

Alicyclobacillus acidoterrestris 芽胞に対する植物精油成分の抗菌特性

小林 哲也, 青山 好男

Antimicrobial Effect of Essential oils for *Alicyclobacillus acidoterrestris* Spores

Tetsuya Kobayashi and Yoshio Aoyama

Antimicrobial effect of plant essential oils (EOs) for *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores was investigated. The minimum inhibitory concentration of carvacrol, *trans*-cinnamaldehyde and thymol was 125 ppm at pH 3.2 and 250 ppm at pH 4.0. Eugenol and d-limonene showed inhibitory effect only at pH 3.2 (MIC=250 ppm). Citral and *p*-cymene did not show inhibitory effect at neither pH 3.2 nor 4.0 (MIC>500 ppm). All combination of two components of three EOs (carvacrol, *trans*-cinnamaldehyde and thymol) showed additive effect and the inhibitory concentration decreased to 1/32~1/2 folds of each MIC. Spore germination was inhibited at 2000 ppm *trans*-cinnamaldehyde or 1000 ppm thymol. But inhibitory effect on germination was reduced with decreasing EOs concentration. These results suggested that antimicrobial effect of EOs for *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores depended on the concentration of EOs and its effect was anti-germination and anti-outgrowth or -vegetative growth.

Key words: *Alicyclobacillus acidoterrestris*, 植物精油成分 (Essential oils), 発芽 (Germination), 最小発育阻止濃度 (MIC), 複合効果 (Combined effect)

植物精油成分は食品用香料の原料として用いられ、現在の食品には欠かせないものとなっている。特に、飲料ではフレッシュ感やナチュラル感の演出や加熱臭のマスキングなどに用いられている。また、特定の植物精油成分は微生物に対して抗菌効果を示すことから、天然物由来の抗菌物質（バイオブリザパティブ）のひとつとしても注目されている¹⁾。

我が国では、pH4.0未満の清涼飲料水の殺菌には、65℃、10分の加熱またはこれと同等以上の効力を有する方法で実施することが定められており、果汁飲料に代表される酸性飲料は、主に85～95℃、数十秒程度の加熱殺菌を行うホットパック充填により製造されている。この条件下では耐熱性の高い細菌芽胞が生存している場合でも、製品が酸性環境下であるために発育できず、品質上問題となることは極めて稀である。しかし、*Alicyclobacillus acidoterrestris* に代表される好熱性好酸性芽胞形成菌（Thermophilic Acidophilic Bacteria, TAB）については、ホットパック充填では芽胞を十分に殺菌できず、製品の貯蔵、流通過程で発育し、製品回収の原因となりうる。1984年にはCernyらが混濁リング果汁から変敗原因菌を分離し²⁾、それ以降各国でTAB芽胞による果汁や酸性飲料の汚染が報告されている^{3,4)}。

これまでに、加熱殺菌に依存しない様々なTAB芽胞の制御方法が検討されてきた。特に、近年では消費者のナチュラル志向の高まりから、バイオブリザパティブを用いた微生物制御が注目されている。一方で、微生物制御に関わる

研究では、発育抑制効果の有無については議論されているが、その作用特性についてはあまり明らかにされていない。また、品質への影響を最小限に留めながら十分な微生物制御効果を得るために、複数の制御因子を組み合わせたハードル理論が提唱されており⁵⁾、複数のハードルを併用したときに得られる複合効果も重要になる。

本研究では、*A. acidoterrestris* 芽胞に対する植物精油成分の抗菌特性を調べ、芽胞に対する作用特性および植物精油成分の複合効果に関する知見を得ることを目的とした。

実験方法

1. 供試菌株

供試菌株には変敗飲料から分離した *A. acidoterrestris* TIFT161004⁶⁾ を使用した。芽胞形成は1.5%寒天を加えた modified *Alicyclobacillus acidoterrestris* media⁷⁾ を用いた表面塗末培養法（45℃、5日）にて行い、冷却滅菌水を用いて芽胞を回収した。この芽胞懸濁液を遠心洗浄（1,500 × g, 10分, 5回）し、終濃度約 9 log spore/ml となるように調製して精製芽胞液とした。

2. 供試薬剤の調製

植物精油成分にはオイゲノール（一級）、カルバクロール（化学用）、シトラール（一級）、*p*-シメン（特級）、*trans*-シンナムアルデヒド（特級）、チモール（特級）、d-リモネン（一級）を用い、それぞれエタノール（特

級, いずれも和光純薬) に 10% (v/v または w/v) となるように溶解した. 調製した各薬剤はいずれも濾過滅菌 (SLHV033RS, Millipore) してから以降の試験に供した.

3. 植物精油成分の最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) の測定

植物精油成分の MIC は 96 穴ポリスチレンマイクロプレート (平底, VIOLAMO, アズワン) を用いた微量希釈法により測定した. すなわち, pH 3.2 および 4.0 に調整した二倍濃度 Yeast-Starch-Glucose broth (YSG broth) および 各薬剤を用いて薬剤の二倍希釈液列を作成した後に, 加熱活性化 (80℃, 10 分) した芽胞を終濃度 4 log spore/ml となるように接種した. 45℃, 48 時間培養した後に発育の有無を目視にて観察し, 発育の認められなかった最大希釈段階を植物精油成分の MIC とした.

$$\text{FIC index} = \frac{\text{併用時の薬剤 A の MIC (FIC}_A\text{)}}{\text{単独時の薬剤 A の MIC (MIC}_A\text{)}} + \frac{\text{併用時の薬剤 B の MIC (FIC}_B\text{)}}{\text{単独時の薬剤 B の MIC (MIC}_B\text{)}}$$

5. 芽胞の発芽に対する植物精油成分の影響

5-1) 発芽による濁度低下の測定

植物精油成分を所定濃度添加した YSG broth (pH 4.0) を入れたスクリーキャップ付マイクロセルに, 加熱活性化した芽胞を終濃度 7 log spore/ml となるように接種した. セルは温調付きの分光光度計 (U-2000, 日立) にて 45℃, 120 分保持し, 経時的に 650 nm における濁度変化 (OD₆₅₀) を測定した. なお, 結果は各時間における濁度を初発濁度で割った, 濁度低下率で示した.

5-2) 発芽による耐熱性消失の測定

植物精油成分を所定濃度添加した YSG broth (pH 4.0) に加熱活性化した芽胞を終濃度 7 log spore/ml となるように接種し, 45℃, 120 分間保持して十分に発芽させた. 経時的に菌液を採取し, 発芽した芽胞を加熱殺菌 (80℃, 10 分) した後に 0.1% Trypticase peptone (Difco) を加えた 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いて適宜希釈し, 表面塗末培養法 (YSG agar, pH 3.7, 45℃, 48 時間) にて生残芽胞数を測定した. なお, 耐熱性芽胞の生残率は, 加熱処理前後の芽胞数の割合から求めた.

5-3) 位相差顕微鏡による発芽の観察

trans-シンナムアルデヒドを終濃度 0 ~ 2000 ppm となるように添加した YSG broth (pH 4.0) に加熱活性化した芽胞を接種し, スライドガラスに滴下した. カバーガラスを乗せ, 四辺をマニキュアで固定した後に, 45℃ で保持して位相差顕微鏡 (BX-41, OLYMPUS) を用いて経時的に発芽過程を観察した.

4. 植物精油成分の複合効果の測定

芽胞の発育に対する二種類の植物精油成分併用系の複合効果を, 下式より求めた Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index⁸⁾ から, 相乗効果 (FIC index ≤ 0.5), 相加効果 (0.5 < FIC index ≤ 1.0), 不関 (1.0 < FIC index ≤ 2.0) および拮抗 (2.0 < FIC index) の四種類に分類した. すなわち, pH 4.0 に調整した四倍濃度 YSG broth, 二倍濃度 YSG broth および植物精油成分を用いて 96 穴ポリスチレンマイクロプレートに, 横方向に植物精油成分の二倍希釈液列を作成した後に, 縦方向に別の植物精油成分の二倍希釈液列を作成した. このプレートに加熱活性化した芽胞を終濃度 4 log spore/ml となるように接種した. 45℃, 48 時間培養した後に発育の有無を目視にて観察し, 単独処理時の MIC と併用処理時の植物精油成分の MIC から FIC index を算出して複合効果を分類した.

実験結果および考察

1. 植物精油成分の MIC

A. acidoterrestris TIFT161004 芽胞に対する植物精油成分の MIC を表 1 に示した. 植物精油成分は低 pH 側で MIC が小さくなる傾向が見られ, pH 4.0 におけるカルバクロール, *trans*-シンナムアルデヒドおよびチモールの MIC はいずれも 250 ppm であったのに対して pH 3.2 における MIC はいずれも 125 ppm に低下した. また, d-リモネンおよびオイゲノールは pH 4.0 において添加濃度内では発育抑制効果を示さなかった (MIC > 500 ppm) が, pH 3.2 における MIC はいずれも 250 ppm であった. *p*-シメンおよびシトラールは pH 4.0, 3.2 いずれにおいても添加濃度内では発育抑制効果を示さなかった (MIC > 500 ppm).

天然物由来の抗菌物質である植物精油成分は, 化学合成された保存料などの使用を極力控えようとする現代社会において, その有用性が多数報告されている¹⁾. TAB に対

表 1. YSG 培地における *A. acidoterrestris* TIFT161004 芽胞に対する植物精油成分の最小発育阻止濃度.

植物精油成分	最小発育阻止濃度 (ppm)	
	pH 3.2	pH 4.0
カルバクロール	125	250
シトラール	> 500	> 500
d-リモネン	250	> 500
オイゲノール	250	> 500
<i>p</i> -シメン	> 500	> 500
<i>trans</i> -シンナムアルデヒド	125	250
チモール	125	250

しては、ユーカリ葉抽出物⁹⁾ やオレンジ果皮抽出物およびリモネン¹⁰⁾, *trans*-シンナムアルデヒドやオイゲノール¹¹⁾ などが効果的である。特に、*trans*-シンナムアルデヒドは 100 ~ 500 ppm, オイゲノールは 500 ppm で芽胞の発育を抑制し、その効力は *trans*-シンナムアルデヒド > オイゲノール > リモネンの順であると言われている¹⁰⁾。この傾向は力価がフェノール環ではなく、アルキル基に由来することを示唆している。本研究でもこれら三種類の MIC はいずれの pH においても *trans*-シンナムアルデヒド < オイゲノール, d-リモネンの順となり、過去の報告と類似した傾向が見られた。

一方で、TAB に対するチモールやカルバクロールの効果はこれまでに報告されていない。チモールとカルバクロールはフェノールにアルキル基が結合した位置異性体で、オイゲノールに類似した構造を示す。このことから、TAB に対しても有効であることは容易に推察でき、その作用機作も同様と考えられる。また、*p*-シメンは TAB に対して効力が弱いリモネンと構造が類似していること、シトラールはシス-トランス異性体であるゲラニアルとネラル混合物で、これまでに食中毒細菌に対する抗菌効果は報告されている⁷⁾ が、本研究で用いた植物精油成分とは構造が大きく異なることから芽胞に対しては効果を発揮しなかったと推察された。

2. 植物精油成分の複合効果

A. acidoterrestris TIFT161004 芽胞に対する植物精油成分の複合効果を表 2-1 ~ 3 に示した。カルバクロールはオイゲノール, *trans*-シンナムアルデヒド, チモールとの併用で相加効果を示し、発育阻止に要する濃度が、単独時の MIC の 1/2 ~ 1/8 倍に低下した。シトラールおよび d-リモネンとの併用では、カルバクロールが単独時の MIC の 1/4 倍となる 31.3 ppm 以下では複合効果は得られなかった。*trans*-シンナムアルデヒドはオイゲノール, チモールとの併用で共に相加効果を示し、特にチモール併用系では FIC index が最小の時に発育阻止に要する濃度が、*trans*-シンナムアルデヒドは単独時の 250 ppm から 1/2 倍となる 125 ppm, チモールは 125 ppm から 1/32 倍となる 3.9 ppm に低下した。シトラールおよびリモネンとの併用では *trans*-シンナムアルデヒドが単独時の 1/2 倍となる 125 ppm 存在下では高い複合効果を示したが、1/4 倍となる 62.5 ppm 以下では複合効果は得られなかった。チモールはオイゲノールとの併用で相加効果を示し、FIC index が最小の時に発育阻止に要する濃度がチモールは単独時の 125 ppm から 1/8 倍となる 15.6 ppm, オイゲノールは 500 ppm から 1/2 倍となる 250 ppm に低下した。シトラールおよび d-リモネンとの併用では、チモール 62.5 ppm と併用したときにそれぞれ相加効果を示したが、31.3 ppm

表 2-1. YSG 培地における *A. acidoterrestris* TIFT161004 芽胞に対するカルバクロールと植物精油成分の複合効果。

植物精油成分	カルバクロール (ppm)											
	62.5			31.3			15.6			7.8		
	MIC (ppm)	FIC index	効果	MIC (ppm)	FIC index	効果	MIC (ppm)	FIC index	効果	MIC (ppm)	FIC index	効果
シトラール	250	< 0.75	相加効果	> 500	—	—	> 500	—	—	> 500	—	—
d-リモネン	500	< 1.00	相加効果	> 500	—	—	> 500	—	—	> 500	—	—
オイゲノール	62.5	0.63	相加効果	125	1.06	不関	125	1.03	不関	125	1.02	不関
<i>trans</i> -シンナムアルデヒド	125	1.00	相加効果	125	0.75	相加効果	125	0.63	相加効果	250	1.06	不関
チモール	15.6	0.63	相加効果	62.5	0.75	相加効果	62.5	0.63	相加効果	125	1.06	不関

表 2-2. YSG 培地における *A. acidoterrestris* TIFT161004 芽胞に対する *trans*-シンナムアルデヒドと植物精油成分の複合効果。

植物精油成分	<i>trans</i> -シンナムアルデヒド (ppm)								
	125			62.5			31.3		
	MIC (ppm)	FIC index	効果	MIC (ppm)	FIC index	効果	MIC (ppm)	FIC index	効果
シトラール	31.3	< 0.53	相加効果	> 500	—	—	> 500	—	—
d-リモネン	31.3	< 0.53	相加効果	> 500	—	—	> 500	—	—
オイゲノール	125	0.75	相加効果	250	0.75	相加効果	500	1.13	不関
チモール	3.91	0.53	相加効果	62.5	0.75	相加効果	125	1.13	不関

表 2-3. YSG 培地における *A. acidoterrestris* TIFT161004 芽胞に対するチモールと植物精油成分の複合効果。

植物精油成分	チモール (ppm)											
	62.5			31.3			15.6			7.8		
	MIC (ppm)	FIC index	効果	MIC (ppm)	FIC index	効果	MIC (ppm)	FIC index	効果	MIC (ppm)	FIC index	効果
シトラール	31.3	0.53	相加効果	> 500	—	—	> 500	—	—	> 500	—	—
d-リモネン	250	0.75	相加効果	> 500	—	—	> 500	—	—	> 500	—	—
オイゲノール	125	0.75	相加効果	250	0.75	相加効果	250	0.63	相加効果	500	1.06	不関

以下では複合効果は得られなかった。

これまでに植物精油（抽出物）や植物精油成分を用いたTABの制御はいくつか報告されている^{9~11)}が、その多くが高濃度であり、品質への影響が考慮されていない。Bevilacquaらは*trans*-シンナムアルデヒドとオイゲノールを併用することで単独添加よりも低濃度で*A. acidoterrestris* 芽胞の発育抑制を達成し、リンゴジュース中に*trans*-シンナムアルデヒドを20~40 ppm添加した場合でも官能評価にほとんど影響がないことを報告している¹²⁾。この数値を本研究に照合すると、官能評価に影響しないと考えられる水準である*trans*-シンナムアルデヒド31.3 ppm存在下では、芽胞の発育抑制のためにオイゲノールは500 ppm、チモールは125 ppmが必要である。これら併用系の効果は共に不関で、官能評価でも異常を感じる

水準であると想像される。さらに、果汁中での制御ではパルプなどの食品成分が阻害物質として作用する可能性もあるため、より一層の添加が求められる。このような点から、芽胞の発育抑制に要する添加濃度の低減は達成できたが、植物精油成分二種類のハードルのみでは品質に影響しない水準での制御は困難であると推察された。

3. 芽胞の発芽に対する植物精油成分の影響

trans-シンナムアルデヒドまたはチモール存在下における*A. acidoterrestris* TIFT161004 芽胞懸濁液の濁度低下挙動と芽胞の耐熱性の消失挙動を図1および図2に示した。植物精油成分非添加区では保持10分後までに濁度は約20%減少し、耐熱性芽胞も保持15分後までに約70%減少した。一方、*trans*-シンナムアルデヒド存在下では、濃度

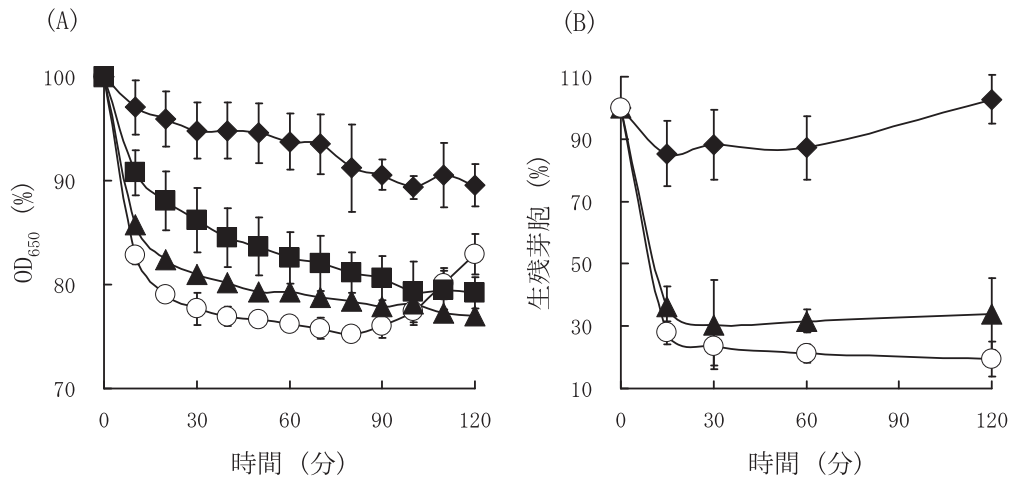


図1. YSG 培地における *A. acidoterrestris* TIFT161004 芽胞の濁度低下(A)と耐熱性の消失(B)に対する *trans*-シンナムアルデヒドの影響。

各シンボルはそれぞれ *trans*-シンナムアルデヒド 0 ppm (○), 250 ppm (▲), 1000 (■), 2000 ppm (◆) を示す。

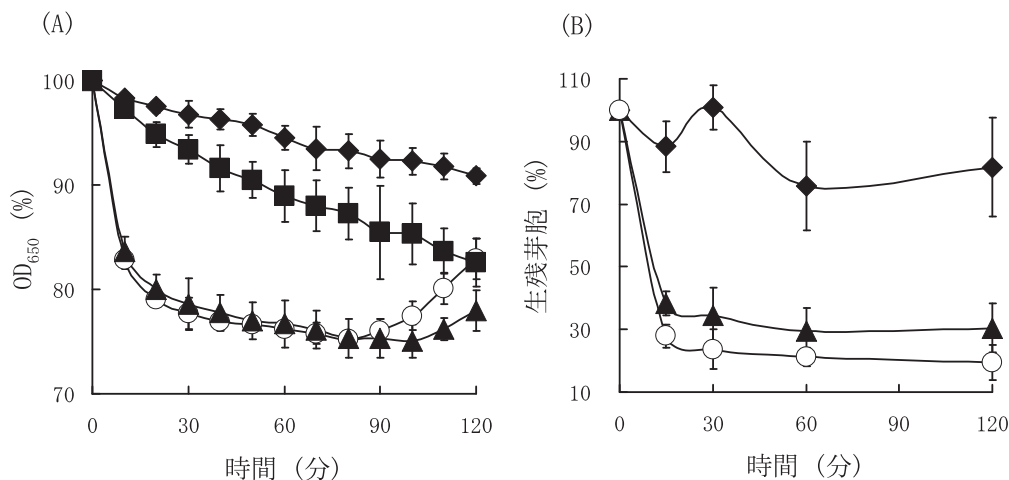


図2. YSG 培地における *A. acidoterrestris* TIFT161004 芽胞の濁度低下(A)と耐熱性の消失(B)に対するチモールの影響。

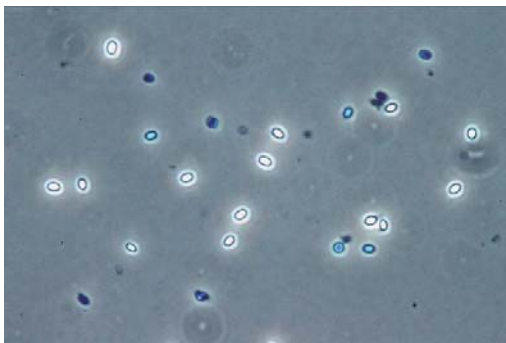
各シンボルはそれぞれチモール 0 ppm (○), 125 ppm (▲), 500 (■) and 1000 ppm (◆) を示す。

依存的に濁度低下および耐熱性芽胞数の低下が抑制され、250 ppm 添加区では保持 10 分後までに濁度は約 15%，保持 15 分後までに耐熱性芽胞は約 65% 減少し、2000 ppm 添加区ではそれぞれ約 5% および約 15% 低下した。特に、2000 ppm 添加区では保持 120 分経過後も濁度および耐熱性芽胞の低下はほとんど観察されなかった。この傾向はチモール共存下でも同様に確認され、125 ppm 添加区では保持 10 分後までに濁度は約 15%，保持 15 分後までに耐熱性芽胞は約 65% 低下し、1000 ppm 添加区では濁度および耐熱性芽胞の低下はそれぞれ約 2% および 12% に留まり、保持 120 分経過後も濁度および耐熱性芽胞の低下は観察されなかった。

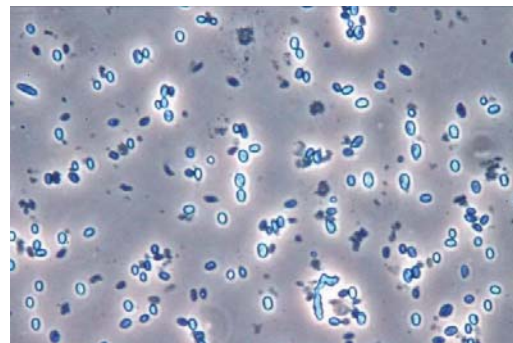
さらに *trans*-シンナムアルデヒド存在下での *A. acidoterrestris* TIFT161004 芽胞の発芽を観察した位相差顕微鏡画像を

図 3 に示した。処理前ではほとんどの芽胞が休眠芽胞 (phase-bright) であった (図 3-A) が、保持 4 時間後には *trans*-シンナムアルデヒド非添加区 (図 3-B)，125 ppm 添加区 (図 3-C) および 500 ppm 添加区 (図 3-D) においては暗色化 (phase-gray, dark) や膨化が生じている芽胞が多数観察され、発芽していることが推察された。一方、2000 ppm 添加区 (図 3-E) では多くの芽胞が光屈折性を示しており、膨化も認められなかったため、休眠芽胞のままであることが観察された。これらのことから、*trans*-シンナムアルデヒドやチモールは濃度依存的に *A. acidoterrestris* TIFT161004 芽胞の発芽を阻害し、高濃度では主に発芽阻害によって芽胞の発育を抑制することが示唆された。

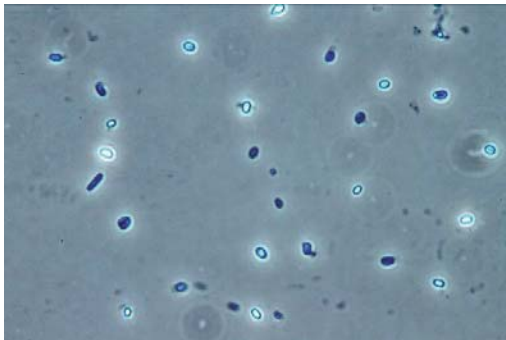
(A) 0 時間



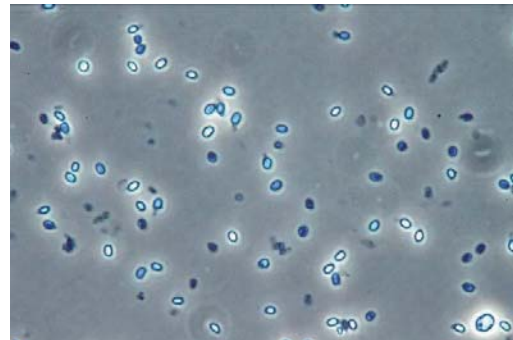
(B) 0 ppm-4 時間



(C) 125 ppm-4 時間



(D) 500 ppm-4 時間



(E) 2000 ppm-4 時間

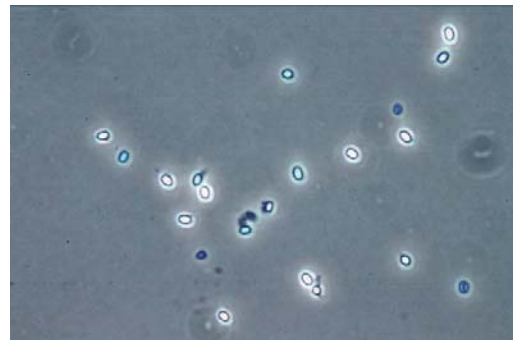


図 3. YSG 培地における *A. acidoterrestris* TIFT161004 芽胞の発芽に対する *trans*-シンナムアルデヒドの影響。

発芽の観察は位相差顕微鏡を用い、1000 倍で行った。

Chaibi らは *Bacillus cereus* と *Clostridium botulinum* の芽胞を用い、植物精油が低濃度の場合には栄養増殖の阻害により、高濃度の場合には発芽の阻害により芽胞の発育を抑制することを示した。さらに、この発芽阻害は、発芽誘起剤が受容体へ結合するコミットメントの阻害に由来すると報告した¹³⁾。Cui らはスペイン甘草抽出物で処理した *C. botulinum* 芽胞を Tween 80 で洗浄すると、洗浄処理の有無により生菌数が大きく異なることから、芽胞表面にスペイン甘草抽出物中の精油成分が吸着していると推察した¹⁴⁾。これらのことから、本研究における発芽阻害効果も *trans*-シンナムアルデヒドやチモールが芽胞表面に吸着し、表面を覆うことで発芽誘起剤の結合を阻害したことが作用の一つと推察された。また、濁度や耐熱性芽胞の低下が植物精油成分の濃度依存的に阻害される傾向も過去の報告と類似していたことから、植物精油成分の発芽阻害効果は濃度依存的で、様々な芽胞に対して発揮されると推察された。

結論

A. acidoterrestris 芽胞に対する植物精油成分の抗菌特性を調べた。カルバクロールや *trans*-シンナムアルデヒド、チモールはリモネンやオイゲノールなどと比較すると低濃度で芽胞の発育を抑制した。異なる二種類の植物精油成分を併用した複合効果では多くの組合せが相加効果を示した。特に、芽胞に対して発育抑制効果の高かったカルバクロール、*trans*-シンナムアルデヒド、チモールの三種類はいずれを組み合わせた場合でも、比較的高い複合効果を示し、併用により発育抑制効果を維持したままで添加量の低減が可能となることが示唆された。ただし、過去の報告と照合すると品質に対して悪影響を与えない水準での制御までは添加量を低減できていないことが推察された。*trans*-シンナムアルデヒドおよびチモールは濃度依存的に発芽阻害効果を示し、高濃度では発芽阻害によって芽胞の発育が抑制されることが示唆された。また、発芽阻害が認められない低濃度でも芽胞の発育が抑制されたことから、MIC 付近では発芽後生育や栄養増殖を阻害することで芽胞の発育を抑制することが推察された。すなわち、発芽阻害により芽胞の発育を抑制するよりも、発芽後生育や栄養増殖の阻害により芽胞の発育を抑制する方が、低濃度の植物精油成分で芽胞の制御が可能となることが示唆された。

文献

- 1) Burt S.: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International J. Food Microbiol.*, **94**, 223-253, (2004).
- 2) Cerny G., Hennlich W. und Poralla K.: Fruchtsaftverderb durch Bacillen: Isolierung und Charakterisierung des Verderbserregers. *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, **179**, 224-227, (1984).

- 3) McIntyre S., Ikawa J. Y., Parkinson N., Haglund J. and Lee J.: Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf-stable juices. *J. Food Prot.*, **58**, 391-321, (1995).
- 4) 丹羽源廣, 廣田裕子, 白須由治: 輸入原料果汁より検出された新規耐熱性好酸性菌. 果汁協会報, **9**, 31-42, (1991).
- 5) Leistner L. and Gorris L. G. M.: Food preservation by hurdle technology. *Trend in Food Sci. Technol.*, **6**, 41-46, (1995).
- 6) 松井智江, 遠田昌人, 中尾 浩, 吉本 周: 好酸性菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* の耐熱性について. 東洋食品工業短大・東洋食品研究所研究報告書, **22**, 123-127, (1998).
- 7) Yamazaki K., Murakami M., Kawai Y., Inoue N. and Matsuda T.: Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. *Food Microbiol.*, **17**, 315-320, (2000).
- 8) Hewlett P. S.: Measurement of potencies of drug mixtures. *Biometrics*, **25**, 477-487, (1969).
- 9) Takahashi T., Kokubo R. and Sakaino M.: Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **39**, 60-64, (2004).
- 10) 新井誠尚, 谷山智親: 果実由来成分による耐熱性好酸性菌の制御. 果汁協会報, 594, 1-8, (2008).
- 11) Bevilacqua A., Corbo M. R. and Sinigaglia M.: Inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by natural compounds. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **43**, 1271-1275, (2008).
- 12) Bevilacqua A., Corbo M. R. and Sinigaglia M.: Combining eugenol and cinnamaldehyde to control the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Control*, **21**, 172-177, (2010).
- 13) Chaibi A., Ababouch L. H., Belasri K., Boucetta S. and Busta F. F.: Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiol.*, **14**, 161-174, (1997).
- 14) Cui H. Gabriel A. A. and Nakano H.: Heat-sensitizing effects of plant extracts on *Clostridium* spp. spores. *Food Control*, **22**, 99-104, (2011).