبكتيريا ومضادات الفطريات أثناء تطبيق المستخلصات على المنتجات الطبيعية المختارة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الزيت العطري لأوكسيم قراتيسيم أنه من الممكن الحفاظ على الأسماك المدخنة لمدة 10 أيام في المتوسط، كما أن تطبيق مستخلصات أوراق الزيتون على اللحوم مارس نشاطاً مضاداً للميكروبات بشكل ملحوظ خلال 7 أيام من التخزين، يكشف النشاط المضاد للفطريات للزيت العطري للافوندولا سيواش عن قدرة تثبيط كبيرة على نمو الفطريات مقارنة بالمواد الحافظة الاصطناعية. أظهرت اختبارات حفظ الحليب عن طريق إضافة زيوت عطرية من النعناع منتا بيبيريتا أن الأخير له نشاط قوي مضاد للميكروبات المتلفة للحليب الطازج

**الكلمات المفتاحية:** المزاج الحافظة، المستخلصات الطبيعية، الغذائية، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للفطريات

### Résumé

Ce travail s'agit d'une recherche bibliographique dont l'objectif est d'évaluer l'effet conservateurs des extraits de quatre plantes medicinales: (*Ocimum gratissimum*, *Olea europaea*, *Lavandula stoechas* et *Mentha x piperita*) sur des différentes denrées alimentaires. Des différents tests *in vitro* y compris les tests antibactériens, antigongiques ont effectués au cours de l'application des extraits sur les produits naturels choisis. Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* a permis de conserver les poissons fumés pendant une durée moyenne de 10 jours, ainsi que l'application des extraits de feuilles d'olivier "*Olea europaea*" sur la viande ont exercé une remarquable activité antimicrobienne durant 7 jours de stockage, l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* révèle une importante capacité inhibitrice sur la croissance fongique en comparaison avec les conservateurs de synthèse. Les essais de conservation du lait par adjonction des huiles essentielles de *Mentha x piperita* ont montré que ces dernières possèdent une forte activité antimicrobienne sur la flore d'altération du lait frais.

**Mot clé :** Conservation, Extraits naturels, Activité antibactérienne, Activité antifongique.

### Abstract

This work is a bibliographic research whose objective is to evaluate the preservative effect of extracts from four medicinal plants: (*Ocimum gratissimum*, *Olea europaea*, *Lavandula stoechas* and *Mentha x piperita*) on different foods tuffs. Various *in vitro* tests including antibacterial and antigungal tests were carried out during the application of the extracts on the selected natural products. The results obtained showed that the essential oil of *Ocimum gratissimum* made it possible to preserve the smoked fish for an average period of 10 days, as well as the application of extracts of olive leaves "*Olea europaea*" on the meat exerted a remarkable antimicrobial activity during 7 days of storage, the antifungal activity of the essential oil of *Lavandula stoechas* reveals a significant inhibitory capacity on fungal growth in comparison with synthetic preservatives. Tests of preserving milk by adding essential oils of *Mentha x piperita* have shown that the latter have a strong antimicrobial activity on the spoilage flora of fresh

**Key words:** Conservation, Naturals extracts, Antibacterial activity, Antifungal activ milk.