



Kačániová Miroslava • Čmiková Natália

## Mikrobiota sous vide hovädzieho mäsa po aplikácii rastlinných silíc a patogénnych baktérií



SPU·FZKI  
Fakulta záhradníctva  
a krajinného  
inžinierstva

Nitra 2023



**Miroslava Kačániová, Natália Čmiková**

**Mikrobiota sous vide hovädzieho mäsa po aplikácii  
rastlinných silíc a patogénnych baktérií**

Vedecká monografia

**2023**

DOI: <https://doi.org/10.15414/2023.9788055226583>



**Názov:** Mikrobiologická kvalita sous vide hovädzieho mäsa po aplikácii rastlinných silíc a patogénnych baktérií

**Autori:** **prof. Ing. Miroslava Kačániová, PhD.** (3,52 AH)

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,  
Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva,  
Ústav záhradníctva

**Ing. Natália Čmiková** (3,52 AH)

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,  
Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva,  
Ústav záhradníctva

**Recenzenti:** **prof. RNDr. Leona Buňková, PhD.**

Univerzita Tomáša Baťu v Zlíne  
Technologická fakulta  
Ústav inžinierstva ochrany životného prostredia

**prof. Ing. Peter Haščík, PhD.**

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre  
Fakulta biotechnológie a potravinárstva  
Ústav potravinárstva

Vedecká monografia bola vydaná s finančnou podporou projektu APVV-20-0058.

Schválila rektorka Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre dňa 24. 10. 2023 ako vedeckú monografiu.

This work is published under the license of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 International Public License (CC BY-NC 4.0).  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



**ISBN 978-80-552-2658-3**

DOI: <https://doi.org/10.15414/2023.9788055226583>



## Obsah

<b>Zoznam tabuliek .....</b>	<b>5</b>
<b>Zoznam obrázkov .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Sous vide mäso .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Aplikácia sous vide varenia v potravinárskom priemysle .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3 Charakteristika mäsa .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Zmeny spojené s mikrobiálnymi charakteristikami.....</b>	<b>12</b>
1.4.1 Mikrobiota mäsa a mäsových výrobkov.....	12
1.4.2 Mikrobiálne biokonzervačné látky na kontrolu kazenia hovädzieho mäsa	14
1.4.3 Rastlinné silice (RS) ako potenciálne antimikrobiálne látky v mäse a	
mäsových výrobkoch.....	17
1.4.4 Antimikrobiálna aktivita potenciálnych RS v mäse a mäsových	
výrobkoch .....	17
1.4.5 Obmedzenia a perspektívy rastlinných silíc do budúcnosti .....	18
<b>1.5 Rozmarínová silica .....</b>	<b>20</b>
1.5.1 Biologické aktivity zlúčenín <i>R. officinalis</i> .....	21
1.5.2 Protinádorová aktivita.....	21
1.5.3 Antioxidačná aktivita.....	22
1.5.4 Proti-infekčná aktivita .....	23
1.5.5 Protizápalové a analgetické aktivity.....	24
<b>1.6 Tymianová silica .....</b>	<b>26</b>
1.6.1 Aktivita proti mikrobiálnym biofilmom .....	28
1.6.2 Antifungálna aktivita .....	31
1.6.3 Ďalšie antifungálne vlastnosti.....	33
<b>2 Cieľ práce .....</b>	<b>34</b>
<b>3 Metodika práce.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Rastlinné silice, použité mikroorganizmy, hovädzie mäso .....</b>	<b>35</b>
3.1.1 Príprava vzorky .....	35
<b>3.2 Príprava sous vide vzoriek .....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 Príprava vzoriek na desiatkové riedenie .....</b>	<b>37</b>
3.3.1 Príprava fyziologického roztoku s peptónom.....	37
3.3.2 Príprava vzoriek hovädzieho mäsa na mikrobiologickú analýzu .....	38
<b>3.4 Príprava kultivačných médií .....</b>	<b>38</b>
3.4.1 XLD agar .....	38
3.4.2 Oxford agar .....	39
3.4.3 VRBL agar.....	40
3.4.4 PCA agar.....	41
3.4.5 TSA agar .....	42
<b>3.5 Izolácia a identifikácia mikroorganizmov .....</b>	<b>42</b>



3.6	Štatistické vyhodnotenie výsledkov .....	44
4	Výsledky a diskusia .....	45
4.1	Mikrobiologická analýza sous vide hovädzieho mäsa po aplikácii rozmarínovej rastlinnej silice a baktérie <i>Salmonella enterica</i> .....	45
4.2	Mikrobiologická analýza sous vide hovädzieho mäsa po aplikácii tymianovej rastlinnej silice a baktérie <i>Listeria monocytogenes</i> .....	61
	Záver .....	75
	Abstrakt .....	76
	Abstract .....	77
	Zoznam použitej literatúry .....	78



## Zoznam tabuliek

<b>Tabuľka 1.</b> Schéma označovania vzoriek hovädzej sviečkovej a podmienky tepelného spracovania metódou sous vide .....	<b>36</b>
<b>Tabuľka 2.</b> Schéma označovania vzoriek hovädzej sviečkovej a podmienky tepelného spracovania metódou sous vide .....	<b>37</b>
<b>Tabuľka 3.</b> Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a <i>S. enterica</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 1. dňa .....	<b>46</b>
<b>Tabuľka 4.</b> Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a <i>S. enterica</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 3. dňa .....	<b>48</b>
<b>Tabuľka 5.</b> Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a <i>S. enterica</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 6. dňa .....	<b>50</b>
<b>Tabuľka 6.</b> Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a <i>S. enterica</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 9. dňa .....	<b>52</b>
<b>Tabuľka 7.</b> Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a <i>S. enterica</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 12. dňa .....	<b>55</b>
<b>Tabuľka 8.</b> Počet izolátov zo sous vide hovädzieho mäsa v kontrolnej skupine .....	<b>57</b>
<b>Tabuľka 9.</b> Počet izolátov zo sous vide hovädzieho mäsa v skupine ošetrenej rozmarínovou silicou a <i>S. enterica</i> .....	<b>59</b>
<b>Tabuľka 10.</b> Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej tymianovou RS a <i>L. monocytogenes</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 1. dňa .....	<b>62</b>
<b>Tabuľka 11 .</b> Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej tymianovou RS a <i>L. monocytogenes</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 3. dňa .....	<b>63</b>
<b>Tabuľka 12.</b> Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej tymianovou RS a <i>L. monocytogenes</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 6. dňa .....	<b>65</b>
<b>Tabuľka 13.</b> Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej tymianovou RS a <i>L. monocytogenes</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 9. dňa .....	<b>66</b>
<b>Tabuľka 14.</b> Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej tymianovou RS a <i>L. monocytogenes</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 12. dňa .....	<b>68</b>
<b>Tabuľka 15.</b> Počet izolátov zo sous vide hovädzieho mäsa v kontrolnej skupine ....	<b>71</b>
<b>Tabuľka 16.</b> Počet izolátov zo sous vide hovädzieho mäsa v skupine ošetrenej tymianovou silicou a <i>L. monocytogenes</i> .....	<b>73</b>



## Zoznam obrázkov

<b>Obrázok 1.</b> Počet koliformných baktérií v skupine ošetrenej rozmarínovou RS a <i>S. enterica</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 1. dňa.....	47
<b>Obrázok 2.</b> Počet buniek <i>S. enterica</i> v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 1. dňa v log KTJ.g <sup>-1</sup> .....	47
<b>Obrázok 3.</b> Počet koliformných baktérií v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a <i>S. enterica</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 3. dňa .....	49
<b>Obrázok 4.</b> Počet buniek <i>S. enterica</i> v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 3. dňa v log KTJ.g <sup>-1</sup> .....	49
<b>Obrázok 5.</b> Počet koliformných baktérií v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a <i>S. enterica</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 6. dňa .....	51
<b>Obrázok 6.</b> Počet buniek <i>S. enterica</i> v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 6. dňa v log KTJ.g <sup>-1</sup> .....	51
<b>Obrázok 7.</b> Počet koliformných baktérií v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a <i>S. enterica</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 9. dňa .....	53
<b>Obrázok 8.</b> Počet buniek <i>S. enterica</i> v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 9. dňa v log KTJ.g <sup>-1</sup> .....	54
<b>Obrázok 9.</b> Počet koliformných baktérií v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a <i>S. enterica</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 12. dňa .....	56
<b>Obrázok 10.</b> Počet buniek <i>S. enterica</i> v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 12. dňa v log KTJ.g <sup>-1</sup> .....	56
<b>Obrázok 11.</b> Percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov mikroorganizmov v kontrolnej skupine z použitím rozmarínovej rastlinnej silice .....	58
<b>Obrázok 12.</b> Percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov mikroorganizmov v pokusnej skupine z použitím rozmarínovej rastlinnej silice .....	60
<b>Obrázok 13.</b> Počet buniek <i>L. monocytogenes</i> v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 1. dňa v log KTJ.g <sup>-1</sup> .....	62
<b>Obrázok 14.</b> Počet buniek <i>L. monocytogenes</i> v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 3 dňa v log KTJ.g <sup>-1</sup> .....	64
<b>Obrázok 15.</b> Počet buniek <i>L. monocytogenes</i> v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 6 dňa v log KTJ.g <sup>-1</sup> .....	65
<b>Obrázok 16.</b> Počet koliformných baktérií v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a <i>L. monocytogenes</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 9. dňa .....	67
<b>Obrázok 17.</b> Počet buniek <i>L. monocytogenes</i> v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 9. dňa v log KTJ.g <sup>-1</sup> .....	67
<b>Obrázok 18.</b> Počet koliformných baktérií v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a <i>L. monocytogenes</i> (log KTJ.g <sup>-1</sup> ) počas 12. dňa.....	69
<b>Obrázok 19.</b> Počet buniek <i>L. monocytogenes</i> v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 12. dňa v log KTJ.g <sup>-1</sup> .....	70
<b>Obrázok 20.</b> Percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov mikroorganizmov v kontrolnej skupine z použitím tymianovej rastlinnej silice .....	72
<b>Obrázok 21.</b> Percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov mikroorganizmov v pokusnej skupine z použitím tymianovej rastlinnej silice .....	74



## Úvod

Produkcia hovädzieho mäsa v Európe prispieva k potravinovej bezpečnosti, trvalo udržateľnému využívaniu pôdy, sociálno-ekonomickému blahobytu vidieckych komunít a gastronomickým pôžitkom mestských a vidieckych spotrebiteľov na celom kontinente. Hovädzie mäso je tiež vysoko hodnotným produktom, ktorý predstavuje drahú položku v nákupných košíkoch domácností. Spotreba hovädzieho mäsa v EÚ je 10,9 kg.osoba.rok<sup>-1</sup>, v priemere za 28 krajín v roku 2016 (OECD 2017), so značnými rozdielmi medzi členskými krajinami. To je nižšie ako v krajinách Južnej Ameriky (napr. Argentína, 46,8 kg), Severnej Amerike (napr. Spojené štáty americké, 25 kg), Austrálii (21,9 kg), podstatne vyššie v porovnaní s Čínou (4 kg). Spotreba vo vyspelých krajinách však za posledných 20 rokov klesla, v EÚ o 12 %, v Spojených štátoch o 19 % a v Austrálii o 20 %. Spolu s nepriaznivou publicitou o otázkach životného prostredia, zdravia, autenticity a bezpečnosti mohla k tomuto poklesu prispieť nekonzistentná kvalita.

Sous vide je francúzsky výraz pre „vo vákuu“ a varenie sous vide je definované ako „suroviny, ktoré sa varia za kontrolovaných podmienok, teploty a času, v tepelne stabilných vákuových vreckách“. Potravinári aktívne študujú sous vide spracovanie od 90-tych rokov 20. storočia a zaujímajú sa hlavne o používanie sous vide varenia na predĺženie trvanlivosti spracovaných potravín. Zdá sa, že tieto snahy boli úspešné, keďže neexistujú žiadne správy o sous vide potravinách, ktoré by mohli spôsobiť ochorenie. Šéfkuchári v niektorých špičkových svetových reštauráciách používajú varenie sous vide od 70. rokov 20. storočia, ale až v polovici roku 2000 sa varenie sous vide stalo všeobecne známe; koncom 20. storočia a začiatkom 2010 zaznamenali obrovský nárast používania sous vide varenia v reštauráciách a domácnostiach. Sous vide varenie sa líši od tradičných spôsobov varenia dvoma zásadnými spôsobmi: surové potraviny sú vákuovo uzavreté v tepelne stabilných, potravinárskych plastových vreckách a jedlo je varené pomocou presne kontrolovaného ohrevu.

Pochopenie otravy, alebo kazenia potravín si vyžaduje znalosti o komplexnej interakcii medzi mikroorganizmami a ich potravinovým ekosystémom. Meranie správania všetkých baktérií vo všetkých rastových podmienkach nie je možné, ale ak sú pozorované dostatočné reakcie v rôznych prostrediach, potom je možné





interpolovať a tak predpovedať, ako budú organizmy reagovať na akékoľvek podmienky v rámci environmentálnej oblasti, kde boli pozorovania uskutočnené. Mikrobiologické riziká spojené s varením sous vide sú rast spór tvoriacich baktérií *Clostridium botulinum* patogénu a produkcia toxínov. Potravinové patogény netvoriace spóry v produktoch sous vide zahŕňajú *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria* a *Yersinia*. Tieto patogény musia byť zničené počas tepelného spracovania. Môžu však ovplyvniť zdravie spotrebiteľov, ak suroviny majú nízku mikrobiologickú kvalitu, keď sú sekundárne kontaminované počas výroby v dôsledku nesprávnych výrobných postupov. Primárna pozornosť pri vývoji technológie výroby sous vide by sa preto mala zamerať na zabezpečenie mikrobiologickej bezpečnosti produktu.

Rastlinné silice (RS) rôznych rastlinných druhov sa stali populárnymi ako bezpečná alternatíva namiesto chemických konzervačných látok na kontrolu patogénov. Vzhľadom na to, že RS sú vnímané ako alternatívna ekologická potravinová konzervačná látka, záujem o aplikáciu RS v potravinárskom priemysle a balení v posledných rokoch vzrástol. Hlavné zdroje relevantné pre priemyselné využitie sú z čeľade rastlín Alliaceae, Apiaceae, Asteraceae (Compositae), Lamiaceae (Labiatae), Myrtaceae, Poaceae, Cupressaceae, Lauraceae, Pinaceae, Zingiberaceae a Rutaceae a extrakcia sa môže uskutočniť z rôznych častí rastlín: kvety, listy, ovocie, semená, tráv, korene, podzemky, drevo, kôra, guma, kvety stromov, cibulky a sušené puky kvetov. RS zohrávajú významnú úlohu v potravinárskom sektore so širokou škálou aplikácií, najmä na predĺženie skladovateľnosti a zabránenie oxidácii. Na tento účel sa zhodnocujú pridávaním do potravinárskych výrobkov buď priamym primiešaním, alebo v jedlých a aktívnych obaloch.

Rastlinné silice sa vyznačujú svojou antimikrobiálnou aktivitou a z tohto dôvodu sme sa vo vedeckej monografii snažili zistiť a vyhodnotiť dobu skladovania hovädzieho mäsa upraveného sous vide varením pri rôznej teplote a čase, inokulovaného baktériou *Salmonella enterica* a *Listeria monocytogenes* v kombinácii s použitím rastlinných silíc.



# 1 Súčasný stav riešenej problematiky doma i v zahraničí

## 1.1 Sous vide mäso

Vákuové balenie má niekoľko výhod: umožňuje efektívny prenos tepla z vody (alebo pary) do jedla; zvyšuje trvanlivosť potravín tým, že eliminuje riziko rekontaminácie počas skladovania; inhibuje oxidáciu pachov a zabraňuje stratám prchavých látok a vlhkosti odparovaním počas varenia (Church a Parsons, 2000); a znižuje rast aeróbných baktérií – výsledkom sú obzvlášť chutné a výživné potraviny (Creed, 1998; García-Linares et al., 2004; Ghazala et al., 1996; Lassen et al., 2002; Schellekens, 1996; Stea et al., 2007). Presná kontrola teploty má pre kuchárov viac výhod ako vákuované balenie: umožňuje takmer dokonalú reprodukovateľnosť; umožňuje väčšiu kontrolu nad prepečením ako tradičné spôsoby varenia; potraviny môžu byť pasterizované a bezpečné pri nižších teplotách, takže nemusia byť dobre uvarené, aby boli bezpečné; a tvrdé kusy mäsa (ktoré sa tradične dusili, aby boli jemné) môžu byť jemné a stále môžu byť stredne, alebo stredne prepečené (Baldwin, 2012).

Kvalita produktu získaného technikou sous vide je výrazne ovplyvnená teplotou, časom a tlakom aplikovaným počas varenia. Táto metóda zabraňuje strate vlhkosti, živín a prchavých látok a tiež inhibuje oxidačné zmeny spôsobené varením vo vákuu. Okrem toho táto technika znižuje rast aeróbných baktérií a je celkom účinná pri prevencii opätovnej kontaminácie mrazených potravín, čím sa predlžuje trvanlivosť produktov počas skladovania (Kehlet et al., 2017; Stringer a Metris, 2018). V roku 1991 Poradný výbor pre sous vide (SVAC) oznámil, že trvanlivosť produktov varených metódou sous vide závisí od spôsobu varenia a podmienok skladovania (González-Fandos et al., 2005). Rôzne štúdie tvrdia, že prítomnosť patogénnych mikroorganizmov v jedlách varených metódou sous vide počas konzumácie je spojená hlavne s mikroorganizmami, ktoré existovali v surovine a prežili proces varenia. Varenie by sa preto malo vykonávať pri určitej teplote počas dostatočne dlhého časového obdobia tak, aby teplota v jadre bola vyššia ako 54,4 °C počas približne 6 hodín, aby sa úplne inaktivovala *Salmonella*, *Listeria* spp. atď. (Zavadlav et al., 2020).



## 1.2 Aplikácia sous vide varenia v potravinárskom priemysle

Podľa International Fresh-Cut Produce Association je varenie sous vide (SV) technikou minimálneho spracovania, ktorá sa používa na varenie rôznych druhov potravinového materiálu, vrátane hovädzieho, bravčového, kuracieho mäsa, rýb, niektorých druhov ovocia a zeleniny, ako sú zemiaky, paradajky, fazuľa, a pod. Na rozdiel od iných tradičných spôsobov varenia si SV zachováva vyššie nutričné a senzorické vlastnosti, ako aj zabraňuje priamemu kontaktu potravín s kyslíkom (Iborra-Bernad et al., 2015). Sous vide varenie sa všeobecne používa pri premenlivom teplotnom rozsahu v závislosti od typu potraviny, napr. v prípade zeleniny okolo 95 °C, zatiaľ čo v mäsových výrobkoch pod 70 °C (Zavadlav et al., 2020). Pomerne vyššia teplota na varenie zeleniny je spôsobená tepelnou difúziou, ku ktorej dochádza pri približne 100 °C na inaktiváciu potravinových patogénov. Okrem toho je čas potrebný na varenie a chladenie produktov nevyhnutný na zachovanie kvality.

## 1.3 Charakteristika mäsa

Mäso je svalovina z akéhokoľvek zvieratá, alebo vtáka, ktoré sa používa ako potrava. Kvalita mäsa závisí od bunkovej štruktúry vyvinutej zo svalového vlákna a spojivového tkaniva. Surové mäso má neporušenú štruktúru, ktorá pozostáva z medzibunkových medzier naplnených vzduchom, ktoré umožňujú vzájomné odpájanie buniek (Hong et al., 2015). V modernom svete si spotrebiteľ váži financie, a preto spája kvalitu mäsa s farbou, jemnosťou, šťavnatosťou a chuťou. Okrem toho sú neoddeliteľnou súčasťou aj nutričné charakteristiky a bezpečnosť produktu. Spotrebiteľia všeobecne vnímajú, že mäso červenej farby je v porovnaní s mäsom hnedej farby vysoko čerstvé. Avšak hlavné problémy spojené s čerstvým mäsom sú mikrobiálne kazenie, oxidácia tukov a posmrtné stuhnutie svalov. Mikrobiálny rast spôsobuje alimentárne ochorenia, zatiaľ čo oxidácia tukov vedie k rozvoju pachuti, zápachu a farby v dôsledku produkcie malónaldehydu, prchavých látok odvodených od lipidov atď. a tiež ovplyvňuje kvalitu výživy (Zavadlav et al., 2020). Preto je skladovanie čerstvého mäsa na dlhšie obdobie náročné, pokiaľ nie je správne spracované, zabalené a distribuované. Živiny prítomné v mäse ovplyvňujú jeho aromatické vlastnosti, zatiaľ čo varenie vnútro svalového tuku a obsah vody zvyšuje chutnosť mäsa tým, že špecificky prispieva k chuti, šťavnatosti a jemnosti (Hopkins a Mortimer, 2014).



Mastné kyseliny s rozvetveným reťazcom poskytujú dobrú chuť, zatiaľ čo koncentrácia vody a tuku po varení dodáva šťavnatosť. Vo varenom mäse je mäkkosť hlavným kritériom na posúdenie kvality, ktorá je spojená s deformáciou svalového tkaniva vrátane kolagénových a myofibrilárnych proteínov. Pri aplikácii tepelného spracovania dochádza k prasknutiu buniek, čo vedie k prenosu vody z cytosolu do medzibunkových medzier, čo spôsobuje zmeny v distribúcii vody, denaturáciu bielkovín, topenie tuku, vlákniny a spojivového tkaniva, zmršťovanie, alebo solubilizáciu kolagénu, stratu odkvapkávania a pod. Tieto zmeny ovplyvňujú myofibrilárne proteíny a podporujú stuhnutie (Ismail et al., 2019). Okrem toho dochádza k oxidácii myoglobínu a premene hémového železa na nehémové železo, k skracovaniu proteínov a tvorbe konečných produktov pokročilej glykácie (AGE), ktoré tiež ovplyvňujú nutričnú hodnotu mäsa (Sun et al., 2015). V mäsovom priemysle bolo varenie sous vide prvýkrát zavedené v 70-tych rokoch 20. storočia, kedy sa mäso varilo ponorením do vody, alebo pary, čím sa zabezpečil rovnomerný prenos tepla priamo spolu s minimálnou stratou chuti (Baldwin, 2012). Na rozdiel od tradičných metód SV varenie pri nízkych teplotách vo vákuu vytvára pretlak v dôsledku nasýtenej pary, a preto mäsový výrobok neprichádza do priameho kontaktu s vykurovacím médiom. Tento jav pomáha pri zachovaní bunkovej štruktúry, minimalizácii interakcie proteín-proteín a gélovatenia, ako aj pri zvyšovaní kapacity zadržiavania vody (Jeong et al., 2018).

Pomerne intenzívna solubilizácia kolagénu prebieha pri varení SV a vytvára želatínu v porovnaní s myofibrilárnym spevňovaním (Sánchez Del Pulgar et al., 2012). Podľa správ Souza et al. (2011) a Roldán et al. (2013), varené mäso SV odhaľuje jasne viditeľnú medzeru svalových vlákien na rozdiel od iných spôsobov varenia, ako je varenie, dusenie, vyprážanie a pod. Li et al. (2010) varili hovädzí sval pri 60 – 80 °C a zistili intenzívnu granuláciu pri 70 °C v dôsledku narušenia sarkolemy. Proteínová štruktúra sa vo vákuu denaturuje a spôsobuje zmäknutie mäsa (Souza et al., 2011). Vo vzorkách varených pri 61 °C a viac sa zadržiava obsah vody medzi medzerami svalových vlákien (Roldán et al., 2013). Teplota varenia, ako aj použitý stupeň vákua výrazne ovplyvňujú silu varenia SV (Jeong et al., 2018). Varenie SV pri nízkej teplote po dlhú dobu spôsobuje minimálnu stratu vody, vedie k nižšej oxidácii lipidov a bielkovín a modifikácii prchavých aromatických zlúčenín. Zachováva tiež biologickú dostupnosť aminokyselín a požadované farebné charakteristiky. Minimálna úroveň tepelne indukovanej oxidácie tukov a bielkovín vo varených produktoch SV podporujú



zistenia Roldán et al. (2013); Sánchez Del Pulgar et al. (2012). Varenie sous vide podporuje aktiváciu endogénnych enzýmov (katepsín a calpín), ktoré sú zodpovedné za jemnosť mäsa zvýšením rozpustnosti kolagénu (Kaur et al., 2020). Keď sa teplota pohybuje medzi 50 a 70 °C, ukázalo sa, že stabilita je vyššia pre katepsín, zatiaľ čo nad 70 °C sa enzýmy úplne inaktivujú. Technika sous vide tiež spĺňa cieľ varenia mäsa na zníženie mikrobiálneho rastu, pretože táto úprava v kombinácii s časom a teplotou zabíja vegetatívne baktérie na bezpečnú úroveň. Kuracie klobásky spracované sous vide možno bezpečne skladovať 120 dní pri chladnejšej teplote (Naveena et al., 2017). Sous vide sa zvyčajne používa v komerčných kuchyniach a špičkových značkových reštauráciách na prípravu jedla na varenie a servírovanie, alebo varenie a chladenie, kde sa jedlo rýchlo chladí na 0 – 3 °C (Baldwin, 2012).

## 1.4 Zmeny spojené s mikrobiálnymi charakteristikami

Sous vide varenie zahŕňa vákuové tesnenie, pasterizáciu a rýchle chladenie, alebo mrazenie. Hlavným problémom týkajúcim sa tejto techniky je prežitie patogénnych baktérií tvoriacich spóry. Mikroorganizmy ako *Clostridium botulinum*, *E. coli*, psychrotrofné, spórotvorné baktérie môžu zostať nažive pri teplote pasterizácie, zatiaľ čo iné ako *L. monocytogenes* a *Yersinia* môžu dobre rásť pri skladovacej teplote v chladničke. Priaznivá teplota pre množenie mikroorganizmov spôsobujúcich kazenie sa pohybuje od -1,3 do 52,3 °C, napr. *C. botulinum* rastie a produkuje toxíny pri 3 °C (Baldwin, 2012). Preto musí varenie metódou sous vide zabezpečiť teplotu nad 54,4 °C počas 6 hodín v strede produktu, aby sa úplne inaktivovali *E. coli*, *L. monocytogenes* a *Salmonella* spp. Okrem toho bezpečnosť varených produktov SV závisí od rýchleho chladenia a kontroly teploty počas skladovania. FDA (2019) odporúča zníženie na 6,5 – 7 log<sup>10</sup> pre salmonely, 6 log<sup>10</sup> pre *L. monocytogenes* a 5 log<sup>10</sup> pre *E. coli*.

### 1.4.1 Mikrobiota mäsa a mäsových výrobkov

Prevládajúce baktérie, ktoré spôsobujú kazenie mäsa a mäsových výrobkov sú *B. cereus*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp., Enterobacteriaceae, *E. coli*, *Leuconostoc* spp. a *Pseudomonas* spp. Hodnotenie mikrobiálnej bezpečnosti je dôležitým meradlom na určenie účinnosti varenia sous vide. Mikroorganizmy prítomné vo varených mäsových výrobkoch SV sú vysoko závislé od patogénov prítomných v surovine a tých, ktoré prežijú po varení.



Varenie SV jahňacích stehien na menej intenzívne tepelné podmienky (60 °C počas 6 hodín) znižuje mikrobiálnu populáciu (Enterobacteriaceae, LAB, koliformné a psychrotrofné počty) na menej ako 1 log KTJ.g<sup>-1</sup> (Roldán et al., 2013). Hong et al. (2015) skúmali kvalitu kuracích prs po varení SV (teplota jadra 61 °C počas 35 minút) a zaznamenali nižší počet koliformných baktérií v porovnaní so surovým mäsom. Ďalej bol zaznamenaný znížený celkový počet životaschopných a koliformných baktérií so zvýšením doby skladovania, ale s nižšou rýchlosťou varenia mäsa SV, čo môže byť spôsobené inhibičným účinkom vákuových podmienok na anaeróbný mikrobiálny rast. Kuracie klobásky varené za aeróbnych podmienok pri 100 °C počas 30 minút vykazovali vyšší celkový počet mikroorganizmov (>3 log KTJ.g<sup>-1</sup>) a psychrotrofný počet (3 log KTJ.g<sup>-1</sup>) ako pri varení SV pri 100 °C počas 30 minút, ktoré malo hodnotu menšiu ako 1 log KTJ.g<sup>-1</sup> (Naveena et al., 2017). Okrem toho sa údeniny pokazia po 20 dňoch v aeróbnej vzorke, zatiaľ čo pri varení SV bola pozorovaná mikrobiálna bezpečnosť až 120 dní. Celkový počet životaschopných a koliformných baktérií v bravčovej šunke varenej pri 51 °C počas 45 minút bol zaznamenaný 3,67 a 0,33 log KTJ.g<sup>-1</sup>, zatiaľ čo vzorky ošetrené SV (61 °C počas 45 minút) neodhalili žiadny rast podľa štúdie vykonanej Jeong et al. (2018). Aplikácia varenia SV na mäso zveriny na inaktiváciu *L. monocytogenes* ukázala, že hodnota D je vysoko závislá od okolitej matrice a zistilo sa, že je 49,2; 14,9 a 3,7 min. pre srnčiu zver, zatiaľ čo 100,2; 23,8; a 4,2 min. pre diviaka pri teplote 50, 55 a 60 °C (Abel et al., 2020). Dĺžka varenia však závisí od druhu vareného mäsového výrobku, ale varenie SV do 60 °C je dostatočné na zabitie patogénu. Skúmanie mikrobiálnej kvality morčacieho rezňa po varení SV, ktoré študovali Bıyıklı et al. (2020) ukázali, že celkový počet mezofilných baktérií, celkový počet Enterobacteriaceae a *E. coli* sa výrazne znížil o 2 log KTJ.g<sup>-1</sup> medzi rôznymi kombináciami liečby (65, 70 a 75 °C) – čas (20, 40 a 60 minút). Okrem toho medzi rôznymi ošetreniami s výnimkou pri 65 °C počas 20 minút možno *Listeria* spp. úplne zabiť. Vo väčšine prípadov výskumníci dosiahli varenie sous vide pri alebo nad 60 °C počas 45 minút ako najefektívnejšiu metódu na zníženie počtu *Listeria*, *E. coli* a mezofilných mikroorganizmov zodpovedných za kazenie mäsa a mäsových výrobkov.

Okrem toho použitie prírodného extraktu, antioxidantu, alebo antimikrobiálnych extraktov spolu s varením SV výrazne mení krivku tepelnej inaktivácie mikroorganizmu (Naveena et al., 2017). Tieto zložky fungujú na základe zmeny mechanizmu homeostázy. Na udržanie tohto stavu je potrebné dostatočné množstvo energie a tým





sa mikrobiálna bunka stáva veľmi citlivou na teplo. Karyotis et al. (2017) vypočítali tepelnú inaktiváciu *L. monocytogenes* a *Salmonella* spp. v marinovaných kuracích prsiach spracovaných varnou metódou SV. Uviedli, že kyslé prostredie, ktoré poskytuje marinovanie, podporuje citlivosť patogénov. Zistilo sa, že D hodnota pre *Salmonella* bola 47,65 min. pri 55 °C a 7,48 min. pri 60 °C, zatiaľ čo pre *L. monocytogenes* bola hodnota 54,81 °C a 10,39 min. pri príslušnej teplote. Cosansu et al. (2019) zistili desiatkový čas redukcie v hovädzom mäse uvarenom SV na zabitie vegetatívnych buniek *C. perfringens* ako 67,11; 17,15; 4,02 °C a 1,62 min. pri 57,5; 60; 62,5 °C a 62,5 min. Ďalej, aplikáciou varenia SV spolu s 1 % extraktom z hroznových jadier sa hodnota D znížila na 62,89; 13,70; 3,47 °C a 1,46 min. pri príslušnej teplote. Juneja et al. (2020) skúmali vplyv varenia SV (55 – 62,5 °C) spolu s arginátom laurovým (LAE) na inaktiváciu *L. monocytogenes* v mletom hovädzom mäse. Hodnota D, ktorá bola zaznamenaná v rozsahu od 33,62 do 3,22 min., klesla z 31,86 na 2,28 min. s pridaním 100 ppm LAE.

#### **1.4.2 Mikrobiálne biokonzervačné látky na kontrolu kazenia hovädzieho mäsa**

Mäso je produkt podliehajúci skaze. Pri porážke sa prirodzené ochranné bariéry (napr. koža) a prirodzené obranné mechanizmy (napr. antimikrobiálne peptidy) živých zvierat rozkladajú. Vďaka tomu môžu mikroorganizmy rýchlo rásť a rozkladať svalové tkanivá. Zmeny spôsobené mikroorganizmami vedú k tvorbe odfarbenia, pachov a hlienu. Takéto mäso sa stáva pre spotrebiteľov neprijateľným a obmedzuje trvanlivosť produktu (Comi, 2017; Lulietto et al., 2015). Hoci endogénna svalová enzymatická a neenzymatická chemická látka, reakcie a fyzické zmeny prispievajú k znehodnoteniu svalového tkaniva, účinok je v porovnaní s pôsobením mikroorganizmov nepatrný (Sofos et al., 2012).

Čas použiteľnosti ovplyvňuje každého v potravinovom dodávateľskom reťazci. Pre spotrebiteľov, nedostatočná trvanlivosť často vedie k nespokojnosti, ktorá potom ovplyvní prijatie a predaj produktu. V dôsledku toho supermarkety vo všeobecnosti neprijímajú produkty, ktorým zostáva menej ako 75 % skladovateľnosti (Robertson, 2005). Distribúcia produktov na medzinárodné trhy a miestnym predajcom môže byť tiež obmedzená na dobu použiteľnosti, čo je sklamaním najmä pre distribútorov v súčasnej ére globalizácie obchodu s potravinami. Rýchlo sa kaziaca povaha mäsa spôsobuje nielen značné ekonomické straty, ale prispieva aj k ďalším globálnym



problémom, ako je potravinová neistota a plytvanie potravinami (Odeyemi et al., 2020). Preto sa výrobcovia vo všeobecnosti pokúšajú maximalizovať trvanlivosť produktu, berúc do úvahy náklady a požiadavky distribútorov, maloobchodníkov a spotrebiteľov (Robertson, 2005). V súčasnosti sa mnohé potravinárske výrobky na trhu konzervujú viacerými metódami. Chladiace a baliace systémy sú široko používané pre čerstvé mäso a iné konzervačné technológie boli vyvinuté, alebo navrhnuté ako dodatočné procesy na kontrolu mikrobiálneho rastu a predĺženie trvanlivosti produktu. Okrem toho fyzikálna (napr. spracovanie vysokým tlakom, ionizujúce ožarovanie, a ultrazvuk) a chemická (napr. organické kyseliny, peroctová kyselina a nanočastice) biokonzervácia sa objavila ako sľubná možnosť v oblasti technológie pre zvyšujúci sa dopyt spotrebiteľov po metódach prirodzenej konzervácie a minimálne spracovaných potravinách (Chen et al., 2013; Rosario et al., 2021). Biokonzervácia je založená na použití prirodzenej, alebo kontrolovanej mikrobioty alebo antimikrobiálnych zlúčenín, ktoré majú za úlohu zvýšiť bezpečnosť potravín a predĺžiť trvanlivosť výrobkov (Dikeman a Devine, 2014). Antimikrobiálne zlúčeniny ktoré možno použiť na biokonzerváciu (jednoducho nazývané ako biokonzervačné látky), môžu pochádzať z rôznych zdrojov, vrátane rastlín (napr. rastlinné silice), živočíchov (napr. chitosan) a mikroorganizmov (napr. bakteriocíny). Líšia sa vo svojej povahe a môžu sa používať jednotlivo, alebo v kombinácii (Davidson et al., 2015). Mikrobiálne biokonzervačné látky boli skúmané v mnohých štúdiách proti bežným patogénom prenášaným mäsom, ako sú *Salmonella* spp., shiga toxín produkujúce *E. coli*, *S. aureus* a *L. monocytogenes* a preukázali veľkú účinnosť. Avšak k dnešnému dňu, ich použitie na kontrolu patogénnych baktérií sa dostalo oveľa menej pozornosti, pretože vo všeobecnosti spôsobuje znehodnotenie skôr ekonomické ako zdravotné riziká (Sofos et al., 2012).

Mikroorganizmy sú prenášané na mäso zo samotných zvierat, pracovníkov, z procesu a prostredia spracovania mäsa počas spracovania (Zagorec a Champomier-Vergès, 2017). Keďže čerstvé mäso sa zvyčajne uchováva v chlade pri teplote 1 – 4 °C, rast mezofilných mikroorganizmov je inhibovaný. Spočiatku sú na mäse prítomné hlavne psychrotrofné mikroorganizmy (Sun a Holley, 2012). Rôzne psychrotrofné mikroorganizmy môžu prispieť k znehodnoteniu čerstvého mäsa. Pretože kvasinky a plesne sú prítomné v malom množstve a rastú pomalšie na chladenom mäse v porovnaní s baktériami, zvyčajne nehrajú dôležitú úlohu pri kazení mäsa (Petruzzi et al., 2017). Medzi bakteriálne druhy nájdené na pokazenom chladenom mäse, ktoré sú prítomné vo významných číslach sú z rodov *Acinetobacter*, *Brochothrix*, *Moraxella*,





*Pseudomonas* a *Shewanella* a členovia čeľade Enterobacteriaceae a baktérie mliečného kvasenia (BML) (Doulgeraki et al., 2012; Sun a Holley, 2012; Mills et al., 2014; Odeyemi et al., 2020). *B. thermosphacta*, *Pseudomonas* spp., Enterobacteriaceae a BML boli všeobecne uznávané ako hlavné skupiny baktérií kaziacich mäso (Pennacchia et al., 2011). *Acinetobacter* spp. a *Moraxella* spp. majú nízky potenciál pri kazení mäsa, a preto majú malý význam. *Shewanella* spp., hoci majú vysoký potenciál kazenía, sú len hlavné kaziace organizmy v mäse s vysokým pH (pH > 6,0) (Sun a Holley, 2012).

Význam rôznych kaziacich sa baktérií je rôzny v závislosti od plynného prostredia. Mäso sa skladuje aeróbnymi podmienkami (napr. prebalené tácky, alebo plastové vrecká), *Pseudomonas* spp. prevládajú, keďže majú vyššiu afinitu ku kyslíku v dôsledku ich prísneho respiračného typu metabolizmu a tým rýchlejšie rastú (Palleroni, 2015; Sofos et al., 2012). Ovládanie týchto aeróbov možno dosiahnuť pomocou úpravy plynovej atmosféry mäsových výrobkov s vákuovým balením (VP) (vrátane vákuového balenia do kože) a balenie v modifikovanej atmosfére (MAP), ktoré sú najbežnejšími procesmi používané na celom svete (Arvanitoyannis a Stratakos, 2012). Vo VP je mäso umiestnené vo filmoch s nízkou priepustnosťou pre plyny a vzduch sa odstráni počas zapečatenia obalu, čím sa vytvorí anaeróbne prostredie. V MAP je mäso umiestnené do bariérových obalových materiálov a potom je odstránený vzduch nahradený zmesou plynov (zvyčajne kyslíka, oxidu uhličitého a dusíka). Oxid uhličitý na úrovniach vyšších ako 20 % inhibuje rast aeróbnymi gramnegatívnymi baktériami (napr. *Pseudomonas* spp.). Presný proces bakteriostatického účinku nie je známy, ale môže zahŕňať zmenu membránovej funkcie baktérií, inhibíciu aktivity enzýmov a penetrácia bakteriálnych membrán spôsobujúca intracelulárne zmenu pH. Skutočnosť, že oxid uhličitý sa rozpúšťa v potravinách (vodná aj lipidová fáza) a tvorí kyselinu uhličitú, zníženie pH môže tiež pôsobiť ako prekážka pre mikrobiálnu rast. Oxid uhličitý sa stáva čoraz rozpustnejším s klesajúcou teplotou je jeho antimikrobiálny účinok vylepšený v podmienkach chladenia. Kyslík je zvyčajne aplikovaný v množstve 70 – 80 % na čerstvé červené mäso, aby sa zachovala charakteristická jasne červená farba zachovaním myoglobínu okysličený stav (oxymyoglobín). Dusík sa môže použiť ako plniaci plyn, ktorý má klesajúcu teplotou a jeho antimikrobiálny účinok je vylepšený v podmienkach chladenia (Arvanitoyannis a Stratakos, 2012; Kontominas, 2014; Djenane a Roncalés, 2018). Za týchto podmienok *Pseudomonas* spp. sú inhibované a kazenie je spôsobené hlavne



aktivitami *B. thermosphacta* a LAB, pričom *B. thermosphacta* má väčší potenciál kazenia napriek tomu, že sú prítomné v menšom počte. Enterobacteriaceae sú tiež prítomné v relatívne malom počte a sú hlavnými kaziacimi sa organizmami pre mäso s vysokým pH s obmedzeným množstvom kyslíka (Sofos et al. 2012; Mills et al. 2014).

Výroba bezpečného a vysokokvalitného mäsa a mäsových výrobkov spolu so súčasným dopytom spotrebiteľov po čisto prírodnom a jasnom označení je náročná. Rastlinné silice (RS) preukázali pozoruhodnú antimikrobiálnu účinnosť proti kazeniu a patogénnym mikroorganizmom v mäse a mäsových výrobkoch. Aplikácia RS je čiastočne obmedzená z dôvodu ich intenzívnej arómy, ale je možné kombinovať pokročilé technológie na zlepšenie mikrobiálnej stability a senzorickej kvality.

### **1.4.3 Rastlinné silice (RS) ako potenciálne antimikrobiálne látky v mäse a mäsových výrobkoch**

Spôsob účinku RS naznačuje, že antimikrobiálnu aktivitu danej RS možno pripísať jeho hlavným zložkám, ako aj ich interakciu s menšími zložkami prítomnými v siliciach (Hyldgaard et al., 2012). Antimikrobiálna aktivita RS je však dôsledne spojená s fenolickými zložkami, ako sú karvakrol, eugenol a tymol (Seydim a Sarikus, 2006; Barbosa et al., 2009). Prítomnosť hydroxylových skupín vo fenolových zlúčeninách je veľmi dôležitá pre ich antimikrobiálnu aktivitu. Burt (2004) uvádza, že antimikrobiálnu aktivitu RS nemožno pripísať jednému špecifickému mechanizmu. V mikrobiálnych bunkách existuje niekoľko miest, alebo mechanizmov, ktoré majú byť miestami pôsobenia zložiek RS. Stručne povedané, RS môžu degradovať bunkovú stenu, narušiť fosfolipidovú dvojvrstvu cytoplazmatickej membrány a poškodiť membránové proteíny, čo vedie k zvýšenej permeabilite bunkovej membrány a strate bunkových zložiek. Môžu ďalej narúšať protónovú hnaciu silu, tok elektrónov a aktívny transport a koagulovať obsah bunky (Burt, 2004). Okrem toho môžu tieto silice poškodiť rôzne enzýmové systémy vrátane enzýmov zapojených do regulácie energie a syntézy štruktúrnych zložiek (Burt, 2004) a inaktivovať, alebo zničiť genetický materiál (Solomakos et al., 2008), čím sa posilnia ich antimikrobiálne aktivity.

### **1.4.4 Antimikrobiálna aktivita potenciálnych RS v mäse a mäsových výrobkoch**

Zistilo sa, že RS majú antibakteriálne a antifungálne účinky (Ouattara et al., 1997) proti niekoľkým mikroorganizmom spojeným s mäsom, vrátane



gramnegatívnych a grampozitívnych baktérií (Karabagias et al., 2011). Mnoho nedávnych štúdií sa uskutočnilo na preskúmanie účinkov RS získaných zo zdrojov, ako je oregano, rozmarín, tymian, šalvia, bazalka, kurkuma, koriander, zázvor, cesnak, muškátový oriešok, klinček, muškátový kvet, saturejka a fenikel, ak sa používajú samostatne, alebo v kombinácii s inými RS alebo konzervačnými metódami s cieľom zlepšiť senzorické vlastnosti a predĺžiť trvanlivosť mäsa a mäsových výrobkov (Goulas a Kontominas, 2007). Extrahované RS a olejové živice sú navyše v mäsovom priemysle uprednostňované pred surovým korením kvôli ich lepšej stabilite počas skladovania, mikrobiálnej bezpečnosti, vysokej koncentrácii aromatických zložiek, menšiemu skladovaciemu priestoru, ľahkej manipulácii, žiadnym sezónnym zmenám a štandardizácii (Tipsrisukond et al., 1998).

Vo všeobecnosti môžu tieto RS pozostávať z viac ako 60 jednotlivých organických zložiek (Burt, 2004) s nízkou molekulovou hmotnosťou a veľkými rozdielmi v antimikrobiálnych a antioxidantných aktivitách (Hyldgaard et al., 2012). Bolo dobre zdokumentované, že biologické vlastnosti konkrétnej RS primárne pripisujú jej hlavným zlúčeninám (Bakkali et al., 2008). Okrem toho, minoritné zlúčeniny konkrétnej RS môžu mať synergické účinky s inými zložkami, čo vedie k antibakteriálnym vlastnostiam (Marino et al. 2001; Burt 2004).

Tieto zlúčeniny RS sú vo všeobecnosti klasifikované do 2 skupín odlišného biosyntetického pôvodu. Hlavná skupina obsahuje terpény a terpenoidy, zatiaľ čo druhú tvoria aromatické zlúčeniny (fenylpropanoidy). Stručne povedané, terpény sú uhľovodíky zložené z niekoľkých izoprénových jednotiek a terpény obsahujúce kyslík sa nazývajú terpenoidy. Príklady terpénov prítomných v RS sú p-cymén, terpinén, limonén, sabinén a pinén. Terpenoidy možno ďalej rozdeliť na alkoholy, estery, aldehydy, ketóny, étery a fenoly. Geraniol, mentol, linalool, citronellol, karvón, tymol, karvakrol, geranylacetát, eugenylacetát, geranial, neral a 1,8-cineol sú dobre známe terpenoidy nachádzajúce sa v RS. Cinnamaldehyd, cinnamylalkohol, chavikol, eugenol, estragol, metyleugenoly a metylcinnamát sú fenylpropanoidy (Ayala-Zavala et al., 2008; Bakkali et al., 2008; Hyldgaard et al., 2012).

#### **1.4.5 Obmedzenia a perspektívy rastlinných silíc do budúcnosti**

Hoci pri mnohých RS boli pozorované dobré antimikrobiálne aktivity, určité obmedzenia sa zistili aj pri aplikácii RS v mäse a mäsových výrobkoch. Interakcia niektorých RS s potravinovými zložkami a štruktúrou môže znížiť ich účinnosť (Juven



et al., 1994; Skandamis et al., 2000; Skandamis a Nychas, 2000). Okrem toho môže výrazne znížená aktivita RS viesť k znehodnoteniu potravín, ako je mäso a mäsové výrobky, v porovnaní s výsledkami *in vitro*. To možno pripísať prítomnosti tukov, sacharidov, bielkovín a solí v takýchto systémoch (Burt, 2004; Busatta et al., 2008). Napríklad RS z mäty a koriandra neboli účinné proti *L. monocytogenes* vo výrobkoch s vysokým obsahom tuku, ako je paštéta a poleva na šunku s obsahom repkového oleja (Gill et al., 2002). Môže byť ťažké udržať konzistentnosť kvality (Fasseas et al., 2008), pretože zloženie jednotlivých RS sa môže líšiť v dôsledku niekoľkých faktorov vrátane času zberu (Naghdi Badi et al., 2004), odrody (Ložiene et al., 2003), použitej časti rastliny a spôsobu extrakcie (Burt, 2004; Hyldgaard et al. 2012). Okrem toho Hyldgaard et al. (2012) uviedli, že antimikrobiálna účinnosť zložiek RS závisí od pH, teploty (Rattanachaikunsopon a Phumkhachorn, 2010) a úrovne mikrobiálnej kontaminácie (Somolinos et al., 2010).

Použitie RS ako konzervačných látok bolo v potravinách obmedzené, pretože sú potrebné vo vysokých koncentráciách, aby sa dosiahla dostatočná antimikrobiálna aktivita (Hyldgaard et al., 2012). Používanie niektorých RS sa obmedzuje hlavne na korenené jedlá vrátane mäsových výrobkov, ktoré sú spojené s bylinkami, alebo koreninami, pretože ovplyvňujú organoleptickú kvalitu potravín (Hyldgaard et al., 2012). Na vyriešenie týchto problémov sa uskutočňujú štúdie, najmä prostredníctvom technológie prekážok. Niekoľko autorov napríklad uviedlo, že lepšie výsledky možno dosiahnuť začlenením prchavých zložiek RS do filmov, alebo jedlých obalov, zapuzdrením RS do polymérov jedlých a biologicky odbúrateľných obalov, vrecúšok, alebo do nanoemulzií (Pelissari et al., 2009; Donsì et al., 2010; Sánchez-González et al., 2011; Phillips a Laird, 2014). Nižšie koncentrácie RS možno kombinovať s inými antimikrobiálnymi zlúčeninami a/alebo inými konzervačnými technológiami, aby sa dosiahol synergický účinok bez ohrozenia antimikrobiálnych aktivít (Nguefack et al., 2012).

Mäso a mäsové výrobky sú vystavené mikrobiálnemu znehodnocovaniu, čo v konečnom dôsledku vedie k problémom s bezpečnosťou a kvalitou, ak sa s mäsom nemanipuluje a nekonzervuje správne. V mäse a mäsových výrobkoch je možné efektívne použiť niekoľko RS ako prírodné alternatívy k syntetickým potravinovým prísadám, najmä ako účinné antimikrobiálne látky. Fenolové zlúčeniny, ako karvakrol, eugenol a tymol, sú zodpovedné hlavne za antimikrobiálnu aktivitu RS na zvýšenie permeability bunkových membrán a vedú k strate bunkových zložiek. Aplikácia RS je



však čiastočne obmedzená z dôvodu ich intenzívnej arómy, ktorá môže spôsobiť negatívne organoleptické účinky. Na zlepšenie mikrobiálnej stability a senzorickej kvality mäsa a mäsových výrobkov sa používajú nové technológie, ako je zapuzdrenie RS do nanoemulzií a použitie RS ako súčasti prekážkovej technológie (kombinované procesy s MAP, nízinom, EDTA, lyzozýmom a pod.) v mäsovom priemysle; používajú sa aj tradičné metódy pridávania RS priamo do mäsového cesta pri výrobe mäsových výrobkov (Jayasena a Jo, 2013).

## 1.5 Rozmarínová silica

Rastliny sa už dlho používajú na terapeutické účely. *Rosmarinus officinalis* Linnaeus (1753, Lamiaceae), je známy aj pod synonymami: *Salvia rosmarinus* Schleid. a *Rosmarinus angustifolius* Mill. (The Plant List, 2018). Tento druh je celosvetovo pestovanou rastlinou známou pre svoju nutričnú hodnotu a farmakologické vlastnosti, ktoré ju preslávili v miestnej a tradičnej medicíne. V potravinárskom priemysle sa používa ako potravinová aróma a konzervačná látka pre svoj antioxidantný a antimikrobiálny potenciál. *R. officinalis* sa používa aj v kozmetických výrobkoch (Borrás-Linares et al., 2014).

Andrade et al. (2018) preukázali rastúci záujem o túto rastlinu s priemerným počtom 120 štúdií ročne od roku 2010. V miestnej a tradičnej medicíne sa *R. officinalis* používa ako tinktúra, alebo čaj z nadzemných častí rastliny na liečbu žalúdočných ochorení a ochorenia súvisiace so zápalom (Datiles a Acevedo-Rodríguez, 2021). Ďalším populárnym spôsobom použitia *R. officinalis* je jeho rastlinná silica.

Rastlinné silice sú komplexné zmesi, ktoré obsahujú stovky zlúčenín, prchavé látky, monoterpény, seskviterpény, aromatické zlúčeniny a iné deriváty (Lovkova et al., 2001; Faixová a Faix, 2008; Begum et al., 2013). Rastlinná silica rozmarínu získaná parnou destiláciou z listov (do 2,5 %) je bezfarebná až svetložltá, vo vode nerozpustná a s charakteristickou arómou gáfru. Hlavnými zložkami rozmarínovej silice sú gáfor (5,0 – 21 %), 1,8-cineol (15 – 55 %),  $\alpha$ -pinén (9,0 – 26 %), borneol (1,5 – 5 %), kamfén (2,5 – 12 %),  $\beta$ -pinén (2,0 – 9 %) a limonén (1,5 – 5 %) v pomeroch, ktoré sa líšia podľa vegetatívneho štádia a bioklimatických podmienok (Begum et al., 2013).

Čo sa týka extraktov, fytochemikálie, ktoré sa v *R. officinalis* vyskytujú sú hlavne kyselina rozmarínová, gáfor, kyselina kávová, kyselina ursolová, kyselina betulínová, kyselina karnosová a karnosol (Ulbricht et al., 2010). Preto sa *R. officinalis* skladá hlavne z fenolových zlúčenín, di- a triterpénov a silíc (Bozin et al., 2007). V tradičnej



medicíne sa listy *R. officinalis* L. používajú na základe ich antibakteriálnych účinkov (Bozin et al., 2007), karminatívnych (Begum et al., 2013) a ako analgetikum vo svaloch a kĺboch (Begum et al., 2013). Rozmarínové silice a výťažky z kvetov a listov sa tiež používajú na liečbu drobných rán, vyrážok, bolesti hlavy, dyspepsie, obehových problémov, ale aj ako expektorans, diuretikum a spazmolytikum pri renálnej kolike (Ulbricht et al., 2010). Polyfenoly sú antioxidantné chemické zlúčeniny primárne zodpovedné za sfarbenie ovocia, ktoré sú klasifikované ako fenolové kyseliny, flavonoidy a neflavonoidy (Hamuel, 2012). Okrem antioxidantných vlastností zohrávajú veľmi dôležitú úlohu v obrane rastlín proti byľinožravcom, patogénom a predátorom; preto majú uplatnenie pri kontrole infekčných agens u ľudí. U *R. officinalis* sú najčastejšie polyfenoly apigenín, diosmín, luteolín, genkwanina a fenolové kyseliny (>3 %), najmä kyselina rozmarínová, kyselina chlorogénová a kyselina kávová (Wagstaff a Olmstead, 1997).

### **1.5.1 Biologické aktivity zlúčenín *R. officinalis***

Rozmarín sa široko používa nielen pri varení na úpravu a zvýraznenie chuti, ale aj v tradičnej medicíne, pretože je vysoko cenenou liečivou rastlinou na prevenciu a liečbu prechladnutia, reumatizmu, bolesti svalov a kĺbov (Calvo et al. 2011; Zhang et al. 2014). V súčasnosti je jedným z najpopulárnejších zdrojov prírodných bioaktívnych zlúčenín a v skutočnosti táto rastlina vykazuje rôzne farmakologické aktivity, ako sú antibakteriálne (Bozin et al., 2007), antidiabetické (You et al., 2013), protizápalové (Takaki et al., 2008), protinádorové (Yesil-Celiktas et al., 2010) a antioxidantné (Pérez-Fons et al., 2010).

### **1.5.2 Protinádorová aktivita**

Zloženie ľudskej stravy môže ovplyvňovať zvýšenie rizika vzniku rakoviny a jej zložky môžu mať pozitívny, alebo negatívny vplyv (Visanji et al., 2006). Chemoprevencia je dlhodobá farmakologická kontrola rizika rakoviny. V tejto súvislosti sa niekoľko rastlín spolu s ich zlúčeninami skúmali na ich protinádorový potenciál (Visanji et al., 2006). Asi 70 % liekov používaných pri liečbe rakoviny pochádza z prírodných zdrojov (Prasad et al., 2011). Ako už bolo opísané, o rozmaríne je známe, že má antioxidantnú aktivitu, čím inhibuje genotoxicitu a chráni pred karcinogénmi, alebo toxickými látkami (González-Vallinas et al., 2013). Výrazné vedľajšie účinky terapeutických metód však do značnej miery bránia jej účinnosti, čím sa zvyšuje dopyt





po nových prístupoch v liečbe a prevencii rakoviny (Xiang et al., 2015). Polyfenoly sú zlúčeniny schopné modulovať bunkový rast a diferenciáciu, a tak interferovať s vývojom a progresiou nádoru (Kar et al., 2012). Keďže rozmarín je bohatý na fenolové zlúčeniny, mnohé štúdie boli zamerané na protinádorovú aktivitu (asi 20 %) (Dörrie et al., 2001; Tsai et al., 2011).

Kyselina karnosová a karnosol sú diterpény, ktoré predstavujú asi 5 % hmotnosti sušených listov *R. officinalis* a tieto zlúčeniny majú väčší protinádorový význam. Za posledných 5 rokov došlo k veľkému nárastu počtu štúdií týkajúcich sa protinádorovej aktivity kyseliny karnozovej, karnosolu, kyseliny rozmarínovej a kyseliny ursolovej. Najviac skúmané boli rakoviny prsníka, melanóm, rakovina hrubého čreva, karcinóm pečene a leukémia. V skutočnosti sa uskutočnilo niekoľko štúdií *in vitro* týkajúcich sa cytotoxicity karnosolu a kyseliny karnozovej na ľudské rakovinové bunky (HepG2, COLO 205 a HL-60), bunky rakoviny prsníka a bunky rakoviny hrubého čreva (Dörrie et al., 2001; Bai et al., 2010). Tieto štúdie uvádzajú zníženie životaschopnosti buniek s použitím kyseliny karnozovej v závislosti od dávky, vrátane rezistentných nádorových buniek, čo naznačuje, že táto zlúčenina je komplementárnym protinádorovým prístupom (González-Vallinas et al., 2013). Z *in vivo* experimentov sa zistilo, že kyselina karnosová a jej esterové deriváty sú účinné pri prevencii žalúdočných lézií v modeli žalúdočných lézií vyvolaných HCl/EtOH u myší (Theoduloz et al., 2011). Tiež liečba rozmarínovým extraktom z 7,12-dimetylbenz[a]antracénom (DMBA) indukovanej tumorigenézy prsníka u potkanov naznačila chemopreventívny účinok pre experimentálnu tumorigenézu prsníka (Singletary et al., 1996).

### 1.5.3 Antioxidačná aktivita

Prírodné antioxidanty z rastlín nadobúdajú čoraz väčší význam nielen v oblasti výživy (konzervácia a stabilita potravín), ale aj v preventívnej medicíne (Lee a Shibamoto, 2002). Čeľad' Lamiaceae bola študovaná na výskum antioxidačných zlúčenín kvôli vysokému obsahu polyfenolov (Botsoglou et al., 2010). Podobne, listy *R. officinalis* sa bežne používajú ako korenie na dochucovanie potravín a ako zdroj antioxidačných zlúčenín používaných pri konzervácii potravín (Benincá et al., 2011). Antioxidanty hrajú hlavnú úlohu v prevencii a liečbe ochorení spojených s oxidačným poškodením, vrátane rakoviny, kardiovaskulárnych a neurodegeneratívnych ochorení (Leal et al., 2003; Aherne et al., 2007). Reaktívne formy kyslíka, vrátane peroxidu vodíka a voľných radikálov, ako je superoxidový anión ( $O_2^{\bullet-}$ ) a hydroxylový radikál



(HO•), sa nevyhnutne tvoria v živých organizmoch, ktoré sú výsledkom metabolických procesov, alebo vonkajších zdrojov (Botsoglou et al., 2010).

Dlhodobé vystavenie voľným radikálom v biologických systémoch môže spôsobiť funkčné a štrukturálne poškodenie, starnutie a bunkovú smrť (González-Vallinas et al., 2013). Bolo preskúmaných niekoľko štúdií *in vitro* týkajúcich sa antioxidantnej aktivity hlavných izolovaných zlúčenín z rozmarínu, konkrétne karnosolu, kyseliny karnozovej, rosmanolu, kyseliny rozmarínovej, kyseliny oleanolovej a kyseliny ursolovej. Použitím 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylvej metódy boli tieto bioaktívne zlúčeniny a rastlinná silica overené na ich antioxidantnú aktivitu (Lo et al., 2002; Klančnik et al., 2009; Beretta et al., 2011). Tiež pomocou testov aktivity zachytávania voľných radikálov kyseliny tiobarbiturovej, superoxidových aniónov a lipidov a metód Rancimat (stanovenie oxidačnej stability tuku) sa uvádza, že bioaktívne zlúčeniny karnosol, rosmanol a epirosmanol inhibujú peroxidáciu lipidov prostredníctvom mechanizmu zachytávania voľných radikálov (Zeng et al., 2001; Del Baño et al., 2003).

Tieto štúdie ukázali antioxidantný potenciál rozmarínových fytochemikálií, ktorých vlastnosti sú úzko spojené s inými biologickými aktivitami, ako sú cytoprotektívne a protirakovinové, predovšetkým vďaka ich schopnosti neutralizovať reaktívne formy kyslíka. Pokiaľ ide o štúdie *in vivo*, do roku 2014 sa našli iba tri rôzne štúdie na overenie experimentálnych výsledkov *in vitro* s použitím silíc a kyseliny karnosovej. Tieto štúdie sa uskutočňovali na potkanoch Wistar a hodnotili aktivity katalázy, glutatiónpoxidázy, superoxiddismutázy a syntázy oxidu dusnatého, ako aj peroxidáciu lipidov a reaktívne formy kyslíka v tkanivách mozgu a srdca po pridaní silice z rozmarínu do stravy. To viedlo k zníženiu oxidačného stresu, pretože rozmarín z potravy má potenciál zachytávať voľné radikály, inhibovať peroxidáciu lipidov a zlepšiť antioxidantný stav v tkanivách potkanov (Botsoglou et al., 2010; Rašković et al., 2014).

#### 1.5.4 Proti-infekčná aktivita

Väčšina rastlín produkuje antimikrobiálne sekundárne metabolity buď z normálneho priebehu rastu a vývoja, alebo ako odpoveď na stres, alebo napadnutie patogénom. Použitie rastlinných silíc predstavuje nový spôsob inhibície množenia mikroorganizmov (Kačániová et al., 2014). *R. officinalis* L. je dnes široko používaný ako potravinový konzervant a známy pre svoju silnú antibakteriálnu aktivitu (Wang et al., 2012).





Rastúce používanie antibiotík v medicíne, poľnohospodárstve a chove hospodárskych zvierat do značnej miery prispelo k nárastu mikroorganizmov rezistentných voči viacerým liekom. Antimikrobiálna rezistencia je celosvetovým problémom verejného zdravia a výskumníci sa v tejto oblasti čoraz viac zapájajú do dopytu po nových účinných antimikrobiálnych bioaktívnych látkach (Qabaha, 2013).

Rastlinné silice majú okrem antibakteriálnych vlastností aj insekticídne, antiparazitické a antifungálne účinky, ktoré sú dôležité pre kontrolu ľudských chorôb mikrobiálneho pôvodu (Luqman et al., 2007). Od 90. rokov 20. storočia do roku 2014 vykazovala rastlinná silica z rozmarínu najvyššiu antimikrobiálnu aktivitu so 65 % štúdií proti-infekčnej aktivity. Antimikrobiálna aktivita RS bola lepšia v porovnaní s jednotlivými zložkami 1,8-cineolom a  $\alpha$ -pinénom (Baratta et al., 1998).

Experimentálne štúdie *in vitro* týkajúce sa MIC, minimálnej baktericídnej koncentrácie a dynamických procesov usmrcovania v čase ukázali, že existuje možný synergický účinok medzi antimikrobiálnymi zložkami v RS (Luqman et al., 2007; Swamy et al., 2016). Tieto štúdie sa uskutočnili testovaním kyseliny karnozovej, karnosolu, kyseliny rozmarínovej, kyseliny oleanolovej, kyseliny ursolovej a RS proti grampozitívnym baktériám (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*), trom gramnegatívnym baktériám (*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) a dvom hubám (*Candida albicans* a *Aspergillus niger*). Všetky uvádzali výraznú antibakteriálnu a antifungálnu aktivitu (Baratta et al., 1998). Zistilo sa tiež, že kyselina karnosová vykazuje antivírusovú aktivitu proti ľudskému respiračnému syncytiálnemu vírusu (Shin et al., 2013).

### 1.5.5 Protizápalové a analgetické aktivity

Rastliny sú dobrým zdrojom protizápalových látok a neustále hľadanie nových zlúčenín, najmä z rastlín s historicky doloženými farmakologickými účinkami, predstavuje obrovský farmaceutický potenciál (Benincá et al., 2011). Riadenie uvoľňovania mediátorov v zápalovom procese je hlavným cieľom protizápalových liekov (Da Rosa et al., 2013). Bolesť a zápal súvisia s hojením rán a produkciou voľných radikálov, ktoré by mohli predĺžiť zápalový proces (Backhouse et al., 2008). Zápalová odpoveď a oxidačné poškodenie sú teda dva hlavné faktory, ktoré vyvolávajú kardiovaskulárne a neurodegeneratívne ochorenia; avšak polyfenoly z niektorých rastlín sú schopné tieto problémy redukovať (Peng et al., 2007).



V ľudovom liečiteľstve je rozmarín známy svojimi terapeutickými vlastnosťami proti bolestiam brucha a na liečbu zápalových ochorení dýchacích ciest, ako je bronchiálna astma (Zanella et al., 2012). Niektoré experimentálne štúdie uvádzajú protizápalové a analgetické aktivity rastlinnej silice a biologicky aktívnych terpenov, ako je kyselina karnosová, karnosol, kyselina ursolová a kyselina betulínová, ako aj kyselina rozmarínová, rosmanol a kyselina oleanolová. V skutočnosti sa uvádza, že majú antinociceptívnu aktivitu a že každý jednotlivý triterpén vykazoval podobnú účinnosť, aká bola pozorovaná pri ketorolaku, nesteroidnom protizápalovom lieku (Zanella et al., 2012).

Pokiaľ ide o štúdie *in vitro*, protizápalové a analgetické štúdie boli založené na hodnotení expresie zápalových cytokínov (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  atď.), COX-1/COX-2, iNOS a hodnotenie produkcie oxidu dusnatého v bunkách makrofágov RAW 264.7 (Rosenbaum et al., 2010; Kuo et al., 2011). Boli vyvinuté aj štúdie týkajúce sa anti-aterosklerotických účinkov rozmarínu prostredníctvom migrácie a aktivácie matricovej metaloproteinázy buniek hladkého svalstva ciev. Tieto štúdie uvádzajú, že kyselina karnosová má schopnosť potláčať expresiu matrix metaloproteinázy-9 prostredníctvom downregulácie NF- $\kappa$ B, a teda znižovať migráciu buniek hladkého svalstva (Yu et al. 2008; Chae et al. 2012). Je zrejmé, že protizápalové a analgetické aktivity boli najviac študované a existuje pokus vysvetliť tieto vlastnosti niekoľkými zlúčeninami *R. officinalis*, pričom najviac skúmaný je karnosol. Tieto *in vitro* štúdie ukázali potenciálne využitie pri prevencii zápalových ochorení (Kuo et al., 2011). V predklinických štádiách sa rastlinná silica z rozmarínu používala lokálne pri svalových a reumatických bolestiach, čo bolo hodnotené pomocou testov zápalu pohrudnice vyvolanej karagénanom a edému labky u potkanov vyvolaného karagénanom. Tieto štúdie naznačili, že rastlinná silica môže výrazne znížiť indukovaný edém za 1 – 4 hodiny a významne znížiť objem pleurálneho exsudátu, pričom pôsobí protizápalovo aj antinociceptívne (Lucarini et al., 2013).

Na tieto aktivity boli testované aj nové zlúčeniny olova získané derivatizáciou kyseliny rozmarínovej. Najmä acetylový derivát môže znížiť indukovaný edém labky, ako aj olizovanie labky, čo naznačuje potenciálne použitie tejto zlúčeniny ako protizápalového a antinociceptívneho činidla (Lucarini et al., 2013). Čo sa týka klinických štúdií na túto tému, od roku 2005 prebehlo niekoľko štúdií. Lukaczer et al. (2005) skonštatovali účinnosť „Meta050“ (kombinácia redukovaných izo-alfa-kyselín z chmeľu, extraktu z rozmarínu a kyseliny oleanolovej) u pacientov s reumatickým



ochorením. Pacientom s bolesťou spôsobenou osteoartritídou, reumatoidnou artritídou a fibromyalgiou bolo podaných 440 mg „Meta050“, čo sa u väčšiny pacientov zdvojnásobilo po 4 týždňoch. Táto práca uvádza signifikantný pokles bolesti u pacientov s artritídou o 40 – 50 %, ale nie pri subjektoch s fibromyalgiou (Lukaczer et al., 2005).

V *ex vivo* klinickej štúdii vykonanej Minich et al. (2007) na úľavu od bolesti použili kombináciu podobnú „Meta050“, ale v ich práci je prezentovaná ako NG440. Cieľom bolo preskúmať klinickú bezpečnosť a účinnosť NG440. V správe sa uvádza, že NG440 je bezpečný pre ľudskú spotrebu a že toxicita pre zvieratá neodhalila žiadne nepriaznivé účinky pri denných dávkach  $\leq 250 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Podľa týchto výsledkov môže NG440 slúžiť ako alternatíva tam, kde sa tradične používajú špecifické inhibítory COX- 2. Ďalšia práca vykonaná Rosenbaum et al. (2010) uviedli použitie triterpénov, kyseliny ursolovej, kyseliny oleanolovej a kyseliny mikromérovej ako výživových doplnkov pri osteoartritíde a reumatoidnej artritíde. Tieto zlúčeniny (získané z rôznych extraktov z listov rozmarínu) boli schopné znížiť lokálnu protizápalovú aktivitu, čo bolo testované pomocou ušného testu s krotónovým olejom na myšiach.

## 1.6 Tymianová silica

Rod *Thymus* z čeľade Lamiaceae obsahuje množstvo zástupcov. Tieto rastliny pochádzajúce z oblasti Stredozemného mora sa bežne používajú na potravinárske, kozmetické a liečebné účely (Ghasemi et al., 2020). Tymián získavaný z *Thymus vulgaris* L. a *Thymus zygis* L. je najznámejšou rastlinnou látkou vo farmaceutickom priemysle.

V súčasnosti sa na výrobu liekov používajú iba štandardizované prípravky z tymianovej byliny a silice, ktoré spĺňajú požiadavky národných liekopisov, alebo Európskeho liekopisu X (Ph. Eur. X). Podľa Ph. Eur. X definícia, tymiánová bylina je opísaná ako celé listy a kvety oddelené od sušených stoniek *T. vulgaris*, alebo *T. zygis*, alebo ich zmes s  $12 \text{ ml.kg}^{-1}$  minimálnej rastlinnej silice a minimálnym obsahom tymolu a karvakrolu 40 % (Council, 2019).

Tymián RS je definovaná ako produkt parnej destilácie čerstvých kvitnúcich nadzemných častí jedného, alebo zmesi oboch druhov s koncentráciou 37 – 55 % tymolu a 0,5 – 5,5 % karvakrolu (EMAAR 2020). Bylina tymiánu, RS a ich hlavné prchavé zložky – tymol a karvakrol – našli široké uplatnenie na terapeutické účely. Rozsah medicínskeho použitia, predklinické a klinické údaje, ako aj chemické zloženie



tymianovej byliny a RS zhrnul a zverejnil Výbor pre rastlinné lieky (HMPC) Európskej liekovej agentúry (EMA) ako zodpovedajúce hodnotiace správy a monografie (EMAAR, 2020). Pri diskusii o chemickom zložení a aktivite tymianovej byliny a jej hydroalkoholových extraktov by sa okrem prchavej frakcie mali brať do úvahy aj neprchavé zložky, ako sú flavonoidové glykozidy, oligoméry kyseliny kávovej, jednoduché fenolové kyseliny, deriváty hydrochinónu a terpenoidy. Podrobné informácie o týchto komponentoch možno nájsť v literatúre (Bendif et al., 2020; Kosakowska et al., 2020; Tohidi et al., 2020).

Zlúčeniny rastlinnej silice tymiánu patria do rôznych chemických skupín vrátane monoterpénov, monoterpénových alkoholov, fenolových derivátov, ketónov, aldehydov, éterov a esterov. V rámci druhu *T. vulgaris* existuje aj množstvo chemotypov, ktoré sa líšia hlavnou zložkou RS, ale v Európskom liekopise je uvedený iba „tymolový typ“ s tymolom ako hlavnou zložkou. Hlavnými zložkami RS tymianu sú izoméne fenolové monoterpény: tymol (2-izopropyl-5-metylphenol) a karvakrol (2-metyl-5-(propán-2-yl)fenol). Oba tieto monoterpény sa biosyntetizujú hydroxyláciou p-cyménu po aromatizácii γ-terpinénu na p-cymén (Tohidi et al., 2020).

Tymol je bezfarebná kryštalická zlúčenina s charakteristickými vlastnosťami vrátane silného zápachu a rozpustnosti v alkohole a iných organických rozpúšťadlách, ale vo vode je len málo rozpustná (PubChem, 2020). Na druhej strane karvakrol je bezfarebná až svetložltá kvapalina, nerozpustná vo vode, ale vysoko rozpustná v etanole, acetóne a dietyléteri a s tymolovým zápachom (Sharifi-Rad et al., 2018). Tymol sa po perorálnom podaní rýchlo absorbuje a pomaly eliminuje približne v priebehu 24 hodín. Nachádza sa vo forme tymolsulfátu v plazme a dva konjugáty fázy II – tymolsulfát a tymolglukuronid – možno nájsť v moči. Tvorba glukuronidu sa pozorovala len pri vyšších dávkach. Perorálna biologická dostupnosť označovaná ako tymolsulfát je približne 16 % a plazmatický polčas je približne 1,5 hodiny (Kohlert et al., 2002; Nagoor Meeran et al., 2017). Bioaktivitu a toxikologické účinky karvakrolu boli opísané v práci Sharifi-Rad et al. (2018).

Tymián a jeho rastlinná silica sa už dlho používajú na liečbu infekcií horných dýchacích ciest, symptómov bronchitídy, parazitárnych infekcií, svrbenia spojeného s dermatitídou, modrín a vyvrtnutí. V súčasnosti sa všeobecne používa ako expektorans pri kašli spojenom s prechladnutím a tiež v zubnom lekárstve ako dezinfekčný prostriedok (Thosar et al., 2013). Má antibakteriálny účinok na grampozitívne a gramnegatívne baktérie a má antivírusovú (vírus herpes simplex



typu I, ľudské rinovírusy a vírusy chrípky), antimykotickú, antioxidačnú, protizápalovú a spazmolytickú aktivitu. Hoci tymianová rastlinná silica má vo vysokých koncentráciách cytotoxické vlastnosti a pri perorálnom podávaní môže spôsobiť poškodenie črevných buniek, pri bežne používaných dávkach nebola zaznamenaná žiadna toxicita a možno ho považovať za bezpečný liek. Podanie vysokých koncentrácií na pokožku môže spôsobiť podráždenie. V zriedkavých prípadoch sa môže vyskytnúť alergická reakcia prejavujúca sa ako kožná vyrážka, bronchospazmus, astmatický záchvat a anafylaxia. Preto je táto RS kontraindikovaná u osôb alergických na tymian, alebo iné rastliny z čeľade Lamiaceae z dôvodu možnej skríženej reaktivity (Walther a Schmidtke, 2020). Ukázalo sa, že tymol, ako hlavná aktívna zložka zodpovedná za aktivitu tymianovej RS, má antiseptické, antibakteriálne, antifungálne, anthelmintické, antivírusové, antioxidačné, expektoračné, antispazmodické, karminatívne, diaforetické, sedatívne, antireumatické a dokonca aj antirakovinové, antihyperlipidemické a antihyperglykemické pôsobenie (Salehi et al., 2018; Tariq et al., 2019). Výskum látok s novými biologickými a farmakologickými aktivitami zahŕňa bežne známe prírodné látky vrátane tymolu a tymianovej RS.

### 1.6.1 Aktivita proti mikrobiálnym biofilmom

Antibiotická rezistencia v súčasnosti používaných a často nadužívaných antibiotík je rastúcim problémom farmakoterapie bakteriálnych infekcií. Preto je veľmi dôležité hľadať nové látky, vrátane látok prírodného pôvodu, ktoré možno použiť na boj proti patogénom (Memar et al., 2017; Zhang et al., 2018). Odolnosť baktérií a húb voči antibiotikám a dezinfekčným prostriedkom súvisí s ich schopnosťou vytvárať biofilm, ktorý zabraňuje prenikaniu antibakteriálneho činidla do miesta infekcie. Biofilm je definovaný ako skupina mikroorganizmov spojených bezbunkovou polymérnou maticou zloženou hlavne z polysacharidov, proteínov a DNA. Táto štruktúra vykazuje priľnavosť k pevným povrchom, zvyčajne vnútorným implantátom, chlopniam, alebo katétrom. Patogénne baktérie a huby sú chránené silnou vrstvou polysacharidu proti škodlivým faktorom, ako sú imunitné bunky, oxidačný stres a antimikrobiálne látky. Tieto mikroorganizmy sú tisíckrát odolnejšie voči antimikrobiálnym látkam ako planktónové formy. Je to spôsobené fyziologickými rozdielmi buniek, ktoré tvoria biofilm – ich rýchlosť metabolizmu a spotreba kyslíka a živín sú znížené. Tieto mechanizmy vedú k zvýšenej tolerancii na bežne používané antibiotiká a k exacerbácii infekčných procesov (Al-Shuneigat et al., 2014; Bazargani a Rohloff, 2016).



Okrem toho prítomnosť biofilmu uľahčuje komunikáciu baktérií a húb pomocou quorum sensing (QS). Ide o komunikačný systém medzi bakteriálnymi bunkami, ktorý ovplyvňuje reguláciu génovej expresie v reakcii na hustotu mikrobiálnych populácií. QS má osobitný význam pri kolonizácii nových území baktériami. Špecifikuje podmienky, na ktoré sa môžu jednotlivé mikroorganizmy adaptovať (Singh et al., 2017; Hayat et al., 2019). Odhaduje sa, že 65 – 80 % všetkých infekcií je spôsobených mikroorganizmami súvisiacimi s biofilmom, čo je hlavnou príčinou neúčinnosti liečby (Van Acker et al., 2014).

Podľa WHO medzi prioritné baktérie, ktoré sú tiež schopné vytvárať biofilm, patria *P. aeruginosa* – rezistentné na karbapeném, *S. aureus* – najmä rezistentné na metilín (MRSA) – a Enterobacteriaceae tretej generácie rezistentné na cefalosporín (Tacconelli et al., 2018). Závažným problémom modernej farmakoterapie sú infekcie spôsobené vyššie uvedenými mikroorganizmami pre ich schopnosť produkovať faktory virulencie. Na základe Správy o rezistencii na antibiotiká z roku 2019 sa v USA každý rok vyskytne viac ako 2,8 milióna infekcií baktériami rezistentnými na antibiotiká, ktoré spôsobujú smrť viac ako 35 000 ľudí (Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2019). Ďalšou výzvou pre modernú antibiotickú terapiu je vysoká toxicita v súčasnosti používaných antimikrobiálnych liekov a následne aj závažné vedľajšie účinky, ktoré spôsobujú. Terapeutické dávky sú často príliš cytotoxické na použitie v liečbe (Qaralleh, 2019). Výskum naznačuje, že prírodné baktericídy môžu byť účinnou alternatívou k bežne používaným syntetickým, alebo polosyntetickým antimikrobiálnym liekom.

Antimikrobiálna aktivita tymianovej RS závisí od percentuálneho zloženia jeho hlavných zložiek (Kryvtsova et al., 2019). RS s vysokým percentom fenolických monoterpénov, predovšetkým tymolom, majú najsilnejšie antibakteriálne vlastnosti spojené s ich štruktúrou. Malé a lipofóbne častice môžu ľahko prekonať lipidové bariéry (Perez et al., 2019). Bunková membrána patogénov je vďaka svojmu hydrofóbnemu zloženiu cieľom zlúčenín RS. Štúdie o mechanizme antibakteriálnej aktivity tymolu naznačujú, že jeho schopnosť integrovať sa do lipidovej vrstvy bunkovej membrány zvyšuje zakrivenie povrchu. Hydrofilná časť molekuly interaguje s polárnou časťou membrány, zatiaľ čo hydrofóbny benzénový kruh a alifatické bočné reťazce sa ponoria do vnútornej časti biologickej membrány. To spôsobuje veľké zmeny v štruktúre membrány destabilizáciou lipidovej vrstvy, znížením elasticity a zvýšením tekutosti. Tento proces vedie k zvýšenej priepustnosti pre ióny draslíka a vodíka. Ovplyvňuje tiež





aktivitu vnútorných membránových proteínov, ako sú enzýmy a receptory. Po inkorporácii do bunkovej membrány tymol interaguje so svojimi zabudovanými proteínmi prostredníctvom rôznych nešpecifických mechanizmov, ktoré vedú k zmenám v konformácii a aktivite vnútorných a membránových proteínov. Napätie a destabilizácia bunkovej membrány teda môže byť vyvolaná prítomnosťou tymolu. Karvakol pôsobí na bakteriálnu membránu podobným spôsobom ako tymol. Izolované zlúčeniny majú silnejšie deštruktívne účinky ako RS, ktorý ich obsahuje (Liolios et al., 2009; Nazar et al., 2019; Ahmad et al., 2011).

Kryvtsova et al. (2019) študovali účinok *T. vulgaris* RS na rôzne typické bakteriálne kmene, vrátane (MRSA) metecilín-rezistentného *S. aureus* izolovaného z ústnej dutiny pacientov trpiacich parodontitídou a faryngitídou. Test aktivity antibiofilmu ukázal, že bakteriálny biofilm sa znížil o 53 % po vystavení najnižšej koncentrácii tymianovej RS (0,01 % v.v<sup>-1</sup>). Použitie vyššej koncentrácie (0,05 % v.v<sup>-1</sup>) viedlo k zníženiu štruktúry o 76 %. Najnižšia aktivita bola preukázaná proti *Streptococcus pyogenes* a *Escherichia coli*. Hlavnými zložkami prchavého oleja použitého v tomto výskume boli fenolické monoterpény vrátane tymolu. Tohidpour et al. (2010) tiež skúmali účinok *T. vulgaris* a *Eucalyptus globulus* Labill. RS na klinicky izolovanej MRSA. Zistilo sa, že tymianová RS, ktorá obsahovala tymol ako hlavnú zložku, vykazovala pre tieto mikroorganizmy lepšie vlastnosti inhibujúce rast ako eukalyptusová RS. Yuan et al. (2020) hodnotili aj účinok tymolu na biofilm MRSA a potenciálnu synergiu tymolu s vankomycínom, ktorý je antibiotikom voľby pre túto patogénnu infekciu. Thymol preukázal schopnosť inhibovať tvorbu biofilmu a eliminovať zrelý biofilm MRSA inhibíciou syntézy dôležitých zložiek biofilmu týchto baktérií, ako je polysacharidový intercelulárny adhezín (PIA) a extracelulárna DNA (eDNA), čo je dôležitý mechanizmus pre tvorbu *Staphylococcus aureus* biofilmu. Tieto štruktúry sú zodpovedné okrem iných funkcií za podporu bunkovej agregácie a adhézie k neutrálnym pevným povrchom, čo podmieňuje antibiotickú rezistenciu (Okshevsky et al., 2015; Kostoglou et al., 2020). Ani tymol ani vankomycín aplikované na kolónie MRSA v biofilme v použitých koncentráciách nepreukázali úplnú elimináciu baktérií; v kombinácii týchto zlúčenín sa však percento živých baktérií výrazne znížilo, čo naznačuje, že tymol je účinný pri podpore terapeutického účinku vankomycínu na biofilmy MRSA. Kerekes et al. (2013) študovali potenciálnu antimikrobiálnu inhibíciu tvorby biofilmu a mechanizmus snímania kvóra (QS) škoricovníkovej cejlónskej (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), majoránovej (*Origanum majorana* L.) a tymianovej



(*T. vulgaris*) RS a tri hlavné vybrané zlúčeniny z nich – trans-cinnamaldehyd, terpinén-4-ol a tymol. Spomedzi nich tymol vykazoval najsilnejšiu aktivitu proti jednodruhovým biofilmom *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida* a *S. aureus*. V štúdií na kultúrach polymikrobiálnych baktérií preukázala *T. vulgaris* RS silný účinok na zníženie biofilmu na *E. coli* a *L. monocytogenes* v koncentrácii 0,5 – 4 mg.ml<sup>-1</sup>. Na dvojruhovom (*L. monocytogenes* so *S. aureus*) biofilme tymiánová RS spôsobila zníženie rastu pri koncentrácii 0,2 – 1,5 mg.ml<sup>-1</sup> a smrť baktérií pri koncentrácii 0,2 mg.ml<sup>-1</sup>. Deštruktívny účinok tymianovej RS a tymolu na *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* a *P. putida* bol pozorovaný aj v štúdií s použitím elektrónového mikroskopu (SEM). Výskum uskutočnený Qaralleh (2019) preukázal silný účinok *T. capitata* L. RS na znižovanie biofilmu u *P. aeruginosa*, ktorý pravdepodobne súvisel aj s prítomnosťou tymolu ako hlavnej zložky RS. Zníženie biofilmu o 44,8 % a 49,8 % sa dosiahlo pri koncentrácii 0,0046 % (v.v<sup>-1</sup>), zatiaľ čo 99,6 % a 98,4 % zníženie (v závislosti od kmeňa *P. aeruginosa*) sa pozorovalo pri koncentrácii 0,041 % (v.v<sup>-1</sup>).

*Klebsiella pneumoniae* z čeľade Enterobacteriaceae je príčinou mnohých chronických nemocničných infekcií s vysokou mortalitou a predĺženou hospitalizáciou v dôsledku vysokej virulencie tohto patogénu, dynamicky sa rozvíjajúcej rezistencie na antibiotiká a obmedzených liečebných metód (Navon-Venezia et al., 2017). V štúdií Mohamed et al. (2018) na kmeňoch *K. pneumoniae* tvoriacich biofilm bola preukázaná schopnosť eradikácie biofilmu od 80,1 do 98 % RS tymianu v rôznych koncentráciách. Hlavnou zložkou zodpovednou za tieto antibakteriálne vlastnosti bol tymol. Čistý tymol (5 µg.ml<sup>-1</sup>) bol tiež testovaný a bola potvrdená jeho schopnosť znižovať biofilm. Schopnosť znížiť životaschopnosť patogénu však nebola preukázaná. Silný synergizmus v pôsobení na životaschopnosť buniek sa pozoroval pri použití tymianovej RS a tymolu s ciprofloxacínom. Použitie RS umožnilo zníženie dávky antibiotika v bunkách tvoriacich biofilm aj v planktónových bunkách. Výsledky štúdie naznačujú, že kombinácia tymianovej RS a tymolu s týmto antibiotikom by mohla znížiť jeho možné toxické účinky a náklady na liečbu.

## 1.6.2 Antifungálna aktivita

### Aktivita tymolu pri kryptokokóze

Kryptokokóza je systémová mykóza spôsobená hubami rodu *Cryptococcus*, najčastejšie druhom *C. neoformans* (Virella, 1999). V poslednom desaťročí sa





percento infekcií *C. gattii* zvýšilo, zatiaľ čo infekcie druhmi *C. albidus* a *C. laurentii* sú zriedkavé (Zavala a Baddley, 2020). Tento patogén napáda najmä dýchací a nervový systém, spôsobuje zápal pľúc, alebo meningitídu (Virella, 1999; Rohatgi a Pirofski, 2015). Toto ochorenie postihuje najmä imunokompromitovaných pacientov, najmä pacientov s AIDS (Quintero et al., 2019). Každý rok sa na celom svete vyskytne viac ako 223 000 prípadov kryptokokovej meningitídy, z ktorých približne 181 000 je smrteľných (Zavala a Baddley, 2020). Táto infekcia je často spojená s katetrizáciou pacienta, umelými srdcovými chlopnami, alebo dialýzou (Ajesh a Sreejith, 2012; Martinez a Casadevall, 2015). Liečba takéhoto invazívneho ochorenia je problematická kvôli schopnosti *C. neoformans* a *C. laurentii* produkovať extracelulárnu maticu biofilmu bohatú na polysacharidy. Vďaka tomu sú kryptokokové bunky odolné voči štandardnej liečbe, ako sú azolové antifungálne látky. Amfotericín B je účinný pri liečbe *Cryptococcus* spp. infekcie, ale koncentrácie proti hubovým biofilmom prekračujú maximálne dávky, čo môže viesť k toxickým symptómom, najmä k poškodeniu obličiek. Bunky húb asociované s biofilmom sú chránené pred fagocytózou makrofágov, čo zvyšuje ich odolnosť. Preto je dôležité hľadať nové účinné látky proti kmeňom *Cryptococcus*. Kumari et al. (2017) skúmali antifungálnu aktivitu rôznych zložiek Lamiaceae RS proti planktonickým bunkám *C. neoformans* a *C. laurentii*. Použilo sa šesť účinných látok: tymol, karvakrol, eugenol, citral, cinnamaldehyd a mentol. Ukázalo sa, že najlepší antifungálny účinok má tymol a karvakrol, ktorý inhiboval planktonické bunky druhov *Cryptococcus*, tvorbu biofilmu a rast. Výsledky tejto štúdie sa porovnávali so štandardnou liečbou amfotericínom B, nystatínom a flukonazolom. Tieto lieky vykazovali antifungálnu aktivitu proti planktonickým formám *Cryptococcus* v nižšej minimálnej inhibičnej koncentrácii (MIC) v porovnaní s tymolom a karvakrolom. Koncentrácie týchto liekov na eradikáciu biofilmu však boli 32 – 64 krát vyššie ako MIC pre planktonické formy, zatiaľ čo tymol a karvakrol boli účinné na zníženie biofilmu pri koncentráciách 4 – 8 vyšších ako MIC. Preto sa dospelo k záveru, že biofilm *C. neoformans* a *C. laurentii* boli oveľa citlivejšie na tymol, alebo karvakrol v porovnaní so štandardnými terapiami. Štúdia tiež odhalila, že biofilm *C. laurentii* bol citlivejší na aktívne zložky RS v porovnaní s *C. neoformans*. Toto bolo potvrdené elektrónovým mikroskopom na kolóniách húb ošetrených tymolom. Výrazné zníženie počtu buniek spolu s deformovanou a perforovanou vonkajšou bunkovou membránou spôsobené prienikom tymolu do vonkajšej vrstvy bunkovej membrány vedie k expanzii dipalmitoylfosfatidylcholínu (DPPC). To znižuje



elasticitu membrány a narúša lipidovú vrstvu, čo spôsobuje bunkovú smrť rýchlym odtokom intracelulárnych zložiek (Ferreira et al., 2016).

### 1.6.3 Ďalšie antifungálne vlastnosti

Ergosterol je jedinečný sterol nachádzajúci sa iba v bunkovej membráne húb, dôležitý pre ich správny rast a fungovanie. Preto zlúčeniny ovplyvňujúce jeho hladinu môžu mať antifungálnu aktivitu. Pravdepodobný antifungálny mechanizmus tymolu je založený na účinku metabolizmu mastných kyselín vrátane ergosterolu v bunke huby. Vedie okrem iného k zvýšenej koncentrácii reaktívnych foriem kyslíka a oxidačnému stresu, čo spôsobuje pokles extracelulárnej polymérnej matrice (EPS) a kapsulárneho polysacharidu. Zníženie ergosterolu bolo pozorované v bunkových membránach *Candida* a *Cryptococcus* liečených tymolom, čo spôsobilo narušenie integrity membrány, poruchy enzýmov spojených s membránou, rozsiahle poškodenie a v dôsledku toho bunkovú smrť (Soković et al., 2009; Kumari et al., 2019). Al-Shahrani et al. (2017) študovali antifungálnu aktivitu *T. vulgaris* RS na klinických kmeňoch *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. (*A. flavus*, *A. niger*) a *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr* a *C. parapsilosis*). Výsledky potvrdili, že táto RS má silné antifungálne vlastnosti proti všetkým kmeňom v koncentráciách v rozmedzí od 0,5 do 10 mg.ml<sup>-1</sup>. Preto môže byť účinnou alternatívou k súčasne používaným antimykotickým liekom, ako je amfotericín B, ktoré majú vysoký toxický potenciál.

Kyselina kaprylová je jednou z mnohých nasýtených mastných kyselín, ktoré sa nachádzajú v lipidoch rastlinného a živočíšneho pôvodu. Tymol, alebo karvakrol v kombinácii s kyselinou kaprylovou má synergickú antifungálnu aktivitu (Pohl et al. 2011). Mechanizmus antifungálnej aktivity je spojený so schopnosťou kyseliny kaprylovej zabudovať sa do lipidovej vrstvy, čo zvyšuje tekutosť bunkovej membrány huby, narúša jej štruktúru a funkciu a spôsobuje konformačné zmeny membránových proteínov, uvoľňovanie intracelulárnych zložiek a dezintegráciu buniek (Avis a Bélanger, 2001). V štúdiu Bae a Rhee (2019) sa eliminácia *C. albicans* dosiahla počas niekoľkých minút expozície kyseline kaprylovej (1 – 1,5 mM) s tymolom, alebo karvakrolom (0,5 – 1,5 mM). Táto kombinácia umožnila znížiť dávku kyseliny kaprylovej, a tým aj možné toxické účinky. Synergizmus týchto kombinácií môže spôsobiť zvýšený prechod týchto fenolických monoterpénov do bunky ako rozrušenie hubovej membrány vyvolané kyselinou kaprylovou. Tento druh kombinácie by sa teda mohol použiť pri liečbe plesňových infekcií spôsobených *C. albicans*.



## 2 Cieľ práce

Cieľom vedeckej monografie bola mikrobiota hovädzieho mäsa spracovaného sous vide metódou po aplikácii rozmarínovej a tymianovej rastlinnej silice a patogénnych mikroorganizmov druhu *Listeria monocytogenes* a *Salmonella enterica*.

Vo vedeckej monografii sme sa zamerali na hodnotenie:

- počtu koliformných baktérií,
- celkového počtu mikroorganizmov,
- baktérie *Listeria monocytogenes*,
- baktérie *Salmonella enterica* za použitia klasických mikrobiologických metód.

Čisté kultúry izolovaných baktérií boli identifikované hmotnostnou spektrometriou MALDI-TOF MS Biotyper a následne percentuálne spracované do tabuliek a obrázkov.



## 3 Metodika práce

### 3.1 Rastlinné silice, použité mikroorganizmy, hovädzie mäso

Na sledovanie antimikrobiálnej aktivity bola použitá rozmarínová (*Rosmarinus officinalis*) a tymianová (*Thymus zygis*) silica, ktoré boli zakúpené od firmy Hanus s.r.o. (Nitra, Slovensko). Rastlinné silice sa zmiešali so slnečnicovým olejom, voľne dostupnom v obchodnej sieti, v koncentrácii 2 %.

Na mikrobiálnu kontamináciu vzoriek hovädzieho mäsa zo sviečkovej (*muscles psoas major*) bola použitá bakteriálna kultúra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (CCM 4420) a *Listeria monocytogenes* (CCM 4699) s koncentráciou 0,5 McFarlanda ( $1,5 \times 10^8$ ) (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno). Bakteriálne kultúry boli pripravené v tekutom živnom médiu Müller Hinton bujón a kultivovali sa cez noc pri teplote 37 °C.

V obchodnej sieti bolo zakúpené hovädzie mäso zo sviečkovej, približne 1 kg, ktoré bolo použité na analýzu. Mäso bolo zo slovenskej produkcie.

#### 3.1.1 Príprava vzorky

Hovädzie mäso zakúpené v obchodnej sieti bolo spracované na použitie v laboratóriu aplikovanej bakteriológie vo výskumnom centre AgroBioTech, SPU Nitra.

Na odobratie vzorky sa použili: sterilný kuchynský nôž, sterilná silikónová podložka na krájanie, taktiež sterilná pinzeta, sterilné Petriho misky. Sterilným kuchynským nožom sa odoberali približne rovnako veľké kúsky vzorky o hmotnosti 5 g ( $\pm 0.1$  g). Potom sa vzorky mäsa odvážili na digitálnych váhach, ktoré sa pred použitím povrchovo dezinfikovali etanolom. Následne sa takto pripravené vzorky o požadovanej hmotnosti vložili pinzetou do vopred pripraveného špeciálneho vrečka určeného na vákuovanie a pripravené na sous vide, v ktorom sa vzorka varila vo vodnom kúpeli, kde bola nastavená teplota a čas varenia.

Takto sa pripravilo spolu 128 vreciek, s ktorými sa ďalej pracovalo. V laboratóriu sa vrecká rozdelili na 2 skupiny po 64 vreciek a každá skupina sa označila, akým spôsobom bola ošetrená, a to teplota a čas použité pri varení sous vide. Vzorky sa rozdelili a označili podľa silice, baktérie, teploty a času. Do vreciek okrem kontroly sa pridalo 100  $\mu$ l pripravenej bakteriálnej kultúry pomocou mikropipety a hneď sa vákuovo uzavreli pomocou vákuovej baličky. Do vreciek so vzorkami sa pridalo 100  $\mu$ l bakteriálnej kultúry a 100  $\mu$ l rastlinného oleja zmiešaného s rastlinou silicou v požadovanej koncentrácii taktiež sa hneď uzavreli pomocou vákuovej baličky.



Uzavreté vrecká sa odložili na 24 hodín do chladničky pri teplote 4 – 6 °C. Schéma prípravy vzoriek je uvedená v nasledovnej kapitole.

### 3.2 Príprava sous vide vzoriek

Varenie vákuovo zabalených vreciek so vzorkami prebiehalo vo vodnom kúpeli (Memmert WNB7), ktorý sa pred samotným varením nechal temperovať na požadovanú počiatočnú teplotu. Vrecká so vzorkami sa vkladali do vodného kúpeľa naraz, podľa schémy v Tab. 1 a Tab.2, podľa použitej silice a mikroorganizmu.

Začínalo sa variť pri teplote 50 °C a pokračovalo sa až na teplotu 65 °C po dobu 5 až 25 min. Vodný kúpeľ sa temperoval za každým na teplotu a čas uvedenú v schéme tabuliek. V momente vloženia vreciek do vodného kúpeľa sa začal sledovať čas na stopkách. Po uplynutí stanoveného času sa vrecká so vzorkami ihneď vybrali a vložili do misy so studenou vodou na schladenie. V každom variante bola použitá jedna vzorka, ako kontrola čerstvého hovädzieho mäsa, bez použitia mikroorganizmu a rastlinnej silice.

**Tabuľka 1.** Schéma označovania vzoriek hovädzej sviečkovej a podmienky tepelného spracovania metódou sous vide

Čas / Teplota	5 min.	15 min.	20 min.	25 min.
50 °C	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS
55 °C	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS
60 °C	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS
65 °C	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS	Kontrola <i>Salmonella enterica</i> + rozmarínová RS



**Tabuľka 2.** Schéma označovania vzoriek hovädzej sviečkovej a podmienky tepelného spracovania metódou sous vide

<b>Čas</b> <b>Teplota</b>	<b>5 min.</b>	<b>15 min.</b>	<b>20 min.</b>	<b>25 min.</b>
<b>50 °C</b>	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS
<b>55 °C</b>	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS
<b>60 °C</b>	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS
<b>65 °C</b>	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS	Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> + tymianová RS

### 3.3 Príprava vzoriek na desiatkové riedenie

#### 3.3.1 Príprava fyziologického roztoku s peptónom

Fyziologický roztok potrebný pre prípravu riedenia bol vyrobený z 9,5 g NaCl, kazeínových peptónov rozpustený v jednom litri destilovanej vody. NaCl sa dôkladne zamiešalo a varilo počas doby jednej minúty za intenzívneho miešania, až pokým sa úplne neroztopilo. Následne sa prelialo do pripravených nádob a sterilizovalo v autokláve po dobu 15 minút pri 121 °C. Získaný fyziologický roztok sa skladoval pri teplote 2 – 8 °C. Výsledná hodnota pH pripraveného fyziologického roztoku pri teplote 25 °C je 7,0±0,2.

Zloženie fyziologického roztoku :

- chlorid sodný 8,5 g,
- kazeínové peptóny 1 g,
- destilovaná voda 1000 ml.



### 3.3.2 Príprava vzoriek hovädzieho mäsa na mikrobiologickú analýzu

Pracovné nástroje použité pri pokusoch, ako kovový skalpel, Petriho misky, pinzetu, silikónovú podložku, 100 ml odmerné banky, digitálne váhy, boli sterilizované etanolom. Vákuovo zabalené vrecká so vzorkami sa postupne, opatrne otvárali skalpelom na silikónovej podložke. Z vreciek sa pomocou pinzety, opálenej v plameni, vybrali vzorky na Petriho misku. Pomocou skalpela, sa odobrala a navážila na digitálnych váhach  $5 \pm 0,1$  g vzorky a pinzetou sa preniesla do pripravených, umytých, sterilných odmerných baniek, ktoré sa označili rovnako, ako vrecko. Po každom jednom odobratí vzorky sa nástroje dezinfikovali etanolom, resp. kovový skalpel a pinzeta sa vypálila v plameni kahana. Opakovaným postupom sa pripravilo 36 baniek so vzorkami.

Do každej banky s 5 g vzorky sa pridalo 45 ml fyziologického roztoku pomocou pipety, čím sa dosiahlo riedenie  $10^{-1}$ . Následne sa banky so vzorkami umiestnili na 30 minút do trepačky na premiešanie.

## 3.4 Príprava kultivačných médií

### 3.4.1 XLD agar

XLD agar (Xylose-Lysine Deoxycholate Agar (SigmaAldrich®, St. Louis, USA)) je selektívne médium a odporúča sa na izoláciu a vyčíslenie *Salmonella typhi* a iných druhov *Salmonella*.

Príprava: rozpustilo sa 55,43 g v 1000 ml destilovanej vody, zahrievaním s častým miešaním, pokým médium nevrie. Médium sa neautoklávuje. Okamžite sa preniesie do vodného kúpeľa pri teplote  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po ochladení sa naleje do sterilných Petriho misiek.

Na prípravu, nám postačujúceho množstva agaru, sa použilo 500 ml destilovanej vody a polovičný návažok agaru a výsledné pH bolo  $7,4 \pm 0,2$  (pri  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Zloženie:	g.l <sup>-1</sup>
• kvasničný extrakt	3,00
• laktóza	7,50
• sacharóza	7,50
• xylóza	3,75
• L-lyzín hydrochlorid	5,00



- chlorid sodný 5,00
- citrát amónno-železitý 0,80
- tiosíran sodný 6,80
- deoxycholát sodný 1,00
- fenolová červená 0,08
- agar 15,00

Tvorí sa na ňom kolónia pri teplote 37 °C. STN EN ISO 9308 – 1. Na stuhnutú a vychladnutú živnú pôdu v Petriho miske sa pomocou mikropipety napipetuje po 1 ml suspenzie a rozotrie L- tyčinkou. Rovnako sa postupuje s ďalšími Petriho miskami, pričom sa vždy použije nová špička na mikropipetu a nová L-tyčinka na rozotieranie.

Každá Petriho miska sa označí rovnako ako banka, z ktorej sa pipetovalo. Petriho misky sa inkubujú v termostate pri teplote 37±1 °C počas 48 hodín. Po skončení kultivácie sa na agare sledujú vyrastené kolónie.

Na ostatné druhy agarov (TSA, TSI a XLD) sme mikroorganizmy očkovali a inkubovali rovnako. Po stanovenom čase kultivácie baktérií v inkubátore sa vyrastené kolónie baktérií spočítajú.

### 3.4.2 Oxford agar

Na kultivácii listerií sa použil Oxford agar. Selektívne a diagnostické médium na detekciu *Listeria monocytogenes*, sa pripravuje z Listeria Selective Agar Base a Listeria Selective Supplement SR0140, alebo Modified Listeria Selective Supplement (Oxford) SR0206.

Príprava: rozpustili sme 27,75 g selektívneho agarového základu Listeria (Oxfordská formulácia) v 500 ml destilovanej vody. Jemne sa priviedol agar do varu, aby sa rozpustil. Sterilizovali sme ho v autokláve pri 121 °C počas 15 minút. Ochladili sme ho na 50 °C a asepticky pridali obsah jednej injekčnej liekovky Listeria Selective Supplement (Oxford Formulation), alebo Modified Listeria Selective Supplement (Oxford) SR0206, SR0140 rekonštituovanej s 5 ml 70 % etanolu. Dobre sme premiešali a naliali ho do sterilných Petriho misiek. Konečné pH by malo byť pH 7±0,2.

Zloženie: g.l<sup>-1</sup>

- columbia Blood Agar Base 39.0
- aesculin 1.0





- citran železito-amónny 0,5
- chlorid lítny 15,0

Potravinová infekcia *L. monocytogenes* vyvolala zvýšený záujem o detekciu tohto organizmu v potravinách, v životnom prostredí a v patologických vzorkách od ľudí aj zvierat. *L. monocytogenes* hydrolyzuje aeskulín, pričom vytvára čierne zóny okolo kolónií v dôsledku tvorby čiernych fenolických zlúčenín železa odvodených z aglukónu. Gramnegatívne baktérie sú úplne inhibované. Väčšina nežiaducich grampozitívnych druhov je potlačená, ale niektoré kmene enterokokov sú inhibované a vykazujú slabú aeskulínovú reakciu, zvyčajne po 40 hodinách inkubácie. Niektoré stafylokoky môžu rásť ako aeskulín-negatívne kolónie. Typické kolónie *L. monocytogenes* sú takmer vždy viditeľné po 24 hodinách, ale inkubácia by mala pokračovať ďalších 24 hodín, aby sa zistili pomaly rastúce kmene.

### 3.4.3 VRBL agar

VRBL agar je selektívne médium na izoláciu a stanovenie počtu koliformných baktérií vo vode, mlieku a iných mliečnych výrobkoch, mliekarenských zariadení a iných potravin.

Príprava: zložky, dehydrovaný prášok, sa suspenduje vo vode (39,5 g v 1 l destilovanej vody). Médium sa varí niekoľko sekúnd, kým sa zložky úplne nerozpustia. Živný agar sa neutoklavuje. Ochladí sa na 47 °C a naleje do Petriho misky. Konečné pH by malo byť 7,5±0,2.

Zloženie:	g.l <sup>-1</sup>
• peptón	7,00
• chlorid sodný	5,00
• kvasnicový extrakt	3,00
• ceutrálna červená	0,03
• žlčové soli	1,50
• kryštalová violet'	0,002

Mikroorganizmy, ktoré rýchlo fermentujú laktózu, vytvárajú fialové kolónie obklopené fialovými plochami (v prípade silného okyslenia spojeného s použitím



laktózy). Mikroorganizmy, ktoré nefermentujú laktózu, alebo neskoro, dávajú bledé kolónie so zelenkastými plochami.

Koliformné baktérie sú všeobecne definované svojou schopnosťou rýchlo fermentovať laktózu, produkovať kyselinu a plyn, zvyčajne do 24 hodín. Rody, o ktorých sa všeobecne predpokladá, že patria do tejto skupiny sú *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* a najmä *Escherichia coli*. Avšak druhy v iných rodoch, napr. *Erwinia* a *Serratia* môžu tiež fermentovať laktózu, aj keď pomaly, a niektoré kmene *Citrobacter* a *Klebsiella*, ako aj *Salmonella arizonae* a *Hafnia alvei* sa prejavujú oneskorene, alebo variabilne.

#### 3.4.4 PCA agar

PCA agar, alebo Plate Count Agar (SigmaAldrich®, St. Louis, USA) je neselektívne médium pre celkový počet mikroorganizmov (CPM) v mlieku, iných mliečnych výrobkoch, potravinách, vode a odpadovej vode.

Príprava agaru: Rozmiešalo sa 17,5 g v 1 l destilovanej vody a rozpustilo sa varením s častým miešaním, následne sa premiešalo a rozdelilo do konečných nádob. Sterilizácia média prebehla autoklávaním pri teplote 121 °C počas 15 minút. Na prípravu, nám postačujúceho množstva agaru, sa použilo 500 ml destilovanej vody a polovičný návažok agaru. Výsledné pH je (pri 25 °C) 7,0±0,2.

Zloženie:	g.l <sup>-1</sup>
• tryptón (enzymatický kazeínový hydrolyzát )	5,00
• kvasnicový extrakt	2,50
• dextróza	1,00
• agar	9,00

Celkový počet mikroorganizmov (CPM) sa stanovuje použitím PCA agaru. Tvorí sa v ňom typické kolónie pri teplote 30 °C. STN 4833 – 1.

Do pripravených sterilných Petriho misiek sme nalievali 15-20 ml sterilného živného média a kruhovým pohybom sme zabezpečili, aby bolo rovnomerne rozliate po celej ploche Petriho misky. Agar v takto zaliatych Petriho miskách sme nechali vychladnúť niekoľko minút. Na vychladnuté a stuhnuté kultivačné médium sme pomocou mikropipety napipetovali 1 ml suspenzie (pokiaľ možno bez väčších častí mäsa) z pretrepaných baniek a rozotreli L- tyčinku po celom povrchu živnej pôdy.



Rovnako sme postupovali pri ďalších Petriho miskách, pričom sme vždy použili novú špičku na mikropipetu a novú L-tyčinku na rozotieranie. Každú Petriho misku sme označili rovnako ako banka, z ktorej sme pipetovali. Naočkované Petriho misky sme inkubovali pri teplote 3 °C 48 hodín.

### 3.4.5 TSA agar

Tryptónový agar, alebo Tryptone Soya agar (HiMedia®, India), je univerzálne médium používané na kultiváciu širokej škály mikroorganizmov a na testovanie sterility vo farmaceutických postupoch.

Príprava: rozpustilo sa 45 g v 1 l destilovanej vody. Médium sa úplne rozpustí počas zahrievania. Sterilizácia autoklávaním pri 121 °C počas 15 minút. Médium sa ochladí na 45 až 50 °C, dobre sa premieša a naleje do sterilných Petriho misiek.

Na prípravu, nám postačujúceho množstva agaru, sa použilo 500 ml destilovanej vody a polovičný návažok agaru. Výsledné pH (pri 25 °C) je 7.3±0.2.

Zloženie :	g.l <sup>-1</sup>
• tryptón	15,00
• sójový peptón	5,00
• chlorid sodný	5,00
• agar	15,00

### 3.5 Izolácia a identifikácia mikroorganizmov

Vybrané kolónie z celkového počtu baktérií a z ostatných agarov boli ďalej potvrdené pomocou MALDI-TOF MS Biotyper. Vybrané, vyrastené kolónie z jednotlivých Petriho misiek boli kultivované na TSA agare (Tryptone Soya Agar) spôsobom, že každá Petriho miska s TSA agarom bola rozdelená na 8 častí. Na každú jednu časť Petriho misky bola prenesená bakteriálna kultúra pomocou bakteriologického očka. Takto naočkované Petriho misky sme inkubovali v inkubátore pri teplote 37 °C a 24 hodín.

Izolované druhy mikroorganizmov sme identifikovali pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF (**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization-**T**ime of **F**light).

Jedným z prvých krokov identifikácie mikroorganizmov je využitie metódy extrakcie pomocou etanolu (99,8 %) a kyseliny mravčej (70 %).



Kultúry mikroorganizmov sme identifikovali hneď po stanovenej dobe kultivácie. Vyberali sme kultúry, ktoré vyrástli v ohraničenej časti a neprerástli cez viacero častí Petriho misky. Na odoberanie kultúr mikroorganizmov z Petriho misiek sme použili bakteriologické očká, ktoré sme po každom odobratí bakteriálnej kultúry vypálili (sterilizovali) v plameni kahana.

Pomocou bakteriologického očka sme odoberali malé množstvo vyrastenej kolónie, ktoré sme rozmiešali v Ependorfke s 300  $\mu$ l ultra čistej vody. K tomuto obsahu sme potom napipetovali 900  $\mu$ l absolútneho etanolu (99,8 %). Takto pripravené vzorky sme následne centrifugovali pri maximálnych otáčkach (12 000 xg) po dobu 2 minút. Po 2 minútach v centrifúge sme kvapalnú časť (supernatant) opatrne zliali do pripravenej kadičky na odpad a zvyšné množstvo etanolu sme jemne oklepali na čistý filtračný papier. Pelet, ktorý zostal na dne Ependorfky sme nechali sušiť krátky čas pri laboratórnej teplote. K uschnutému peletu sme napipetovali stanovený objem kyseliny mravčej (70 %) pomocou mikropipety, ktorý sme rozmiešali s peletom, a následne sme pridali novou mikropipetou rovnaký objem acetonitrilu (100 %) a znova premiešali pipetovaním. Pri vzorkách sme použili 30  $\mu$ l kyseliny mravčej a rovnaké množstvo, teda 30  $\mu$ l acetonitrilu. Takto upravené vzorky sme vložili znova do centrifúgy a nechali centrifugovať opäť, pri najvyšších otáčkach (12 000 xg) po dobu 2 minút. Zo supernatantu, kvapalnej časti, sme mikropipetou opatrne napipetovali 1  $\mu$ l na čistú, oceľovú MALDI platničku. Dávali sme pri tom pozor, aby sa nám jednotlivé už napipetované množstvá supernatantu na MALDI platničke nezlievali. Platničku sme nechali voľne uschnúť pri laboratórnej teplote. Po zaschnutí sme vzorky prekryli 1  $\mu$ l nasýteným roztokom kyseliny  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyškoricovej (MALDI matrica). Po zaschnutí matrice bola vzorka pripravená na okamžitú identifikáciu hmotnostným spektrometrom. Flex control (verzia 3.4) je základný program pomocou ktorého boli hmotnostné spektrá merané v reálnom čase. Nový projekt identifikácie sme zadávali cez softvér Real-time classification (verzia 3.1). V tomto kroku bola zvolená príslušná databáza mikroorganizmov (Bruker taxonomy), s ktorou sme porovnávali jednotlivé hmotnostné spektrá našich vzoriek.

Všetky merania boli vykonávané prostredníctvom prístroja hmotnostného spektrometra MALDI-TOF Microflex™ LT od nemeckej spoločnosti Bruker Daltonics.



### **3.6 Štatistické vyhodnotenie výsledkov**

Na štatistické vyhodnotenie výsledkov sa použil program Excel. Vyhodnotené boli výsledky vo forme aritmetického priemeru, štandardnej odchýlky a medzi jednotlivými skupinami, boli vypočítané štatisticky významné rozdiely t-tesom.



## 4 Výsledky a diskusia

### 4.1 Mikrobiologická analýza sous vide hovädzieho mäsa po aplikácii rozmarínovej rastlinnej silice a baktérie *Salmonella enterica*

Produkty pripravené varením sous vide majú niekoľko výhod. Ekonomické výhody prípravy produktov pomocou varenia sous vide sú efektívnejšie využitie práce a vybavenia vďaka centralizovanej výrobe a predĺženiu trvanlivosti produktu vďaka vákuovému baleniu (Hyytiä-Trees et al., 2000). Sous vide varenie môže byť dobrým riešením na zníženie potravinového odpadu v podnikoch verejného stravovania, kde nie je možné predvídať dopyt po konkrétnych položkách jedálneho lístka (Głuchowski et al., 2020). V produktoch sous vide je rast aeróbnych baktérií obmedzený a riziko kontaminácie produktu je znížené. Tiež je optimalizovaný prenos tepla do produktov vo vákuovom balení. Varením sous vide sa môžu vyrábať potravinové produkty s konštantnými, spoľahlivými a reprodukovateľnými organoleptickými vlastnosťami. Plastová fólia zabraňuje strate prchavých chutí a vody počas varenia v režime sous vide, čím sa zlepšuje organoleptická kvalita, podporuje šťavnatosť a jemnosť mäsa a zvyšuje sa výťažnosť produktu. Spracovanie sous vide varenie zachováva nutričnú hodnotu produktov. Minimalizuje obsah škodlivých chemikálií, ktoré vznikajú pri nedokonalom spaľovaní, alebo pyrolýze organických látok a koncentrujú sa v mäse pri vyprážaní, grilovaní a údení (Kilibarda et al., 2018).

Cieľom našej práce bolo sledovanie mikrobiologickej kontaminácie sous vide hovädzieho mäsa po aplikácii rozmarínovej rastlinnej silice v kombinácii s baktériou *S. enterica*. V práci sme sa zamerali na sledovanie celkového počtu mikroorganizmov, koliformných baktérií a baktérií *S. enterica* počas 5, 15, 20 a 25 minút pri teplote varenia 55, 60 a 65 °C po dobu 1 až 12 dní.

Tabuľka 3 uvádza výsledky celkového počtu mikroorganizmov. Vyhodnotením výsledkov sme zistili, že najnižší počet bol v skupine, kde bola použitá rozmarínová silica v kombinácii s *S. enterica* pri teplote 65 °C počas 20 min. a najvyšší počet bol v kontrolnej skupine bez ošetrenia pri teplote 50 °C počas 5 min., potom nasledovala vzorka vákuovo balená, ošetrená rozmarínovou silicou s aplikáciou *S. enterica* pri teplote 50 °C počas 5 min. Porovnaním vzoriek kontrolných a ošetrených sme zistili, že celkový počet mikroorganizmov počas prvého dňa vyšší v kontrolných skupinách. Pri použití teploty 65 °C počas 15 a 20 min. celkové počty boli nulové v oboch



skupinách. Počet koliformných baktérii bol zaznamenaný len v skupine, ktorá bola ošetrovaná baktériou *S. enterica* a rozmarínovou silicou pri teplote 50 °C počas 5, 10, 15 a 20 min. (obr. 1). *S. enterica* sa vyskytovala rovnako v tej istej skupine ako koliformné baktérie a jej počet klesal s teplotou a časom (obr. 2).

**Tabuľka 3.** Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a *S. enterica* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 1. dňa

Ošetrovanie	Teplota (°C)	Čas (min.)	Priemer	SD
K	50	5	3,71	0,07
HMSERS	50	5	3,34	0,18
K	50	10	3,69	0,14
HMSERS	50	10	2,90	0,10
K	50	15	3,47	0,19
HMSERS	50	15	2,65	0,08
K	50	20	3,44	0,11
HMSERS	50	20	2,54	0,11
K	55	5	3,26	0,04
HMSERS	55	5	2,51	0,04
K	55	10	3,15	0,03
HMSERS	55	10	2,25	0,10
K	55	15	3,10	0,01
HMSERS	55	15	2,21	0,11
K	55	20	2,88	0,09
HMSERS	55	20	1,93	0,06
K	60	5	2,66	0,06
HMSERS	60	5	1,71	0,08
K	60	10	2,57	0,05
HMSERS	60	10	1,59	0,05
K	60	15	2,38	0,06
HMSERS	60	15	1,31	0,10
K	60	20	2,23	0,09
HMSERS	60	20	1,19	0,04
K	65	5	2,03	0,06
HMSERS	65	5	1,05	0,04
K	65	10	1,31	0,04
HMSERS	65	10	1,01	0,01

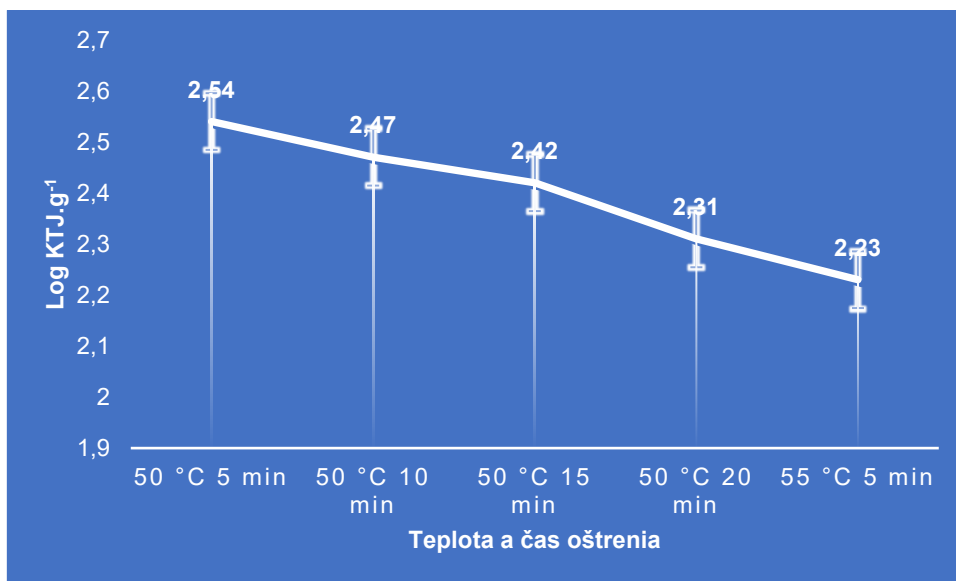
K – kontrola; HMSERS – hovädzie mäso ošetrované *S. enterica* a rozmarínovou silicou

Po tepelnom spracovaní sa celkový počet aeróbných mikroorganizmov znížil asi o 2 logaritmy a pohyboval sa od 1,10 do 2,01 log KTJ.g<sup>-1</sup>. Fekálna mikrobiota, Enterobacteriaceae a koaguláza-pozitívne stafylokoky boli v populácii stanovené na úrovni <1 log KTJ.g<sup>-1</sup>. Výsledky získané vo výskume naznačujú, že použité

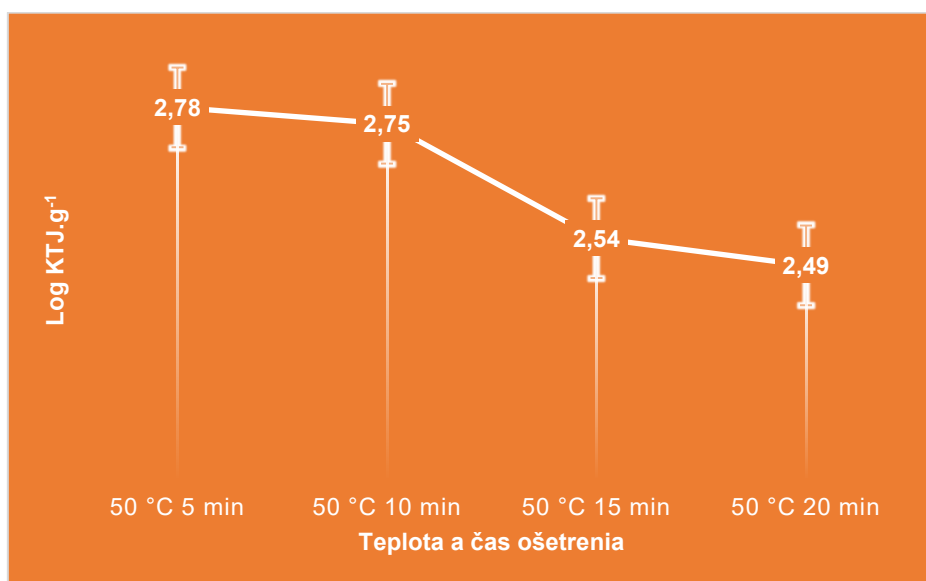




parametre spracovania sous vide boli dostatočné na zníženie mikrobioty v bravčovom karé. Inaktivačné účinky gramnegatívnych baktérií Enterobacteriaceae sú obzvlášť uspokojivé (Kurp et al., 2022). Iní autori tiež dosiahli zníženie populácie Enterobacteriaceae v bravčovom karé na  $<1 \text{ log KTJ.g}^{-1}$  (Díaz et al., 2008). V štúdií Jeong et al. (2018) uviedli účinnosť liečby sous vide vo vzťahu k fekálnej mikroflóre, pričom bola stanovená len časť koliformných baktérií čelade Enterobacteriaceae.



**Obrázok 1.** Počet koliformných baktérií v skupine oštrenej rozmarínovou RS a *S. enterica* ( $\text{log KTJ.g}^{-1}$ ) počas 1. dňa



**Obrázok 2.** Počet buniek *S. enterica* v skupine oštrenej rastlinou silicou a baktériou počas 1. dňa v  $\text{log KTJ.g}^{-1}$

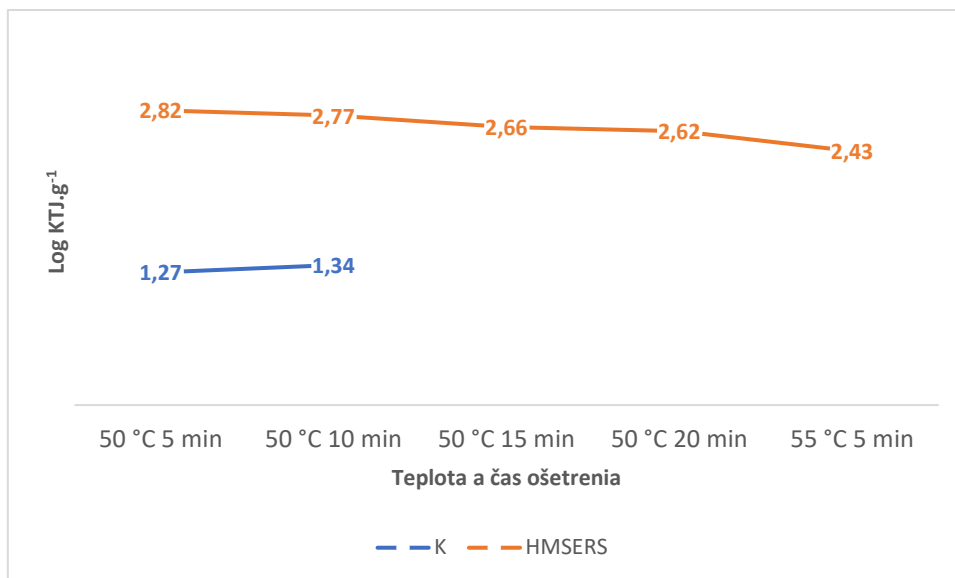


Ako ukazuje literatúra, rozsahy teplotných a časových režimov aplikovaných aj na rovnaké kusy mäsa sú veľmi široké, čo značne sťažuje praktické využitie tejto techniky. Navyše, dôraz na dlhé časy varenia na zabezpečenie mikrobiologickej bezpečnosti mäsa robí túto techniku časovo a energeticky náročnou. Okrem toho sú kombinované vedecké údaje o fyzikálno-chemických a mikrobiologických vlastnostiach, ako aj o senzorických vlastnostiach mäsa vareného metódou sous vide vzácne (Kurp et al., 2022).

**Tabuľka 4.** Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a *S. enterica* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 3. dňa

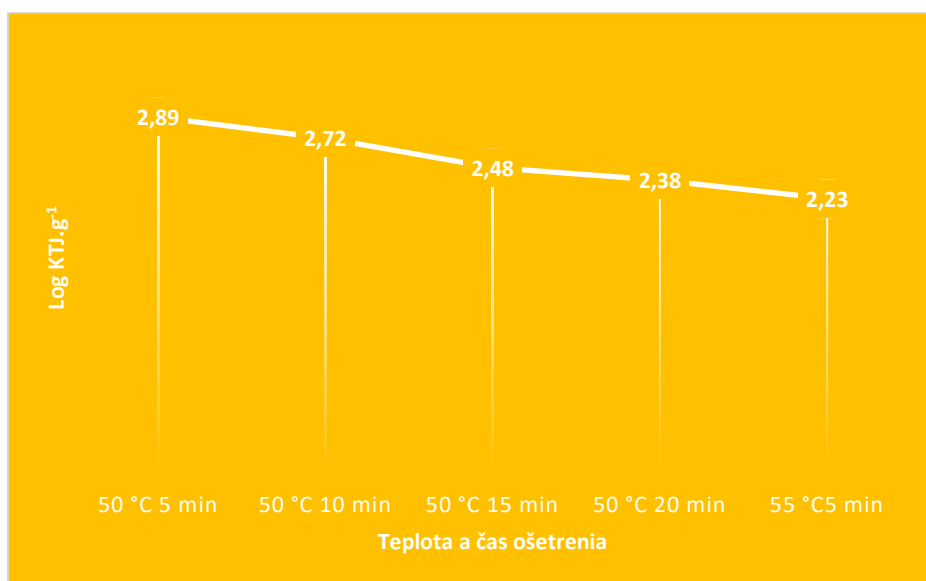
Ošetrovanie	Teplota (°C)	Čas (min.)	Priemer	SD
K	50	5	3,83	0,17
HMSERS	50	5	3,66	0,10
K	50	10	3,74	0,17
HMSERS	50	10	3,20	0,07
K	50	15	3,48	0,19
HMSERS	50	15	3,12	0,03
K	50	20	3,37	0,17
HMSERS	50	20	3,02	0,06
K	55	5	3,21	0,18
HMSERS	55	5	2,84	0,14
K	55	10	3,15	0,07
HMSERS	55	10	2,58	0,06
K	55	15	3,14	0,07
HMSERS	55	15	2,16	0,01
K	55	20	2,93	0,06
HMSERS	55	20	2,06	0,03
K	60	5	2,88	0,10
HMSERS	60	5	0,00	0,00
K	60	10	2,69	0,22
HMSERS	60	10	0,00	0,00
K	60	15	2,49	0,22
HMSERS	60	15	0,00	0,00
K	60	20	2,43	0,51
HMSERS	60	20	0,00	0,00
K	65	5	1,77	0,28
HMSERS	65	5	0,00	0,00
K	65	10	1,42	0,30
HMSERS	65	10	0,00	0,00

K – kontrola; HMSERS – hovädzie mäso ošetrované *S. enterica* a rozmarínovou silicou



**Obrázok 3.** Počet koliformných baktérií v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a *S. enterica* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 3. dňa

K – kontrola; HMSERS – hovädzie mäso ošetrené *S. enterica* a rozmarínovou silicou



**Obrázok 4.** Počet buniek *S. enterica* v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 3. dňa v log KTJ.g<sup>-1</sup>

V tabuľke 4 uvádzame výsledky celkového počtu mikroorganizmov. Vyhodnotením výsledkov sme zistili, že najnižší počet bol v kontrolnej skupine, kde bola použitá teplota 65 °C počas 20 min. a najvyšší počet bol v kontrolnej skupine bez ošetrenia pri teplote 50 °C počas 5 min., potom nasledovala vzorka vákuovo balená, ošetrená rozmarínovou silicou s aplikáciou *S. enterica* pri teplote 50 °C počas 5 min. Porovnaním vzoriek kontrolných a ošetrovaných sme zistili, že celkový počet

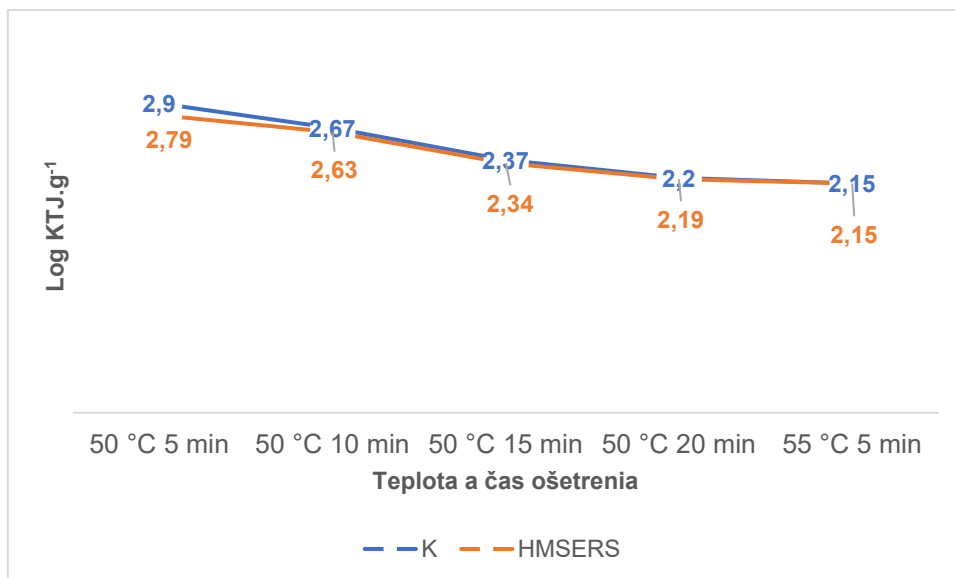


mikroorganizmov počas tretieho dňa vyšší v kontrolných skupinách a v skupine ošetrenej rozmarínovou silicou a baktériou *S. enterica* pri teplote 60 °C sa už baktérie nevyskytovali. Počet koliformných baktérii bol zaznamenaný v obidvoch skupinách pri teplote 50 °C počas 5, 10, 15 a 20 min. a 55 °C pri 5 min (obr. 3). *S. enterica* sa vyskytovala v skupinách, ktoré boli ošetrené rozmarínovou silicou pri teplote 50 °C a 55 °C počas 5 min. (obr. 4).

**Tabuľka 5.** Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a *S. enterica* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 6. dňa

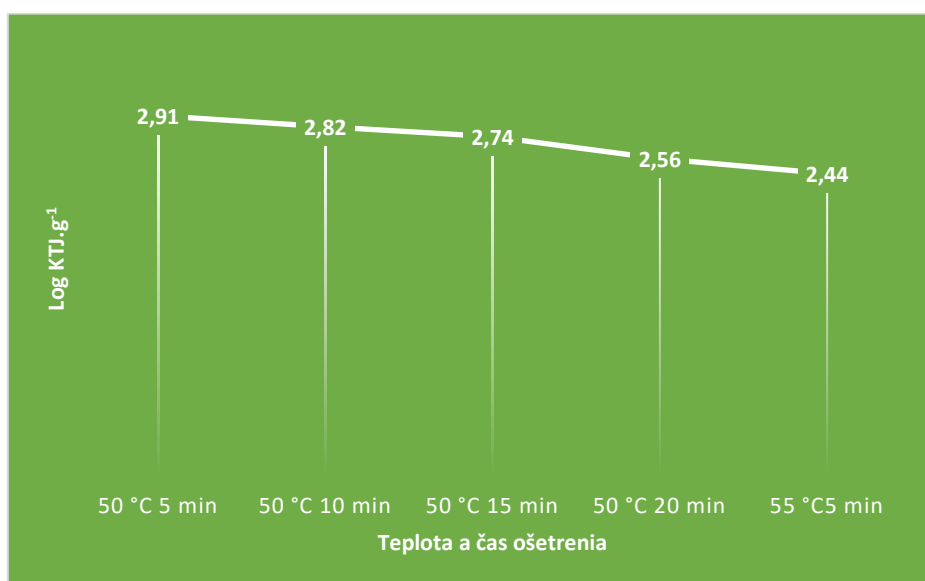
Ošetrovanie	Teplota (°C)	Čas (min.)	Priemer	SD
K	50	5	3,95	0,07
HMSERS	50	5	3,84	0,12
K	50	10	3,79	0,61
HMSERS	50	10	3,59	0,23
K	50	15	3,57	0,09
HMSERS	50	15	3,57	0,07
K	50	20	3,56	0,11
HMSERS	50	20	3,34	0,10
K	55	5	3,48	0,05
HMSERS	55	5	3,29	0,23
K	55	10	3,24	0,08
HMSERS	55	10	2,91	0,06
K	55	15	3,39	0,26
HMSERS	55	15	2,53	0,14
K	55	20	3,46	0,32
HMSERS	55	20	2,38	0,15
K	60	5	3,22	0,24
HMSERS	60	5	0,00	0,00
K	60	10	3,20	0,06
HMSERS	60	10	0,00	0,00
K	60	15	3,14	0,93
HMSERS	60	15	0,00	0,00
K	60	20	2,88	0,10
HMSERS	60	20	0,00	0,00
K	65	5	2,72	0,07
HMSERS	65	5	0,00	0,00
K	65	10	2,38	0,07
HMSERS	65	10	0,00	0,00
K	65	15	2,10	0,02
HMSERS	65	15	0,00	0,00
K	65	20	1,63	0,17
HMSERS	65	20	0,00	0,00

K – kontrola; HMSERS – hovädzie mäso ošetrené *S. enterica* a rozmarínovou silicou



**Obrázok 5.** Počet koliformných baktérií v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a *S. enterica* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 6. dňa

K – kontrola; HMSERS – hovädzie mäso ošetrené *S. enterica* a rozmarínovou silicou



**Obrázok 6.** Počet buniek *S. enterica* v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 6. dňa v log KTJ.g<sup>-1</sup>

Tabuľka 5 uvádza celkový počet mikroorganizmov po 6. dni skladovania. Najvyšší počet bol zistený v kontrolnej skupine, ktorá bola ošetrená metódou sous vide pri teplote 50 °C počas 5 min. Počet koliformných baktérií pri teplote 50 a 55 °C počas 5 min. bol vyšší v skupine ošetrenej rozmarínovou silicou a baktériou *S. enterica* (obr. 5). Počet buniek sa oproti prvému a tretiemu dňu zvýšil (obr. 6).



**Tabuľka 6.** Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a *S. enterica* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 9. dňa

Ošetreni	Teplota (°C)	Čas (min.)	Priemer	SD
K	50	5	4,15	0,07
HMSERS	50	5	3,96	0,17
K	50	10	3,98	0,10
HMSERS	50	10	3,74	0,11
K	50	15	3,87	0,08
HMSERS	50	15	3,63	0,17
K	50	20	3,62	0,16
HMSERS	50	20	3,44	0,07
K	55	5	3,51	0,05
HMSERS	55	5	3,41	0,31
K	55	10	3,19	0,13
HMSERS	55	10	2,91	0,06
K	55	15	3,27	0,14
HMSERS	55	15	3,07	0,08
K	55	20	3,63	0,33
HMSERS	55	20	2,81	0,12
K	60	5	3,31	0,20
HMSERS	60	5	0,00	0,00
K	60	10	3,22	0,11
HMSERS	60	10	0,00	0,00
K	60	15	3,15	0,07
HMSERS	60	15	0,00	0,00
K	60	20	3,05	0,07
HMSERS	60	20	0,00	0,00
K	65	5	2,82	0,23
HMSERS	65	5	0,00	0,00
K	65	10	2,41	0,08
HMSERS	65	10	0,00	0,00
K	65	15	2,21	0,21
HMSERS	65	15	0,00	0,00
K	65	20	1,74	0,06
HMSERS	65	20	0,00	0,00

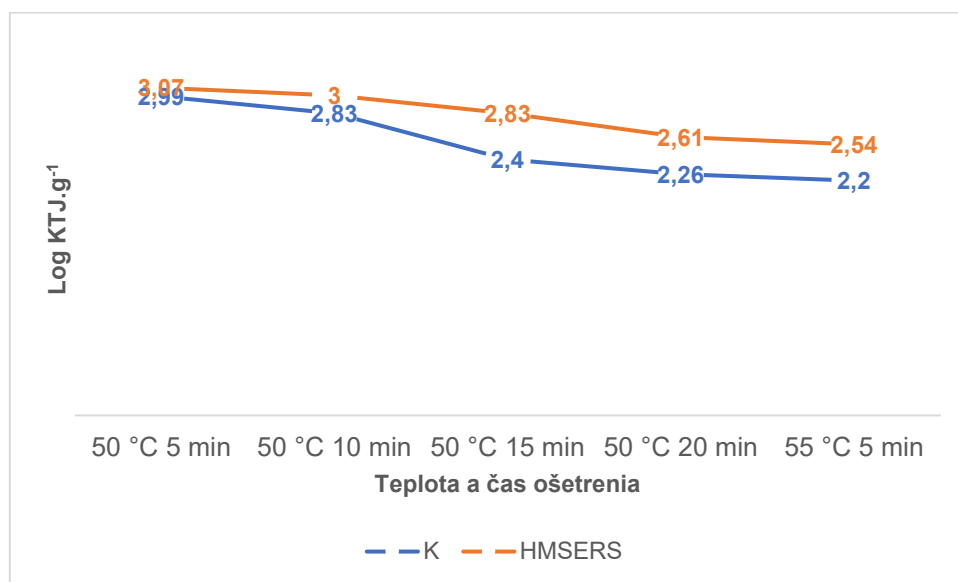
K – kontrola; HMSERS – hovädzie mäso ošetrené *S. enterica* a rozmarínovou silicou

Skazenie vákuovo baleného hovädzieho mäsa je jednou z hlavných výziev, ktorým čelí mäsový priemysel. Vákuové balenie hovädzieho mäsa sa používa na zabránenie aeróbnemu znehodnocovaniu obalov tým, že zabezpečuje rýchlú premenu akéhokoľvek zvyškového O<sub>2</sub> na CO<sub>2</sub> (Sarantópoulos et al., 2002). Výsledkom je anaeróbné prostredie, ktoré predlžuje trvanlivosť hovädzieho mäsa počas prepravy (Zwirzitz et al., 2019). Kaziace baktérie na hovädzom mäse však prispievajú k zmenám



v štruktúre mäsa, farbe a chuti, čo ho robí neprijateľným pre ľudskú spotrebu (Mills et al., 2014). Pôvodne prítomné mikroorganizmy na čerstvom mäse závisia od viacerých zdrojov kontaminácie, ako sú živé zvieratá, porážka a úprava až po kontamináciu jatočných tiel a rezov steakov (Moschonas et al., 2011a).

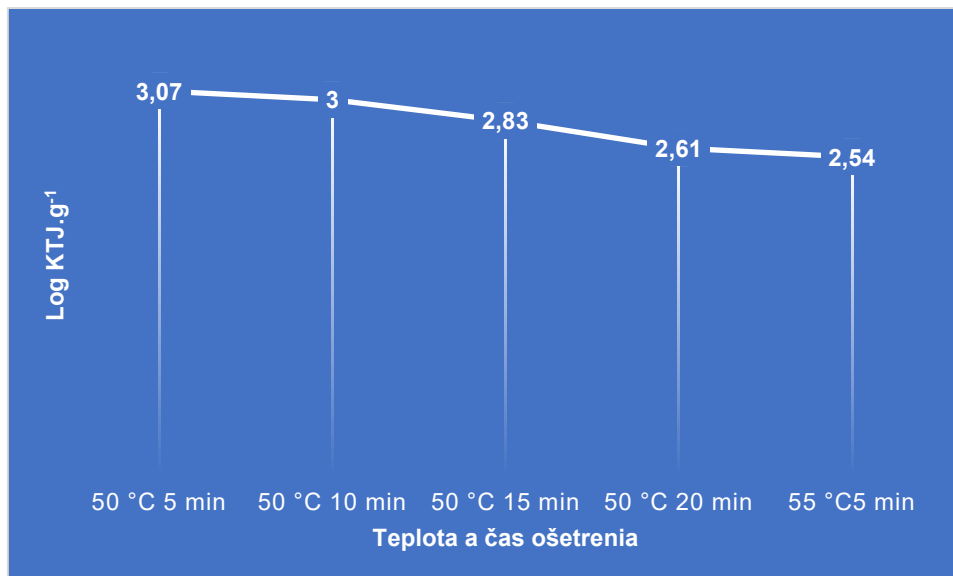
V tabuľke 6 uvádzame celkový počet mikroorganizmov vo vzorkách hovädzieho mäsa na 9. deň. Najvyšší počet bol zaznamenaný v kontrolnej skupine pri teplote 50 °C počas 5 min., rovnako ako to bolo v predchádzajúcich dňoch skladovania. Počet koliformných baktérií sa znižoval vplyvom teploty a času pôsobenia a vyšší bol v skupine ošetrenej rozmarínovou silicou a baktériou *S. enterica* (obr. 7). Počet buniek *S. enterica* bol podobný ako v predchádzajúcich dňoch len s vyššími hodnotami (obr. 8).



**Obrázok 7.** Počet koliformných baktérií v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a *S. enterica* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 9. dňa

K – kontrola; HMSERS – hovädzie mäso ošetrenejé *S. enterica* a rozmarínovou silicou





**Obrázok 8.** Počet buniek *S. enterica* v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 9. dňa v log KTJ.g<sup>-1</sup>

Tabuľka 7 uvádza celkový počet mikroorganizmov po 12 dňoch. Najvyšší počet mikroorganizmov bol zaznamenaný v kontrolnej skupine pri ošetrení teplotou 50 °C počas 5 min. a najnižší v kontrolnej skupine pri teplote 65 °C počas 20 min. Celkový počet mikroorganizmov v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou od teploty 60 °C bol nulový. Počet koliformných baktérií (obr. 9) bol nižší v kontrolnej skupine a počet buniek *S. enterica* sa zvyšoval v závislosti od dňa skladovania ale len pri teplote 50 a 55 °C počas 5 min. (obr. 10).

Hovädzie steaky boli jednotlivo vákuovo uzavreté a varené sous vide pri 46,1, 51,6 a 54,4 °C. Minimálny čas nameraný pre zníženie o 5 log pri 51,6 a 54,4 °C bol 150 a 64,5 min., v tomto poradí ( $P < 0,01$ ). Okrem toho sa konečná redukcia 7,28 log dosiahla pri 51,6 °C po 322,5 min. ( $P < 0,01$ ). Avšak teplota 46,1 °C bola schopná dosiahnuť konečné zníženie o 2,01 log ( $P < 0,01$ ) po dobe varenia 420 minút. Výsledky tohto experimentu potvrdzujú, že produkty varené sous vide kombinácie času a teploty 5-násobné znižujú *Salmonella* spp. v mäsových výrobkoch (Hunt et al., 2023).

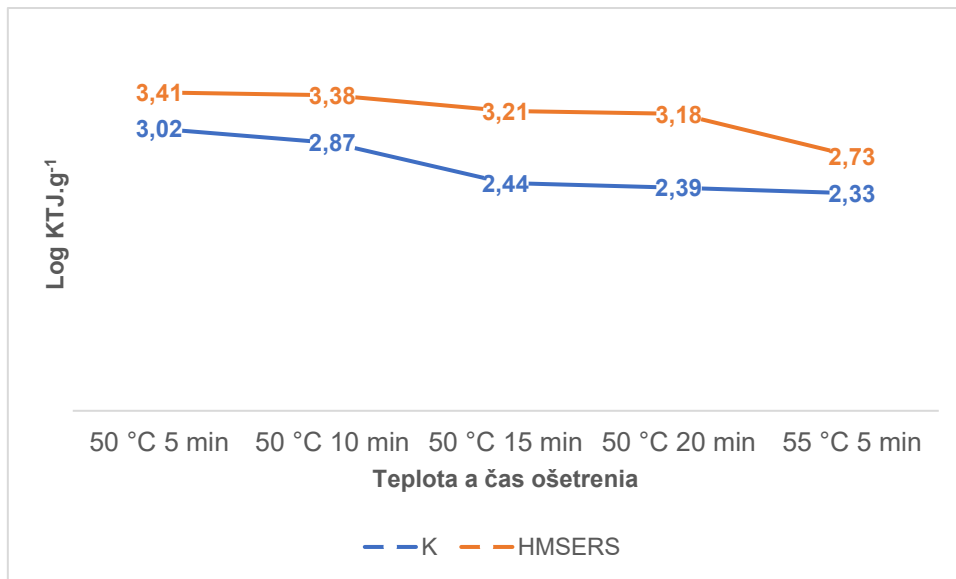
Varenie kuracích pŕs naočkovaných salmonelou a pripravované metódou sous vide viedlo k hodnotám D pri 55 °C 47,65±3,68 min. pre kontrolné vzorky a 34,12±1,73 min. pre vzorky marinované kyslou omáčkou teriyaki (Karyotis et al., 2017).



**Tabuľka 7.** Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a *S. enterica* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 12. dňa

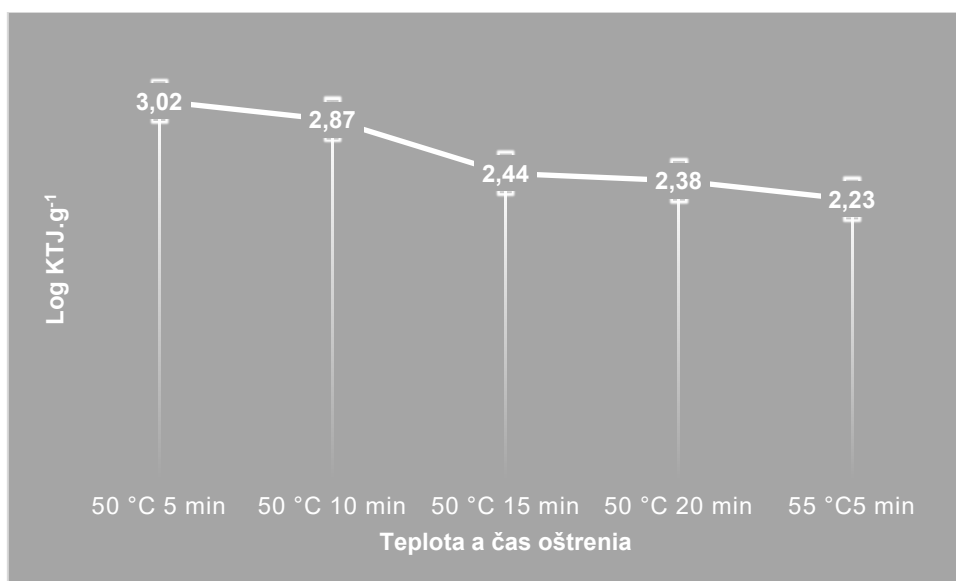
Ošetrovanie	Teplota (°C)	Čas (min.)	Priemer	SD
K	50	5	4,96	0,20
HMSERS	50	5	4,66	0,09
K	50	10	4,48	0,17
HMSERS	50	10	4,52	0,16
K	50	15	4,60	0,54
HMSERS	50	15	4,47	0,13
K	50	20	4,39	0,42
HMSERS	50	20	4,29	0,21
K	55	5	4,16	0,50
HMSERS	55	5	3,94	0,06
K	55	10	3,86	0,56
HMSERS	55	10	3,58	0,12
K	55	15	3,59	0,17
HMSERS	55	15	3,29	0,18
K	55	20	3,73	0,40
HMSERS	55	20	2,81	0,12
K	60	5	3,64	0,07
HMSERS	60	5	0,00	0,00
K	60	10	3,48	0,18
HMSERS	60	10	0,00	0,00
K	60	15	3,21	0,03
HMSERS	60	15	0,00	0,00
K	60	20	3,18	0,13
HMSERS	60	20	0,00	0,00
K	65	5	2,87	0,20
HMSERS	65	5	0,00	0,00
K	65	10	2,52	0,24
HMSERS	65	10	0,00	0,00
K	65	15	2,24	0,26
HMSERS	65	15	0,00	0,00
K	65	20	1,82	0,19
HMSERS	65	20	0,00	0,00

K – kontrola; HMSERS – hovädzie mäso ošetrované *S. enterica* a rozmarínovou silicou



**Obrázok 9.** Počet koliformných baktérií v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a *S. enterica* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 12. dňa

K – kontrola; HMSERS – hovädzie mäso ošetrené *S. enterica* a rozmarínovou silicou



**Obrázok 10.** Počet buniek *S. enterica* v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 12. dňa v log KTJ.g<sup>-1</sup>

Počet izolátov vyizolovaných z kontrolnej skupiny uvádza Tabuľka 8. Celkovo bolo zo všetkých skupín vyizolovaných 324 izolátov. Celkovo bolo z hovädzej sviečkovej zo všetkých kontrolných skupín vyizolovaných 20 druhov baktérií, 11 rodov a 8 čeladi. Najčastejšie identifikovaným druhom bola *Pseudomonas fragi* 12 %. Najviac izolovanými druhmi okrem *P. fragi* boli, *Micrococcus luteus* 11 %,



*Pseudomonas fluorescens* a *P. putida*, ktoré sa vyskytovali v kontrolných vzorkách hovädzieho mäsa v 10 % (obr. 11).

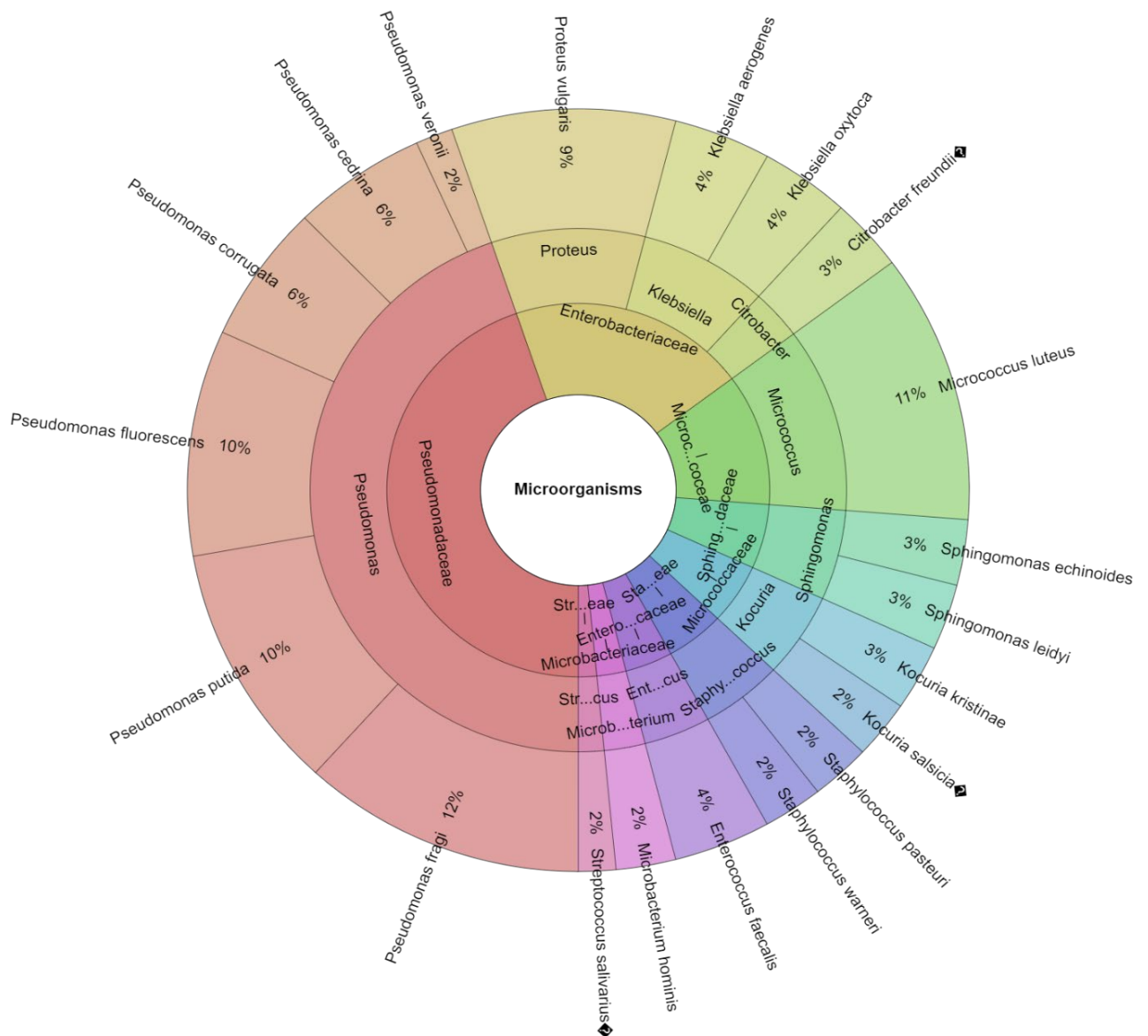
**Tabuľka 8.** Počet izolátov zo sous vide hovädzieho mäsa v kontrolnej skupine

Čeľad'	Rod	Druh	izoláty
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	10
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	13
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	13
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	12
Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria kristinae</i>	9
Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria salsicia</i>	8
Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium hominis</i>	8
Micrococcoceae	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	37
Enterobacteriaceae	<i>Proteus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	30
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cedrina</i>	18
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	19
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	31
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>	38
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	34
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas veronii</i>	5
Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas echinoides</i>	9
Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas leidy</i>	9
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	8
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	8
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	5
<b>Spolu</b>			<b>324</b>

Vákuové balenie zabraňuje rastu aeróbných mikroorganizmov a mikrobiotu ovládajú pomaly rastúce baktérie tolerantné voči CO<sub>2</sub>, ktoré by v konečnom dôsledku mohli spôsobiť kazenie. Dokonca aj počiatočná mikrobiálna záťaž len 10 buniek, alebo spór môže rásť a dosiahnuť počet dostatočný na to, aby spôsobil znehodnotenie vo vákuových baleniach (Ray a Bhunia, 2013). Baktérie znehodnocovania sú ideálne prítomné vo fázach predbaleni, ktoré sa môžu vyvinúť, keď sú priaznivé podmienky uľahčené vákuovým balením. Príklady takýchto druhov zahŕňajú *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., Enterobacteriaceae a *Lactobacillus* spp. (Broda et al., 1996; Brightwell et al., 2007; Ercolini et al., 2009; Ray a Bhunia, 2013) *Carnobacterium*, *Brochothrix*, *Leuconostoc* a *Lactococcus* izolované z vákuových balení sa podieľajú na kazení mäsa (Säde et al., 2017). Baktérie mliečneho kvasenia (LAB) sa tiež vyskytujú vo vákuovo balenom mäse (Nattress, 2001). Psychrofilné a psychrotrofné *Clostridium* spp. (PPC), hlavne *Clostridium estertheticum*



a *Clostridium gasigenes*, môžu spôsobiť znehodnotenie vákuových balení produkciou plynu (predovšetkým CO<sub>2</sub>) bez zmeny teploty (Broda et al., 2003), čo vedie k „nafúknutiu“ vákuových balení (Moschonas et al., 2011b).



**Obrázok 11.** Percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov mikroorganizmov v kontrolnej skupine s použitím rozmarínovej rastlinnej silice

Existujúce baktérie spôsobujúce kazenie prítomné v predbalení už by mohli potenciálne kolonizovať povrch mäsa v závislosti od vnútorných a vonkajších faktorov (Firstenberg-Eden, 1981). Štúdie sa zaoberali aj mikrobiálnou kontamináciou na linke na spracovanie mäsa, identifikáciou kaziacich sa baktérií na bitúnkoch hovädzieho dobytku a vplyvom aeróbného skladovania na jahňacie mäso (De Filippis et al., 2013;



Kaur et al., 2017). Rôzne štúdie preukázali využitie hmotnostnej spektrometrie na umožnenie ľahkej identifikácie a citlivej detekcie mikroorganizmov v potravinových matriciach (Ottesen et al., 2013; Jarvis et al., 2015; Saltykova et al., 2020).

**Tabuľka 9.** Počet izolátov zo sous vide hovädzieho mäsa v skupine ošetrenej rozmarínovou silicou a *S. enterica*

Čeľad'	Rod	Druh	izoláty
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	7
Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	7
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	8
Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	5
Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria kristinae</i>	8
Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria salsicia</i>	4
Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium hominis</i>	6
Micrococcoceae	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	17
Enterobacteriaceae	<i>Proteus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	36
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas cedrina</i>	4
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas corrugata</i>	5
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	8
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>	31
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas libanensis</i>	6
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i>	7
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas mandelii</i>	6
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	22
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas veronii</i>	14
Ralstoniaceae	<i>Ralstonia</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>	5
Enterobacteriaceae	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella enterica</i>	64
Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas echinoides</i>	8
Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas leidyi</i>	7
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	6
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	3
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	4
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	6
<b>Spolu</b>			<b>313</b>

Počet izolátov vyizolovaných zo skupiny ošetrenej rozmarínovou silicou a *S. enterica* uvádza tabuľka 9. Celkovo bolo zo všetkých skupín vyizolovaných 313 izolátov. Celkovo bolo z hovädzej sviečkovej zo všetkých skupín ošetrených rozmarínovou silicou a *S. enterica* vyizolovaných 27 druhov baktérií, 13 rodov a 9 čeľadí. Najčastejšie identifikovaným druhom bola *S. enterica* 20 %, ktorá bola pridaná do týchto skupín. Najviac izolovanými druhmi okrem *S. enterica* boli, *Proteus vulgaris*









rozmarínovej silice v sous vide hovädzom mäse proti *S. enterica*. Mikrobiologická bezpečnosť potravín je aj naďalej hlavným záujmom spotrebiteľov, regulačných orgánov a potravinárskeho priemyslu na celom svete napriek rôznym dostupným stratégiám konzervácie. V posledných rokoch došlo k početným rozsiahlym prepuknutiam salmonely, ktorá je významnou príčinou otravy jedlom na celom svete (Hayouni et al., 2008). Antibiotiká sú kľúčovou taktikou na elimináciu týchto baktérií a často sa používajú terapeuticky a preventívne na liečbu a prevenciu salmonelózy u ľudí aj zvierat. Používanie antibiotík však nevyhnutne vedie k rozvoju liekovej rezistencie a nedávny výskum odhalil nárast prevalencie *Salmonella*, ktorá je odolná voči antibiotikám u ľudí aj zvierat (O'Brien, 2002). Preto sú potrebné nové, účinné a bezpečné spôsoby liečby salmonelózy.

#### **4.2 Mikrobiologická analýza sous vide hovädzieho mäsa po aplikácii tymianovej rastlinnej silice a baktérie *Listeria monocytogenes***

Predchádzajúce výskumy ukázali, že počiatočná mikrobiota hovädzieho mäsa je komplexná s rôznymi mikroorganizmami prítomnými, ako bolo pozorované aj pri vzorkách jatočných tiel jahniat (De Filippis et al., 2013; Wang et al., 2016; Kaur et al., 2017). Mikrobiota mäsa sa zvyčajne počas skladovania zmení. Malá časť počiatočnej mikrobioty môže ovplyvniť mikrobiálnu komunitu súvisiacu s kazením, ktorá sa nachádza na mäse na konci skladovania (Casaburi et al., 2015; Chaillou et al., 2015). Ku skazeniu mäsa dochádza najmä v dôsledku mikrobiálnej metabolickej aktivity, ktorá je ovplyvnená aplikáciou špecifických podmienok skladovania, ako je anaeróbne prostredie prostredníctvom vákuového balenia (Ercolini et al., 2006).

Ďalším cieľom práce bolo sledovanie mikrobiologickej kontaminácie sous vide hovädzieho mäsa po aplikácii tymianovej rastlinnej silice v kombinácii s baktériou *L. monocytogenes*. V práci sme sa zamerali rovnako ako v predchádzajúcej kapitole na sledovanie celkového počtu mikroorganizmov, koliformných baktérií a s výnimkou baktérií *L. monocytogenes* počas 5, 15, 20 a 25 minút pri teplote varenia 55, 60 a 65 °C po dobu 1 až 12 dní.

Tabuľka 10 uvádza výsledky celkového počtu mikroorganizmov v 1. deň pokusu. Vyhodnotením výsledkov sme zistili, že najnižší počet bol v kontrolnej skupine pri teplote 55 °C počas 20 min. a najvyšší počet bol v kontrolnej skupine bez ošetrenia pri teplote 50 °C počas 5 min., potom nasledovala kontrolná vzorka pri teplote 50 °C počas 10 min. Porovnaním vzoriek kontrolných a ošetrených sme zistili, že celkový

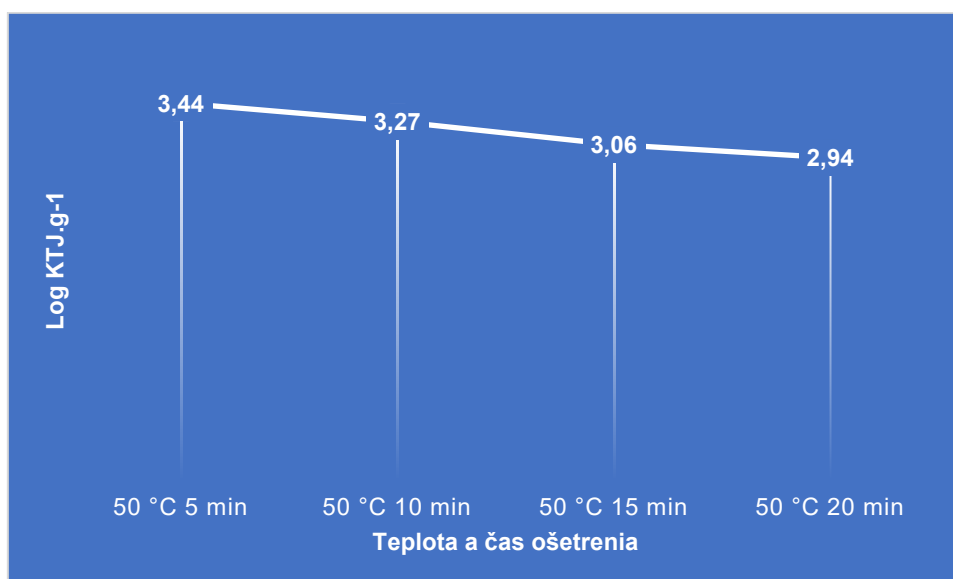


počet mikroorganizmov počas prvého dňa bol vyšší v kontrolných skupinách. Pri použití teploty vyššej ako 55 °C celkové počty boli nulové v oboch skupinách. Počet koliformných baktérii boli nulové. *L. monocytogenes* sa vyskytovala iba v skupine oštrenej tymianovou silicou a baktériou *L. monocytogenes* (obr. 13).

**Tabuľka 10.** Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine oštrenej tymianovou RS a *L. monocytogenes* (log KTJ.g-1) počas 1. dňa

Ošetrovanie	Teplota (°C)	Čas (min.)	Priemer	SD
K	50	5	2,53	0,07
HMLMTS	50	5	2,28	0,05
K	50	10	2,39	0,05
HMLMTS	50	10	2,14	0,07
K	50	15	2,28	0,06
HMLMTS	50	15	2,00	0,11
K	50	20	2,17	0,05
HMLMTS	50	20	1,90	0,05
K	55	5	2,15	0,01
HMLMTS	55	5	0,00	0,00
K	55	10	2,11	0,01
HMLMTS	55	10	0,00	0,00
K	55	15	2,00	0,03
HMLMTS	55	15	0,00	0,00
K	55	20	1,92	0,14
HMLMTS	55	20	0,00	0,00

K – kontrola; HMLMTS – hovädzie mäso ošetrované *L. monocytogenes* a tymianovou silicou



**Obrázok 13.** Počet buniek *L. monocytogenes* v skupine oštrenej rastlinou silicou a baktériou počas 1. dňa v log KTJ.g<sup>-1</sup>

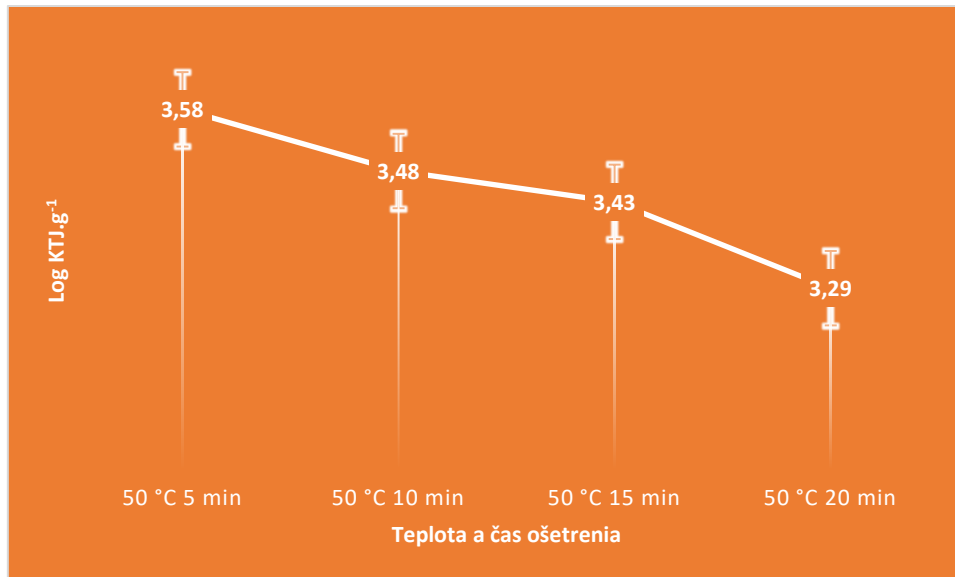


Mikroorganizmy v hovädzom mäse môžu spôsobiť znehodnotenie produktov a otravu jedlom. Pretože hovädzie mäso je bohaté na živiny a má vysoký obsah obsahu vody môžu mikroorganizmy z prostredia spracovania ľahko kolonizovať hovädzie mäso (De Filippis et al., 2013). Dokonca aj počas skladovania v chladiacich teplotách, psychrotrofné baktérie ako sú baktérie mliečneho kvasenia a *Pseudomonas* spp. môžu rásť na hovädzom mäse, čím sa zvyšuje riziko kazení mäsa (Doulgeraki et al., 2012). Okrem toho, ohniská v dôsledku kontaminácie hovädzieho mäsa s *Escherichia coli* O157 a *Salmonella* spp. sa neustále vyskytovali napriek tomu, že bola udržiavaná vysoká úroveň hygieny (Kivi et al., 2007; Friesema et al., 2012; Heiman et al., 2015). Niekoľko štúdií analyzovalo baktérie a patogény podieľajúcimi sa na kazení mäsa, metódami založenými na spôsoboch identifikácie týchto mikroorganizmov, ktoré zabezpečia znížiť kazenie a choroby prenášané potravinami (Ercolini et al., 2006; Black et al., 2010; Limbo et al., 2010). Nedávne štúdie používajúce vysokovýkonné sekvenčné metódy tiež zistili prítomnosť mikroorganizmov a patogénov súvisiacich so kazením mäsa počas krokov spracovania, alebo pri rôznych podmienky skladovania (De Filippis et al., 2013; Hultman et al., 2015; Stoops et al., 2015; Yang et al., 2016).

**Tabuľka 11.** Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej tymianovou RS a *L. monocytogenes* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 3. dňa

Ošetrovanie	Teplota (°C)	Čas (min.)	Priemer	SD
K	50	5	2,63	0,06
HMLMTS	50	5	2,53	0,07
K	50	10	2,57	0,08
HMLMTS	50	10	2,44	0,03
K	50	15	2,48	0,05
HMLMTS	50	15	2,39	0,06
K	50	20	2,34	0,14
HMLMTS	50	20	2,42	0,10
K	55	5	2,30	0,12
HMLMTS	55	5	2,30	0,02
K	55	10	2,29	0,12
HMLMTS	55	10	2,21	0,06
K	55	15	2,25	0,07
HMLMTS	55	15	2,17	0,04
K	55	20	2,18	0,06
HMLMTS	55	20	2,04	0,10

K – kontrola; HMLMTS – hovädzie mäso ošetrované *L. monocytogenes* a tymianovou silicou



**Obrázok 14.** Počet buniek *L. monocytogenes* v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 3 dňa v log KTJ.g<sup>-1</sup>

Celkový počet mikroorganizmov po troch dňoch skladovania uvádza Tabuľka 11. Najvyšší počet mikroorganizmov bol najvyšší v kontrolnej skupine rovnako ako počas prvého dňa skladovania. Počty koliformných baktérií boli nulové. Počet buniek *L. monocytogenes* sa vyskytovali len pri teplote 55 °C (obr. 14).

Tabuľka 12 uvádza výsledky celkového počtu mikroorganizmov v 6. deň pokusu. Vyhodnotením výsledkov sme zistili, že najnižší počet bol v skupine ošetrenej tymianovou silicou a *L. monocytogenes* pri teplote 55 °C počas 20 min. a najvyšší počet bol v kontrolnej skupine bez ošetrenia pri teplote 50 °C počas 5 min., potom nasledovala vzorka ošetrená silicou a baktériou pri teplote 55 °C počas 20 min. Porovnaním vzoriek kontrolných a ošetrovaných sme zistili, že celkový počet mikroorganizmov počas 6. dňa vyšší v kontrolných skupinách. Pri použití teploty vyššej ako 55 °C celkové počty boli nulové v oboch skupinách. Počet koliformných baktérií boli nulové. *L. monocytogenes* sa vyskytovala iba v skupine ošetrenej tymianovou silicou a baktériou *L. monocytogenes* (obr. 15).

V mletom hovädzom mäse udržiavanom pri teplote 55 °C bola metódou sous vide dosiahnuť schopnosť D-hodnotu  $67,79 \pm 5,48$  min. vo vzorkách naočkovaných *E. coli* O157:H7 (Juneja et al., 2009) a D-hodnotu 33,62 min. vzorky naočkované *L. monocytogenes* (Juneja et al., 2020). Vyššie uvedené štúdie však nepoužívali teploty varenia sous vide pod 55 °C. V ďalšom experimente steaky udržiavané pri 51,6 °C mali konečné zníženie o 7,28 log<sub>10</sub> (P < 0,01) po 322,5 min., čo naznačuje,

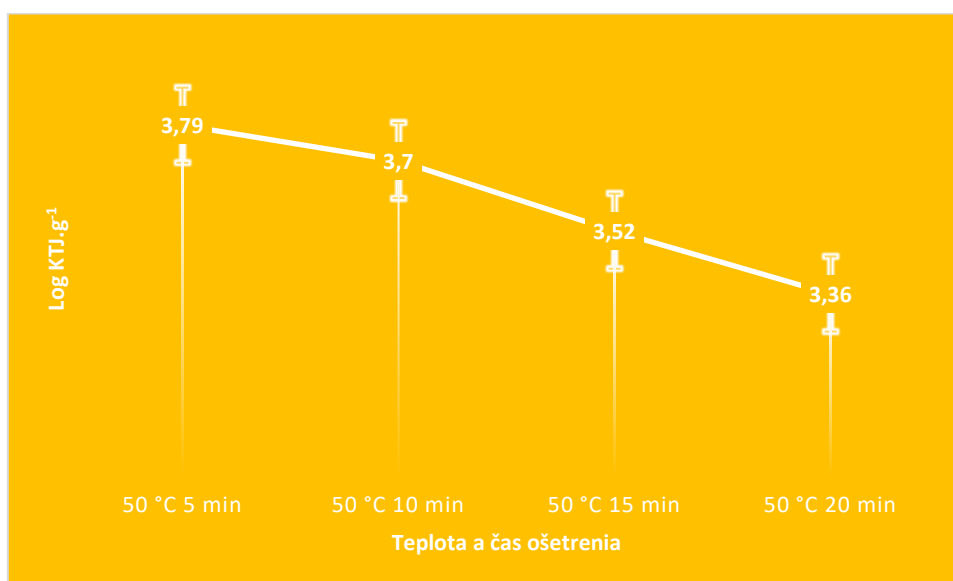


že udržiavanie pri tejto teplote by sa mohlo použiť na dosiahnutie bezpečnosti produktu pre hovädzie mäso (Hunt et al., 2023). Vzorky mäsa z diviny naočkované *L. monocytogenes* mali za následok D 50°C 49,2±2,0 min, u srnčej zveri a D 50°C 100,2±13,3 min, u diviakov (Abel et al., 2020) a zdôrazňujú, že bezpečne varené produkty pri teplotách je možné pri teplote nižšej ako 54,4 °C.

**Tabuľka 12.** Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej tymianovou RS a *L. monocytogenes* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 6. dňa

Ošetrovanie	Teplota (°C)	Čas (min.)	Priemer	SD
K	50	5	2,90	0,10
HMLMTS	50	5	2,67	0,08
K	50	10	2,74	0,05
HMLMTS	50	10	2,60	0,07
K	50	15	2,68	0,09
HMLMTS	50	15	2,52	0,07
K	50	20	2,58	0,13
HMLMTS	50	20	2,45	0,24
K	55	5	2,46	0,06
HMLMTS	55	5	2,40	0,05
K	55	10	2,43	0,07
HMLMTS	55	10	2,27	0,12
K	55	15	2,36	0,07
HMLMTS	55	15	2,21	0,02
K	55	20	2,31	0,40
HMLMTS	55	20	2,13	0,09

K – kontrola; HMLMTS – hovädzie mäso ošetrované *L. monocytogenes* a tymianovou silicou



**Obrázok 15.** Počet buniek *L. monocytogenes* v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 6 dňa v log KTJ.g<sup>-1</sup>

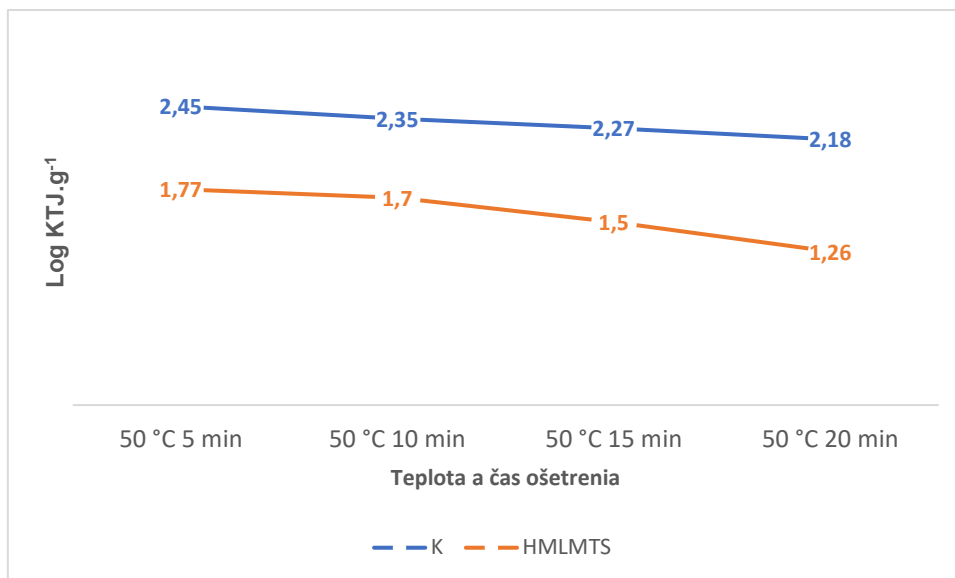


Celkový počet mikroorganizmov počas skladovania na 9. deň je uvedený v tabuľke 13. V 9. deň skladovania sa už objavil aj celkový počet mikroorganizmov pri teplote 60 °C. Najvyšší počet bol v kontrolnej skupine pri najnižšej teplote a najnižšom čase a najnižší pri teplote 60 °C počas 20 min. Koliformné baktérie na 9. deň skladovania boli zaznamenané v oboch skupinách a vyššie boli v kontrolných vzorkách (obr. 16). Počet baktérií *L. monocytogenes* uvádza obrázok 17.

**Tabuľka 13.** Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej tymianovou RS a *L. monocytogenes* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 9. dňa

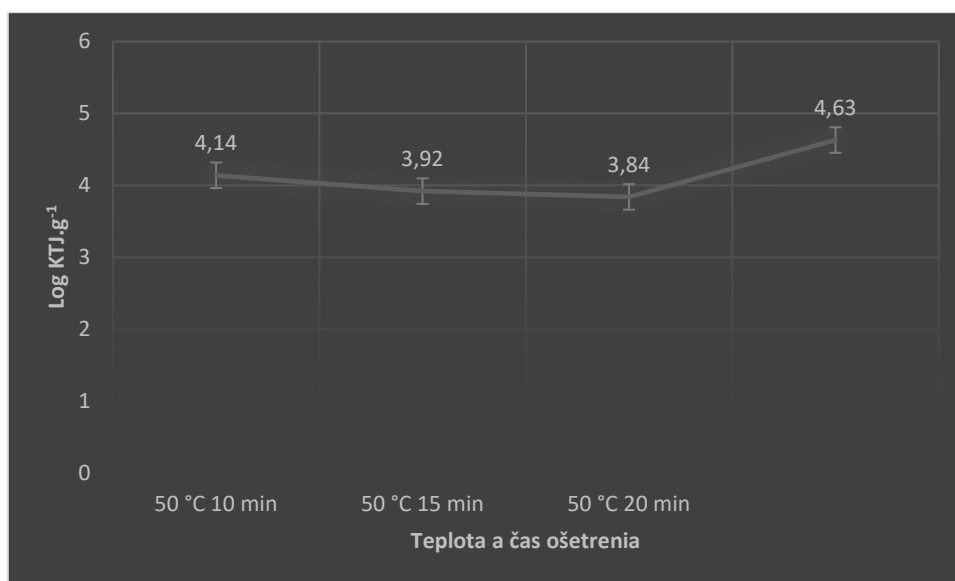
Ošetrovanie	Teplota (°C)	Čas (min.)	Priemer	SD
K	50	5	3,41	0,05
HMLMTS	50	5	3,29	0,14
K	50	10	3,30	0,06
HMLMTS	50	10	2,90	0,06
K	50	15	3,27	0,10
HMLMTS	50	15	2,72	0,06
K	50	20	3,11	0,04
HMLMTS	50	20	2,61	0,09
K	55	5	3,02	0,11
HMLMTS	55	5	2,50	0,10
K	55	10	2,89	0,14
HMLMTS	55	10	2,23	0,08
K	55	15	2,82	0,08
HMLMTS	55	15	2,15	0,06
K	55	20	2,78	0,10
HMLMTS	55	20	1,94	0,05
K	60	5	2,39	0,10
HMLMTS	60	5	1,68	0,11
K	60	10	2,32	0,04
HMLMTS	60	10	1,57	0,06
K	60	15	2,22	0,04
HMLMTS	60	15	1,40	0,10
K	60	20	2,19	0,13
HMLMTS	60	20	1,18	0,06

K – kontrola; HMLMTS – hovädzie mäso ošetrované *L. monocytogenes* a tymianovou silicou



**Obrázok 16.** Počet koliformných baktérií v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a *L. monocytogenes* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 9. dňa

K – kontrola; HMLMTS – hovädzie mäso ošetrené *L. monocytogenes* a tymianovou silicou



**Obrázok 17.** Počet buniek *L. monocytogenes* v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 9. dňa v log KTJ.g<sup>-1</sup>

V práci Gál et al. (2023) sa *L. monocytogenes* inaktivovala teplom aj rastlinou silicou zo *Salvia officinalis* (šalvia) v hovädzej sviečkovej z *musculus psoas major*, ktorá prešla spracovaním metódou sous vide. Aby sa určilo, či je zvýšenie účinnosti tepelného spracovania perspektívne, zmiešali sa *L. monocytogenes* a RS šalvie. Boli založené skupiny so samotnou *L. monocytogenes* a šalviovou silicou kombinovanou s *L. monocytogenes* a testované skupiny bez RS. Vzorky boli vákuovo zabalené,





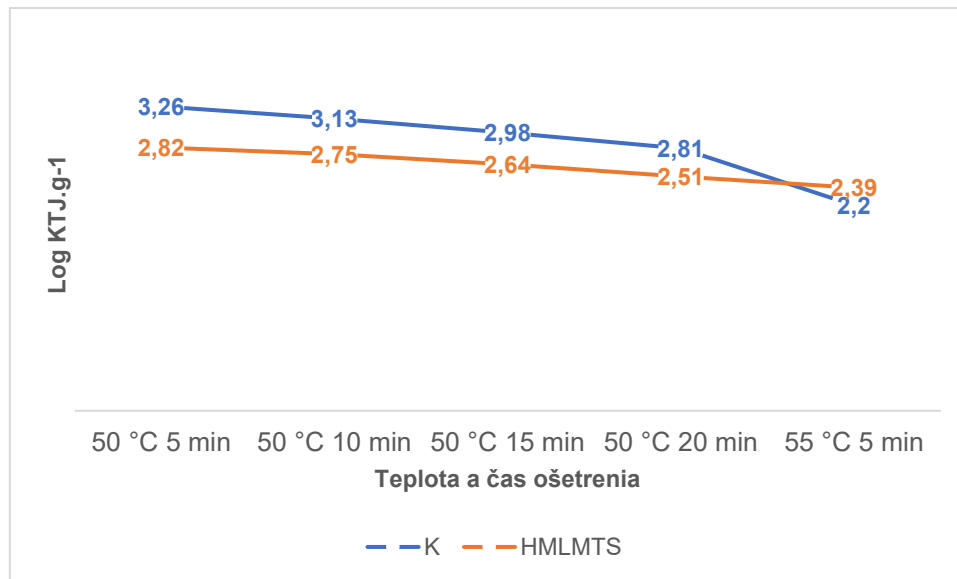
naočkované *L. monocytogenes* a potom varené sous vide počas vopred stanovenej doby pri 50, 55, 60 a 65 °C. V oboch skupinách s hovädzou sviečkovou na sous vide sa hodnotil celkový počet baktérií, počet koliformných baktérií a množstvo *L. monocytogenes* v dňoch 0, 3, 6, 9 a 12. Počas týchto dní sa množstvá *L. monocytogenes* zvýšili, koliformné baktérie a celkovo baktérie.

Tabuľka 14 uvádza celkový počet mikroorganizmov posledný deň skladovania hovädzieho mäsa. Rovnako ako v predchádzajúcich dňoch bol tento počet najvyšší v kontrolnej vzorke pri teplote 50 °C, počet koliformných baktérií bol len pri teplote 50 °C a pri 55 °C počas teploty pôsobenia 5 min.

**Tabuľka 14.** Celkový počet mikroorganizmov v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej tymianovou RS a *L. monocytogenes* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 12. dňa

Ošetrovanie	Teplota (°C)	Čas (min.)	Priemer	SD
K	50	5	3,92	0,15
HMLMTS	50	5	3,66	0,11
K	50	10	3,82	0,19
HMLMTS	50	10	3,59	0,20
K	50	15	3,66	0,08
HMLMTS	50	15	3,41	0,14
K	50	20	3,53	0,12
HMLMTS	50	20	3,33	0,12
K	55	5	3,49	0,10
HMLMTS	55	5	3,13	0,12
K	55	10	3,22	0,10
HMLMTS	55	10	3,01	0,09
K	55	15	3,11	0,11
HMLMTS	55	15	2,84	0,14
K	55	20	3,05	0,15
HMLMTS	55	20	2,63	0,13
K	60	5	2,73	0,11
HMLMTS	60	5	2,42	0,11
K	60	10	2,68	0,13
HMLMTS	60	10	2,36	0,15
K	60	15	2,47	0,12
HMLMTS	60	15	2,32	0,09
K	60	20	2,36	0,08
HMLMRT	60	20	2,15	0,06
K	65	5	2,23	0,15
HMLMTS	65	5	2,06	0,08
K	65	10	1,85	0,15
HMLMTS	65	10	2,02	0,13

K – kontrola; HMLMTS – hovädzie mäso ošetrované *L. monocytogenes* a tymianovou silicou



**Obrázok 18.** Počet koliformných baktérií v kontrolnej skupine a skupine ošetrenej rozmarínovou RS a *L. monocytogenes* (log KTJ.g<sup>-1</sup>) počas 12. dňa

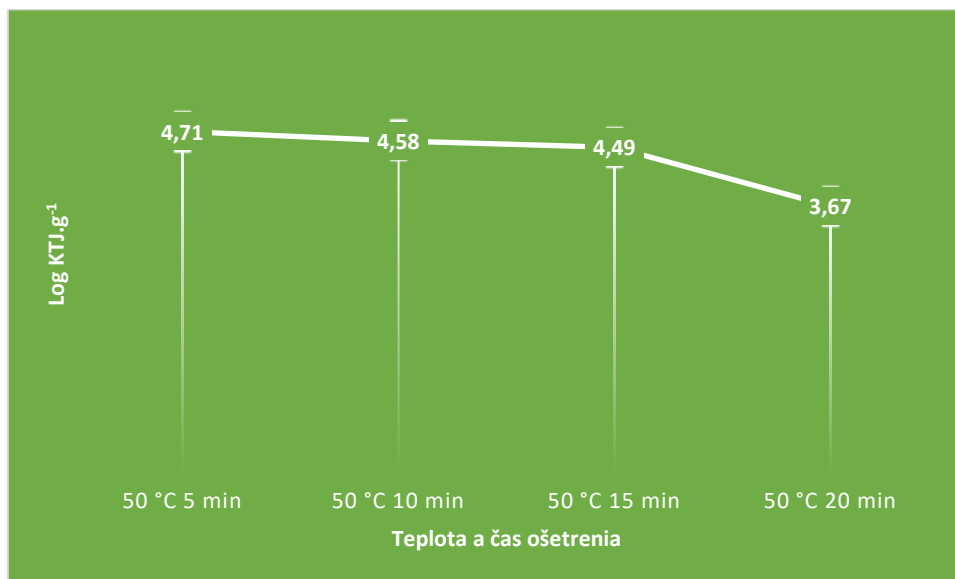
K – kontrola; HMLMTS – hovädzie mäso ošetrené *L. monocytogenes* a tymianovou silicou

Podľa Tangwatcharin et al. (2019), rôzne sous vide teploty pre naočkovanú reštrukturalizovanú koziu sviečkovicu mali vplyv na D-hodnoty *L. monocytogenes*. Jej Z-hodnota bola 8,20 °C a jej D-hodnota klesala so zvyšujúcou sa teplotou. Neočkovaná reštrukturalizovaná kozia sviečkovica bola varená s použitím šiestich D-hodnôt pri 60, 65 a 70 °C, aby sa zaistila bezpečnosť produktu sous vide. Počet mikroorganizmov vo všetkých vzorkách sa znížil a po varení rôznymi technikami sous vide neboli nájdené patogény. Odhaduje sa, že optimálne trvanie a teplota na varenie lososa sous vide eliminuje *L. monocytogenes* a oreganová silica a kyselina citrónová môžu pomôcť tým, že znížia schopnosť baktérií odolávať teplu. Zistenia štúdie sú dôležité pre zaistenie bezpečnosti potravín a môžu pomôcť spracovateľským centrom znížiť riziko *L. monocytogenes* počas tepelného spracovania.

Naše zistenia tiež objasnili potenciálne využitie tepelného spracovania, ktoré by mohlo zlepšiť výsledky (Dogruyol et al., 2020). Nízke teploty mali podľa Chan a Wiedmann (2008) bakteriostatický vplyv na *L. monocytogenes*. Tento záver je v súlade so zisteniami tejto štúdie, ktoré naznačujú, že kontrolné vzorky skladované pri 2 °C sa od dňa 0 do dňa 28 výrazne znížili o 1,23 log (v priemere). V našom výskume bol pozorovaný konzistentný pokles počtu *L. monocytogenes* počas skladovania pri 4 °C.



V štúdií Lee et al. (2017) sa zistilo, že rastu *L. monocytogenes* prospieva teplota 5 °C. Výpočet oneskorenia a stacionárnej fázy bol nemožný kvôli veľmi nízkej rýchlosti vývoja pri tejto teplote. Podľa Farber a Peterkin (1999) fáza oneskorenia *L. monocytogenes* vo vákuovo balenej pečienky pri teplote 3 °C trvala 59 hodín, čo ilustruje účinok stresovej tepelnej úpravy na organizmus a vedie k lag fáze. Nedostatočný rast *L. monocytogenes* počas skladovania bol zistený pri teplote 2 °C (McCarthy, 1991).



**Obrázok 19.** Počet buniek *L. monocytogenes* v skupine ošetrenej rastlinou silicou a baktériou počas 12. dňa v log KTJ.g<sup>-1</sup>

Počet izolátov vyizolovaných z kontrolnej skupiny uvádza tabuľka 15. Celkovo bolo zo všetkých skupín vyizolovaných 234 izolátov. Celkovo bolo z hovädzej sviečkovej zo všetkých kontrolných skupín vyizolovaných 24 druhov baktérií, 14 rodov a 8 čeľadí. Najčastejšie identifikovaným druhom bola *Proteus vulgaris* 14 %. Najviac izolovanými druhmi okrem *P. vulgaris* boli, *Citrobacter freundii* a *Pseudomonas fragi*, ktoré sa vyskytovali v kontrolných vzorkách hovädzieho mäsa v 9 % (obr. 20). Z čeľade Enterobacteriaceae boli identifikované rody *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pantotea*, *Proteus* a *Serratia*. Najviac zástupcov bolo identifikovaných z rodu *Pseudomonas*.

Enterobacteriaceae môže spôsobiť kazenie vákuovo baleného hovädzieho a jahňacieho mäsa prvotnou fermentáciou glukózy a následnou dekarboxyláciou aminokyselín (Chaves et al., 2012). V štúdií Esteves et al. (2021) boli identifikované rôzne rody Enterobacteriaceae, vrátane *Serratia*, *Aeromonas*, *Proteus*, *Providencia* a *Raoultella*. Ich prítomnosť môže byť charakterizovaná neprijemným zápachom



a „zelenaním“ mäsa (Brightwell et al., 2007). Druhy zo *Serratia* môžu rásť medzi 0 a 10 °C (Holley et al., 2004).

Zástupcovia rodu *Pseudomonas* boli zistené v kuracom a hovädzom mäse skladovanom v modifikovanej atmosfére (MAP) so zníženým obsahom kyslíka (Höll et al., 2016; Hilgarth et al., 2018). *Pseudomonas* spp. bol tiež detegovaný v neskorej fáze MAP kazenia hovädzieho mäsa, možno mu pripisovať zmenu metabolizmu, uvoľňovaniu proteínov prežitia/stresu na prekonanie obmedzenej dostupnosti kyslíka (Schreiber et al., 2006; Hilgarth et al., 2018).

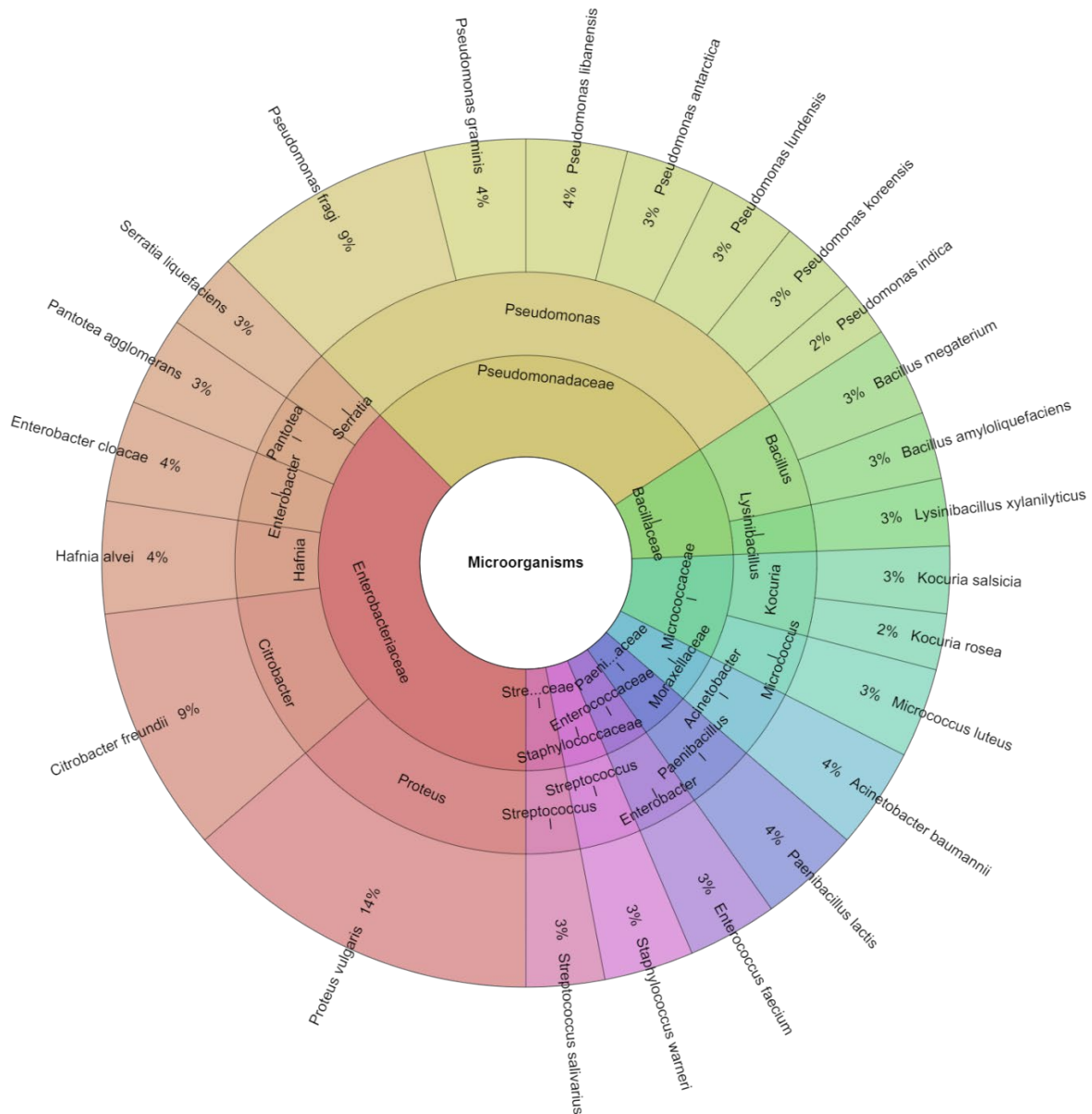
**Tabuľka 15.** Počet izolátov zo sous vide hovädzieho mäsa v kontrolnej skupine

Čeľaď	Rod	Druh	izoláty
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	9
Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6
Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	8
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	22
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	9
Enterococcaceae	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	8
Enterobacteriaceae	<i>Hafnia</i>	<i>Hafnia alvei</i>	10
Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria rosea</i>	5
Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria salsicia</i>	6
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	6
Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	8
Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus lactis</i>	9
Enterobacteriaceae	<i>Pantotea</i>	<i>Pantotea agglomerans</i>	8
Enterobacteriaceae	<i>Proteus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	32
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas antarctica</i>	8
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>	20
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas graminis</i>	9
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas indica</i>	5
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas korensis</i>	7
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas libanensis</i>	9
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i>	8
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	7
Staphylococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	8
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	7
<b>Spolu</b>			<b>234</b>

Identifikácia bakteriálnych kmeňov v rôznych dňoch a kategóriách bola vykonaná pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie. Testovaná skupina, ktorá bola vystavená teplote 50 °C počas 5 min., mala vyšší celkový počet baktérií za každý deň, ktorý sa posudzoval. *P. fragi* a *L. monocytogenes* boli najviac izolované organizmy z testovanej a kontrolnej skupiny. Aby sa zaistila bezpečnosť konzumácie sous vide



hovädzej sviečkovice, zistilo sa, že pridanie prírodných antimikrobiálnych látok by mohlo priniesť efektívne výsledky (Gál et al., 2023). Rovnaké výsledky boli dosiahnuté aj v našej práci.



**Obrázok 20.** Percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov mikroorganizmov v kontrolnej skupine z použitím tymianovej rastlinnej silice

Počet izolátov vyizolovaných zo skupiny ošetrenej tymianovou silicou a *L. monocytogenes* uvádza tabuľka 16. Celkovo bolo zo všetkých skupín vyizolovaných 223 izolátov. Celkovo bolo z hovädzej sviečkovej zo všetkých kontrolných skupín vyizolovaných 24 druhov baktérií, 15 rodov a 9 čeľadí. Najčastejšie identifikovaným druhom bola *L. monocytogenes* 20 %. Najviac izolovanými druhmi okrem *L. monocytogenes* boli, *Proteus vulgaris* 11 % a *Pseudomonas fragi* 10 %, ktoré sa



vyskytovali v kontrolných vzorkách hovädzieho mäsa ošetrených tymianovou silicou a *L. monocytogenes* (obr. 20).

**Tabuľka 16.** Počet izolátov zo sous vide hovädzieho mäsa v skupine ošetrenej tymianovou silicou a *L. monocytogenes*

Čeľad'	Rod	Druh	izoláty
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	7
Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	8
Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	5
Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	10
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	8
Enterobacteriaceae	<i>Hafnia</i>	<i>Hafnia alvei</i>	5
Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria rosea</i>	3
Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	<i>Kocuria salsicia</i>	4
Listeriaceae	<i>Listeria</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	44
Bacillaceae	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	6
Micrococcaceae	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	8
Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus lactis</i>	5
Enterobacteriaceae	<i>Pantotea</i>	<i>Pantotea agglomerans</i>	7
Enterobacteriaceae	<i>Proteus</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	25
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas antarctica</i>	4
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>	22
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas graminis</i>	7
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas indica</i>	6
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas koreensis</i>	9
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas libanensis</i>	7
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas lundensis</i>	5
Enterobacteriaceae	<i>Serratia</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	5
Staphylococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	8
Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	5
<b>Spolu</b>			<b>223</b>

V štúdií Ercolini et al. (2006) zistili znehodnotenie mäsa medzi 7. a 14. dňom skladovania a mikrobiálne druhy nachádzajúce sa v pokazenom mäse sa líšili v závislosti od podmienok balenia. *Rahnella aquatilis*, *Rahnella* spp., *Pseudomonas* spp. a *Carnobacterium divergens* boli identifikované ako mikroorganizmy rastúce počas skladovania hovädzieho mäsa na vzduchu (MAP1). *Pseudomonas* spp. a *Lactobacillus sakei* sa našli v hovädzom mäse skladovanom v podmienkach MAP s vysokým obsahom kyslíka (MAP2), zatiaľ čo *Rahnella* spp. a *L. sakei* boli hlavné druhy nájdené počas skladovania pomocou MAP3. Identifikácia mikrobioty súvisiacej s kazením hmotnostnou spektrometriou využiteľnej v našej monografii môže pomôcť pri efektívnom stanovení podmienok skladovania čerstvého mäsa.







## Záver

Cieľom vedeckej monografie bolo sledovanie antimikrobiálneho vplyvu rozmarínovej a tymianovej rastlinnej silice na baktérie *S. enterica* a *L. monocytogenes* aplikovaných na povrch sous vide hovädzieho mäsa pri použití rôznych teplôt a času na prípravu tepelne ošetreného sous vide mäsa. Nami zistené výsledky naznačujú, že kombinácia vhodnej teploty, času a rastlinnej silice, ovplyvnila rast mikroorganizmov. Z mikroorganizmov bol sledovaný celkový počet baktérií, počet koliformných baktérií a podľa aplikácie prítomnosť baktérií *L. monocytogenes* a *S. enterica*. Naše výsledky dokazujú antimikrobiálny charakter rastlinných silíc. Výsledkom našej práce bolo, že neporušené vzorky hovädzieho mäsa, ktoré boli infikované *S. enterica*, boli bezpečne zohrievané pomocou varenia sous vide pri teplote 50, 55, 60 a 65 °C počas doby varenia 5, 10, 15 a 20 minút. Počet buniek salmonely, celkový počet baktérií a počet koliformných baktérií v hovädzom mäse uchovávanom pri 50 °C počas 5, 10, 15 a 20 minút neklesli na úrovne, ktoré by sa mohli považovať za bezpečné. Aby bol tento výrobok bezpečný na konzumáciu, musí sa použiť dodatočný krok tepelného spracovania, alebo varenia pri vyššej teplote pomocou metódy sous vide. Kombinácia rozmarínovej rastlinnej silice s úpravou sous vide je dobrou alternatívou pre skladovanie vzoriek hovädzieho mäsa pri teplote 6 °C.

Ďalej sa našimi analýzami zistilo najefektívnejšie kombinácie doby varenia a teploty sous vide pre hovädzie mäso na inaktiváciu *L. monocytogenes* a predpokladá sa, že tymianová rastlinná silica môže byť schopná znížiť schopnosť rozmnožovania *L. monocytogenes* hovädzej sviečkovej upravenej technikou sous vide. Výsledky tejto štúdie sú dôležité pre zaistenie bezpečnosti potravín a môžu pomôcť spracovateľským zariadeniam znížiť riziko *L. monocytogenes* počas tepelnej úpravy. Naš výskum tiež objasnil potenciálne použitia, ktoré by mohli zlepšiť účinky tepelnej úpravy v kombinácii so správnymi časmi a tymianovou rastlinnou silicou.





## Abstrakt

Ak je jedlo kontaminované patogénmi, ako je *Salmonella enterica* a *Listeria monocytogenes*, nesprávne varenie počas prípravy sous vide môže viesť k alimentárnym ochoreniam. Cieľom vedeckej monografie bolo zistiť antimikrobiálny účinok rastlinných silíc, a z tohto dôvodu sme sa v našej práci snažili zistiť dobu skladovania hovädzieho mäsa upraveného sous vide varením pri rôznej teplote a čase, inokulovaného baktériou *S. enterica* a *L. monocytogenes* v kombinácii s použitím rastlinných silíc. Aby sa určilo, či je zvýšenie účinnosti tepelného spracovania perspektívne, aplikovali sme *S. enterica* a rozmarínovú rastlinnú silicu a *L. monocytogenes* a tymianovú rastlinnú silicu na hovädzie mäso. Boli založené skupiny v kombinácii so samotnou *S. enterica* s rozmarínovú silicou a *L. monocytogenes* s tymianovou silicou a kontrolné skupiny bez rastlinných silíc a baktérií. Vzorky boli vákuovo zabalené, naočkované *S. enterica* a *L. monocytogenes* a potom varené sous vide počas vopred stanovenej doby pri 50, 55, 60 a 65 °C. V obidvoch experimentoch s hovädzou sviečkovou sous vide sme hodnotil celkový počet baktérií, počet koliformných baktérií a množstvo *S. enterica* a *L. monocytogenes* v dňoch 1, 3, 6, 9 a 12. Počas týchto dní sa celkové počty mikroorganizmov, koliformné baktérie zvyšovali závislosti od použitej teploty a času. Identifikácia bakteriálnych druhov v rôznych dňoch a kategóriách bola vykonaná pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie. Skupina kontrolných vzoriek mala vyšší celkový počet mikroorganizmov a koliformných baktérií v závislosti od dňa testovania, použitej teploty a času použitého pre prípravu sous vide hovädzieho mäsa za každý deň, ktorý sme hodnotili antimikrobiálny účinok rastlinných silíc. Najčastejšie izolovanými druhmi v experimente s rozmarínovou silicou boli *P. fragi* a *S. enterica*, a *P. vulgaris* a *L. monocytogenes* boli najviac izolované druhy v experimente z tymianovou rastlinou silicou. Aby sa zaistila bezpečnosť konzumácie sous vide hovädzej sviečkovice, zistilo sa, že pridanie prírodných antimikrobiálnych látok by mohlo priniesť efektívne výsledky.



## Abstract

If food is contaminated with pathogens such as *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*, improper cooking during sous vide preparation can lead to alimentary diseases. The aim of our work was to investigate the antimicrobial effect of essential oils, and for this reason, our work sought to determine the storage time of beef prepared by sous vide cooking for different temperatures and times, inoculated with *S. enterica* and *L. monocytogenes* in combination with the use of essential oils. To determine if increasing the efficiency of heat treatment is prospective, we applied *S. enterica* and rosemary essential oil and *L. monocytogenes* and thyme essential oil to beef. Groups were established in combination with *S. enterica* and rosemary essential oil and *L. monocytogenes* and thyme essential oil, and control groups without essential oils and bacteria. Samples were vacuum-packed, inoculated with *S. enterica* and *L. monocytogenes*, and then cooked sous vide for a predetermined time at 50, 55, 60 and 65 °C. In both beef tenderloin sous vide experiments, we evaluated total bacterial counts, coliform counts, and *S. enterica* and *L. monocytogenes* counts on days 1, 3, 6, 9, and 12. During these days, the total counts of microorganisms, coliforms increased, but in relation to the temperature and time used. Identification of bacterial species in different days and categories was done using MALDI-TOF mass spectrometry. The control group had higher total counts of microorganisms and coliforms depending on the day of testing, temperature used and time used for sous vide beef preparation for each day we evaluated the antimicrobial effect of the essential oils. *P. fragi* and *S. enterica* were the most frequently isolated species in the rosemary essential oil experiment, and *P. vulgaris* and *L. monocytogenes* were the most frequently isolated species in the thyme essential oil experiment. To ensure the safety of eating sous vide beef tenderloin, it was found that the addition of natural antimicrobials could yield effective results.



## Zoznam použitej literatúry

ABEL, Tobias, Annika BOULAABA, Karolina LIS, Amir ABDULMAWJOOD, Madeleine PLÖTZ a André BECKER, 2020. Inactivation of *Listeria monocytogenes* in game meat applying sous vide cooking conditions. *Meat Science* [online]. 2020, roč. 167, s. 108164 [cit. 8.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na: doi:10.1016/j.meatsci.2020.108164

AHERNE, S. Aisling, Joseph P. KERRY a Nora M. O'BRIEN, 2007. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition* [online]. 2007, roč. 97, č. 2, s. 321–328 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0007-1145, 1475-2662. Dostupné na: doi:10.1017/S0007114507250469

AHMAD, A., A. KHAN, F. AKHTAR, S. YOUSUF, I. XESS, L. A. KHAN a N. MANZOOR, 2011. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. 2011, roč. 30, č. 1, s. 41–50 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0934-9723, 1435-4373. Dostupné na: doi:10.1007/s10096-010-1050-8

AJESH, K. a K. SREEJITH, 2012. *Cryptococcus laurentii* Biofilms: Structure, Development and Antifungal Drug Resistance. *Mycopathologia* [online]. 2012, roč. 174, č. 5–6, s. 409–419 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0301-486X, 1573-0832. Dostupné na: doi:10.1007/s11046-012-9575-2

AL-SHAHRANI, Mohammed Hamed, Maysa MAHFOUD, Riyasdeen ANVARBATCHA, Md Tanwir ATHAR a Abdulrahman AL ASMARI, 2017. Evaluation of antifungal activity and cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil. *Pharmacognosy Communications* [online]. 2017, roč. 7, č. 1, s. 34–40 [cit. 23.8.2023]. ISSN 22490159, 22490167. Dostupné na: doi:10.5530/pc.2017.1.5

AL-SHUNEIGAT, Jehad, Sameeh AL-SARAYREH, Yousef AL-SARAIREH, Mahmoud AL-QUDAH, Ibrahim AL-TARAWNEH a Eman ALBATAINEH, 2014. Effects of wild *Thymus vulgaris* essential oil on clinical isolates biofilm-forming bacteria. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences* [online]. 2014, roč. 13, č. 9, s. 62–66 [cit. 23.8.2023]. ISSN 22790861, 22790853. Dostupné na: doi:10.9790/0853-13936266

ANDRADE, Joana M, Célia FAUSTINO, Catarina GARCIA, Diogo LADEIRAS, Catarina P REIS a Patrícia RIJO, 2018. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science OA* [online]. 2018, roč. 4, č. 4, s. FSO283 [cit. 23.8.2023]. ISSN 2056-5623. Dostupné na: doi:10.4155/fsoa-2017-0124

ARVANITTOYANNIS, Ioannis S. a Alexandros Ch. STRATAKOS, 2012. Application of Modified Atmosphere Packaging and Active/Smart Technologies to Red Meat and Poultry: A Review. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2012, roč. 5, č. 5, s. 1423–1446 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1935-5130, 1935-5149. Dostupné na: doi:10.1007/s11947-012-0803-z

AVIS, Tyler J. a Richard R. BÉLANGER, 2001. Specificity and Mode of Action of the Antifungal Fatty Acid *cis*-9-Heptadecenoic Acid Produced by *Pseudozyma flocculosa*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2001, roč. 67, č. 2, s. 956–960 [cit. 23.8.2023].



23.8.2023]. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné na: doi:10.1128/AEM.67.2.956-960.2001

AYALA-ZAVALA, J. Fernando, Gemma OMS-OLIU, Isabel ODRIÓZOLA-SERRANO, Gustavo A. GONZÁLEZ-AGUILAR, Emilio ÁLVAREZ-PARRILLA a Olga MARTÍN-BELLOSO, 2008. Bio-preservation of fresh-cut tomatoes using natural antimicrobials. *European Food Research and Technology* [online]. 2008, roč. 226, č. 5, s. 1047–1055 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1438-2377, 1438-2385. Dostupné na: doi:10.1007/s00217-007-0630-z

BACKHOUSE, N., L. ROSALES, C. APABLAZA, L. GOÍTY, S. ERAZO, R. NEGRETE, C. THEODOLUZ, J. RODRÍGUEZ a C. DELPORTE, 2008. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2008, roč. 116, č. 2, s. 263–269 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03788741. Dostupné na: doi:10.1016/j.jep.2007.11.025

BAE, Y.S. a M.S. RHEE, 2019. Short-Term Antifungal Treatments of Caprylic Acid with Carvacrol or Thymol Induce Synergistic 6-Log Reduction of Pathogenic *Candida albicans* by Cell Membrane Disruption and Efflux Pump Inhibition. *Cellular Physiology and Biochemistry* [online]. 2019, roč. 53, č. 2, s. 285–300 [cit. 23.8.2023]. ISSN 10158987, 14219778. Dostupné na: doi:10.33594/000000139

BAI, Naisheng, Kan HE, Marc ROLLER, Ching-Shu LAI, Xi SHAO, Min-Hsiung PAN a Chi-Tang HO, 2010. Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, roč. 58, č. 9, s. 5363–5367 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné na: doi:10.1021/jf100332w

BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK a M. IDAOMAR, 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2008, roč. 46, č. 2, s. 446–475 [cit. 17.8.2023]. ISSN 02786915. Dostupné na: doi:10.1016/j.fct.2007.09.106

BALDWIN, Douglas E., 2012. Sous vide cooking: A review. *International Journal of Gastronomy and Food Science* [online]. 2012, roč. 1, č. 1, s. 15–30 [cit. 28.11.2022]. ISSN 1878-450X. Dostupné na: doi:10.1016/j.ijgfs.2011.11.002

BARATTA, M. Tiziana, H. J. Damien DORMAN, Stanley G. DEANS, Daniela M. BIONDI a Giuseppe RUBERTO, 1998. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research* [online]. 1998, roč. 10, č. 6, s. 618–627 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1041-2905, 2163-8152. Dostupné na: doi:10.1080/10412905.1998.9700989

BARBOSA, Lidiane Nunes, Vera Lucia Mores RALL, Ana Angélica Henrique FERNANDES, Priscila Ikeda USHIMARU, Isabella DA SILVA PROBST a Ary FERNANDES, 2009. Essential Oils Against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria in Minced Meat. *Foodborne Pathogens and Disease* [online]. 2009, roč. 6, č. 6, s. 725–728 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1535-3141, 1556-7125. Dostupné na: doi:10.1089/fpd.2009.0282



BAZARGANI, Mitra Mohammadi a Jens ROHLOFF, 2016. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control* [online]. 2016, roč. 61, s. 156–164 [cit. 23.8.2023]. ISSN 09567135. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodcont.2015.09.036

BEGUM, Asia, Subarda SANDHYA, Syed SHAFFATH ALI, Kombath Ravindran VINOD, Swapna REDDY a David BANJI, 2013. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*. 2013, roč. 12, č. 1, s. 61–73. ISSN 1898-9594.

BENDIF, Hamdi, Gregorio PERON, Mohamed Djamel MIARA, Stefania SUT, Stefano DALL'ACQUA, Guido FLAMINI a Filippo MAGGI, 2020. Total phytochemical analysis of *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* from Algeria by HS-SPME-GC-MS, NMR and HPLC-MSn studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2020, roč. 186, s. 113330 [cit. 23.8.2023]. ISSN 07317085. Dostupné na: doi:10.1016/j.jpba.2020.113330

BENINCÁ, Jucélia Pizzetti, Juliana Bastos DALMARCO, Moacir Geraldo PIZZOLATTI a Tânia Silvia FRÖDE, 2011. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. *Food Chemistry* [online]. 2011, roč. 124, č. 2, s. 468–475 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03088146. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2010.06.056

BERETTA, G., R. ARTALI, R. Maffei FACINO a F. GELMINI, 2011. An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2011, roč. 55, č. 5, s. 1255–1264 [cit. 23.8.2023]. ISSN 07317085. Dostupné na: doi:10.1016/j.jpba.2011.03.026

BIYIKLI, Merve, Aylin AKOĞLU, Şebnem KURHAN a İlker Turan AKOĞLU, 2020. Effect of different Sous Vide cooking temperature-time combinations on the physicochemical, microbiological, and sensory properties of turkey cutlet. *International Journal of Gastronomy and Food Science* [online]. 2020, roč. 20, s. 100204 [cit. 5.12.2022]. ISSN 1878-450X. Dostupné na: doi:10.1016/j.ijgfs.2020.100204

BLACK, E.P., K.A. HIRNEISEN, D.G. HOOVER a K.E. KNIEL, 2010. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef following high-pressure processing and freezing. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2010, roč. 108, č. 4, s. 1352–1360 [cit. 25.8.2023]. ISSN 13645072, 13652672. Dostupné na: doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04532.x

BORRÁS-LINARES, Isabel, Zorica STOJANOVIĆ, Rosa QUIRANTES-PINÉ, David ARRÁEZ-ROMÁN, Jaroslava ŠVARC-GAJIĆ, Alberto FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ a Antonio SEGURA-CARRETERO, 2014. *Rosmarinus Officinalis* Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, roč. 15, č. 11, s. 20585–20606 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1422-0067. Dostupné na: doi:10.3390/ijms151120585

BOTSOGLOU, N., I. TAITZOGLU, I. ZERVOS, E. BOTSOGLOU, M. TSANTARLIOTOU a P.S. CHATZOPOULOU, 2010. Potential of long-term dietary administration of rosemary in improving the antioxidant status of rat tissues following





carbon tetrachloride intoxication. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2010, roč. 48, č. 3, s. 944–950 [cit. 23.8.2023]. ISSN 02786915. Dostupné na: doi:10.1016/j.fct.2010.01.004

BOZIN, Biljana, Neda MIMICA-DUKIC, Isidora SAMOJLIK a Emilija JOVIN, 2007. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, roč. 55, č. 19, s. 7879–7885 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné na: doi:10.1021/jf0715323

BRIGHTWELL, Gale, Robyn CLEMENS, Shelley URLICH a Jackie BOEREMA, 2007. Possible involvement of psychrotolerant Enterobacteriaceae in blown pack spoilage of vacuum-packaged raw meats. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2007, roč. 119, č. 3, s. 334–339 [cit. 25.8.2023]. ISSN 01681605. Dostupné na: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.024

BRODA, D.M., D.R. MUSGRAVE a R.G. BELL, 2003. Molecular differentiation of clostridia associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats using internal transcribed spacer polymorphism analysis. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, roč. 84, č. 1, s. 71–77 [cit. 25.8.2023]. ISSN 01681605. Dostupné na: doi:10.1016/S0168-1605(02)00396-3

BRODA, Dorota M., Karen M. DELACY, R.Graham BELL, Terry J. BRAGGINS a Roger L. COOK, 1996. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, roč. 29, č. 2–3, s. 335–352 [cit. 25.8.2023]. ISSN 01681605. Dostupné na: doi:10.1016/0168-1605(95)00070-4

BURT, Sara, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, roč. 94, č. 3, s. 223–253 [cit. 5.12.2022]. ISSN 01681605. Dostupné na: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

BUSATTA, C., R.S. VIDAL, A.S. POPIOLSKI, A.J. MOSSI, C. DARIVA, M.R.A. RODRIGUES, F.C. CORAZZA, M.L. CORAZZA, J. VLADIMIR OLIVEIRA a R.L. CANSIAN, 2008. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology* [online]. 2008, roč. 25, č. 1, s. 207–211 [cit. 23.8.2023]. ISSN 07400020. Dostupné na: doi:10.1016/j.fm.2007.07.003

CALVO, M.I., S. AKERRETA a R.Y. CAVERO, 2011. Pharmaceutical ethnobotany in the Riverside of Navarra (Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2011, roč. 135, č. 1, s. 22–33 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03788741. Dostupné na: doi:10.1016/j.jep.2011.02.016

CASABURI, Annalisa, Paola PIOMBINO, George-John NYCHAS, Francesco VILLANI a Danilo ERCOLINI, 2015. Bacterial populations and the volatiles associated to meat spoilage. *Food Microbiology* [online]. 2015, roč. 45, s. 83–102 [cit. 25.8.2023]. ISSN 07400020. Dostupné na: doi:10.1016/j.fm.2014.02.002



CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (U.S.), 2019. *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019* [online]. B.m.: Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) [cit. 23.8.2023]. Dostupné na: doi:10.15620/cdc:82532

COMI, Giuseppe, 2017. Spoilage of Meat and Fish. V: *The Microbiological Quality of Food* [online]. B.m.: Elsevier, s. 179–210 [cit. 23.8.2023]. ISBN 978-0-08-100502-6. Dostupné na: doi:10.1016/B978-0-08-100502-6.00011-X

COSANSU, Serap, Vijay K. JUNEJA, Marangeli OSORIA a Sudarsan MUKHOPADHYAY, 2019. Effect of grape seed extract on heat resistance of *Clostridium perfringens* vegetative cells in sous vide processed ground beef. *Food Research International* [online]. 2019, roč. 120, s. 33–37 [cit. 23.8.2023]. ISSN 09639969. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodres.2019.02.014

COUNCIL, 2019. Shutdown of European Pharmacopoeia 10th Edition - European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare - EDQM. *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare* [online] [cit. 25.8.2023]. Dostupné na: <https://www.edqm.eu/en/-/shutdown-of-european-pharmacopoeia-10th-edition>

CREED, Philip, 1998. *Sensory and nutritional aspects of sous vide processed foods*. V: . Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, s. 57–88. ISBN 978-0-7514-0433-3.

DA ROSA, Julia, Bruno FACCHIN, Juliana BASTOS, Mariana SIQUEIRA, Gustavo MICKE, Eduardo DALMARCO, Moacir PIZZOLATTI a Tânia FRÖDE, 2013. Systemic Administration of *Rosmarinus officinalis* Attenuates the Inflammatory Response Induced by Carrageenan in the Mouse Model of Pleurisy. *Planta Medica* [online]. 2013, roč. 79, č. 17, s. 1605–1614 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0032-0943, 1439-0221. Dostupné na: doi:10.1055/s-0033-1351018

DATILES, Marianne Jennifer a Pedro ACEVEDO-RODRÍGUEZ, 2021. *Rosmarinus officinalis* (rosemary). [online]. other. B.m.: Forestry Compendium [cit. 23.8.2023]. Dostupné na: doi:10.1079/FC.47678.20210115066

DAVIDSON, P.M., H. Bozkurt CEKMER, E.A. MONU a C. TECHATHUVANAN, 2015. The use of natural antimicrobials in food. V: *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* [online]. B.m.: Elsevier, s. 1–27 [cit. 5.12.2022]. ISBN 978-1-78242-034-7. Dostupné na: doi:10.1016/B978-1-78242-034-7.00001-3

DE FILIPPIS, Francesca, Antonietta LA STORIA, Francesco VILLANI a Danilo ERCOLINI, 2013. Exploring the Sources of Bacterial Spoilers in Beefsteaks by Culture-Independent High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* [online]. 2013, roč. 8, č. 7, s. e70222 [cit. 25.8.2023]. ISSN 1932-6203. Dostupné na: doi:10.1371/journal.pone.0070222

DEL BAÑO, María José, Juan LORENTE, Julián CASTILLO, Obdulio BENAVENTE-GARCÍA, José Antonio DEL RÍO, Ana ORTUÑO, Karl-Werner QUIRIN a Dieter GERARD, 2003. Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis* . Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, roč. 51, č. 15, s. 4247–4253 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné na: doi:10.1021/jf0300745



DÍAZ, Pedro, Gema NIETO, María Dolores GARRIDO a Sancho BAÑÓN, 2008. Microbial, physical–chemical and sensory spoilage during the refrigerated storage of cooked pork loin processed by the sous vide method. *Meat Science* [online]. 2008, roč. 80, č. 2, s. 287–292 [cit. 25.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na: doi:10.1016/j.meatsci.2007.12.002

DIKEMAN, Michael a Carrick DEVINE, 2014. *Encyclopedia of meat sciences*. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. ISBN 978-0-12-384734-8.

DJENANE, Djamel a Pedro RONCALÉS, 2018. Carbon Monoxide in Meat and Fish Packaging: Advantages and Limits. *Foods* [online]. 2018, roč. 7, č. 2, s. 12 [cit. 23.8.2023]. ISSN 2304-8158. Dostupné na: doi:10.3390/foods7020012

DOGRUYOL, Hande, Suhendan MOL a Serap COSANSU, 2020. Increased thermal sensitivity of *Listeria monocytogenes* in sous-vide salmon by oregano essential oil and citric acid. *Food Microbiology* [online]. 2020, roč. 90, s. 103496 [cit. 5.12.2022]. ISSN 07400020. Dostupné na: doi:10.1016/j.fm.2020.103496

DONSÌ, F., M. SESSA a G. FERRARI, 2010. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *Journal of Biotechnology* [online]. 2010, roč. 150, s. 67–67 [cit. 23.8.2023]. ISSN 01681656. Dostupné na: doi:10.1016/j.jbiotec.2010.08.175

DÖRRIE, Jan, Katrin SAPALA a Susan J. ZUNINO, 2001. Carnosol-induced apoptosis and downregulation of Bcl-2 in B-lineage leukemia cells. *Cancer Letters* [online]. 2001, roč. 170, č. 1, s. 33–39 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03043835. Dostupné na: doi:10.1016/S0304-3835(01)00549-3

DOULGERAKI, Agapi I., Danilo ERCOLINI, Francesco VILLANI a George-John E. NYCHAS, 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2012, roč. 157, č. 2, s. 130–141 [cit. 23.8.2023]. ISSN 01681605. Dostupné na: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020

EMAAR, 2020. *European Medicines Agency Assessment Report on Thymus vulgaris L., Thymus zygis Loefl. ex. L., aetheroleum*. [online]. 2020. Dostupné na: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-thymus-vulgaris-l-thymus-zygis-loefl-ex-l-aetheroleum\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-thymus-vulgaris-l-thymus-zygis-loefl-ex-l-aetheroleum_en.pdf)

ERCOLINI, Danilo, Federica RUSSO, Antonella NASI, Pasquale FERRANTI a Francesco VILLANI, 2009. Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential *In Vitro* and in Beef. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2009, roč. 75, č. 7, s. 1990–2001 [cit. 25.8.2023]. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné na: doi:10.1128/AEM.02762-08

ERCOLINI, Danilo, Federica RUSSO, Elena TORRIERI, Paolo MASI a Francesco VILLANI, 2006. Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, roč. 72, č. 7, s. 4663–4671 [cit. 25.8.2023]. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné na: doi:10.1128/AEM.00468-06





ESTEVEES, Eden, Paul WHYTE, John MILLS, Gale BRIGHTWELL, Tanushree B GUPTA a Declan BOLTON, 2021. An investigation into the anaerobic spoilage microbiota of beef carcass and rump steak cuts using high-throughput sequencing. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2021, roč. 368, č. 17, s. fnab109 [cit. 25.8.2023]. ISSN 1574-6968. Dostupné na: doi:10.1093/femsle/fnab109

FAIXOVÁ, Zita a S. FAIX, 2008. Biological effects of rosemary essential oil (Review). *Folia Veterinaria*. 2008, roč. 52, s. 135–139.

FARBER, M. a P. PETERKIN, 1999. *Incidence and Behaviour of Listeria monocytogenes in Meat Products. Listeria, Listeriosis and Food Safety*. New York: Marcel Dekker Inc. ISBN ISBN 978-1-4200-0087-0.

FASSEAS, M.K., K.C. MOUNTZOURIS, P.A. TARANTILIS, M. POLISSIOU a G. ZERVAS, 2008. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry* [online]. 2008, roč. 106, č. 3, s. 1188–1194 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03088146. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2007.07.060

FDA, 2019. Food Code 2009. *FDA* [online]. 2019 [cit. 23.8.2023]. Dostupné na: <https://www.fda.gov/food/fda-food-code/food-code-2009>

FERREIRA, João Victor N., Tabata M. CAPELLO, Leonardo J. A. SIQUEIRA, João Henrique G. LAGO a Luciano CASELI, 2016. Mechanism of Action of Thymol on Cell Membranes Investigated through Lipid Langmuir Monolayers at the Air–Water Interface and Molecular Simulation. *Langmuir* [online]. 2016, roč. 32, č. 13, s. 3234–3241 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0743-7463, 1520-5827. Dostupné na: doi:10.1021/acs.langmuir.6b00600

FIRSTENBERG-EDEN, Ruth, 1981. Attachment of Bacteria to Meat Surfaces: A Review. *Journal of Food Protection* [online]. 1981, roč. 44, č. 8, s. 602–607 [cit. 25.8.2023]. ISSN 0362028X. Dostupné na: doi:10.4315/0362-028X-44.8.602

FRIESEMA, Ingrid H.M., Barbara SCHIMMER, Jeanette A. ROS, Henk Jan OBER, Max E.O.C. HECK, Corien M. SWAAN, Carolien M. DE JAGER, Rosa M. PERAN I SALA a Wilfrid VAN PELT, 2012. A Regional *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Outbreak Associated with Raw Beef Products, The Netherlands, 2010. *Foodborne Pathogens and Disease* [online]. 2012, roč. 9, č. 2, s. 102–107 [cit. 25.8.2023]. ISSN 1535-3141, 1556-7125. Dostupné na: doi:10.1089/fpd.2011.0978

GÁL, Robert, Natália ČMIKOVÁ, Aneta PROKOPOVÁ a Miroslava KAČÁNIOVÁ, 2023. Antilisterial and Antimicrobial Effect of *Salvia officinalis* Essential Oil in Beef Sous-Vide Meat during Storage. *Foods* [online]. 2023, roč. 12, č. 11, s. 2201 [cit. 25.8.2023]. ISSN 2304-8158. Dostupné na: doi:10.3390/foods12112201

GARCÍA-LINARES, M.c., E. GONZALEZ-FANDOS, M.c. GARCÍA-FERNÁNDEZ a M.t. GARCÍA-ARIAS, 2004. Microbiological and Nutritional Quality of Sous Vide or Traditionally Processed Fish: Influence of Fat Content. *Journal of Food Quality* [online]. 2004, roč. 27, č. 5, s. 371–387 [cit. 28.11.2022]. ISSN 1745-4557. Dostupné na: doi:10.1111/j.1745-4557.2004.00676.x

GHASEMI, Ghader, Abolfazl ALIREZALU, Youbert GHOSTA, Azadeh JARRAHI, Seyed Ali SAFAVI, Mahdi ABBAS-MOHAMMADI, Francisco J. BARBA, Paulo E. S.



MUNEKATA, Rubén DOMÍNGUEZ a José M. LORENZO, 2020. Composition, Antifungal, Phytotoxic, and Insecticidal Activities of *Thymus kotschyanus* Essential Oil. *Molecules* [online]. 2020, roč. 25, č. 5, s. 1152 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1420-3049. Dostupné na: doi:10.3390/molecules25051152

GHAZALA, S., J. AUCCOIN a T. ALKANANI, 1996. Pasteurization Effect on Fatty Acid Stability in a Sous Vide Product Containing Seal Meat (*Phoca groenlandica*). *Journal of Food Science* [online]. 1996, roč. 61, č. 3, s. 520–523 [cit. 28.11.2022]. ISSN 1750-3841. Dostupné na: doi:10.1111/j.1365-2621.1996.tb13147.x

GILL, A.O, P DELAQUIS, P RUSSO a R.A HOLLEY, 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2002, roč. 73, č. 1, s. 83–92 [cit. 23.8.2023]. ISSN 01681605. Dostupné na: doi:10.1016/S0168-1605(01)00712-7

GŁUCHOWSKI, Artur, Ewa CZARNIECKA-SKUBINA a Maria BUŁA, 2020. The Use of the Sous-Vide Method in the Preparation of Poultry at Home and in Catering—Protection of Nutrition Value Whether High Energy Consumption. *Sustainability* [online]. 2020, roč. 12, č. 18, s. 7606 [cit. 24.8.2023]. ISSN 2071-1050. Dostupné na: doi:10.3390/su12187606

GONZÁLEZ-FANDOS, E., A. VILLARINO-RODRÍGUEZ, M. C. GARCÍA-LINARES, M. T. GARCÍA-ARIAS a M. C. GARCÍA-FERNÁNDEZ, 2005. Microbiological safety and sensory characteristics of salmon slices processed by the sous vide method. *Food Control* [online]. 2005, roč. 16, č. 1, s. 77–85 [cit. 28.11.2022]. ISSN 0956-7135. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodcont.2003.11.011

GONZÁLEZ-VALLINAS, Margarita, Susana MOLINA, Gonzalo VICENTE, Ana DE LA CUEVA, Teodoro VARGAS, Susana SANTOYO, Mónica R. GARCÍA-RISCO, Tiziana FORNARI, Guillermo REGLERO a Ana RAMÍREZ DE MOLINA, 2013. Antitumor effect of 5-fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells. *Pharmacological Research* [online]. 2013, roč. 72, s. 61–68 [cit. 23.8.2023]. ISSN 10436618. Dostupné na: doi:10.1016/j.phrs.2013.03.010

GOULAS, Antonios E. a Michael G. KONTOMINAS, 2007. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry* [online]. 2007, roč. 100, č. 1, s. 287–296 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03088146. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.045

HAMUEL, James Doughari, 2012. Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents. V: [online]. ISBN 978-953-51-0296-0. Dostupné na: doi:10.5772/26052

HAYAT, Sumreen, Saima MUZAMMIL, SHABANA, Bilal ASLAM, Muhammad Hassnain SIDDIQUE, Muhammad SAQALEIN a Muhammad Atif NISAR, 2019. Quorum quenching: role of nanoparticles as signal jammers in Gram-negative bacteria. *Future Microbiology* [online]. 2019, roč. 14, č. 1, s. 61–72 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1746-0913, 1746-0921. Dostupné na: doi:10.2217/fmb-2018-0257



HAYOUNI, El Akrem, Imed CHRAIEF, Manaf ABEDRABBA, Marielle BOUIX, Jean-Yves LEVEAU, Hammami MOHAMMED a Moktar HAMDJ, 2008. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2008, roč. 125, č. 3, s. 242–251. ISSN 0168-1605. Dostupné na: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.005

HEIMAN, Katherine E., Rajal K. MODY, Shacara D. JOHNSON, Patricia M. GRIFFIN a L. Hannah GOULD, 2015. *Escherichia coli* O157 Outbreaks in the United States, 2003–2012. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 2015, roč. 21, č. 8 [cit. 25.8.2023]. ISSN 1080-6040, 1080-6059. Dostupné na: doi:10.3201/eid2108.141364

HILGARTH, M., J. BEHR a R.F. VOGEL, 2018. Monitoring of spoilage-associated microbiota on modified atmosphere packaged beef and differentiation of psychrophilic and psychrotrophic strains. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2018, roč. 124, č. 3, s. 740–753 [cit. 25.8.2023]. ISSN 13645072. Dostupné na: doi:10.1111/jam.13669

HÖLL, Linda, Jürgen BEHR a Rudi F. VOGEL, 2016. Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS. *Food Microbiology* [online]. 2016, roč. 60, s. 84–91 [cit. 25.8.2023]. ISSN 07400020. Dostupné na: doi:10.1016/j.fm.2016.07.003

HOLLEY, Richard A., Michael D. PEIRSON, Jocelyn LAM a Kit Bee TAN, 2004. Microbial profiles of commercial, vacuum-packaged, fresh pork of normal or short storage life. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, roč. 97, č. 1, s. 53–62 [cit. 25.8.2023]. ISSN 01681605. Dostupné na: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.029

HONG, Go-Eun, Ji-Han KIM, Su-Jin AHN a Chi-Ho LEE, 2015. Changes in Meat Quality Characteristics of the Sous-vide Cooked Chicken Breast during Refrigerated Storage. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* [online]. 2015, roč. 35, č. 6, s. 757–764 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1225-8563. Dostupné na: doi:10.5851/kosfa.2015.35.6.757

HOPKINS, D.L. a S.I. MORTIMER, 2014. Effect of genotype, gender and age on sheep meat quality and a case study illustrating integration of knowledge. *Meat Science* [online]. 2014, roč. 98, č. 3, s. 544–555 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na: doi:10.1016/j.meatsci.2014.05.012

HULTMAN, Jenni, Riitta RAHKILA, Javeria ALI, Juho ROUSU a K. Johanna BJÖRKROTH, 2015. Meat Processing Plant Microbiome and Contamination Patterns of Cold-Tolerant Bacteria Causing Food Safety and Spoilage Risks in the Manufacture of Vacuum-Packaged Cooked Sausages. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2015, roč. 81, č. 20, s. 7088–7097 [cit. 25.8.2023]. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné na: doi:10.1128/AEM.02228-15

HUNT, Heather B., Samuel C. WATSON, Byron D. CHAVES a Gary A. SULLIVAN, 2023. Inactivation of *Salmonella* in nonintact beef during low-temperature sous vide cooking. *Journal of Food Protection* [online]. 2023, roč. 86, č. 1, s. 100010 [cit. 25.8.2023]. ISSN 0362028X. Dostupné na: doi:10.1016/j.jfp.2022.11.003



HYLDGAARD, Morten, Tina MYGIND a Rikke MEYER, 2012. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2012, roč. 3 [cit. 12.8.2023]. ISSN 1664-302X. Dostupné na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00012>

HYTTIÄ-TREES, Eija, Eija SKYTTÄ, Mirja MOKKILA, Arvo KINNUNEN, Miia LINDSTRÖM, Liisa LÄHTEENMÄKI, Raija AHVENAINEN a Hannu KORKEALA, 2000. Safety Evaluation of Sous Vide-Processed Products with Respect to Nonproteolytic *Clostridium botulinum* by Use of Challenge Studies and Predictive Microbiological Models. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2000, roč. 66, č. 1, s. 223–229 [cit. 25.3.2023]. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné na: doi:10.1128/AEM.66.1.223-229.2000

CHAE, In Gyeong, Mi Hee YU, Nam-Kyung IM, Young Tae JUNG, Jinho LEE, Kyung-Soo CHUN a In-Seon LEE, 2012. Effect of *Rosemarinus officinalis* L. on MMP-9, MCP-1 Levels, and Cell Migration in RAW 264.7 and Smooth Muscle Cells. *Journal of Medicinal Food* [online]. 2012, roč. 15, č. 10, s. 879–886 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1096-620X, 1557-7600. Dostupné na: doi:10.1089/jmf.2012.2162

CHAILLOU, Stéphane, Aurélie CHAULOT-TALMON, Hélène CAEKEBEKE, Mireille CARDINAL, Souad CHRISTIEANS, Catherine DENIS, Marie HÉLÈNE DESMONTS, Xavier DOUSSET, Carole FEURER, Erwann HAMON, Jean-Jacques JOFFRAUD, Stéphanie LA CARBONA, Françoise LEROI, Sabine LEROY, Sylvie LORRE, Sabrina MACÉ, Marie-France PILET, Hervé PRÉVOST, Marina RIVOLLIER, Daphine ROUX, Régine TALON, Monique ZAGOREC a Marie-Christine CHAMPOMIER-VERGÈS, 2015. Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. *The ISME Journal* [online]. 2015, roč. 9, č. 5, s. 1105–1118 [cit. 25.8.2023]. ISSN 1751-7362, 1751-7370. Dostupné na: doi:10.1038/ismej.2014.202

CHAN, Yvonne C. a Martin WIEDMANN, 2008. Physiology and Genetics of *Listeria monocytogenes* Survival and Growth at Cold Temperatures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2008, roč. 49, č. 3, s. 237–253 [cit. 25.8.2023]. ISSN 1040-8398, 1549-7852. Dostupné na: doi:10.1080/10408390701856272

CHAVES, Rafael D., Alessandra R. SILVA, Anderson S. SANT'ANA, Felipe B. CAMPANA a Pilar R. MASSAGUER, 2012. Gas-producing and spoilage potential of Enterobacteriaceae and lactic acid bacteria isolated from chilled vacuum-packaged beef: Spoilage of vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2012, roč. 47, č. 8, s. 1750–1756 [cit. 25.8.2023]. ISSN 09505423. Dostupné na: doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03030.x

CHEN, Cynthia H., Sadhana RAVISHANKAR, John MARCHELLO a Mendel FRIEDMAN, 2013. Antimicrobial Activity of Plant Compounds against *Salmonella Typhimurium* DT104 in Ground Pork and the Influence of Heat and Storage on the Antimicrobial Activity. *Journal of Food Protection* [online]. 2013, roč. 76, č. 7, s. 1264–1269 [cit. 12.8.2023]. ISSN 0362028X. Dostupné na: doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-493





CHURCH, Ivor J. a Anthony L. PARSONS, 2000. The sensory quality of chicken and potato products prepared using cook-chill and sous vide methods. *International Journal of Food Science and Technology* [online]. 2000, roč. 35, č. 2, s. 155–162 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0950-5423, 1365-2621. Dostupné na: doi:10.1046/j.1365-2621.2000.00361.x

IBORRA-BERNAD, C., P. GARCÍA-SEGOVIA a J. MARTÍNEZ-MONZÓ, 2015. Physico-Chemical and Structural Characteristics of Vegetables Cooked Under Sous-Vide, Cook-Vide, and Conventional Boiling: Vacuum cooked vegetables.... *Journal of Food Science* [online]. 2015, roč. 80, č. 8, s. E1725–E1734 [cit. 19.8.2023]. ISSN 00221147. Dostupné na: doi:10.1111/1750-3841.12950

ISMAIL, Ishamri, Young-Hwa HWANG, Allah BAKHSH a Seon-Tea JOO, 2019. The alternative approach of low temperature-long time cooking on bovine semitendinosus meat quality. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* [online]. 2019, roč. 32, č. 2, s. 282–289 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1011-2367, 1976-5517. Dostupné na: doi:10.5713/ajas.18.0347

IULIETTO, Maria F., Paola SECHI, Elena BORGOGNI a Beniamino T. CENCI-GOGA, 2015. Meat Spoilage: A Critical Review of a Neglected Alteration Due to Ropy Slime Producing Bacteria. *Italian Journal of Animal Science* [online]. 2015, roč. 14, č. 3, s. 4011 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1828-051X. Dostupné na: doi:10.4081/ijas.2015.4011

JARVIS, Karen G., James R. WHITE, Christopher J. GRIM, Laura EWING, Andrea R. OTTESEN, Junia Jean-Gilles BEAUBRUN, James B. PETTENGILL, Eric BROWN a Darcy E. HANES, 2015. Cilantro microbiome before and after nonselective pre-enrichment for *Salmonella* using 16S rRNA and metagenomic sequencing. *BMC Microbiology* [online]. 2015, roč. 15, č. 1, s. 160 [cit. 25.8.2023]. ISSN 1471-2180. Dostupné na: doi:10.1186/s12866-015-0497-2

JAYASENA, Dinesh D. a Cheorun JO, 2013. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2013, roč. 34, č. 2, s. 96–108 [cit. 23.8.2023]. ISSN 09242244. Dostupné na: doi:10.1016/j.tifs.2013.09.002

JEONG, Kiyoung, Hyeonbin O, So Yeon SHIN a Young-Soon KIM, 2018. Effects of sous-vide method at different temperatures, times and vacuum degrees on the quality, structural, and microbiological properties of pork ham. *Meat Science* [online]. 2018, roč. 143, s. 1–7 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na: doi:10.1016/j.meatsci.2018.04.010

JUNEJA, Vijay K., M.L. BARI, Y. INATSU, S. KAWAMOTO a Mendel FRIEDMAN, 2009. Thermal Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in Sous-Vide Cooked Ground Beef as Affected by Tea Leaf and Apple Skin Powders. *Journal of Food Protection* [online]. 2009, roč. 72, č. 4, s. 860–865 [cit. 25.8.2023]. ISSN 0362028X. Dostupné na: doi:10.4315/0362-028X-72.4.860

JUNEJA, Vijay K., Marangeli OSORIA, Uma TIWARI, Xinran XU, Chase E. GOLDEN, Sudarsan MUKHOPADHYAY a Abhinav MISHRA, 2020. The effect of lauric arginate on the thermal inactivation of starved *Listeria monocytogenes* in sous-vide cooked



ground beef. *Food Research International* [online]. 2020, roč. 134, s. 109280 [cit. 8.8.2023]. ISSN 09639969. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodres.2020.109280

JUVEN, B.J., J. KANNER, F. SCHVED a H. WEISSLOWICZ, 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* [online]. 1994, roč. 76, č. 6, s. 626–631 [cit. 12.8.2023]. ISSN 00218847. Dostupné na: doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x

KAČÁNIOVÁ, Miroslava, Nenad VUKOVIČ, Elena HORSKÁ, Ivan ŠALAMON, Alica BOBKOVÁ, Lukáš HLEBA, Martin MELLEN, Alexander VATLÁK, Jana PETROVÁ a Marek BOBKO, 2014. Antibacterial activity against *Clostridium* genus and antiradical activity of the essential oils from different origin. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* [online]. 2014, roč. 49, č. 7, s. 505–512 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0360-1234, 1532-4109. Dostupné na: doi:10.1080/03601234.2014.896673

KAR, Susanta, Shreyasi PALIT, Writoban Basu BALL a Pijush K. DAS, 2012. Carnosic acid modulates Akt/IKK/NF- $\kappa$ B signaling by PP2A and induces intrinsic and extrinsic pathway mediated apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Apoptosis* [online]. 2012, roč. 17, č. 7, s. 735–747 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1360-8185, 1573-675X. Dostupné na: doi:10.1007/s10495-012-0715-4

KARABAGIAS, I., A. BADEKA a M.G. KONTOMINAS, 2011. Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. *Meat Science* [online]. 2011, roč. 88, č. 1, s. 109–116 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na: doi:10.1016/j.meatsci.2010.12.010

KARYOTIS, Dimitrios, Panagiotis N. SKANDAMIS a Vijay K. JUNEJA, 2017a. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in sous-vide processed marinated chicken breast. *Food Research International* [online]. 2017, roč. 100, s. 894–898 [cit. 8.8.2023]. ISSN 09639969. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodres.2017.07.078

KAUR, Lovedeep, Seah Xin HUI a Mike BOLAND, 2020. Changes in Cathepsin Activity during Low-Temperature Storage and Sous Vide Processing of Beef Brisket. *Food Science of Animal Resources* [online]. 2020, roč. 40, č. 3, s. 415–425 [cit. 23.8.2023]. ISSN 2636-0772, 2636-0780. Dostupné na: doi:10.5851/kosfa.2020.e21

KAUR, Mandeep, Hongshan SHANG, Mark TAMPLIN, Tom ROSS a John P. BOWMAN, 2017. Culture-dependent and culture-independent assessment of spoilage community growth on VP lamb meat from packaging to past end of shelf-life. *Food Microbiology* [online]. 2017, roč. 68, s. 71–80 [cit. 25.8.2023]. ISSN 07400020. Dostupné na: doi:10.1016/j.fm.2017.06.015

KEHLET, Ursula, Bhaskar MITRA, Jorge RUIZ CARRASCAL, Anne RABEN a Margit AASLYNG, 2017. The Satiating Properties of Pork are not Affected by Cooking Methods, Sousvide Holding Time or Mincing in Healthy Men—A Randomized Cross-Over Meal Test Study. *Nutrients* [online]. 2017, roč. 9, č. 9, s. 941 [cit. 19.8.2023]. ISSN 2072-6643. Dostupné na: doi:10.3390/nu9090941

KEREKES, E.-B., É. DEÁK, M. TAKÓ, R. TSERENNADMID, T. PETKOVITS, C. VÁGVÖLGYI a J. KRISCH, 2013. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity



of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2013, roč. 115, č. 4, s. 933–942 [cit. 23.8.2023]. ISSN 13645072. Dostupné na: doi:10.1111/jam.12289

KILIBARDA, Natasa, Ivana BRDAR, Branislav BALTIC, Vladan MARKOVIC, Hava MAHMUTOVIC, Nedjeljko KARABASIL a Svetlana STANISIC, 2018. The Safety and Quality of Sous Vide Food. *Meat Technology* [online]. 2018, roč. 59, č. 1, s. 38–45 [cit. 24.8.2023]. ISSN 2466-4812, 2560-4295. Dostupné na: doi:10.18485/meattech.2018.59.1.5

KIVI, M., A. HOFHUIS, D. W. NOTERMANS, W. J. B. WANNET, M. E. O. C. HECK, A. W. VAN DE GIESSEN, Y. T. H. P. VAN DUYNHOVEN, O. F. J. STENVERS, A. BOSMAN a W. VAN PELT, 2007. A beef-associated outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT104 in The Netherlands with implications for national and international policy. *Epidemiology and Infection* [online]. 2007, roč. 135, č. 6, s. 890–899 [cit. 25.8.2023]. ISSN 0950-2688, 1469-4409. Dostupné na: doi:10.1017/S0950268807007972

KLANČNIK, Anja, Bernarda GUZEJ, Majda Hadolin KOLAR, Helena ABRAMOVIČ a Sonja Smole MOŽINA, 2009. *In Vitro* Antimicrobial and Antioxidant Activity of Commercial Rosemary Extract Formulations. *Journal of Food Protection* [online]. 2009, roč. 72, č. 8, s. 1744–1752 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0362028X. Dostupné na: doi:10.4315/0362-028X-72.8.1744

KOHLERT, Claudia, Gernot SCHINDLER, Reinhard W MÄRZ, Gudrun ABEL, Benno BRINKHAUS, Hartmut DERENDORF, Eva-Ulrike GRÄFE a Markus VEIT, 2002. Systemic Availability and Pharmacokinetics of Thymol in Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 2002, roč. 42, č. 7, s. 731–737 [cit. 23.8.2023]. ISSN 00912700. Dostupné na: doi:10.1177/009127002401102678

KONTOMINAS, Michael, 2014. Modified Atmosphere packaging of foods. V: *In Encyclopedia of food microbiology*. London: Academic Press, Batt C.A., Tortorello M.L., s. 1012–1026.

KOSAKOWSKA, Olga, Katarzyna BĄCZEK, Jarosław L. PRZYBYŁ, Anna PAWEŁCZAK, Katarzyna ROLEWSKA a Zenon WĘGLARZ, 2020. Morphological and Chemical Traits as Quality Determinants of Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.), on the Example of 'Standard Winter' Cultivar. *Agronomy* [online]. 2020, roč. 10, č. 6, s. 909 [cit. 23.8.2023]. ISSN 2073-4395. Dostupné na: doi:10.3390/agronomy10060909

KOSTOGLU, Dimitra, Ioannis PROTOPAPPAS a Efstathios GIAOURIS, 2020. Common Plant-Derived Terpenoids Present Increased Anti-Biofilm Potential against *Staphylococcus* Bacteria Compared to a Quaternary Ammonium Biocide. *Foods* [online]. 2020, roč. 9, č. 6, s. 697 [cit. 23.8.2023]. ISSN 2304-8158. Dostupné na: doi:10.3390/foods9060697

KRYVTSOVA, M. V., I. SALAMON, J. KOSCOVA, D. BUCKO a M. SPIVAK, 2019. Antimicrobial, antibiofilm and biochemical properties of *Thymus vulgaris* essential oil against clinical isolates of opportunistic infections. *Biosystems Diversity* [online]. 2019, roč. 27, č. 3, s. 270–275 [cit. 23.8.2023]. ISSN 2520-2529, 2519-8513. Dostupné na: doi:10.15421/011936



- KUMARI, Poonam, Neha ARORA, Apurva CHATRATH, Rashmi GANGWAR, Vikas PRUTHI, Krishna Mohan POLURI a Ramasare PRASAD, 2019. Delineating the Biofilm Inhibition Mechanisms of Phenolic and Aldehydic Terpenes against *Cryptococcus neoformans*. *ACS Omega* [online]. 2019, roč. 4, č. 18, s. 17634–17648 [cit. 23.8.2023]. ISSN 2470-1343, 2470-1343. Dostupné na: doi:10.1021/acsomega.9b01482
- KUMARI, Poonam, Ritusmita MISHRA, Neha ARORA, Apurva CHATRATH, Rashmi GANGWAR, Partha ROY a Ramasare PRASAD, 2017. Antifungal and Anti-Biofilm Activity of Essential Oil Active Components against *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus laurentii*. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, roč. 8, s. 2161 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1664-302X. Dostupné na: doi:10.3389/fmicb.2017.02161
- KUO, Chia-Feng, Jeng-De SU, Chun-Hung CHIU, Chiung-Chi PENG, Chi-Huang CHANG, Tzu-Ying SUNG, Shiau-Huei HUANG, Wen-Chin LEE a Charng-Cherng CHYAU, 2011. Anti-Inflammatory Effects of Supercritical Carbon Dioxide Extract and Its Isolated Carnosic Acid from *Rosmarinus officinalis* Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2011, roč. 59, č. 8, s. 3674–3685 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné na: doi:10.1021/jf104837w
- KURP, Lidia, Marzena DANOWSKA-OZIEWICZ a Lucyna KŁĘBUKOWSKA, 2022. Sous Vide Cooking Effects on Physicochemical, Microbiological and Sensory Characteristics of Pork Loin. *Applied Sciences* [online]. 2022, roč. 12, č. 5, s. 2365 [cit. 25.8.2023]. ISSN 2076-3417. Dostupné na: doi:10.3390/app12052365
- LASSEN, Anne, Morten KALL, Kristen HANSEN a Lars OVESEN, 2002. A comparison of the retention of vitamins B1, B2 and B6, and cooking yield in pork loin with conventional and enhanced meal-service systems. *European Food Research and Technology* [online]. 2002, č. 215, s. 194–199 [cit. 28.11.2022]. Dostupné na: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-002-0554-6>
- LEAL, Patrícia F., Mara E. M. BRAGA, Daisy N. SATO, João E. CARVALHO, Marcia O. M. MARQUES a M. Angela A. MEIRELES, 2003. Functional Properties of Spice Extracts Obtained via Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, roč. 51, č. 9, s. 2520–2525 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné na: doi:10.1021/jf0260693
- LEE, Kwang-Geun a Takayuki SHIBAMOTO, 2002. Determination of Antioxidant Potential of Volatile Extracts Isolated from Various Herbs and Spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2002, roč. 50, č. 17, s. 4947–4952 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné na: doi:10.1021/jf0255681
- LEE, So-Yeon, Ki-Hyun KWON, Changhoon CHAI a Se-Wook OH, 2017. Growth behavior comparison of *Listeria monocytogenes* between Type strains and beef isolates in raw beef. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2017 [cit. 25.8.2023]. ISSN 1226-7708, 2092-6456. Dostupné na: doi:10.1007/s10068-017-0258-0
- LI, C. B., G. H. ZHOU a X. L. XU, 2010. Dynamical Changes of Beef Intramuscular Connective Tissue and Muscle Fiber during Heating and their Effects on Beef Shear Force. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2010, roč. 3, č. 4, s. 521–527 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1935-5130, 1935-5149. Dostupné na: doi:10.1007/s11947-008-0117-3





LIMBO, S., L. TORRI, N. SINELLI, L. FRANZETTI a E. CASIRAGHI, 2010. Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Science* [online]. 2010, roč. 84, č. 1, s. 129–136 [cit. 25.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na: doi:10.1016/j.meatsci.2009.08.035

LIOLIOS, C.C., O. GORTZI, S. LALAS, J. TSAKNIS a I. CHINOU, 2009. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry* [online]. 2009, roč. 112, č. 1, s. 77–83 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03088146. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.060

LO, Ai-Hsiang, Yu-Chih LIANG, Shoei-Yn LIN-SHIAU, Chi-Tang HO a Jen-Kun LIN, 2002. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- $\kappa$ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis* [online]. 2002, roč. 23, č. 6, s. 983–991 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1460-2180, 0143-3334. Dostupné na: doi:10.1093/carcin/23.6.983

LOVKOVA, M. Ya., G. N. BUZUK, S. M. SOKOLOVA a N. I. KLIMENT'EVA, 2001. Chemical Features of Medicinal Plants. *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2001, roč. 37, č. 3, s. 229–237 [cit. 23.8.2023]. ISSN 00036838. Dostupné na: doi:10.1023/A:1010254131166

LOŽIENE, Kristina, Jon VAIČIŪNIENE a Petras R. VENSKUTONIS, 2003. Chemical composition of the essential oil of different varieties of thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Lithuania. *Biochemical Systematics and Ecology* [online]. 2003, roč. 31, č. 3, s. 249–259 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03051978. Dostupné na: doi:10.1016/S0305-1978(02)00142-4

LUCARINI, Rodrigo, Wagner A. BERNARDES, Daniele S. FERREIRA, Marcos G. TOZATTI, Ricardo FURTADO, Jairo K. BASTOS, Patrícia M. PAULETTI, Ana H. JANUÁRIO, Márcio L. Andrade E SILVA a Wilson R. CUNHA, 2013. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of *Rosmarinus officinalis* aqueous extracts, rosmarinic acid and its acetyl ester derivative. *Pharmaceutical Biology* [online]. 2013, roč. 51, č. 9, s. 1087–1090 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1388-0209, 1744-5116. Dostupné na: doi:10.3109/13880209.2013.776613

LUKACZER, Daniel, Gary DARLAND, Matthew TRIPP, De Ann LISKA, Robert H. LERMAN, Barbara SCHILTZ a Jeffrey S. BLAND, 2005. A Pilot trial evaluating meta050, a proprietary combination of reduced iso-alpha acids, rosemary extract and oleanolic acid in patients with arthritis and fibromyalgia. *Phytotherapy Research* [online]. 2005, roč. 19, č. 10, s. 864–869 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0951-418X, 1099-1573. Dostupné na: doi:10.1002/ptr.1709

LUQMAN, Suaib, Gaurav R. DWIVEDI, Mahendra P. DAROKAR, Alok KALRA a Suman P. S. KHANUJA, 2007. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 2007, roč. 13, č. 5, s. 54–59. ISSN 1078-6791.

MARINO, Marilena, Carla BERSANI a Giuseppe COMI, 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and



Compositae. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2001, roč. 67, č. 3, s. 187–195 [cit. 8.8.2023]. ISSN 01681605. Dostupné na: doi:10.1016/S0168-1605(01)00447-0

MARTINEZ, Luis R. a Arturo CASADEVALL, 2015. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. V: Mahmoud GHANNOUM, Matthew PARSEK, Marvin WHITELEY a Pranab K. MUKHERJEE, ed. *Microbial Biofilms* [online]. Washington, DC, USA: ASM Press, s. 135–147 [cit. 23.8.2023]. ISBN 978-1-68367-091-9. Dostupné na: doi:10.1128/9781555817466.ch7

MCCARTHY, S A, 1991. Pathogenicity of nonstressed, heat-stressed, and resuscitated *Listeria monocytogenes* 1A1 cells. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1991, roč. 57, č. 8, s. 2389–2391 [cit. 25.8.2023]. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné na: doi:10.1128/aem.57.8.2389-2391.1991

MEMAR, Mohammad Y., Parisa RAEI, Naser ALIZADEH, Masoud AKBARI AGHDAM a Hossein Samadi KAFIL, 2017. Carvacrol and thymol: strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical Microbiology* [online]. 2017, roč. 28, č. 2, s. 63–68 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0954-139X, 1473-5601. Dostupné na: doi:10.1097/MRM.000000000000100

MILLS, John, Andrea DONNISON a Gale BRIGHTWELL, 2014. Factors affecting microbial spoilage and shelf-life of chilled vacuum-packed lamb transported to distant markets: A review. *Meat Science* [online]. 2014, roč. 98, č. 1, s. 71–80 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na: doi:10.1016/j.meatsci.2014.05.002

MINICH, Deanna M., Jeffrey S. BLAND, Jeffrey KATKE, Gary DARLAND, Amy HALL, Robert H. LERMAN, Joseph LAMB, Brian CARROLL a Matthew TRIPP, 2007. Clinical safety and efficacy of NG440: a novel combination of rho iso-alpha acids from hops, rosemary, and oleanolic acid for inflammatory conditions This article is one of a selection of papers published in this special issue (part 1 of 2) on the Safety and Efficacy of Natural Health Products. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* [online]. 2007, roč. 85, č. 9, s. 872–883 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0008-4212, 1205-7541. Dostupné na: doi:10.1139/Y07-055

MOHAMED, S.H., M.S.M. MOHAMED, M.S. KHALIL, M. AZMY a M.I. MABROUK, 2018. Combination of essential oil and ciprofloxacin to inhibit/eradicate biofilms in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2018, roč. 125, č. 1, s. 84–95 [cit. 23.8.2023]. ISSN 13645072. Dostupné na: doi:10.1111/jam.13755

MOSCHONAS, G., D. J. BOLTON, D. A. MCDOWELL a J. J. SHERIDAN, 2011a. Diversity of Culturable Psychrophilic and Psychrotrophic Anaerobic Bacteria Isolated from Beef Abattoirs and Their Environments. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011, roč. 77, č. 13, s. 4280–4284 [cit. 25.8.2023]. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné na: doi:10.1128/AEM.01778-10

MOSCHONAS, Galatios, Declan J. BOLTON, James J. SHERIDAN a David A. MCDOWELL, 2011b. The effect of heat shrink treatment and storage temperature on the time of onset of “blown pack” spoilage. *Meat Science* [online]. 2011, roč. 87, č. 2,



s. 115–118 [cit. 25.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na:  
doi:10.1016/j.meatsci.2010.09.007

NAGHDI BADI, Hassanali, Darab YAZDANI, Sajed Mohammad ALI a Fatemeh NAZARI, 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* [online]. 2004, roč. 19, č. 3, s. 231–236 [cit. 23.8.2023]. ISSN 09266690. Dostupné na:  
doi:10.1016/j.indcrop.2003.10.005

NAGOOR MEERAN, Mohamed Fizur, Hayate JAVED, Hasan AL TAE, Sheikh AZIMULLAH a Shreesh K. OJHA, 2017. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2017, roč. 8, s. 380 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1663-9812. Dostupné na: doi:10.3389/fphar.2017.00380

NATTRESS, F, 2001. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2001, roč. 70, č. 1–2, s. 111–119 [cit. 25.8.2023]. ISSN 01681605. Dostupné na: doi:10.1016/S0168-1605(01)00531-1

NAVEENA, Bm, Panjab S KHANSOLE, M SHASHI KUMAR, N KRISHNAIAH, Vinayak V KULKARNI a Sj DEEPAK, 2017. Effect of sous vide processing on physicochemical, ultrastructural, microbial and sensory changes in vacuum packaged chicken sausages. *Food Science and Technology International* [online]. 2017, roč. 23, č. 1, s. 75–85 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1082-0132, 1532-1738. Dostupné na:  
doi:10.1177/1082013216658580

NAVON-VENEZIA, Shiri, Kira KONDRATYEVA a Alessandra CARATTOLI, 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2017, roč. 41, č. 3, s. 252–275 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1574-6976. Dostupné na: doi:10.1093/femsre/fux013

NAZAR, F.N., E.A. VIDELA a R.H. MARIN, 2019. Thymol supplementation effects on adrenocortical, immune and biochemical variables recovery in Japanese quail after exposure to chronic heat stress. *animal* [online]. 2019, roč. 13, č. 2, s. 318–325 [cit. 23.8.2023]. ISSN 17517311. Dostupné na: doi:10.1017/S175173111800157X

NGUEFACK, J., O. TAMGUE, J.B. Lekagne DONGMO, C.D. DAKOLE, V. LETH, H.F. VISMER, P.H. AMVAM ZOLLO a A.E. NKENGFACK, 2012. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. *Food Control* [online]. 2012, roč. 23, č. 2, s. 377–383 [cit. 23.8.2023]. ISSN 09567135. Dostupné na:  
doi:10.1016/j.foodcont.2011.08.002

O'BRIEN, Thomas F., 2002. Emergence, Spread, and Environmental Effect of Antimicrobial Resistance: How Use of an Antimicrobial Anywhere Can Increase Resistance to Any Antimicrobial Anywhere Else. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2002, roč. 34, č. s3, s. S78–S84 [cit. 25.8.2023]. ISSN 1058-4838, 1537-6591. Dostupné na: doi:10.1086/340244



ODEYEMI, Olumide Adedokun, Oluwadara Oluwaseun ALEGBELEYE, Mariyana STRATEVA a Deyan STRATEV, 2020. Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2020, roč. 19, č. 2, s. 311–331 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1541-4337, 1541-4337. Dostupné na: doi:10.1111/1541-4337.12526

OECD, 2017. Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD). *Ministerstvo financií Slovenskej republiky* [online] [cit. 23.8.2023]. Dostupné na: <https://www.mfsr.sk/sk/medzinarodne-vztahy/medzinarodne-institucie/medzinarodne-organizacie/organizacia-hospodarsku-spolupracu-rozvoj-oecd/organizacia-hospodarsku-spolupracu-rozvoj-oecd.html>

OKSHEVSKY, Mira, Viduthalai R REGINA a Rikke Louise MEYER, 2015. Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2015, roč. 33, s. 73–80 [cit. 23.8.2023]. ISSN 09581669. Dostupné na: doi:10.1016/j.copbio.2014.12.002

OTTESEN, Andrea R., Antonio GONZALEZ, Rebecca BELL, Caroline ARCE, Steven RIDEOUT, Marc ALLARD, Peter EVANS, Errol STRAIN, Steven MUSSER, Rob KNIGHT, Eric BROWN a James B. PETTENGILL, 2013. Co-Enriching Microflora Associated with Culture Based Methods to Detect *Salmonella* from Tomato Phyllosphere. *PLoS ONE* [online]. 2013, roč. 8, č. 9, s. e73079 [cit. 25.8.2023]. ISSN 1932-6203. Dostupné na: doi:10.1371/journal.pone.0073079

OUATTARA, Blaise, Ronald E SIMARD, Richard A HOLLEY, Gabriel J.-P PIETTE a André BÉGIN, 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1997, roč. 37, č. 2–3, s. 155–162 [cit. 23.8.2023]. ISSN 01681605. Dostupné na: doi:10.1016/S0168-1605(97)00070-6

PALLERONI, Norberto J., 2015. *Pseudomonas*. V: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, s. 1–1 [cit. 23.8.2023]. ISBN 978-1-118-96060-8. Dostupné na: doi:10.1002/9781118960608.gbm01210

PELLISSARI, Franciele M., Maria V. E. GROSSMANN, Fabio YAMASHITA a Edgardo Alfonso G. PINEDA, 2009. Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch–Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, roč. 57, č. 16, s. 7499–7504 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné na: doi:10.1021/jf9002363

PENG, Chiung-Huei, Jeng-De SU, Charng-Cherng CHYAU, Tzu-Ying SUNG, Shin-Shien HO, Chiung-Chi PENG a Robert Y. PENG, 2007. Supercritical Fluid Extracts of Rosemary Leaves Exhibit Potent Anti-Inflammation and Anti-Tumor Effects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2007, roč. 71, č. 9, s. 2223–2232 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0916-8451, 1347-6947. Dostupné na: doi:10.1271/bbb.70199

PENNACCHIA, C., D. ERCOLINI a F. VILLANI, 2011. Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiology* [online]. 2011, roč. 28, č. 1, s. 84–93 [cit. 25.3.2023]. ISSN 07400020. Dostupné na: doi:10.1016/j.fm.2010.08.010



PEREZ, Ana Paula, Noelia PEREZ, Carlos Mauricio Suligoy LOZANO, Maria Julia ALTUBE, Marcelo Alexandre DE FARIAS, Rodrigo Villares PORTUGAL, Fernanda BUZZOLA, María Jose MORILLA a Eder Lilia ROMERO, 2019. The anti MRSA biofilm activity of *Thymus vulgaris* essential oil in nanovesicles. *Phytomedicine* [online]. 2019, roč. 57, s. 339–351 [cit. 23.8.2023]. ISSN 09447113. Dostupné na: doi:10.1016/j.phymed.2018.12.025

PÉREZ-FONS, Laura, María T. GARZÓN a Vicente MICOL, 2010. Relationship between the Antioxidant Capacity and Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Polyphenols on Membrane Phospholipid Order. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, roč. 58, č. 1, s. 161–171 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné na: doi:10.1021/jf9026487

PETRUZZI, Leonardo, Maria Rosaria CORBO, Milena SINIGAGLIA a Antonio BEVILACQUA, 2017. Microbial Spoilage of Foods. V: [online]. B.m.: Elsevier, s. 1–21 [cit. 23.8.2023]. ISBN 978-0-08-100502-6. Dostupné na: doi:10.1016/B978-0-08-100502-6.00002-9

PHILLIPS, Carol a Katie LAIRD, 2014. Vapour of a Citrus Essential Oil Blend and Its Antimicrobial Properties [online]. US20140037766A1. [cit. 23.8.2023]. 6. február 2014. Dostupné na: <https://patents.google.com/patent/US20140037766A1/en>

POHL, Carolina, Johan KOCK a Vuyisile THIBANE, 2011. Antifungal free fatty acids: A Review. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. 2011, roč. 1.

PRASAD, Sahdeo, Vivek R. YADAV, Ramaswamy KANNAPPAN a Bharat B. AGGARWAL, 2011. Ursolic Acid, a Pentacyclin Triterpene, Potentiates TRAIL-induced Apoptosis through p53-independent Up-regulation of Death Receptors. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2011, roč. 286, č. 7, s. 5546–5557 [cit. 23.8.2023]. ISSN 00219258. Dostupné na: doi:10.1074/jbc.M110.183699

PUBCHEM, 2020. *Thymol* [online] [cit. 23.8.2023]. Dostupné na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6989>

QABAHA, Ki, 2013. Antimicrobial and free radical scavenging activities of five palestinian medicinal plants. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* [online]. 2013, roč. 10, č. 4, s. 101–108 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0189-6016. Dostupné na: doi:10.4314/ajtcam.v10i4.17

QARALLEH, Haitham, 2019. Thymol Rich *Thymbra capitata* Essential Oil Inhibits Quorum Sensing, Virulence and Biofilm Formation of Beta Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Natural Product Sciences* [online]. 2019, roč. 25, č. 2, s. 172 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1226-3907, 2288-9027. Dostupné na: doi:10.20307/nps.2019.25.2.172

QUINTERO, Orlando, Polina TRACHUK, Michael Z. LERNER, Judy SARUNGBAM, Liise-anne PIROFSKI a Sun O. PARK, 2019. Risk factors of *laryngeal cryptococcosis*: A case report. *Medical Mycology Case Reports* [online]. 2019, roč. 24, s. 82–85 [cit. 23.8.2023]. ISSN 22117539. Dostupné na: doi:10.1016/j.mmcr.2019.04.009





RAŠKOVIĆ, Aleksandar, Isidora MILANOVIĆ, Nebojša PAVLOVIĆ, Tatjana ĆEBOVIĆ, Saša VUKMIROVIĆ a Momir MIKOV, 2014. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2014, roč. 14, č. 1, s. 225 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1472-6882. Dostupné na: doi:10.1186/1472-6882-14-225

RATTANACHAIKUNSOPON, Pongsak a Parichat PHUMKHACHORN, 2010. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2010, roč. 110, č. 5, s. 614–619 [cit. 23.8.2023]. ISSN 13891723. Dostupné na: doi:10.1016/j.jbiosc.2010.06.010

RAY, B. a A. BHUNIA, 2013. *Fundamental Food Microbiology* [online]. Hoboken: CRC Press [cit. 25.8.2023]. Dostupné na: [https://books.google.sk/books?hl=en&lr=&id=wmlLBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Ray+B,+Bhunia+AK.+Fundamental+Food+Microbiology.+5th+edn+Hoboken:+CRC+Press,+2013.&ots=BXe9k9C-TG&sig=4zTmPW83b5pEMNfVU18tVLrPp8&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.sk/books?hl=en&lr=&id=wmlLBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Ray+B,+Bhunia+AK.+Fundamental+Food+Microbiology.+5th+edn+Hoboken:+CRC+Press,+2013.&ots=BXe9k9C-TG&sig=4zTmPW83b5pEMNfVU18tVLrPp8&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

ROBERTSON, Gordon L., 2005. *Food Packaging: Principles and Practice, Second Edition* [online]. 2. vyd. Boca Raton: CRC Press. ISBN 978-0-429-13289-6. Dostupné na: doi:10.1201/9781420056150

ROHATGI, Soma a Liise-anne PIROFSKI, 2015. Host immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiology* [online]. 2015, roč. 10, č. 4, s. 565–581 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1746-0913, 1746-0921. Dostupné na: doi:10.2217/fmb.14.132

ROLDÁN, Mar, Teresa ANTEQUERA, Alberto MARTÍN, Ana Isabel MAYORAL a Jorge RUIZ, 2013. Effect of different temperature–time combinations on physicochemical, microbiological, textural and structural features of sous-vide cooked lamb loins. *Meat Science* [online]. 2013, roč. 93, č. 3, s. 572–578 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na: doi:10.1016/j.meatsci.2012.11.014

ROSARIO, Denes K. A., Bruna L. RODRIGUES, Patricia C. BERNARDES a Carlos A. CONTE-JUNIOR, 2021. Principles and applications of non-thermal technologies and alternative chemical compounds in meat and fish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2021, roč. 61, č. 7, s. 1163–1183 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1040-8398, 1549-7852. Dostupné na: doi:10.1080/10408398.2020.1754755

ROSENBAUM, Cathy Creger, Dónal P. O'MATHÚNA, Mary CHAVEZ a Kelly SHIELDS, 2010. Antioxidants and antiinflammatory dietary supplements for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 2010, roč. 16, č. 2, s. 32–40. ISSN 1078-6791.

SALEHI, Bahare, Abhay Prakash MISHRA, Ila SHUKLA, Mehdi SHARIFI-RAD, María Del Mar CONTRERAS, Antonio SEGURA-CARRETERO, Hannane FATHI, Nafiseh Nasri NASRABADI, Farzad KOBARFARD a Javad SHARIFI-RAD, 2018. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses: Thymol, health and potential uses. *Phytotherapy Research* [online]. 2018, roč. 32, č. 9, s. 1688–1706 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0951418X. Dostupné na: doi:10.1002/ptr.6109



SALTYKOVA, Assia, Florence E. BUYTAERS, Sarah DENAYER, Bavo VERHAEGEN, Denis PIÉRARD, Nancy H. C. ROOSENS, Kathleen MARCHAL a Sigrid C. J. DE KEERSMAECKER, 2020. Strain-Level Metagenomic Data Analysis of Enriched *In Vitro* and *In Silico* Spiked Food Samples: Paving the Way towards a Culture-Free Foodborne Outbreak Investigation Using STEC as a Case Study. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, roč. 21, č. 16, s. 5688 [cit. 25.8.2023]. ISSN 1422-0067. Dostupné na: doi:10.3390/ijms21165688

SÁNCHEZ DEL PULGAR, José, Antonio GÁZQUEZ a Jorge RUIZ-CARRASCAL, 2012. Physico-chemical, textural and structural characteristics of sous-vide cooked pork cheeks as affected by vacuum, cooking temperature, and cooking time. *Meat Science* [online]. 2012, roč. 90, č. 3, s. 828–835 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na: doi:10.1016/j.meatsci.2011.11.024

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, Laura, María VARGAS, Chelo GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, Amparo CHIRALT a Maite CHÁFER, 2011. Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings: A Review. *Food Engineering Reviews* [online]. 2011, roč. 3, č. 1, s. 1–16 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1866-7910, 1866-7929. Dostupné na: doi:10.1007/s12393-010-9031-3

SARANTÓPOULOS, Claire, Lea OLIVEIRA a Erica CANAVESI, 2002. *Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis*. ISBN 978-85-7029-037-3.

SÄDE, Elina, Katri PENTTINEN, Johanna BJÖRKROTH a Jenni HULTMAN, 2017. Exploring lot-to-lot variation in spoilage bacterial communities on commercial modified atmosphere packaged beef. *Food Microbiology* [online]. 2017, roč. 62, s. 147–152 [cit. 25.8.2023]. ISSN 07400020. Dostupné na: doi:10.1016/j.fm.2016.10.004

SEYDIM, A.C. a G. SARIKUS, 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International* [online]. 2006, roč. 39, č. 5, s. 639–644 [cit. 23.8.2023]. ISSN 09639969. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodres.2006.01.013

SHARIFI-RAD, Mehdi, Elena Maria VARONI, Marcello IRITI, Miquel MARTORELL, William N. SETZER, María DEL MAR CONTRERAS, Bahare SALEHI, Azam SOLTANI-NEJAD, Sadegh RAJABI, Mercedeh TAJBAKHSH a Javad SHARIFI-RAD, 2018. Carvacrol and human health: A comprehensive review: Carvacrol and Human Health. *Phytotherapy Research* [online]. 2018, roč. 32, č. 9, s. 1675–1687 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0951418X. Dostupné na: doi:10.1002/ptr.6103

SHIN, Han-Bo, Myung-Soo CHOI, Byeol RYU, Na-Rae LEE, Hye-In KIM, Hye-Eun CHOI, Jun CHANG, Kyung-Tae LEE, Dae Sik JANG a Kyung-Soo INN, 2013. Antiviral activity of carnosic acid against respiratory syncytial virus. *Virology Journal* [online]. 2013, roč. 10, č. 1, s. 303 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1743-422X. Dostupné na: doi:10.1186/1743-422X-10-303

SCHELLEKENS, Mia, 1996. New research issues in sous-vide cooking. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 1996, roč. 7, č. 8, s. 256–262 [cit. 28.11.2022]. ISSN 0924-2244. Dostupné na: doi:10.1016/0924-2244(96)10027-3





SCHREIBER, Kerstin, Nelli BOES, Martin ESCHBACH, Lothar JAENSCH, Juergen WEHLAND, Thomas BJARNSHOLT, Michael GIVSKOV, Morten HENTZER a Max SCHOBERT, 2006. Anaerobic Survival of *Pseudomonas aeruginosa* by Pyruvate Fermentation Requires an Usp-Type Stress Protein. *Journal of Bacteriology* [online]. 2006, roč. 188, č. 2, s. 659–668 [cit. 25.8.2023]. ISSN 0021-9193, 1098-5530. Dostupné na: doi:10.1128/JB.188.2.659-668.2006

SINGH, Shriti, Santosh Kumar SINGH, Indrajit CHOWDHURY a Rajesh SINGH, 2017. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *The Open Microbiology Journal* [online]. 2017, roč. 11, č. 1, s. 53–62 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1874-2858. Dostupné na: doi:10.2174/1874285801711010053

SINGLETERY, Keith, Christopher MACDONALD a Matthew WALLIG, 1996. Inhibition by rosemary and carnosol of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Letters* [online]. 1996, roč. 104, č. 1, s. 43–48 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03043835. Dostupné na: doi:10.1016/0304-3835(96)04227-9

SKANDAMIS, P., E. TSIGARIDA a G.-J.E. NYCHAS, 2000. Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2000, roč. 16, č. 1, s. 31–35 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1573-0972. Dostupné na: doi:10.1023/A:1008934020409

SKANDAMIS, Panagiotis N. a George-John E. NYCHAS, 2000. Development and Evaluation of a Model Predicting the Survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in Homemade Eggplant Salad at Various Temperatures, pHs, and Oregano Essential Oil Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2000, roč. 66, č. 4, s. 1646–1653 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné na: doi:10.1128/AEM.66.4.1646-1653.2000

SOFOS, John N., George FLICK, George-John NYCHAS, Corliss A. O'BRYAN, Steven C. RICKE a Philip G. CRANDALL, 2012. Meat, Poultry, and Seafood. V: *Food Microbiology* [online]. B.m.: John Wiley & Sons, Ltd, s. 109–167 [cit. 23.8.2023]. ISBN 978-1-68367-058-2. Dostupné na: doi:10.1128/9781555818463.ch6

SOKOVIĆ, Marina, Jelena VUKOJEVIĆ, Petar MARIN, Dejan BRKIĆ, Vlatka VAJS a Leo VAN GRIENSVEN, 2009. Chemical Composition of Essential Oils of *Thymus* and *Mentha* Species and Their Antifungal Activities. *Molecules* [online]. 2009, roč. 14, č. 1, s. 238–249 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1420-3049. Dostupné na: doi:10.3390/molecules14010238

SOLOMAKOS, N., A. GOVARIS, P. KOIDIS a N. BOTSOGLOU, 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science* [online]. 2008, roč. 80, č. 2, s. 159–166 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na: doi:10.1016/j.meatsci.2007.11.014

SOMOLINOS, M., D. GARCÍA, S. CONDÓN, B. MACKEY a R. PAGÁN, 2010. Inactivation of *Escherichia coli* by citral: *E. coli* inactivation by citral. *Journal of Applied*



*Microbiology* [online]. 2010, roč. 108, č. 6, s. 1928–1939 [cit. 23.8.2023]. ISSN 13645072. Dostupné na: doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04597.x

SOUZA, C.M., D.D. BOLER, D.L. CLARK, L.W. KUTZLER, S.F. HOLMER, J.W. SUMMERFIELD, J.E. CANNON, N.R. SMIT, F.K. MCKEITH a J. KILLEFER, 2011. The effects of high pressure processing on pork quality, palatability, and further processed products. *Meat Science* [online]. 2011, roč. 87, č. 4, s. 419–427 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na: doi:10.1016/j.meatsci.2010.11.023

STEA, Tonje Holte, Madelene JOHANSSON, Margaretha JÄGERSTAD a Wenche FRØLICH, 2007. Retention of folates in cooked, stored and reheated peas, broccoli and potatoes for use in modern large-scale service systems. *Food Chemistry* [online]. 2007, roč. 101, č. 3, s. 1095–1107 [cit. 28.11.2022]. ISSN 0308-8146. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2006.03.009

STOOPS, J., S. RUYTERS, P. BUSSCHAERT, R. SPAEPEN, C. VERRETH, J. CLAES, B. LIEVENS a L. VAN CAMPENHOUT, 2015. Bacterial community dynamics during cold storage of minced meat packaged under modified atmosphere and supplemented with different preservatives. *Food Microbiology* [online]. 2015, roč. 48, s. 192–199 [cit. 25.8.2023]. ISSN 07400020. Dostupné na: doi:10.1016/j.fm.2014.12.012

STRINGER, S.C. a A. METRIS, 2018. Spore forming pathogens and sous vide food safety. V: *Sous Vide and Cook-Chill Processing for the Food Industry*. New York: Springer, 2.

SUN, Xiang Dong a Richard A. HOLLEY, 2012. Antimicrobial and Antioxidative Strategies to Reduce Pathogens and Extend the Shelf Life of Fresh Red Meats. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2012, roč. 11, č. 4, s. 340–354 [cit. 23.8.2023]. ISSN 15414337. Dostupné na: doi:10.1111/j.1541-4337.2012.00188.x

SUN, Xiaohua, Juming TANG, Jing WANG, Barbara A. RASCO, Keqiang LAI a Yiqun HUANG, 2015. Formation of advanced glycation endproducts in ground beef under pasteurisation conditions. *Food Chemistry* [online]. 2015, roč. 172, s. 802–807 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03088146. Dostupné na: doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.129

SWAMY, Mallappa Kumara, Mohd Sayeed AKHTAR a Uma Rani SINNIHA, 2016. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2016, roč. 2016, s. 1–21 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1741-427X, 1741-4288. Dostupné na: doi:10.1155/2016/3012462

TACCONELLI, Evelina, Elena CARRARA, Alessia SAVOLDI, Anna ZORZET, 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2018, roč. 18, č. 3, s. 318–327 [cit. 23.8.2023]. ISSN 14733099. Dostupné na: doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3

TAKAKI, I., L.E. BERSANI-AMADO, A. VENDRUSCOLO, S.M. SARTORETTO, S.P. DINIZ, C.A. BERSANI-AMADO a R.K.N. CUMAN, 2008. Anti-Inflammatory and



Antinociceptive Effects of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil in Experimental Animal Models. *Journal of Medicinal Food* [online]. 2008, roč. 11, č. 4, s. 741–746 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1096-620X, 1557-7600. Dostupné na: doi:10.1089/jmf.2007.0524

TANGWATCHARIN, Pussadee, Supaluk SORAPUKDEE a Kamonthip KONGSRIRAT, 2019. Sous-vided Restructured Goat Steaks: Process Optimized by Thermal Inactivation of *Listeria monocytogenes* and Their Quality Characteristics. *Food Science of Animal Resources* [online]. 2019, roč. 39, č. 6, s. 863–876 [cit. 25.8.2023]. ISSN 2636-0772, 2636-0780. Dostupné na: doi:10.5851/kosfa.2019.e64

TARIQ, Saika, Saira WANI, Waseem RASOOL, Khushboo SHAFI, Muzzaffar Ahmad BHAT, Anil PRABHAKAR, Aabid Hussain SHALLA a Manzoor A. RATHER, 2019. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2019, roč. 134, s. 103580 [cit. 23.8.2023]. ISSN 08824010. Dostupné na: doi:10.1016/j.micpath.2019.103580

THE PLANT LIST, 2018. *Rosmarinus officinalis* L. — *The Plant List* [online] [cit. 23.8.2023]. Dostupné na: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-179873>

THEODULOZ, Cristina, Mariano PERTINO, Jaime RODRÍGUEZ a Guillermo SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2011. Gastroprotective Effect and Cytotoxicity of Carnosic Acid Derivatives. *Planta Medica* [online]. 2011, roč. 77, č. 09, s. 882–887 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0032-0943, 1439-0221. Dostupné na: doi:10.1055/s-0030-1250648

THOSAR, Nilima, Silpi BASAK, Rakesh N. BAHADURE a Monali RAJURKAR, 2013. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An *in vitro* study. *European Journal of Dentistry* [online]. 2013, roč. 07, č. S 01, s. S071–S077 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1305-7456, 1305-7464. Dostupné na: doi:10.4103/1305-7456.119078

TIPSRISUKOND, N., L. N. FERNANDO a A. D. CLARKE, 1998. Antioxidant Effects of Essential Oil and Oleoresin of Black Pepper from Supercritical Carbon Dioxide Extractions in Ground Pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1998, roč. 46, č. 10, s. 4329–4333 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0021-8561, 1520-5118. Dostupné na: doi:10.1021/jf9802880

TOHIDI, Behnaz, Mehdi RAHIMMALEK, Ahmad ARZANI a Helena TRINDADE, 2020. Sequencing and variation of terpene synthase gene (TPS2) as the major gene in biosynthesis of thymol in different *Thymus* species. *Phytochemistry* [online]. 2020, roč. 169, s. 112126 [cit. 23.8.2023]. ISSN 00319422. Dostupné na: doi:10.1016/j.phytochem.2019.112126

TSAI, Chia-Wen, Chia-Yuan LIN a Yu-Jung WANG, 2011. Carnosic Acid Induces the NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1 Expression in Rat Clone 9 Cells through the p38/Nuclear Factor Erythroid-2 Related Factor 2 Pathway. *The Journal of Nutrition* [online]. 2011, roč. 141, č. 12, s. 2119–2125 [cit. 23.8.2023]. ISSN 00223166. Dostupné na: doi:10.3945/jn.111.146779

ULBRICHT, Catherine, Tracee Rae ABRAMS, Ashley BRIGHAM, James CEURVELS, Jessica CLUBB, Whitney CURTISS, Catherine DeFranco, Regina C. WINDSOR,



2010. An Evidence-Based Systematic Review of Rosemary ( *Rosmarinus officinalis* ) by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of Dietary Supplements* [online]. 2010, roč. 7, č. 4, s. 351–413 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1939-0211, 1939-022X. Dostupné na: doi:10.3109/19390211.2010.525049

VAN ACKER, Heleen, Patrick VAN DIJCK a Tom COENYE, 2014. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in Microbiology* [online]. 2014, roč. 22, č. 6, s. 326–333 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0966842X. Dostupné na: doi:10.1016/j.tim.2014.02.001

VIRELLA, G., 1999. *Mikrobiologia i Choroby Zakaźne*. [online]. 1st ed. Wrocław: Edra Urban & Partner [cit. 23.8.2023]. Dostupné na: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Mikrobiologia+i+Choroby+Zaka%C5%BAne&author=G.+Virella&publication\\_year=1999&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Mikrobiologia+i+Choroby+Zaka%C5%BAne&author=G.+Virella&publication_year=1999&)

VISANJI, James M., David G. THOMPSON a Philip J. PADFIELD, 2006. Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Letters* [online]. 2006, roč. 237, č. 1, s. 130–136 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03043835. Dostupné na: doi:10.1016/j.canlet.2005.05.045

WAGSTAFF, Steven J. a Richard G. OLMSTEAD, 1997. *Phylogeny of Labiatae and Verbenaceae Inferred from rbcL Sequences*. *Systematic Botany* [online]. 1997, roč. 22, č. 1, s. 165 [cit. 23.8.2023]. ISSN 03636445. Dostupné na: doi:10.2307/2419684

WALTHER, Christin a Michaela SCHMIDTKE, 2020. *Anti-rhinovirus and anti-influenza virus activities of mucoactive secretolytic agents and plant extracts – a comparative in vitro study* [online]. preprint. B.m.: In Review [cit. 23.8.2023]. Dostupné na: doi:10.21203/rs.2.23461/v1

WANG, Qin, Zibian OU, Hanwu LEI, Xiaohui ZENG, Yue YING a Weidong BAI, 2012. Antimicrobial Activities Of A New Formula Of Spice Water Extracts Against Foodborne Bacteria: Antimicrobial Activity Of A New Food Preservative. *Journal of Food Processing and Preservation* [online]. 2012, roč. 36, č. 4, s. 374–381 [cit. 12.8.2023]. ISSN 01458892. Dostupné na: doi:10.1111/j.1745-4549.2012.00691.x

WANG, Taojun, Liang ZHAO, Yanan SUN, Fazheng REN, Shanbin CHEN, Hao ZHANG a Huiyuan GUO, 2016. Changes in the microbiota of lamb packaged in a vacuum and in modified atmospheres during chilled storage analysed by high-throughput sequencing. *Meat Science* [online]. 2016, roč. 121, s. 253–260 [cit. 25.8.2023]. ISSN 03091740. Dostupné na: doi:10.1016/j.meatsci.2016.06.021

XIANG, Qisen, Yunfang MA, Jilin DONG a Ruiling SHEN, 2015. Carnosic acid induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction and Akt inactivation in HepG2 cells. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* [online]. 2015, roč. 66, č. 1, s. 76–84 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0963-7486, 1465-3478. Dostupné na: doi:10.3109/09637486.2014.953452

YANG, Xiang, Noelle R. NOYES, Enrique DOSTER, Jennifer N. MARTIN, Lyndsey M. LINKE, Roberta J. MAGNUSON, Hua YANG, Ifigenia GEORNARAS, Dale R. WOERNER, Kenneth L. JONES, Jaime RUIZ, Christina BOUCHER, Paul S. MORLEY a Keith E. BELK, 2016. Use of Metagenomic Shotgun Sequencing Technology To





Detect Foodborne Pathogens within the Microbiome of the Beef Production Chain. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2016, roč. 82, č. 8, s. 2433–2443 [cit. 25.8.2023]. ISSN 0099-2240, 1098-5336. Dostupné na: doi:10.1128/AEM.00078-16

YESIL-CELIK TAS, Ozlem, Canan SEVIMLI, Erdal BEDIR a Fazilet VARDAR-SUKAN, 2010. Inhibitory Effects of Rosemary Extracts, Carnosic Acid and Rosmarinic Acid on the Growth of Various Human Cancer Cell Lines. *Plant Foods for Human Nutrition* [online]. 2010, roč. 65, č. 2, s. 158–163 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0921-9668, 1573-9104. Dostupné na: doi:10.1007/s11130-010-0166-4

YOU, Conghui, Hiroyuki OKANO, Sheng HUI, Zhongge ZHANG, Minsu KIM, Carl W. GUNDERSON, Yi-Ping WANG, Peter LENZ, Dalai YAN a Terence HWA, 2013. Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP signalling. *Nature* [online]. 2013, roč. 500, č. 7462, s. 301–306 [cit. 24.8.2023]. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné na: doi:10.1038/nature12446

YU, Ya-Mei, Hsing-Chun LIN a Weng-Cheng CHANG, 2008. Carnosic acid prevents the migration of human aortic smooth muscle cells by inhibiting the activation and expression of matrix metalloproteinase-9. *British Journal of Nutrition* [online]. 2008, roč. 100, č. 4, s. 731–738 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0007-1145, 1475-2662. Dostupné na: doi:10.1017/S0007114508923710

YUAN, Zhongwei, Yuyun DAI, Ping OUYANG, Tayyab REHMAN, Sajjad HUSSAIN, Tianyi ZHANG, Zhongqiong YIN, Hualin FU, Juchun LIN, Changliang HE, Cheng LV, Xiaoxia LIANG, Gang SHU, Xu SONG, Lixia LI, Yuanfeng ZOU a Lizi YIN, 2020. Thymol Inhibits Biofilm Formation, Eliminates Pre-Existing Biofilms, and Enhances Clearance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Mouse Peritoneal Implant Infection Model. *Microorganisms* [online]. 2020, roč. 8, č. 1, s. 99 [cit. 23.8.2023]. ISSN 2076-2607. Dostupné na: doi:10.3390/microorganisms8010099

ZAGOREC, Monique a Marie-Christine CHAMPOMIER-VERGÈS, 2017. Meat Microbiology and Spoilage. V: *Lawrie's Meat Science* [online]. B.m.: Elsevier, s. 187–203 [cit. 23.8.2023]. ISBN 978-0-08-100694-8. Dostupné na: doi:10.1016/B978-0-08-100694-8.00006-6

ZANELLA, Camila Angela, Helen TREICHEL, Rogério Luis CANSIAN a Silvane Souza ROMAN, 2012. The effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) (Lamiaceae) in animal models of memory. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2012, roč. 48, č. 3, s. 389–397 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1984-8250. Dostupné na: doi:10.1590/S1984-82502012000300005

ZAVADLAV, Sandra, Marijana BLAŽIĆ, Franco VAN DE VELDE, Charito VIGNATTI, Cecilia FENOGLIO, Andrea M. PIAGENTINI, María Elida PIROVANI, Cristina M. PEROTTI, Danijela BURSAĆ KOVAČEVIĆ a Predrag PUTNIK, 2020. Sous-Vide as a Technique for Preparing Healthy and High-Quality Vegetable and Seafood Products. *Foods* [online]. 2020, roč. 9, č. 11, s. 1537 [cit. 25.3.2023]. ISSN 2304-8158. Dostupné na: doi:10.3390/foods9111537



ZAVALA, Sofia a John W. BADDLEY, 2020. Cryptococcosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2020, roč. 41, č. 01, s. 069–079 [cit. 23.8.2023]. ISSN 1069-3424, 1098-9048. Dostupné na: doi:10.1055/s-0039-3400280

ZENG, H. H., P. F. TU, K. ZHOU, H. WANG, B. H. WANG a J. F. LU, 2001. Antioxidant properties of phenolic diterpenes from *Rosmarinus officinalis*. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2001, roč. 22, č. 12, s. 1094–1098. ISSN 1671-4083.

ZHANG, Shuhong, Guangli YANG, Shugui HOU, Tingjun ZHANG, Zhiguo LI a Feng LIANG, 2018. Distribution of ARGs and MGEs among glacial soil, permafrost, and sediment using metagenomic analysis. *Environmental Pollution* [online]. 2018, roč. 234, s. 339–346 [cit. 23.8.2023]. ISSN 02697491. Dostupné na: doi:10.1016/j.envpol.2017.11.031

ZHANG, Yi, Tiwalade Adegoke ADELAKUN, Lu QU, Xiaoxia LI, Jian LI, Lifeng HAN a Tao WANG, 2014. New terpenoid glycosides obtained from *Rosmarinus officinalis* L. aerial parts. *Fitoterapia* [online]. 2014, roč. 99, s. 78–85 [cit. 23.8.2023]. ISSN 0367326X. Dostupné na: doi:10.1016/j.fitote.2014.09.004

ZWIRZITZ, Benjamin, Stefanie U. WETZELS, Emmanuel D. DIXON, Beatrix STESSL, Andreas ZAISER, Isabel RABANSER, Sarah THALGUTER, Beate PINIOR, Franz-Ferdinand ROCH, Cameron STRACHAN, Jürgen ZHANGELLINI, Monika DZIECIOL, Martin WAGNER a Evelyne MANN, 2019. *The sources and transmission routes of microbial populations throughout a meat processing facility* [online]. preprint. B.m.: Microbiology [cit. 25.8.2023]. Dostupné na: doi:10.1101/758730



**Názov:** Mikrobiota sous vide hovädzieho mäsa po aplikácii rastlinných silíc a patogénnych baktérií

**Autori:** Miroslava Kačániová, Natália Čmiková

**Vydavateľ:** Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

**Vydanie:** prvé

**Forma:** online

**Rok vydania:** 2023

**AH – VH:** 7,04 – 7,21

Neprešlo redakčnou úpravou vo Vydavateľstve SPU v Nitre.

**ISBN 978-80-552-2658-3**

[DOI: https://doi.org/10.15414/2023.9788055226583](https://doi.org/10.15414/2023.9788055226583)