

INSTYTUT BIOTECHNOLOGII PRZEMYSŁU ROLNO-SPOŻYWCZEGO

im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy

Warszawa, ul. Rakowiecka 36

Zakład Technologii Fermentacji

---

---

Dyrektor Instytutu: dr hab. inż. Marek Roszko, prof. IBPRS-PIB

Kierownik Zakładu: dr inż. Katarzyna Piasecka-Józwiak

## SPRAWOZDANIE Z REALIZACJI OPERACJI

**pt. „Biokonserwacja grzybów hodowlanych przy udziale innowacyjnych kultur starterowych z elementami automatyzacji procesu przygotowania i obróbki surowca”**

Koordynator projektu w IBPRS-PIB: dr inż. Antoni Miecznikowski

Współwykonawcy:

dr inż. Katarzyna Piasecka-Józwiak

dr. Renata Choińska

mgr inż. Marzena Bujak

mgr inż. Anna Dworska

mgr inż. Monika Kliszc

mgr inż. Katarzyna Wierzchowska

mgr inż. Karol Włodarczyk

inż. Piotr Pisarek

Termin rozpoczęcia: styczeń 2023

Termin zakończenia: wrzesień 2024

---

---

Warszawa, wrzesień 2024

## Zakres prac realizowanych w IBPRS przez poszczególnych wykonawców projektu

Lp.	imię i nazwisko	Rola w projekcie	Zakład	Pracownik naukowy/ Inżynierijno-techniczny
1.	Antoni Miecznikowski	Koordinowanie prac zespołów badawczych, nadzór nad całością przebiegu prac, opracowanie i optymalizacja metod otrzymywania utrwalonej biomasy bakterii z rodzaju <i>Leuconostoc</i> oraz udział w testowaniu i uruchamianiu urządzeń linii pilotażowej; prowadzenie i ocena wyników doświadczeń przechowalniczych	Zakład Technologii Fermentacji	Pracownik naukowy
2.	Katarzyna Piasecka-Józwiak	Nadzór nad badaniami związanymi z zastosowaniem kultur starterowych w procesie kontrolowanej fermentacji pieczarek i otrzymywaniem produktu o korzystnych parametrach organoleptycznych oraz technologicznych; badanie szczepów bakterii pod względem przydatności do kultur starterowych	Zakład Technologii Fermentacji	Pracownik naukowy
3.	Renata Choińska	Koordinowanie badań w obszarze analizy instrumentalnej metabolitów fermentacji mlekowej w trakcie badań nad kontrolowaną fermentacją pieczarek z udziałem wybranych szczepów bakterii; badanie kiszonek (mikrobiologiczne, fizyko-chemiczne i organoleptyczne)	Zakład Technologii Fermentacji	Pracownik naukowy

4.	Marzena Bujak	Udział w prowadzeniu doświadczeń – dobór przypraw czasie prób, wykonywanie prób kiszonkarskich, wykonywanie posiewów mikrobiologicznych i ocena ich wyników, identyfikacja genetyczna szczepów bakterii; badania fizyko-chemiczne i organoleptyczne kiszonek; badania przechowalnicze kiszonek	Zakład Technologii Fermentacji	Pracownik naukowo-badawczy
5.	Katarzyna Wierzchowska	Udział w prowadzeniu doświadczeń – dobór przypraw czasie prób, wykonywanie prób kiszonkarskich, wykonywanie posiewów mikrobiologicznych i ocena ich wyników, izolacja i identyfikacja szczepów bakterii; badania fizyko-chemiczne i organoleptyczne kiszonek; badania przechowalnicze kiszonek	Zakład Technologii Fermentacji	Pracownik naukowo-badawczy
6.	Anna Dworska	Przygotowywanie i organizacja oceny organoleptycznej kiszonych pieczarek, udział w ocenie organoleptycznej i interpretacja jej wyników; badania przechowalnicze kiszonek	Zakład Technologii Fermentacji	Pracownik inżyniersko-techniczny
7.	Monika Kliszczyk	Przygotowywanie i organizacja oceny organoleptycznej kiszonych pieczarek, udział w ocenie organoleptycznej; badania fizykochemiczne i organoleptyczne kiszonek; badania przechowalnicze kiszonek	Zakład Technologii Fermentacji	Pracownik inżyniersko-techniczny
8.	Piotr Pisarek	Udział w przygotowaniu materiału badawczego i podłoża mikrobiologicznych, wykonywanie doświadczeń	Zakład Technologii Fermentacji	Pracownik inżyniersko-techniczny

		kiszonkarskich, udział w ocenie fizyko-chemicznej i organoleptycznej kiszonych pieczarek; badania przechowalnicze kiszonek		
9.	Karol Włodarczyk	Udział w przygotowaniu materiału badawczego i podłoży mikrobiologicznych, wykonywanie doświadczeń kiszonkarskich, udział w ocenie fizyko-chemicznej i organoleptycznej kiszonych pieczarek; badania przechowalnicze kiszonek	Zakład Technologii Fermentacji	Pracownik inżyniersko-techniczny

## STRESZCZENIE

Celem badawczej części projektu było opracowanie i optymalizacja metod otrzymywania utrwalonej biomasy bakterii z rodzaju *Leuconostoc*, charakteryzujących się właściwościami biotechnologicznymi pozwalającymi na ich wykorzystanie w procesie kiszenia pieczarki dwuzarodnikowej, opracowanie technologii kiszenia włącznie z doбором zestawu przypraw oraz przeprowadzenie testów eksploatacyjnych pilotażowej linii do kiszenia.

Materiał do badań stanowiło 15 szczepów bakterii fermentacji mlekowej z rodzaju *Leuconostoc*, z których 14 pochodziło z kolekcji Zakładu Technologii Fermentacji a jeden, traktowany jako szczep odniesienia, pochodził z Zakładu Owoców i Warzyw. Właściwości badanych szczepów poddano analizie fizykochemicznej, a otrzymane w wyniku ich zastosowania kiszony pieczarki poddano również analizie sensorycznej. Otrzymane wyniki, zarówno analizy sensorycznej, jak i badań fizykochemicznych opracowano statystycznie w celu udokumentowania występujących zależności oraz wytypowania szczepów bakterii najlepiej odpowiadających zakładanym kryteriom oceny.

Przeprowadzone badania obejmowały: hodowlę bakterii w skali laboratoryjnej na pożywce MRS oraz pożywce produkcyjnej w  $T = 25, 30, 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ocenę łatwości wydzielania biomasy poprzez wirowanie, ocenę przeżywalności bakterii w procesie suszenia sublimacyjnego, analizy ilości kwasów organicznych wydzielanych do podłoża hodowlanego, testy na aktywność antibakteryjną badanych szczepów wobec pięciu szczepów patogennych, określenie liczby LAB, LAB tworzących EPS oraz liczby drożdży i pleśni w doświadczalnych kiszonkach, analizę sensoryczną doświadczalnych kiszonek i statystyczne opracowania wyników. Wykonano kiszonki doświadczalne obejmujące dobór najlepszego zestawu przypraw oraz badania przechowalnicze w cyklu sześciomiesięcznym.

Przeprowadzono testy praktyczne pilotażowej linii do kiszenia pieczarek.

W efekcie podsumowania wszystkich otrzymanych wyników badań, stwierdzono, że ze względu na wysokie oceny jakości sensorycznej oraz korzystne parametry technologiczne jako szczepy odpowiednie do wykorzystania w szczepionce komercyjnej do kiszenia pieczarek można zarekomendować szczepy: (5) *Leuconostoc citreum* C750(3), a następnie (1) *Leuconostoc citreum* (Ł 06) i (2) *Leuconostoc lactis* (Ł 07). Za najkorzystniejsze z organoleptycznego punktu widzenia uznano dodatek do kiszonek marchewki i ziela angielskiego lub marchewki, imbiru i liścia laurowego. Przeprowadzone testy eksploatacyjne

pilotażowej linii wykazały jej przydatność do prowadzenia cyklu produkcyjnego zgodnie z opracowaną technologią.

## SPIS TREŚCI

1. WSTĘP .....	1
2. ANALIZA AKTUALNEGO STANU NAUKI I TECHNIKI .....	2
3. CEL I ZAKRES PRACY .....	21
3.1. Cel pracy .....	21
3.2. Zakres pracy .....	22
4. METODYKA PRACY .....	22
4.1. Materiały .....	22
4.1.1. Badane mikroorganizmy .....	22
4.1.2. Grzyby stosowane w badaniach .....	24
4.2. Przygotowanie materiału biologicznego .....	24
4.3. Liofilizacja próbek bakterii .....	25
4.4. Kiszenie pieczarek .....	25
4.5. Metody badawcze .....	28
4.5.1. Metody mikrobiologiczne .....	28
4.5.2. Metody analityczne .....	29
4.5.3. Analiza sensoryczna pieczarek .....	31
4.5.4. Ocena efektywności mycia surowych pieczarek wodą dekontaminowaną .....	34
4.5.5. Analiza statystyczna wyników .....	34
5. UZYSKANE WYNIKI I ICH OMÓWIENIE .....	35
5.1. Hodowle na podłożu MRS .....	35
5.2. Hodowle na podłożu produkcyjnym .....	40
5.3. Aktywność antybakteryjna badanych szczepów .....	46
5.4. Kiszenie doświadczalne pieczarek w skali laboratoryjnej .....	47
5.5. Analiza sensoryczna kiszonych pieczarek .....	51
5.6. Analiza statystyczna wyników .....	52
5.7. Badania nad doborem zestawu przypraw i badania przechowalnicze .....	58
5.7.1. Badania w układzie I .....	61
5.7.2. Badania w układzie II .....	64
5.7.3. Badania w układzie III .....	66
5.8. Ocena wpływu zastosowania wody dekontaminowanej na liczbę bakterii na powierzchni pieczarek surowych .....	71

5.9. Testowanie pilotażowej linii do kiszenia pieczarek .....	72
6. PODSUMOWANIE .....	81
7. WNIOSKI .....	87
8. LITERATURA .....	87



## 1. WSTĘP

Grzyby od bardzo dawna stanowiły w wielu rejonach nieodłączny element diety. Ceniono je głównie za smak i aromat, wykorzystywano również w medycynie ludowej. Jednak świadomość, że grzyby są żywnością prozdrowotną, zawierającą wiele substancji bioaktywnych, jest stosunkowo nowa. Publikacje naukowe poświęcone wartości odżywczej i właściwościom prozdrowotnym grzybów pochodzą głównie z ostatniego dwudziestolecia. Obecnie grzyby uznawane są za żywność funkcjonalną, gdyż wykazują udokumentowany korzystny wpływ na zdrowie człowieka (Siwulski i in., 2014). Grzyby jadalne stanowią wartościowy składnik diety ze względu na zawartość wielu cennych składników odżywczych, takich jak: błonnik, sole mineralne, witaminy oraz atrakcyjny smak i aromat. Badania wykazały obecność w grzybach związków biologicznie aktywnych o potwierdzonych właściwościach terapeutycznych. Do tzw. żywności funkcjonalnej zaliczono również pieczarki, ze względu na wyjątkowe właściwości prozdrowotne. Oprócz wartościowego białka (zawierają prawie wszystkie aminokwasy), dobrze przyswajalnych węglowodanów i tłuszczów (w tym korzystnych dla zdrowia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych), pieczarki są dobrym źródłem potasu, miedzi, selenu; zawierają jod, błonnik, witaminy A, E, witaminy z grupy B (w tym kwas foliowy), a nawet witaminę D. W pieczarkach stwierdzono również obecność beta glukanu - polisacharydu zaliczanego do rozpuszczalnej frakcji błonnika pokarmowego (Kalbarczyk J., Radzki W., 2009). Pieczarki, podobnie jak większość grzybów, w znacznej części składają się z wody, co sprawia, że ich kaloryczność jest bardzo niska – wartość energetyczna 100 gramów pieczarek wynosi zaledwie 22 kcal. Oceniając całościowo wartości odżywcze pieczarek można stwierdzić, że są one całkiem wartościowe, według skali ANDI (Aggregate Nutrient Density Index, co w potocznym tłumaczeniu oznacza wskaźnik gęstości składników odżywczych), która odnosi się nie do 100 g produktu, a do jednostki kalorii zawartej w produkcie. Indeks ten dla pieczarek wynosi 238, co jest lepszym wynikiem niż np. w odniesieniu do pomidorów, cukini, truskawek czy nawet jajek (Pieczarki – kalorie ..., 2016).

Pieczarki, podobnie jak wszystkie grzyby jadalne, to szybko psująca się żywność, w związku z czym okres ich przechowywania w postaci świeżej jest stosunkowo krótki, a przechowywanie wymaga przestrzegania określonych rygorów technologicznych. Bezpośrednio po zbiorze, w celu zahamowania procesów oddychania, a także zachowania jędrności tkanki i śnieżnej bieli - należy jak najszybciej schłodzić pieczarki do temperatury 2-3 °C, zaś optymalne warunki przechowywania pieczarek to temperatura 0-1 °C i wilgotność

względna 90-95 % – w takich warunkach grzyby można przechowywać przez okres 7-14 dni (Zagórska K., 2015).

Popularną metodą konserwowania pieczarek jest ich marynowanie, czyli proces utrwalania produktów spożywczych m.in. za pomocą octu, wina, oleju, masła czy kwaśnego mleka. Proces marynowania pieczarek znany jest od dawna, a jego technologia została szczegółowo opracowana i jest stosowana na skalę przemysłową w wielu wariantach. Inną metodą konserwowania świeżych pieczarek, mniej popularną i raczej nie stosowaną w skali przemysłowej jest kiszenie, czyli biologiczna metoda konserwacji żywności opierająca się o proces fermentacji mlekowej przy wykorzystaniu cukrów występujących w surowcu (bądź dodanych), co obniża ich kaloryczność. Fermentacja kwasu mlekowego jest uważana za wartościową i prostą z biotechnologicznego punktu widzenia metodę umożliwiającą utrzymanie i/lub poprawę bezpieczeństwa, wartości odżywczych, sensorycznych i trwałości warzyw i owoców (Buckenhüskes, 1997, Steinkraus, 1996, Karovicová i Kohajdová, 2003, Demir i in., 2006). Jak wynika z danych literatury z ostatnich kilkunastu lat, połączenie tej starożytnej metody konserwacji biologicznej z obecnymi narzędziami biotechnologicznymi powinno umożliwić kontrolowane procesy fermentacji i wybór odpowiednich kultur startowych w celu zwiększenia spożycia świeżych warzyw i owoców (McFeeters, 2004).

Wymienione wyżej pozytywne właściwości produktów kiszonych skłoniły autorów niniejszej pracy do zajęcia się problemem kiszenia pieczarek, które są bardzo popularne na krajowym rynku, a Polska jest ich czołowym producentem w Europie, tym bardziej, że opracowana technologia mogłaby stanowić innowacyjne i użyteczne rozwiązanie dla rodzimego przemysłu spożywczego.

## 2. ANALIZA AKTUALNEGO STANU NAUKI I TECHNIKI

Warzywa i owoce są podstawowymi źródłami witamin rozpuszczalnych w wodzie (witamina C i witaminy z grupy B), prowitaminy A, fitosteroli, włókna, minerałów i związków fitochemicznych w diecie człowieka (Gebbers, 2007). Dowody naukowe zachęcają do konsumpcji warzyw i owoców, aby zapobiegać chorobom przewlekłym, takim jak np. nadciśnienie (Dauchet i wsp., 2007), chorobom wieńcowym serca i ryzyku udaru mózgu (He i in., 2007). Niestety codzienne spożycie warzyw i owoców szacuje się na niższe niż dawki (400 g, z wyjątkiem ziemniaków i innych bulw bogatych w skrobię) zalecane przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) oraz Organizację ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) ([www.who.int/](http://www.who.int/); [www.fao.org/](http://www.fao.org/)).

Większa część warzyw i owoców spożywana jest w postaci świeżej lub przemysłowo minimalnie przetworzonej. Minimalnie przetworzone, a zwłaszcza świeże warzywa i owoce, mają krótki okres przydatności do spożycia, ponieważ ulegają szybkiemu zepsuciu mikrobiologicznemu, a w niektórych przypadkach zanieczyszczeniu patogenami. Gotowanie i pasteryzacja, a także dodatek chemicznych środków konserwujących to główne opcje technologii, które gwarantują bezpieczne warzywa i owoce, ale powodują szereg nie zawsze pożądaných zmian w ich cechach fizycznych i składzie chemicznym (Zia-ur-Rehman i in., 2003, Zhang i Hamauzu, 2004). Aby zmniejszyć te niedogodności, stosuje się nowatorskie technologie, takie jak wysokociśnieniowa obróbka hydrostatyczna, promieniowanie jonizujące i działanie pola impulsowo-elektrycznego (Devlieghere i wsp., 2004, Gómez-López i wsp., 2005, Elmnasser i wsp., 2007); testowane są również nowe systemy pakowania i stosowanie naturalnych środków przeciwdrobnoustrojowych (Devlieghere i wsp., 2004).

Świeże grzyby są jednym z najbardziej nietrwałych produktów spożywczych, a po zbiorze szybko tracą na jakości. Utrata wilgoci, zmiany koloru, zmiany tekstury, pogorszenie stanu mikrobiologicznego oraz utrata składników odżywczych i smaku to parametry, które najczęściej wpływają na ich jakość (Farokhian, i wsp. 2017), ograniczając ich okres przydatności do spożycia do zaledwie jednego do trzech dni w temperaturze pokojowej (Jiang 2013) lub pięciu do siedmiu dni, gdy są przechowywane w lodówce (Royse 2014). Grzyby są produktami bardzo nietrwałymi, ponieważ nie mają warstwy kutykuli, która chroniłaby je przed uszkodzeniami mechanicznymi, utratą wody lub atakiem mikrobiologicznym. Ponadto wysoka zawartość wilgoci (85–95%) w świeżych grzybach (Kumar i wsp. 2013) i ich wysoka szybkość oddychania (200–500 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> w temp. 20 ± 1 °C dla *Agaricus bisporus* i 640,8 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> w temp. 10 °C dla *Lentinus edodes*) (Singh i wsp. 2010, Ares i wsp. 2006) przyczyniają się do szybkiego starzenia w efekcie ataku drobnoustrojów i brązowienia enzymatycznego (Aguirre, i wsp. 2008). Ze względu na wysoką zawartość wilgoci i aktywność oddechową grzyby doświadczają szybkiej utraty wilgoci po zbiorze, co powoduje ciągłą utratę wagi, kurczenie się i utratę turgoru, przyspieszając degradację ich jakości (Mahajan i wsp. 2008). Utrata wagi wynosząca 5–10% świeżej masy powoduje więdnienie grzyba, co czyni go niezdatnym do sprzedaży komercyjnej (Mahajan i wsp. 2008a). Z powodu utraty wody jędrność grzybów *Agaricus bisporus* przechowywanych przez 16 dni w temperaturze 4 °C ulega zmniejszeniu z 17,32 N do około 13 N (Gao i wsp. 2014). Podobnie, grzyby *Lentinus edodes* przechowywane w tych samych warunkach wykazują spadek jędrności z 3,4 N do 2,1 N (Jiang i wsp. 2013a), podczas gdy *Pleurotus ostreatus* doświadczył

istotnego spadku jędrności z 162,8 do 1,49 N/m<sup>2</sup> po 15 dniach przechowywania w temperaturze 4 °C (Han Lyn, i wsp. 2019, Castellanos-Reyes i wsp. 2021).

Kolor grzybów, szczególnie białych odmian, jest jedną z cech jakościowych o największym znaczeniu handlowym, ponieważ konsumenci biorą go pod uwagę przy podejmowaniu decyzji o zakupie (Mishra i wsp. 2013). Powierzchnia grzybów jest podatna na brązowienie z powodu skażenia mikrobiologicznego lub aktywności enzymatycznej oraz z powodu urazów mechanicznych, do których dochodzi podczas obsługi i transportu (Quevedo i wsp. 2016). Tyrozynaza, enzym należący do rodziny polifenoloksydaz, jest jednym z głównych enzymów odpowiedzialnych za brązowienie *Agaricus bisporus* i *Pleurotus ostreatus* ze względu na jego wysoką zawartość (Wrona i wsp. 2015). Brązowienie *Lentinus edodes* przypisuje się również działaniu enzymu tlenu polifenylenu i mikroorganizmów na jego tkankę (Jiang, i wsp. 2012). Z drugiej strony, podczas przechowywania w lodówce (4 °C i 85% wilgotności względnej) zawartość związków przeciwutleniających w grzybach (całkowite związki fenolowe) zmniejsza się, a proces peroksydacji lipidów błony wzrasta (Lin i wsp. 2017). Niektóre wcześniejsze przeglądy zidentyfikowały szereg czynników, które mogą wpływać na cechy jakościowe grzybów po zbiorze (Zhang i wsp. 2018), klasyfikując je na czynniki wewnętrzne związane z samym grzybem (aktywność wody, szybkość oddychania i aktywność mikrobiologiczna) oraz czynniki zewnętrzne związane z przechowywaniem (temperatura przechowywania, wilgotność względna i uszkodzenia mechaniczne). Aktywność wodna ( $a_w$ ) jest ważnym czynnikiem wpływającym na jakość grzybów. Ich wysoka zawartość wolnej wody jest związana z utlenianiem lipidów, stabilnością mikrobiologiczną, aktywnością enzymatyczną i nieenzymatyczną oraz zmianami w teksturze grzybów (Jaworska i wsp. 2014). Oddychanie jest dobrym wskaźnikiem fizjologicznego starzenia się świeżych grzybów i jest zależne od temperatury i czasu przechowywania (Azevedo i wsp. 2015). Zwiększona szybkość oddychania podczas przechowywania jest powiązana ze zmniejszeniem masy (Xu i wsp. 2016) i brązowieniem grzybów. W tym ostatnim przypadku wysoka wilgotność i wysoka temperatura powierzchni przyspieszają proces przebarwiania (Castellanos-Reyes i wsp. 2021, Lin i wsp. 2019).

Wyniki wielu badań wskazują na szereg czynników związanych z zastosowanymi metodami obróbki surowca wpływających na utratę wilgoci, zmiany koloru, zmiany tekstury, pogorszenie stanu mikrobiologicznego oraz utratę składników odżywczych i zmiany smaku, czyli parametry jakościowe surowca.

## **Mycie środkami przeciwdrobnoustrojowymi i przeciwbrazowieniu**

Stosowanie kompostu w uprawie grzybów może powodować wysokie początkowe zanieczyszczenie, dlatego konieczne jest usunięcie przylegającego brudu i mikroorganizmów z powierzchni grzybów poprzez proces mycia lub płukania, aby zahamować pogorszenie stanu mikrobiologicznego (Verma i wsp. 2020). Jednak mycie zwiększa zawartość wilgoci w grzybach, czyniąc je bardziej podatnymi na rozwój mikroorganizmów i brązowienie. Z tego powodu dodawanie środków przeciwdrobnoustrojowych i przeciwbrazowieniu do wody do mycia jest powszechne (Zhang i wsp. 2018). Do mycia grzybów stosowano metabisulfit sodu, co dawało doskonałe rezultaty w utrzymaniu początkowej bieli, ale nie było skuteczne w hamowaniu wzrostu namnażających się bakterii (Brennan i wsp. 2000). Ze względu na poważne reakcje alergiczne u konsumentów cierpiących na astmę, amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zakazała jego stosowania w świeżych grzybach w 1986 r. (Zhang i wsp. 2018) i został zastąpiony innymi środkami, takimi jak dwutlenek chloru, kwas cytrynowy, EDTA, nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) i inne (Brennan i wsp. 2000). Gupta i Bhat (Gupta i wsp. 2016) badali wpływ różnych roztworów myjących zawierających  $H_2O_2$  (1,5%, 2,5% i 3,5%), kwas cytrynowy (0,5%, 1,5% i 2,5%) lub EDTA (2%, 4% i 6%), stosowanych do świeżych całych grzybów (*A. bisporus*) przez 10 min, a następnie przechowywanych w lodówce przez 12 dni. Ich wyniki wskazały, że 2,5% kwas cytrynowy był najskuteczniejszym roztworem w zachowaniu jakości grzybów po zbiorze. Kwas cytrynowy był najskuteczniejszy w kontrolowaniu utraty wagi, wskaźnika dojrzałości i wzrostu mikroorganizmów, ale indukował lekkie zażółcenie na powierzchni grzybów. Badano również łączone metody dezynfekcji Guan i in. (Guan i wsp. 2013). Badali oni zastosowanie wody i  $H_2O_2$  przed napromieniowaniem grzybów światłem UV-C (254 nm, 0,45 kJ m<sup>-2</sup>), które następnie przechowywano przez 14 dni w temperaturze 4 °C. Mycie wodą, a następnie obróbka UV-C dała redukcję o 0,77 log CFU/g w *E. coli* O157:H7. Z drugiej strony, podczas mycia 3% wodą  $H_2O_2$  przed zastosowaniem światła UV-C osiągnięto większą redukcję mikrobiologiczną (0,85 log CFU/g) i wzrost całkowitej zawartości kwasu fenolowego i askorbinowego w grzybach w ciągu 14 dni przechowywania. Wykazało to najlepszą skuteczność w hamowaniu zmian i brązowienia grzybów. Wpływ obróbki myjącej na wartość odżywczą i strukturę grzyba *Agaricus bisporus* został zbadany przez Sapers i in. (Sapers i wsp. 1999). Zgłosili oni minimalny wpływ roztworu myjącego  $H_2O_2$  i późniejszego zastosowania erytrobinianu sodu (inhibitora brązowienia) na zawartość węglowodanów, białka, tłuszczu, popiołu, witamin i związków fenolowych. Zaobserwowano również minimalne uszkodzenia strzępek przy

użyciu tych roztworów myjących. Zaobserwowano jedynie 19% spadek wolnych aminokwasów z powodu zjawiska wypłukiwania podczas mycia (Castellanos-Reyes i wsp. 2021).

### **Powłoki**

Wykazano, że stosowanie jadalnych powłok na owocach i warzywach wydłuża ich okres przydatności do spożycia podczas przechowywania (Mannozi i wsp. 2017). Powłoka działa jak półprzepuszczalna bariera dla O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> i wilgoci, modyfikując skład gazowy na styku powłoki z produktem (Kerch i wsp. 2015). W ten sposób mogą one pomóc w zmniejszeniu oddychania, opóźnieniu dojrzewania, zmniejszeniu utraty wilgoci i utrzymaniu jędrności i koloru grzybów (Xue i wsp. 2017). Ostatnio wzrosło zainteresowanie stosowaniem powłok, ponieważ powłoki mogą służyć jako nośnik do włączania szerokiej gamy dodatków do żywności, w tym barwników, aromatów, składników odżywczych, przeciwutleniaczy i środków przeciwdrobnoustrojowych, które mogą wydłużyć okres przydatności do spożycia i zmniejszyć ryzyko rozwoju patogenów na powierzchniach żywności (Atarés i wsp. 2016, Nasiri i wsp. 2018). Powłoki z różnymi biopolimerami mają korzystny wpływ na konserwację grzybów. Zastosowanie gumy arabskiej wzbogaconej natamycyną jako jadalnej powłoki na grzybach shiitake utrzymało jędrność, opóźniło zmiany w rozpuszczalnych substancjach stałych, całkowitym cukrze i kwasie askorbinowym, jakością sensoryczną i zmniejszyło liczbę drożdży i pleśni, wydłużając ich okres przydatności do spożycia o 16 dni (Jiang i wsp. 2013). Podobne wyniki uzyskano po zastosowaniu powłok alginianowych na pieczarkach i przechowywaniu ich w atmosferze 100% O<sub>2</sub>. Pieczarki osiągnęły wysoki poziom jędrności i opóźniły brązowienie, otwieranie kapeluszy i zmiany w rozpuszczalnych substancjach stałych, całkowitych cukrach i kwasie askorbinowym, osiągając okres przydatności do spożycia wynoszący 16 dni (Jiang 2013). Połączone zastosowanie aloesu i gumy tragakantowej jako powłoki na pieczarkach zminimalizowało utratę wagi i brązowienie oraz zmniejszyło utratę tekstury podczas przechowywania przez 13 dni w temperaturze 4 °C. Według Jiang i in. (Jiang i wsp. 2012), obróbka powłoką z kompleksu chitozanowo-glukozowego utrzymała jędrność tkanki, zmniejszyła liczbę drobnoustrojów, znacznie zmniejszyła utratę kwasu askorbinowego i zahamowała wzrost częstości oddechów w grzybach shiitake podczas 16 dni przechowywania w temperaturze 4 °C. Połączenie gumy tragakantowej i olejku eterycznego *Zataria multiflora* Boiss oraz olejku eterycznego *Satureja khuzistanica* pozwoliło utrzymać odpowiednio 93,47% i 92,4% jędrności tkanki grzybów, zmniejszyło liczbę drobnoustrojów i obniżyło wskaźnik brązowienia. Jeśli chodzi o wpływ

tych powłok na zawartość związków czynnych i skład odżywczy grzybów, każda z tych powłok była w stanie zatrzymać 33,3% i 32,9% całkowitej zawartości fenoli oraz 31,9% i 30,9% kwasu askorbinowego w porównaniu z grzybami niepowlekanymi (Nasiri i wsp. 2017, Nasiri i wsp. 2018). Ponadto, Zhu i in. odkryli, że powłoka jadalna przygotowana przy użyciu alginianu sodu, wzbogacona 1% (v/v) olejku eterycznego z tymianku, 0,3 g/l L-cysteiny i 0,4 g/l nizyny, zwiększyła jakość *Pholiota nameko* po zbiorze w temperaturze 4 °C. Ta powłoka jadalna znacząco zahamowała utratę wagi, stopień brązowienia, zawartość malondialdehydu, aktywność polifenoloksygenazy, peroksydazy i celulazy *P. nameko*. Ponadto powłoki jadalne zachowały zawartość rozpuszczalnego cukru, kwasu askorbinowego i rozpuszczalnego białka (Zhu i wsp. 2019). Niedawno Liu i in. zbadali wpływ powlekania grzybów shiitake polisacharydem wyizolowanym z *Oudemansiella radicata* na ich jakość i smak po 18 dniach przechowywania w temperaturze 4 °C. Powlekanie grzyby miały znaczną poprawę jakości, w tym zmniejszoną utratę wagi, poprawioną jędrność, zmniejszone brązowienie, zmniejszoną zawartość malondialdehydu i poprawioną mikrostrukturę. Wykazywały one również wyższe stężenie dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, a także wyższą zawartość niektórych rodzajów aminokwasów przypominających glutaminian sodu, 5'-nukleotydów umami i 1-okten-3-olu. Pieczarki powlekanie miały wyższą zawartość składników odżywczych w porównaniu z grupą kontrolną. Powłoki opóźniały rozkład białek i węglowodanów oraz zachowywały wyższą zawartość kwasu askorbinowego i związków fenolowych, zachowując ich zdolność antyoksydacyjną (Liu i wsp. 2012, Castellanos-Reyes i wsp. 2021).

### **Ozon**

Ozon jest silnym środkiem przeciwdrobnoustrojowym stosowanym w celu przedłużenia okresu przydatności do spożycia żywności. Ze względu na silne właściwości utleniające ozon powoduje szybką inaktywację drobnoustrojów poprzez reakcję z enzymami międzykomórkowymi i składnikami komórkowymi. Biorąc pod uwagę, że po procesie dekontaminacji nadmiar ozonu szybko rozkłada się na tlen, USFDA uważa go za środek dezynfekujący, który może mieć bezpośredni kontakt z żywnością (Prabha i wsp. 2015). Oprócz tych korzystnych efektów, stosowanie ozonu jako środka dezynfekującego może mieć również pewne wady, takie jak jego wysoka niestabilność w stanie gazowym, szybki rozkład, który może powodować ponowne zanieczyszczenie, korozję w wysokich stężeniach i wysokie koszty inwestycyjne (Prabha i wsp. 2015). Wpływ ozonu na mikrobiotę i patogeny w pieczarkach został zbadany przez Akata i in. (Akata i wsp. 2015). Stwierdzono, że narażenie na gaz ozonowy o stężeniu 2,8 i 5,3 mg/l przez 60 minut spowodowało logarytmiczne

zmniejszenie liczby drobnoustrojów tlenowych o 2,44 i 3,07 oraz logarytmiczne zmniejszenie liczby bakterii *Salmonella*, *L. monocytogenes* i *E. coli* O157:H7 o 3,61, 2,80 i 3,41. Watanabe i in. stwierdzili, że wpływ ozonu na skład chemiczny grzyba *Pleurotus ostreatus* obejmował zwiększenie masy, zawartości wody, białek, Ca, K, Zn, ryboflawiny i kwasu askorbinowego oraz zmniejszenie zawartości węglowodanów, żelaza i tiaminy (Watanabe i wsp. 1994). Anjaly i in. badali boczniki wstępnie traktowane 10 i 15 ppm ozonu przez 5 i 10 minut i pakowane w pojemniki HDPE (Anjaly i wsp. 2020). Ich wyniki wskazały, że wstępne zabiegi ozonowe w połączeniu z warunkami pakowania były skuteczne w wydłużaniu okresu przydatności do spożycia grzybów do 10 dni. Zabieg ozonem w stężeniu 15 ppm przez 10 minut osiągnął 2,25 logarytmiczną redukcję CFU w tlenowych płytkach. Chociaż zastosowanie ozonu spowodowało początkowy wzrost brązowienia grzybów w porównaniu z grupą kontrolną, podczas przechowywania przez 10 dni reakcja brązowienia była spowalniana przez ozon. Utrata wagi i konsystencji grzybów nie miała związku z ozonowaniem. W innej pracy Zalewska i in. (Zalewska i wsp. 2021) badali wpływ zastosowania różnych dawek gazowego ozonu (0,05, 1,0 i 2,0 mg/l) i czasu ozonowania (30 i 60 min) na właściwości fizykochemiczne *Agaricus bisporus* przechowywanego w temperaturze 2 °C przez 14 dni. Całkowita zawartość fenoli i całkowita aktywność antyoksydacyjna grzybów zmniejszyły się, podczas gdy utrata wagi wzrosła wraz z zastosowaniem ozonu. Z kolei proces zewnętrznego brązowienia podczas przechowywania został przyspieszony na skutek zastosowania ozonu, podczas gdy zaobserwowano opóźnienie wewnętrznego brązowienia. Liu i in. stwierdzili, że przerywane stosowanie ozonu w stężeniu 3,21 mg/m<sup>3</sup> było skuteczne w utrzymaniu jakości i przedłużeniu okresu przydatności do spożycia grzybów shiitake przechowywanych w temperaturze 4 °C i przy wilgotności względnej 85–95% (Liu i wsp. 2020). Obróbka ozonem zahamowała aktywność polifenoloksydazy i zwiększyła aktywność fenyloalaninowej amoniowej liazy, peroksydazy, superoksydazy dysmutazy i katalazy, skutecznie opóźniając brązowienie grzyba. Z kolei utrzymano wysoki poziom całkowitych fenoli, zawartość rozpuszczalnego białka i uzyskano zmniejszoną akumulację wolnych aminokwasów (Castellanos-Reyes i wsp. 2021).

### **Woda elektrolizowana**

Woda elektrolizowana jest obiecującym środkiem dezynfekującym o szerokim spektrum działania, który może być stosowany w przemyśle spożywczym (Rahman i wsp. 2016). Powstaje w wyniku elektrolizy roztworu soli fizjologicznej, a jej aktywność przeciwdrobnoustrojowa jest określana przez stężenie wolnego chloru, który tworzy kwas



podchloryny (HClO), jego potencjał utleniająco-redukcyjny (ORP) oraz łączny efekt tych dwóch czynników (Lee i wsp. 2014). Łączne zastosowanie wody elektrolizowanej (5, 25, 50 i 100 mg/l) i pasywnej atmosfery modyfikowanej w pieczarkach zostało zbadane przez Aday i in. (Aday i wsp. 2016). Wyniki wskazały, że pieczarki poddane działaniu 25 mg/l wykazywały niższy wskaźnik brązowienia niż pieczarki niepoddane działaniu środka i miały opóźnioną utratę wagi i tekstury. W innym badaniu porównano działanie bakteriobójcze wody elektrolizowanej o niskim stężeniu z czterema innymi środkami dezynfekującymi (woda elektrolizowana silnym kwasem, 1% kwasem cytrynowym, wodnym ozonem i roztworem podchlorynu sodu). Woda elektrolizowana o niskim stężeniu wykazała większą skuteczność przeciwdrobnoustrojową niż inne środki dezynfekujące, osiągając redukcję odpowiednio o 1,35, 1,08 i 1,90–2,16 log CFU/g całkowitej liczby bakterii tlenowych, pleśni i drożdży oraz patogenów przenoszonych przez żywność po 3 minutach obróbki w temperaturze pokojowej ( $23 \pm 2$  °C) (Ding i wsp. 2011, Castellanos-Reyes i wsp. 2021).

### **Światło pulsacyjne**

Światło pulsacyjne (PL) to technologia nietermiczna stosowana do szybkiej inaktywacji patogennych mikroorganizmów w celu zapobiegania psuciu się żywności. Została zatwierdzona jako technologia dekontaminacji przez FDA (FDA. CFR—Code 2021). Technika ta polega na stosowaniu krótkich, intensywnych impulsów szerokiego spektrum światła na powierzchnię żywności w celu inaktywacji mikroorganizmów (Elmnasser i wsp. 2007). Główny mechanizm inaktywacji PL odpowiada efektowi fotochemicznemu wytworzonemu przez szerokie spektrum UV i gęstość użytej energii, co powoduje zmiany strukturalne w DNA bakterii, wirusów i innych patogenów, co zapobiega ich reprodukcji (Takeshita i wsp. 2003). Zastosowanie wysokich fluktuacji światła pulsacyjnego ( $12$  i  $28$  J  $\text{cm}^{-2}$ ) wpłynęło na teksturę pokrojonych pieczarek (*Agaricus bisporus*) z powodu uszkodzeń termicznych wywołanych przez zabiegi. Z kolei większe brązowienie było promowane z powodu wyższej aktywności polifenoloksydazy, a zawartość związków fenolowych, witaminy C i zdolność antyoksydacyjna zostały znacznie zmniejszone. Jednakże zastosowanie PL w niskich dawkach ( $4,8$  J  $\cdot$   $\text{cm}^{-2}$ ) może wydłużyć okres przydatności do spożycia mikrobiologicznego świeżych pieczarek w plastrach o 2–3 dni bez drastycznego wpływu na teksturę lub właściwości antyoksydacyjne (Oms-Oliu i wsp. 2010, Castellanos-Reyes i wsp. 2021).

### **Ultradźwięki**

Ultradźwięki to mechanicznie drgające fale o częstotliwości większej niż 20 kHz. Klasyfikuje się je jako ultradźwięki o niskiej intensywności ( $<1 \text{ W/cm}^2$ , częstotliwości 0,1–20 MHz) i ultradźwięki o wysokiej intensywności ( $10\text{--}1000 \text{ W/cm}^2$ , częstotliwość mniejsza niż 0,1 MHz). Ultradźwięki o wysokiej intensywności są stosowane jako środek przeciwdrobnoustrojowy w żywności (de São José i wsp. 2014). Działanie przeciwdrobnoustrojowe jest związane ze zjawiskiem kawitacji wytwarzanej w pęcherzykach gazu, co powoduje niszczący wpływ na komórki mikroorganizmów obecnych w sonikowanym medium (Guerrero i wsp. 2017). Woda elektrolizowana o niskim stężeniu w połączeniu z ultradźwiękami lepiej utrzymuje kolor powierzchni i jędrność świeżych pokrojonych pieczarek w porównaniu z zabiegiem z użyciem tylko wody elektrolizowanej (de São José i wsp. 2014, Castellanos-Reyes i wsp. 2021).

### **Promieniowanie gamma**

Napromieniowanie gamma kilku produktów zostało zatwierdzone jako bezpieczne przez FDA. Dawka do 1 kGy okazała się przydatna w utrzymaniu jakości i przedłużeniu okresu przydatności do spożycia jadalnych grzybów leśnych, powodując zmniejszenie brązowienia enzymatycznego z powodu opóźnienia aktywności polifenoloksydazy (Cardoso i wsp. 2019, Fernandes i wsp. 2013). W innym badaniu określono wpływ różnych dawek napromieniowania (0,5, 1, 3,1 i 5,2 kGy) na jakość plastrów pieczarek (Koorapati i wsp. 2004). Dawki powyżej 0,5 kGy znacząco zmniejszyły liczbę mikrobiologiczną do poziomów niewykrywalnych i zapobiegły brązowieniu wywołanemu mikrobiologicznie. Napromieniowanie dawką 1 kGy było najskuteczniejsze w przedłużaniu okresu przydatności do spożycia plastrów pieczarek. Jednak stosowanie napromieniowania gamma mogło powodować zmiany w składzie chemicznym (Fernandes i wsp. 2017). Promieniowanie gamma badano w przypadku grzybów dzikich, takich jak *Lactarius deliciosus*, *Boletus edulis* i *Hydnum repandum* (Fernandes i wsp. 2012, Fernandes i wsp. 2013a), oceniając jego wpływ na skład odżywczy i aktywność antyoksydacyjną. Wyniki wskazały, że dawki do 1 kGy pozwalają na utrzymanie jakości i wydłużenie okresu przydatności do spożycia grzybów, bez znaczącego wpływu na makroskładniki odżywcze, wartość energetyczną, tokoferole i aktywność antyoksydacyjną (Fernandes i wsp. 2012, Fernandes i wsp. 2013a). Promieniowanie ultrafioletowe jest ogólnie klasyfikowane do trzech grup: UV-C (200–280 nm), UV-B (280–320 nm) i UV-A (320–400 nm). Promieniowanie UV-C zostało zatwierdzone przez FDA do stosowania jako środek dezynfekujący do powierzchniowej obróbki żywności (Kerch 2015). Zastosowanie promieniowania UV-C ( $4 \text{ kJ/m}^2$ ) na grzyby

shiitake i przechowywanie ich w modyfikowanej atmosferze przez 15 dni w temperaturze 1 °C i wilgotności względnej 95% spowodowało utrzymanie wysokiej jędrności, wyższą zawartość flawonoidów i kwasu askorbinowego oraz większą zdolność antyoksydacyjną grzybów (Jiang i wsp. 2010). W innym badaniu określono wpływ promieniowania UV-C (0,45–3,15 kJ/m<sup>2</sup>) na ładunek mikrobiologiczny świeżych pieczarek przechowywanych przez 21 dni w temperaturze 4 °C. Uzyskano redukcję o 0,46–1,13 CFU/g i 0,63–0,89 CFU/g w liczbie *E. coli* O157:H7 i całkowitej liczbie bakterii tlenowych (Johannessen i wsp. 2002). Grzyby są bogate w sterole, głównie ergosterol. Gdy są wystawione na działanie promieniowania UV, przekształcanie ergosterolu w witaminę D<sub>2</sub> zachodzi poprzez proces fotolizy (Sławińska i wsp. 2016). Taofiq i in. przejrzyli liczne badania oceniające wpływ różnych źródeł promieniowania UV, takich jak ultrafiolet A, ultrafiolet B, ultrafiolet C, na produkcję witaminy D<sub>2</sub> w różnych gatunkach świeżo uprawianych grzybów (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*), a także w innych gatunkach grzybów (*Agaricus bitorquis*, *Agrocybe cylindracea*, *Auricularia polytricha*, *Boletus edulis*, *Cantharellus tubaeformis*, *Cordyceps militaris*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus*, *Hypsizygus marmoreus*, *Lentinus squarrosulus*, *Lentinus polychrous*, *Pholiota nameko*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus cystidiosus*, *Pleurotus djamor*, *Pleurotus eryngii* var. *ferulae*, *Pleurotus pulmonarius* i *Volvariella volvacea*). Autorzy ci wskazują, że te grzyby zawierają znaczną ilość witaminy D<sub>2</sub> po narażeniu na promieniowanie UV (Taofiq i wsp. 2017). Inni autorzy badali wpływ promieniowania UV-B na stężenie witaminy D<sub>2</sub> w pokrojonych grzybach shiitake (*Lentinus edodes*) i pieczarkach dwuzarodnikowych (*Agaricus bisporus*). Stężenie witaminy D<sub>2</sub> w obu rodzajach grzybów wzrastało wraz ze wzrostem dawki napromieniowania. Stwierdzono również, że napromieniowanie pokrojonych grzybów było bardziej skuteczne w zwiększaniu zawartości witaminy D<sub>2</sub> w porównaniu z całym grzybem, ze względu na większą powierzchnię napromieniowania i fakt, że promieniowanie UV działa tylko na powierzchnię grzybów (Ko i wsp. 2008). W innym badaniu oceniono zastosowanie napromieniowanie światłem UV-B przez 2 godziny na zawartość witaminy D<sub>2</sub> w jadalnych owocnikach i grzybni 11 gatunków świeżych grzybów. Po napromieniowaniu zawartość witaminy D<sub>2</sub> w owocnikach grzybów wzrosła znacząco z 0–3,93 do 15,05–208,65 µg/g, a w napromieniowanych grzybniach bocznika złotego, bocznika i bocznika różowego wzrosła z 0,28–5,93 do 66,03–81,71 µg/g. Promieniowanie UV-B miało niewielki wpływ na zawartość ergotioneiny (0,71–3,13, 0,63–0,66 mg/g), flawonoidów (5,31–7,26, 1,78–8,21 mg/g) i całkowitych fenoli (7,15–18,25, 6,36–13,08 mg/g) odpowiednio w

owocnikach i grzybnii, ale autorzy zauważają, że napromieniowane próbki nadal zawierają wystarczające ilości tych związków antyoksydacyjnych (Huang i wsp. 2015, Castellanos-Reyes i wsp. 2021).

### **Wysokie ciśnienie hydrostatyczne (HHP)**

Wysokie ciśnienie hydrostatyczne jest jedną z najczęściej stosowanych technologii nietermicznych w konserwowaniu i przetwarzaniu żywności (Misra i wsp. 2017). HHP jest stosowane w celu poprawy bezpieczeństwa żywności i okresu przydatności do spożycia produktów pochodzenia roślinnego dzięki swojej zdolności do inaktywacji enzymów i mikroorganizmów (Barba i wsp. 2017, Ma i wsp. 2017), utrzymywania związków bioaktywnych i przy niewielkim wpływie na jakość odżywczą i organoleptyczną (Barba i wsp. 2017, Khan i wsp. 2018, Ranganathan i wsp. 2016). Stałe produkty spożywcze przetwarzane pod wysokim ciśnieniem są poddawane systemowi wsadowemu. W tej metodzie produkty są pakowane i uszczelniane przed przetworzeniem, a następnie żywność jest ładowana do perforowanego koszyka, który jest umieszczany w naczyniu ciśnieniowym. Następnie ciśnienie jest zwiększane do zadanego poziomu, a produkt jest utrzymywany pod tym ciśnieniem przez 3 do 10 minut, po czym ciśnienie jest zwalniane, a odprężony produkt jest rozładowywany (Balasubramaniam i wsp. 2008). Aktywność endogennych enzymów degradujących i enzymów ze wzrostu mikroorganizmów jest związana ze zmianami koloru i smaku, degradacją tekstury i utratą wartości odżywczych produktów ogrodniczych, co znacznie obniża ich jakość i okres przydatności do spożycia (Whitaker 1991). Badano wpływ przetwarzania wysokim ciśnieniem hydrostatycznym (HPP) na poziomie 100–300 MPa i czasie przetrzymywania 3–18 min na cechy jakościowe świeżego *Pleurotus eryngii*, takie jak polifenoloksydaza (PPO), utrata masy, kolor, twardość i jakość sensoryczna (Yang i wsp. 2014). Wyniki wykazały, że wraz ze wzrostem ciśnienia i czasu przetrzymywania aktywność enzymu PPO i elastyczność próbek przetworzonych HPP wzrosły po początkowym spadku, wartość jasności ( $L^*$ ) i twardość stopniowo zmniejszyły się, podczas gdy wartość żółtości ( $b^*$ ) i tempo utraty masy wzrosły. Jednak podczas przechowywania (0–12 dni) w temperaturze 4 °C aktywność enzymu PPO była niższa, szybkość utraty wagi była większa, a zakres zmian koloru i twardości był mniejszy w przypadku próbek poddanych działaniu HHP niż w przypadku próbek niepoddanych działaniu. Optymalne warunki przetwarzania wynosiły 200 MPa i 9 min. Badano również wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) na poziomie 300–600 MPa przez 2,5–25 min na inaktywację mikrobiologiczną i kinetykę inaktywacji w świeżych pieczarkach (*Agaricus bisporus*) (Yi i wsp. 2012). Wyniki wykazały,

że efekty inaktywacji poprawiały się wraz ze wzrostem ciśnienia i wydłużeniem czasu przetrzymywania. Drożdże, pleśnie i bakterie *coli* były bardziej wrażliwe na HHP niż bakterie tlenowe i zostały całkowicie inaktywowane przy ciśnieniu 400 MPa przez 2,5 min. Z drugiej strony, obróbka wysokim ciśnieniem w zakresie od 600 do 900 MPa powodowała mniejszą degradację tekstury pieczarek w porównaniu z blanszowaniem termicznym. Z kolei wysokie ciśnienia zwiększyły permeabilizację błon komórkowych z powodu krystalizacji ich fosfolipidów, a ta wyższa przepuszczalność zwiększyła stopień brązowienia (Matser i wsp. 2000). W innym badaniu Lagnika zbadala wpływ argonu pod wysokim ciśnieniem (H, 10 MPa w temp. 4 °C przez 60 min), ultradźwięków (U, 20 kHz przez 10 min) i ich skojarzonych zabiegów (UH) na właściwości fizykochemiczne pieczarek białych w ciągu 9 dni przechowywania po zbiorze w temp. 4 °C. Pieczarki traktowane argonem pod wysokim ciśnieniem wykazały znaczną redukcję PPO, utratę masy i szybkość oddychania oraz nieznacznie zwiększyły aktywność DPPH, całkowitą zawartość fenoli i flawonoidów. Zastosowanie ultradźwięków w połączeniu z argonem pod wysokim ciśnieniem okazało się najskuteczniejszym zabiegiem w celu zmniejszenia PPO (Lagnika i wsp. 2013). Kilka prac koncentrowało się na badaniu inaktywacji polifenylooksydazy (PPO) w pieczarkach. Gomes i in. wskazywali, że obróbka przy 600 MPa przez 10 min, zmniejszyła aktywność grzybowego PPO o około 50%, a obróbka przy 800 MPa przez 1 min nie mogła całkowicie dezaktywować grzybowego PPO (Gomes i wsp. 1996). Sun i in. donieśli o 28% redukcji aktywności grzybowego PPO poprzez wystawienie go na działanie 800 MPa przez 10 min w temperaturze około 35 °C (Sun i wsp. 2003). Zastosowanie obróbki przy ultra wysokim ciśnieniu (UHHP) od 1400 do 1600 MPa przez 1 min zmniejszyło aktywność o 90,4% i 99,2% w buforze, jednak wyższa aktywność enzymatyczna pozostała w stanie czystym. Sugerują, że inaktywacja grzybowego PPO przez obróbkę UHHP przy ciśnieniu wyższym niż 1000 MPa wynika z synergistycznego efektu ciśnienia i wzrostu temperatury generowanego przez ciśnienie na strukturę drugorzędową i trzeciorzędową grzybowego PPO (Yi i wsp. 2012a, Castellanos-Reyes i wsp. 2021).

Coraz wyraźniejszy jest trend konsumencki w kierunku produktów świeżych, o wysokiej wartości odżywczej, promujących zdrowie i bogaty w smak, np. w postaci gotowych do spożycia lub do picia napojów (Endrizzi i in., 2006). Liczebność drobnoustrojów w surowych warzywach i owocach waha się między 5,0 a 7,0 log jtk/g (Spurr, 1994); w owocach dominują głównie drożdże i pleśnie. Drożdżaki często szybciej kolonizują środowisko ze względu na ich szybszy wzrost. Populacja drożdży zawiera się w zależności od rodzaju

owoców, pomiędzy 2,0 i 6,0 log jtk/g (Nyanga i wsp., 2007, Di Cagno i wsp., 2008a, b) i stwierdzono w niej obecność gatunków należących do rodzajów *Cryptococcus*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaromyces* i *Rhodotorula* (Nielsen i wsp., 2007; Chanprasartsuk et al., 2010; Di Cagno i wsp., 2010a). Bakterie zasiedlające surowce roślinne to przeważnie tlenowce należące do rodzajów *Pseudomonas*, *Enterobacteria* i *Coryneforms* (Schneider, 1988). W surowych warzywach mogą również występować gronkowce koagulazo-dodatnie i inne bakterie kałowe; nie stanowią one szczególnego ryzyka zdrowotnego ze względu na niską liczebność komórek i hamowanie ich wzrostu przez niekorzystne warunki środowiskowe i konkurencję drobnoustrojów lepiej do tych warunków przystosowanych (Ciafardini i Di Cagno, 2012).

Bakterie fermentacji mlekowej stanowią niewielką część (2,0-4,0 log jtk/g) autochtonicznej mikrobioty surowych warzyw i owoców (Buckenhüskes, 1997). Z surowych lub spontanicznie fermentowanych warzyw i owoców izoluje się hetero-fermentacyjne i homo-fermentacyjne gatunki należące do rodzajów *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus* i *Pediococcus*. Najczęściej występujące gatunki to *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria* / *Weissella confusa*. W przypadku zastosowania odpowiednich warunków: odpowiedniej aktywności wody, stężenia soli i temperatury, obecności tlenu, spontaniczna fermentacja surowych warzyw i owoców pozwala na otrzymanie produktu dobrej jakości. W niekorzystnych warunkach może wystąpić jednocześnie fermentacja alkoholowa. Zazwyczaj bakterie Gram-ujemne są hamowane we wczesnym stadium fermentacji mlekowej. W szczególności *Leuconostoc mesenteroides* i *Pediococcus pentosaceus* rozpoczynają pierwszy etap fermentacji, a następnie dominować zaczynają *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus brevis* lub *Lactobacillus maltaromicus* i *Lactobacillus bavaricus* w zależności od temperatury inkubacji (odpowiednio 20-30 °C lub 5 °C).

Mikrobiota odpowiedzialna za spontaniczną fermentację surowych warzyw i owoców zasługują na duże zainteresowanie jako potencjalne narzędzie do poprawy bezpieczeństwa mikrobiologicznego sfermentowanej żywności (Fan, Hansen, 2012; Paramithiotis i in., 2012). Zdolność drobnoustrojów do bioprezerwacji wynika głównie z syntezy szerokiej gamy metabolitów pierwotnych i wtórnych antagonistycznych wobec mikroorganizmów niepożądanych. Wśród tych związków są min. kwasy organiczne, dwutlenek węgla, etanol, nadtlenuk wodoru, diacetyl, związki grzybobójcze (np. kwasy tłuszczowe, kwas fenylowy i jego pochodne), bakteriocyny i antybiotyki (Fan, Hansen, 2012). Nie wszystkie szczepy bakterii fermentacji mlekowej, naturalnie występujące w warzywach i owocach, są w stanie

zagwarantować taką samą efektywność podczas przetwarzania tych surowców. Dlatego prowadzenie badań nad doбором odpowiednich drobnoustrojów do procesów przetwórczych jest nieodzowne. Główne kryteria stosowane przy wyborze dotyczą przede wszystkim wartości odżywczych i organoleptycznych otrzymywanych produktów oraz przydatności technologicznej szczepów. Na przykład zdolność szczepów LAB do syntezy egzopolisacharydów (EPS) jest ważną cechą w kształtowaniu zarówno lepkości i właściwości odżywczych niektórych produktów (Di Cagno i wsp., 2011a). W przypadku fermentacji niektórych warzyw wskazane jest łagodne ukwaszenie (Lee i wsp., 2011). Tak jest np.: w przypadku kimchi, gdzie nadmierne kwaszenie uważane jest za jedną z najpoważniejszych wad. Dlatego też jako kultury starterowe do otrzymywania tego produktu zostały wybrane autochtoniczne szczepy *Lactobacillus sakei*, charakteryzujące się powolnym zakwaszaniem środowiska (Rhee i wsp., 2011). Często szczepy rozpoczynające fermentację należą do gatunku *Leuconostoc mesenteroides*, których rozwój jest szybko hamowany przez rosnące stężenie kwasu mlekowego. Gatunki dobrze tolerujące wyższe stężenia kwasów, takie jak *Lactobacillus brevis*, dominują w fazie środkowej fermentacji, po czym wypierane są w późnej fazie przez *Lactobacillus plantarum*. Niemniej jednak kimchi o najlepszych właściwościach organoleptycznych uzyskuje się przed fazą rozwoju *L. plantarum* i *L. brevis*, przy optymalnym pH 4,5. Po fermentacji kimchi pozostawia się do dojrzewania przez kilka tygodni w warunkach chłodniczych (Lee i wsp., 2011).

Obecnie innowacje w biotechnologii żywności dotyczą najczęściej poprawy cech żywieniowych, a także w poprawy cech hedonistycznych. Przykładem tego trendu są koktajle, stosowane w celu zwiększenia spożycia warzyw i owoców, jako alternatywa i/lub uzupełnienie świeżych produktów. Koktajle zostały wprowadzone po raz pierwszy w 1960 roku w Stanach Zjednoczonych. Co więcej, ponownie pojawiły się na całym świecie w 2000 roku (Titus, 2008). Wytwarzanie koktajli owocowych polega na stosowaniu mieszanki owoców i warzyw po usunięciu nasion i skórki, które są przetwarzane na masę włóknistą lub puree. W większości przypadków wybór mieszanin opiera się na barwie, smaku, teksturze pitnej, a zwłaszcza w celu zapewnienia wysokiego stężenia składników odżywczych o niskiej zawartości energii (Watzl, 2008). Ostatnio opracowano nową recepturę wytwarzania sfermentowanych koktajli (Di Cagno i wsp., 2011a). Sok z białych winogron i ekstrakt z *Aloe vera* zmieszano z owocami i warzywami czerwonymi (wiśniami, śliwkami i pomidorami) oraz z zielonymi (fenkułami, szpinakiem, papają i kiwi) i poddano fermentacji przy udziale wieloskładnikowej kultury starterowej zawierającej autochtoniczne szczepy *L. plantarum*, *W.*

*cibaria* i *L. pentosus*. Fermentacja mlekowa produktu pozytywnie wpłynęła na zawartość w nim związków przeciwutleniających i wzmocniła cechy sensoryczne.

Pieczarki, podobnie jak wszystkie grzyby jadalne, są surowcem kłopotliwym do przetwarzania, gdyż zawierają dużą ilość wody oraz charakteryzują się wysoką aktywnością enzymów, takich jak proteaza albo oksydaza polifenolowa, biorących udział w rozkładzie białek i cukrów, a proces ich psucia rozpoczyna się bezpośrednio po zbiorze. Rozwiązanie tego problemu stanowi zastosowanie odpowiedniej obróbki wstępnej, umożliwiającej uzyskanie przetworów charakteryzujących się dobrą jakością. Zwykle w obróbce tego typu surowca stosuje się mycie, blanszowanie, moczenie, często w roztworach o działaniu niwelującym ciemnienie. Blanszowanie, czyli krótkotrwałe moczenie we wrzątku, a następnie hartowanie w zimnej wodzie, chociaż wywiera negatywny wpływ na teksturę mięszu grzybni, bardzo skutecznie zapobiega jej ciemnieniu, co jest ważne przy przetwarzaniu pieczarek.

Popularną, stosowaną obecnie metodą konserwowania pieczarek jest ich marynowanie, czyli proces utrwalania produktów spożywczych m.in. za pomocą octu, wina, oleju, masła czy kwaśnego mleka. Proces marynowania pieczarek znany jest od dawna, a jego technologia została szczegółowo opracowana i jest stosowana na skalę przemysłową w wielu wariantach. Inną metodą konserwowania świeżych pieczarek, mniej popularną i raczej nie stosowaną w skali przemysłowej jest kiszenie, czyli biologiczna metoda konserwacji żywności opierająca się o proces fermentacji mlekowej przy wykorzystaniu cukrów występujących w surowcu (bądź dodanych), co obniża kaloryczność produktu. Fermentacja kwasu mlekowego jest uważana za wartościową i prostą z biotechnologicznego punktu widzenia metodę umożliwiającą utrzymanie i/lub poprawę bezpieczeństwa, wartości odżywczych, sensorycznych i trwałości, głównie stosowaną do konserwowania owoców i warzyw. Nie wszystkie szczepy bakterii fermentacji mlekowej, naturalnie występujące w surowcach roślinnych, są w stanie zagwarantować taką samą efektywność podczas przetwarzania tych surowców. Dlatego prowadzenie badań nad doбором odpowiednich drobnoustrojów do procesów przetwórczych jest nieodzowne. Główne kryteria stosowane przy wyborze dotyczą przede wszystkim wpływu bakterii na zachowanie wartości odżywczych i organoleptycznych otrzymywanych produktów oraz przydatności technologicznej szczepów, tj. ich oporności/przeżywalności podczas przetwarzania.

Jak wynika z danych IERiGŻ w latach 2006-2017 krajowa produkcja pieczarek zwiększyła się o 66% do 325 tys. t. W 2018 r. pieczarki produkowano w pieczarkarniach



o obszarze 245 tys. ha, co daje zwwyżkę powierzchni o 0,4% w skali roku, przy jednoczesnym wzroście produkcji o 1,5% do 330 tys. t.

Od kilku lat Polska jest największym światowym eksporterem pieczarek i to właśnie eksport jest podstawowym rynkiem zbytu grzybów uprawianych w naszym kraju. Szacuje się, że eksport stanowi 65-70% produkcji. Na światowych rynkach polskie pieczarki konkurują zarówno ceną jak i jakością. Świadczy to o dobrze zorganizowanym zapleczu sanitarnym i logistycznym, co gwarantuje możliwość dalszego rozwoju branży przy obecnie ewidentnej przewadze popytu nad podażą.

W Polsce świeża pieczarka stanowi 95% spożycia, w krajach starej Unii Europejskiej 70% to pieczarka w puszcze, 30% - świeża, przy prawie dwukrotnie większym spożyciu ogółem niż w Polsce. Istnieje stabilna tendencja wzrostowa we wszystkich asortymentach grzybów hodowlanych i wszystkich krajach UE, od kilku lat utrzymująca się na poziomie +2% rocznie.

Przy obecnych trendach pro-zdrowotnych, nie jesteśmy w stanie znacznie zwiększyć krajowego spożycia, promując pieczarkę jedynie pod postacią świeżego produktu. Większe krajowe spożycie mogłoby podnieść statystyki produkcyjne, ale to wymaga opracowania i promowania produktów odpowiadających dzisiejszym trendom żywieniowym. Takim produktem powinna stać się pieczarka utrwalana metodą naturalnej fermentacji, przy zastosowaniu specjalnie w tym celu wyselekcjonowanych kultur starterowych bakterii fermentacji mlekowej. Tego typu produkt spełniałby wszystkie kryteria, jakim odpowiada żywność pro-zdrowotna. (Foodfakty.pl., 2019).

Jak już wspomniano grzyby jadalne są surowcem kłopotliwym do przetwarzania, gdyż zawierają dużą ilość wody oraz charakteryzują się wysoką aktywnością enzymów, w tym oksydaz wywołujących ciemnienie owocników w czasie przerobu oraz podczas składowania wyrobów gotowych (Jaworska i wsp. 2008). Rozwiązanie tego problemu stanowi zastosowanie odpowiedniej obróbki wstępnej, umożliwiającej uzyskanie przetworów charakteryzujących się dobrą jakością. Zwykle w obróbce tego typu surowca stosuje się mycie, blanszowanie, moczenie, nasączenie próżniowe owocników, często w roztworach o działaniu niwelującym ciemnienie, do których należą: nadtlenek wodoru, chlorowodorek cysteiny, wersenian sodu, pirosiarczyny, kwasy organiczne, kwas askorbinowy, izoaskorbinian sodu (Czapski 2002). Ponadto wciąż poszukuje się substancji dodatkowych zapobiegających ciemnieniu, które nie miałyby negatywnego wpływu na zdrowie człowieka, a zabezpieczałyby grzyby przed brązowieniem.

Ze względu na dużą zawartość wody i wysoką aktywność enzymów, takich jak proteaza albo oksydaza polifenolowa, biorących udział w rozkładzie białek i cukrów, grzyby są bardzo nietrwałe, a proces ich psucia rozpoczyna się bezpośrednio po zbiorze. Stąd też konieczność szybkiego przetwarzania grzybów, które w handlu dostępne są najczęściej w formie suszonej, a także jako marynowane, mrożone, solone, sterylizowane (konserwy). Znane są także ekstrakty i mączka grzybowa, dodawane do różnych produktów spożywczych ze względu na walory smakowe i zapach. Należy zaznaczyć, że przetwory grzybowe wyróżniają dużą odporność na zmienne warunki przechowywania (Manzi i in., 2004, Bernaś i in., 2007, Jaworska i in., 2007, Bernaś i Jaworska 2010, Lentas i in., 2011, Adamiak i in., 2013).

Grzyby świeże są najpowszechniej spożywane jako smażone. Niestety, podczas obróbki cieplnej zawartość składników odżywczych i aktywność antyoksydacyjna ulega zmniejszeniu bardziej niż podczas mrożenia i suszenia. Mimo to, borowiki w takiej postaci (przygotowane bez dodatkowych składników, grillowane) w 100 g zawierają 32% zalecanej dziennej dawki błonnika pokarmowego i nadal stanowią jego cenne źródło (Manzi i in., 2004, Barrosi i in., 2007).

Blanszowanie, czyli krótkotrwałe moczenie we wrzątku, a następnie hartowanie w zimnej wodzie, chociaż wywiera negatywny wpływ na teksturę mięszu grzybni, bardzo skutecznie zapobiega jej ciemnieniu, co jest ważne przy przetwarzaniu np. pieczarek (Czapski 1994). Należy jednak pamiętać, że im dłuższy czas blanszowania i im wyższa temperatura wody, tym większa deformacja chitynowych ścian komórkowych grzybów poddanych temu procesowi (Lentas i in., 2011). Blanszowanie pieczarek przed ich mrożeniem zwiększa twardość i gumowatość owocników, zwłaszcza podczas długiego składowania w zamrażarkach. Warto zaznaczyć, że mrożenie uznaje się za najlepszą metodę przechowywania w celu zachowania smaku i aromatu świeżych grzybów. Chociaż najpowszechniej mrożone są pieczarki, to, podobnie jak do konserwowania, nadają się tu także borowiki, kurki i rydze. Zamrażanie owocników powoduje zmniejszenie ich chrupkości, kruchości, twardości i żujności, przy jednoczesnym zwiększeniu wodnistości, sprężystości i spójności (Steinbuch 1979, Bernaś i in., 2007).

Grzyby mogą być przechowywane także w formie konserw. W tym celu poddaje się je sterylizacji i utrwaleniu w roztworze chlorku sodu i, czasami, niewielkiego dodatku kwasu cytrynowego, kwasu L-askorbinowego, pirosiarczynu sodu bądź potasu. Konserwy grzybowe są przydatne do spożycia przez 24 miesiące. Przyjmuje się, że wartość odżywcza mrozonek jest większa niż konserw, ale nie zostało to jednoznacznie udowodnione. Badania

porównawcze konserw i mrożonek borowika szlachetnego nie wykazały istotnych różnic w ich podstawowym składzie chemicznym (Bernaś i Jaworska 2010), aczkolwiek są też dane, że mrożonki (borowika i pieczarki) zawierały 3,5-krotnie więcej witaminy B1 i o 25% więcej witaminy B2 aniżeli konserwy z owocnikami tych grzybów. Z kolei wcześniejsze blanszowanie z użyciem pirosiarczanu (IV) sodu i kwasu cytrynowego obniżyło zawartość B1 o średnio 33% w porównaniu do owocników nieblanszowanych (Jaworska i in., 2007).

Trzeba jednak zaznaczyć, że mimo cennego składu, wartość odżywcza grzybów nie jest wysoka, a przyswajalność ich białka jest niższa niż białka roślinnego, ze względu na dużą zawartość aminokwasów siarkowych: metioniny i cysteiny (Bernaś i Jaworska 2010). Duża zawartość białka w suchej masie powoduje, że grzyby stały się współcześnie atrakcyjnym produktem spożywczym, z realną perspektywą zwiększenia ich udziału w diecie. Wynika to nie tylko ze wzrastającego zapotrzebowania na żywność przez rosnącą populację człowieka, ale także, może przede wszystkim, z możliwości wykorzystania mykoprotein w profilaktyce chorób cywilizacyjnych, związanych między innymi z nadmiernym spożyciem tłuszczów zwierzęcych. Ponadto, grzyby są cennym źródłem węglowodanów (do 5% s.m.), kwasów tłuszczowych (3,5% s.m.; w tym niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, NNTK) i składników mineralnych (m.in. chromu, cynku, fluoru, fosforu, jodu, kobaltu, manganu, miedzi, niklu, potasu, selenu, sodu, srebra, wapnia, żelaza). Zawartością witamin, która jest zmienna i zależy od gatunku, grzyby często przewyższają warzywa. Stanowią cenne źródło nie tylko witamin z grupy B: B1, B2, B6, ale także witamin C, E, H, PP, prowitaminy A i D (Golianek i Mazurkiewicz, 2016).

Z uwagi na fakt, że grzyby jadalne charakteryzują się niską kalorycznością, można je traktować jako pokarm dietetyczny (Matilla i in., 2002). Do głównych gatunków uprawnych należy pieczarka dwuzarodnikowa (*Agaricus bisporus*), twardziak jadalny (*Lentinula edodes*), bocznik (*Pleurotus* spp.), uszak bżowy (*Auricularia auricula*), zimówka aksamitnotrzonowa (*Flammulina velutipes*) oraz pochwiak pochwiasty (*Volvariella volvacea*). Największym producentem grzybów na świecie są Chiny, gdzie produkcja w 2007 roku wyniosła 1,6 mln ton (FAO 2007). W produkcji pieczarek Polska wraz z Holandią są liderami w Europie. W 2012 r. zebrano 265 tys. ton pieczarek, z czego 65% przeznaczono na eksport (Trajer i Dyngus 2013).

Fermentacja mlekowa grzybów nie jest tak dobrze poznana jak innych surowców, takich jak chociażby ogórki czy kapusta. W literaturze zagranicznej znaleziono jedną pozycję dotyczącą prób opracowania technologii utrwalania grzybów przy zastosowaniu bakterii

fermentacji mlekowej (Joshi V.K. i in., 1996). Jako surowiec w pracy tej wykorzystywano pieczarki, które po blanszowaniu poddawano fermentacji spontanicznej i kontrolowanej z wykorzystaniem kultur bakterii *L. plantarum*, *L. delbrueckii* i *Streptococcus lactis*. Fermentacja kontrolowana, w porównaniu z procesem spontanicznym, przebiegała zdecydowanie szybciej i z większą wydajnością kwasu mlekowego, przy czym największy wzrost kwasowości zaobserwowano w przypadku *L. plantarum*. Uzyskany produkt był akceptowalny sensorycznie pod względem smaku, zapachu oraz barwy. Wyniki doświadczeń dotyczących kiszenia pieczarek za pomocą bakterii fermentacji mlekowej (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. plantarum*) oraz propionowej (*Propionibacterium freudenreichii*), przedstawione na konferencji PTTŻ w 2005 r. również dowodzą możliwości uzyskania tą metodą atrakcyjnego sensorycznie i trwałego produktu (Jabłońska-Ryś E. i in., 2005). Znane są też wyniki badań dotyczące zastosowania do fermentacji pieczarek szczepów *L. plantarum* Ib oraz *L. plantarum* 299v. Po tygodniowej fermentacji mlekowej wartość pH w próbkach spadła do poziomu 3,6-3,75, a wartości te utrzymywały się lub nieznacznie spadały w okresie dojrzewania fermentowanych próbek w lodówce. Grzyby fermentowane otrzymały wysokie oceny w ocenie organoleptycznej. Grzyby fermentowane szczepem probiotycznym charakteryzowały się wyższą zawartością związków fenolowych i wyższą aktywnością przeciwutleniającą. Szczep *L. plantarum* 299v, z udokumentowanymi właściwościami probiotycznymi, można zastosować w fermentacji owocników grzybów. Produkty uzyskane przy użyciu obu szczepów charakteryzowały się dobrymi właściwościami sensorycznymi. Typ szczepu zastosowanego w fermentacji mlekowej owocników pieczarek miał wpływ na zawartość związków fenolowych i właściwości przeciwutleniające końcowego produktu (Jabłońska-Ryś E. i in., 2016). Badania nad kontrolowaną fermentacją pieczarek podejmowano również w IBPRS, w latach 2007-2009, w ramach realizacji projektu celowego, stosując w nich dwa szczepy bakterii: *L. plantarum* KKP 834 oraz *L. mesenteroides* ZO 1 (Raport końcowy, 2010). Uzyskano pozytywne wyniki badań, a kiszone pieczarki charakteryzowały się dobrą jakością sensoryczną. Firma Bracia Urbanek, w której wykonano pozytywnie zakończone próby w skali półtechnicznej nie podjęła jednak produkcji na skalę przemysłową. Nie znaleziono również innych kontrahentów do wdrożenia opracowanej technologii.

Popularność artykułu spożywczego jakim są pieczarki oraz skala ich produkcji w Polsce sprawiła, że autorzy niniejszej pracy zajęli się zagadnieniem doboru szczepów oraz opracowaniem warunków zakiszania pieczarek, tak aby podnieść jeszcze bardziej

atrakcyjność tego produktu na krajowym rynku spożywczym, poprzez zaproponowanie dotąd rzadko stosowanego u nas sposobu jego konserwowania. Znaczenie tego surowca dokumentuje również fakt znacznej skali eksportu (Fresh-market 2023).



Dane dotyczące eksportu pieczarek pochodzą z GUS, jednak nie są w nich uwzględnione osobne informacje dla poszczególnych gatunków pieczarki, tylko zbiorcze dla całego rodzaju *Agaricus* (kategoria CN 070951 - Grzyby z rodzaju *Agaricus*, świeże lub schłodzone).

Wolumen eksportu pieczarek z Polski w 2023 roku wyniósł 238,4 tys. ton, zaś jego wartość osiągnęła poziom 2 345,7 mln zł (2,3 mld zł). Oznacza to spadek eksportu w tej kategorii w ujęciu ilościowym, ale wzrost w ujęciu wartościowym. W 2022 roku eksport pieczarek wyniósł bowiem 243,3 tys. ton oraz 2 158,8 mln zł (2,2 mld zł). Daje to spadek wolumenu o 4,9 tys. ton, czyli o 2,0 procent oraz wzrost wartości aż o 186,9 mln zł, czyli o 8,7 procent. Średnia cena eksportowanych z Polski pieczarek wyniosła w 2023 roku 9,84 zł/kg wobec poziomu 8,87 zł/kg w analogicznym okresie roku 2022, co oznacza wzrost rok do roku o 10,9 procent.

Polska pozostaje pieczarkowym hegemonem na globalnym rynku z ogromną przewagą eksportu nad importem. W 2023 roku saldo wyniosło +236,6 tys. ton oraz +2 332,2 mln zł na korzyść eksportu (Fresh-market 2023).

### 3. CEL I ZAKRES PRACY

#### 3.1. Cel pracy

Celem pracy było opracowanie i optymalizacja metod otrzymywania utrwalonej biomasy bakterii z rodzaju *Leuconostoc*, charakteryzujących się właściwościami

biotechnologicznymi pozwalającymi na ich wykorzystanie w procesie kiszenia pieczarki dwuzarodnikowej oraz opracowanie kultur starterowych, receptur i technologii kiszenia oraz przeprowadzenie testów eksploatacyjnych pilotażowej linii do kiszenia.

### 3.2. Zakres pracy

Zakres pracy obejmował:

- przebadanie panelu szczepów z rodzaju *Leuconostoc*, pochodzących z zasobów ZF pod kątem możliwości ich zastosowania w kulturze starterowej do kiszenia grzybów - poprzez ocenę ich właściwości biotechnologicznych,
- optymalizację warunków hodowli w skali mikrotechnicznej,
- próby wydzielania biomasy bakterii z podłoża hodowlanego,
- próby utrwalania biomasy drogą suszenia sublimacyjnego,
- wykonanie kiszonek doświadczalnych pieczarki dwuzarodnikowej w skali laboratoryjnej,
- ocenę sensoryczną otrzymanych kiszonek oraz badania chemiczne zalewy,
- ocenę statystyczną wyników,
- wytypowanie najodpowiedniejszych szczepów spośród przebadanych bakterii do ewentualnych zastosowań przemysłowych.
- dobór zestawu przypraw i przeprowadzenie oceny organoleptycznej i analiz fizykochemicznych otrzymanych produktów,
- przeprowadzenie badań przechowalniczych,
- wykonanie prób zastosowania wody dekontaminowanej do mycia surowca,
- wykonanie testów eksploatacyjnych pilotażowej linii do kiszenia pieczarek obejmujących badania mikrobiologiczne czystości urządzeń oraz jakości mikrobiologicznej produktu.

## 4. METODYKA PRACY

### 4.1. Materiały

#### 4.1.1. Badane mikroorganizmy

Panel piętnastu przebadanych mikroorganizmów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Szczepy bakterii wykorzystywane w badaniach

Nr szczepu	Nazwa i symbol szczepu	Pochodzenie szczepu	Identyfikacja genetyczna (weryfikacja przynależności gatunkowej)
1.	<i>Leuconostoc citreum</i> (Ł 06)	Zakwas piekarski żytni	<i>Leuconostoc citreum</i>
2.	<i>Leuconostoc lactis</i> (Ł 07)	Zakwas piekarski żytni	<i>Leuconostoc citreum</i>
3.	<i>Leuconostoc sp. 1</i>	Zakwas piekarski żytni	<i>Leuconostoc lactis</i>
4.	<i>Leuconostoc sp. 2</i>	Zakwas piekarski żytni	<i>Leuconostoc lactis</i>
5.	<i>Leuconostoc citreum</i> C750(9)	Zakwas piekarski żytni	<i>Lactobacillus plantarum</i>
6.	<i>Leuconostoc mesenteroides/dex</i> 750G	Zakwas piekarski żytni	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
7.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sz 1.2-7	Zakwas piekarski żytni	<i>Weisella cibaria</i>
8.	<i>Leuconostoc citreum</i> sz 2.1-3	Zakwas piekarski żytni	<i>Leuconostoc citreum</i>
9.	<i>Leuconostoc citreum</i> sz 2.1-7	Zakwas piekarski żytni	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
10.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sz 2.1-6	Zakwas piekarski żytni	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
11.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> C	Cydr	<i>Lactobacillus plantarum</i>
12.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ZO	Pieczarki fermentowane	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
13.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> G4C	Zakwas piekarski gryczany	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
14.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> JIIF	Jabłka fermentowane	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
15.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PIN	Papryka fermentowana	<i>Staphylococcus pasteurii</i>

Wszystkie bakterie użyte w doświadczeniach zostały wyizolowane z produktów poddanych spontanicznej fermentacji.

Zakwasy piekarskie żytnie (4 szt.) pochodziły z dwóch piekarni rzemieślniczych. Pozostałe zostały sporządzone w warunkach laboratoryjnych.

Przynależność gatunkowa szczepów została oznaczona za pomocą testu APi CH50, a w niektórych przypadkach potwierdzona analizą 16-s RNA.





- ekstrakt słodowy	80 g,
- namok kukurydziany	50 g,
- ekstrakt drożdżowy	20 g,
- pepton	50 g,
- amonu siarczan	50 g,
- amonu diwodorofosforan	30 g,
- magnezu siarczan	6 g,
- manganu (II) siarczan	1,5 g.

Hodowle w tym podłożu prowadzono w celu dokonania oceny wzrostu biomasy bakterii w temperaturze 30 i 37 °C (testowane temperatury namnażania biomasy w skali przemysłowej) w ramach optymalizacji warunków namnażania biomasy w warunkach przemysłowych, do otrzymywania szczepionek komercyjnych. Hodowle trwały 24 h. Po zakończeniu hodowli płyn o objętości 50 ml wirowano przy trzech prędkościach obrotowych rotora: 5500, 7000 i 9000/min, w celu doboru parametrów efektywnego wydzielenia biomasy bakterii z podłoża hodowlanego.

Następnie odbierano supernatant, a pozostały osad suszono konwekcyjnie (owiewowo) w temperaturze otoczenia przez 12 h. W hodowlach, po ich zakończeniu oznaczano liczbę bakterii fermentacji mlekowej. W supernatancie oznaczano również zawartość kwasu mlekowego i octowego, w celu wstępnego określenia przydatności danego szczepu bakterii do kiszenia warzyw (lub pieczarek).

#### 4.3. Liofilizacja próbek bakterii

Dehydratacja metodą sublimacyjną prowadzona była przy użyciu liofilizatora laboratoryjnego Christ Alpha 1-4, w którym możliwe jest przeprowadzenie wszystkich trzech etapów procesu suszenia sublimacyjnego: zamrażania, głównego suszenia oraz dosuszenia; na dowolnym etapie procesu można kontrolować temperaturę produktu, temperaturę kondensatora lodu oraz wartość ciśnienia. Końcowa wilgotność preparatów 2-3 %.

Jako dodatki ochronne stosowano glicerol oraz odtłuszczone mleko w proszku.

#### 4.4. Kiszenie pieczarek

Pieczarki kiszone w słojach typu twist off o pojemności całkowitej 0,9 l. Materiał do kiszenia przygotowywano, a następnie prowadzono proces kiszenia w następujący sposób:

- pieczarki czyszczone z resztek ściółki, po czym myto pod bieżącą wodą,

- następnie pieczarki blanszowano w wodzie o temp. około 92-93 °C przez 5 min w taki sposób, że wrzucano partię grzybów do pojemnika z wodą o  $T \approx 95$  °C, temperatura obniżała się o kilka stopni – oczekiwano przez kilka minut aż temperatura osiągnie zadany poziom, a następnie przetrzymywano grzyby w tej temperaturze przez 5 min,
- warzono słoje, nasypywano porcję pieczarek, ważono całość, zalewano przegotowaną i schłodzoną wodą tak żeby przykryć grzyby i ponownie ważono aby określić masę zalewy, odlewano zalewę do innego naczynia i dodawano kolejno 1,5 % soli oraz 1,5 % cukru (sacharozy spożywczej) w stosunku do masy pieczarek oraz szczepionkę bakteryjną w ilości, która zapewniała średnią początkową liczbę bakterii w zalewie na poziomie  $10^6$  jtk/ml (tzn. dodawano 0,1 ml zawiesiny bakterii o liczbie rzędu  $10^9$  jtk/ml na każde 100 ml zalewy) – dokładnie mieszano, zalewano grzyby, znowu dokładnie mieszano, zamykano słoje i odstawiano do termostatu utrzymującego stałą temperaturę 25 °C na okres 7 dni.

Po 7 dniach próbki wstawiono do chłodni i przetrzymywano w temperaturze 8-10 °C przez 3 tygodnie.

Część próbek po zakończeniu czterotygodniowego procesu zakiszania poddawano procesowi pasteryzacji. Proces ten prowadzony był w następujący sposób:

słoje z kiszonkami wstawiano do naczynia z zimną wodą, wodę podgrzewano do wrzenia, kończono podgrzewanie a próbki przetrzymywano w gorącej wodzie przez 20 min, po czym schładzano w strumieniu zimnej wody.

Badania nad doborem mieszanek przyprawowych wykonywano w następujących układach (układ I):

- kiszenie z udziałem szczepów *Leuconostoc citreum* (Ł 06) oraz *Leuconostoc lactis* Sp. 1 w następującym układzie dodatków przyprawowych:
  1. Fermentacja spontaniczna (W1)
  2. Ł06 bez dodatków (W2)
  3. *Leuconostoc* sp 1 bez dodatków (W3)
  4. 750 (9) bez dodatków (W4)
  5. *Weisella cibaria* KKP 2043 bez dodatków – porównawczy wariant doświadczenia (W5)
  6. Ł06 + marchew + liść laurowy (W6)
  7. Sp1 + marchew + liść laurowy (W7)

8. Ł06 + cebula + pieprz (W8)
9. Sp1 + cebula + pieprz (W9)
10. Ł06 + imbir + czosnek (W10)
11. Sp1 + imbir + czosnek (W11)
12. Ł06 + gorczyca + ziele angielskie (W12)
13. Sp1 + gorczyca + ziele angielskie (W13), gdzie (W....) to robocze ozn. próbek.

Kiszzonek nie poddawano pasteryzacji, a wszystkie próbki przechowywano w warunkach chłodniczych.

- kiszenie z udziałem szczepów *Leuconostoc citreum* (Ł 06) oraz *Leuconostoc citreum* C750(9) (identyfikacja jako *Lactobacillus plantarum*) w następującym układzie dodatków przyprawowych (układ II):

1. Ł06 + marchew + ziele angielskie (K1)
2. Ł06 marchew + imbir + liść laurowy (K2)
3. Ł06 + gorczyca + liść laurowy (K3)
4. Ł06 + chrzan + marchew (K4)
5. 750(9) + marchew + ziele angielskie (K5)
6. 750(9) + marchew + imbir + liść laurowy (K6)
7. 750(9) + gorczyca + liść laurowy (K7)
8. 750(9) + chrzan + marchew (K8), gdzie (K....) to robocze ozn. próbek

W każdym wariantcie połowę kiszzonek poddawano pasteryzacji, a drugiej połowy nie pasteryzowano; wszystkie próbki przechowywano w warunkach chłodniczych.

- kiszenie z udziałem szczepów *Leuconostoc citreum* (Ł 06) oraz *Leuconostoc citreum* C750(9) (identyfikacja jako *Lactobacillus plantarum*) w następującym układzie dodatków przyprawowych, w zmiennych warunkach przechowywania próbek niepasteryzowanych oraz poddanych pasteryzacji (układ III):

1. – P1(2) – Ł06 + marchew + ziele ang., bez pasteryzacji, przechowywanie próbek w chłodni
2. – P1(3) – Ł06 + marchew + ziele ang., pasteryzacja, przechowywanie próbek w chłodni

3. – P1(4) – Ł06 + marchew + ziele ang., pasteryzacja, przechowywanie próbek w T pokojowej
4. – P5(9) – 750(9) + marchew + ziele ang., pasteryzacja, przechowywanie próbek w chłodni
5. – P5(10) – 750(9) + marchew + ziele ang., bez pasteryzacji, przechowywanie próbek w chłodni
6. – P6(12) – 750(9) + marchew + imbir + liść laurowy, bez pasteryzacji, przechowywanie próbek w chłodni
7. – P6(14) – 750(9) + marchew + imbir + liść laurowy, pasteryzacja, przechowywanie próbek w chłodni
8. – P6(11) – 750(9) + marchew + imbir + liść laurowy, pasteryzacja, przechowywanie próbek w T pokojowej
9. – fermentacja spontaniczna – marchew + ziele angielskie, bez pasteryzacji, przechowywanie próbek w T pokojowej
10. - PK(15) – fermentacja spontaniczna – marchew + imbir + liść laurowy, pasteryzacja, przechowywanie próbek w chłodni

#### 4.5. Metody badawcze

##### 4.5.1. Metody mikrobiologiczne

Oznaczenie liczby bakterii fermentacji mlekowej (LAB) metodą płytkową na podłożu MRS według normy (PN-EN 15787:2009).

Oznaczanie liczby bakterii fermentacji mlekowej (LAB) tworzących EPS metodą płytkową na podłożu MRS według normy PN-EN 15787:2009, z tym, że w podłożu MRS jedyne źródło cukrów stanowiła sacharoza. W trakcie oznaczenia liczono kolonie z otoczką śluzową wskazującą na syntezę EPS.

Oznaczenie liczby drożdży i pleśni metodą płytkową według normy PN-ISO 21527-1:2009, z wykorzystaniem podłoża YGC Merck.

Oznaczanie aktywności antybakteryjnej LAB – metodą dyfuzyjną według Pilet (Pilet i in. 1995), zmodyfikowaną w ZF przez mgr B. Chabłowską. Oceniano wielkość stref zahamowania wzrostu wybranych szczepów bakterii patogennych przez 10 ml odcieku po hodowli LAB.

Oznaczanie zdolności do syntezy EPS wykonywano poprzez powierzchniowy posiew hodowli eż na podłożu stałe (MRS lub podłożę produkcyjne), w którym jedynym źródłem

cukrowców była sacharoza. Oceny dokonywano wizualnie, stwierdzając lub nie obecność galaretowatej substancji wzdłuż linii posiewu.

#### 4.5.2. Metody analityczne

Oznaczanie kwasu mlekowego i octowego w supernatantach po wirowaniu hodowli bakterii w skali laboratoryjnej prowadzono z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) z detekcją UV wg. metodyki własnej. Analizy wykonane przez pracownię analityczną Zakładu Technologii Fermentacji.

Analizę ilościową przeprowadzono metodą wzorca zewnętrznego.

Krzywe wzorcowe przygotowano na 4 poziomach stężeń danego analitu w wodzie o czystości HPLC.

Stosowane wzorce substancji chemicznej:

- a) kwas mlekowy, 86,1% (Fluka)
- b) kwas octowy, 99,8% (Sigma-Aldrich)

Aparatura:

1) Zestaw do wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) firmy Gilson:

- Pompa gradientowa - model 322-H1
- Zawór dozujący 20 $\mu$ l
- Autosampler - model LH 271
- Detektor spektrofotometryczny UV/VIS - model 156
- Program integracyjny współpracujący z detektorem - Trilution LC

2) kolumna Aminex HPX-87H (300 x7,8) z przedkolumną firmy Bio-Rad (USA)

Parametry pracy:

- Ciecz elucyjna: wodny roztwór kwasu siarkowego o pH 3.4
- Przepływ cieczy elucyjnej (fazy ruchomej) 0.8 ml/min. (izokratycznie)
- Temperatura pieca kolumny: 64 °C
- Czas analizy: 20 min.

Przygotowanie próbek do analizy:

Próbki rozcieńczano wodą dejonizowaną w proporcji 1:10. Do mieszaniny dodawano roztwór Carrez I i Carezz II. Ekstrakcję prowadzono przez 3 min. na wytrząsarce z częstotliwością 150 obr./min. Roztwór z osadu przesączano przez sączki papierowe. Do otrzymanego przesączu dodawano roztwór EDTA, sączono przez filtr 0.45 $\mu$ m, a następnie poddawano bezpośredniej analizie chromatograficznej.

Zawartość kwasów organicznych (mlekowego, octowego, masłowego i propionowego) w zalewie po kiszeniu pieczarek w skali laboratoryjnej oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV) przy długości fali 210 nm wg modyfikacji metody 2.21.7.2 MEBAK (wyd. 2013). MEBAK – skrót od: Środkowoeuropejski Analityczny Komitet Piwowski. Analizy wykonane przez pracownię analityczną Zakładu Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych.

Oznaczenie kwasów organicznych wykonano metodą wzorca zewnętrznego.

Krzywe wzorcowe przygotowano na 3 poziomach stężenia analitu w wodzie dejonizowanej.

Do oznaczenia stosowano wzorce substancji chemicznych:

- a) kwasu mlekowego 86,1% (Fluka, Szwajcaria)
- b) kwasu octowego 100% (Sigma-Aldrich, USA)
- c) kwasu propionowego 99,9% (Fluka, Szwajcaria)
- d) kwasu masłowego 99,5% (Fluka, Szwajcaria)

Wyposażenie:

- 1) chromatograf cieczowy firmy Waters (USA) wyposażony w:
  - a) zintegrowany moduł separacyjny Waters 2695 (odgazowywacz eluentu, pompa, automatyczny podajnik próbek i układ dozowania),
  - b) piec kolumny sterowany za pomocą detektora refraktometrycznego Waters 2414,
  - c) detektor fotodiodowy Waters 2996,
  - d) oprogramowanie komputerowe do integracji pików Empower2,
- 2) kolumna Aminex HPX-87H (300 mm × 7,8 mm) z przedkolumną firmy Bio-Rad (USA).

Rozdział chromatograficzny:

Faza ruchoma: 4 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VI)

Przepływ fazy ruchomej: 0,6 ml/min. (izokratycznie)

Temperatura kolumny: 35 °C

Czas analizy: 40 min.

Przygotowanie próbki do analizy – oczyszczanie przez filtr strzykawkowy Chromafil Xtra PVDF o średnicy porów 0,45 μm firmy Macherey-Nagel (Niemcy).

Oznaczenia wykonywano w dwóch powtórzeniach.

Oznaczanie pH - bezpośrednio z zalewy w słoju

Oznaczanie kwasowości ogólnej:

Przygotowanie próbki

solankę mieszano i przesączało jeśli to konieczne przez sączek z bibuły. Pobierano 25 ml przesączu do zlewki na 250 ml, dodawano 100 ml H<sub>2</sub>O destylowanej. Doprowadzono do wrzenia. Następnie roztwór oziębiano i przenoszono ilościowo do kolby miarowej na 250 ml, dopełniano do kreski.

#### Wykonanie oznaczenia

Do zlewki o pojemności 100 - 150 ml pobierano od 10 do 25 ml przesączu (taka ilość aby do miareczkowania zużyć od 5 do 25 ml NaOH 0,1 mol/l) i uzupełniano do 50 ml H<sub>2</sub>O destylowaną.

Umieszczano elektrodę w badanym roztworze i miareczkowano roztworem NaOH 0,1 mol/l, przy ciągłym mieszaniu. Miareczkowano szybko do uzyskania pH 6,0 a potem nieco wolniej do pH 7,0. Następnie dodawano 4 krople NaOH 0,1 mol, jednocześnie notowano użytą ilość roztworu i pH.

Miareczkowanie kończono dodając 4 krople NaOH 0,1 mol, już po osiągnięciu pH 8,1.

Obliczanie wyniku oznaczania:

$$X = \frac{V \times N \times K \times V_0 \times 100}{V_1 \times m}$$

Gdzie:

V – objętość roztworu NaOH 0,1 mol/l zużyta do miareczkowania, ml,

N - molowość roztworu NaOH 0,1 mol/,

V<sub>0</sub> - objętość, do której została uzupełniona została odważka, ml,

V<sub>1</sub> - objętość przesączu próbki wzięta do miareczkowania, ml

M - masa próbki, g

K = 0,067 - przy przeliczeniu kwasowości na kwas jabłkowy,

K = 0,064 - przy przeliczeniu kwasowości na kwas cytrynowy,

K = 0,045 - przy przeliczeniu kwasowości na szczawiowy,

K = 0,090 - przy przeliczeniu kwasowości na kwas mlekowy,

K = 0,060 - przy przeliczeniu kwasowości na kwas octowy.

#### 4.5.3. Analiza sensoryczna pieczarek

Do oceny sensorycznej przygotowanych przetworów zastosowano metodę analizy opisowej (Quantitative Description Analysis, QDA), czyli profilowania sensorycznego, zgodnie z procedurą ujętą normą PN-ISO 11035:1999. Oceny profilowe przeprowadzono w

laboratorium sensorycznym, spełniającym wszystkie wymagania określone normą PN-ISO 8589:1998, na 6 indywidualnych stanowiskach oceny, przy użyciu skomputeryzowanego programu ANALSENS, przystosowanego do przygotowania testów, zapisu ocen indywidualnych oraz statystycznej analizy wyników.

Intensywność każdego wyróżnika oceniano na ciągłej skali graficznej, oznaczonej odpowiednimi określeniami brzegowymi. W ocenie sensorycznej brał udział 6-cio osobowy zespół ekspertów. Próbkę były kodowane i podawane oceniającym w losowej kolejności, innej dla każdego oceniającego. Oceny sensoryczne przeprowadzono według wcześniej ustalonych wyróżników jakościowych: zapachu, barwy, tekstury/konsystencji i smaku. Oceniano też ogólną jakość kiszonych pieczarek wyrażoną jako stopień zharmonizowania próbki (Wrzodak i Korzeniowski, 2012; Gajewski M. i in., 2015).

Zestawienie wyróżników jakości sensorycznej (wzór formularza oceny) przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Wzór formularza oceny sensorycznej

## (wzór formularza oceny)

### 1. Zapach

1.1. Zapach kiszonych pieczarek (zapach charakterystyczny dla kiszonych grzybów)  
niewyczuwalny intensywny

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

1.2. Zapach obcy (nietypowy, np.: wynikający z psucia się bądź nienaturalnej fermentacji)

niewyczuwalny intensywny

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

### 2. Barwa

2.1. Barwa skórki (typowa dla pieczarek (odcienie beżu), bez plam i przebarwień)  
nietypowa typowa

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



2.2. Barwa mięszu typowa dla pieczarek (odcienie beżu), bez plam i przebarwień  
nietykowa typowa

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

### 3. Tekstura

3.1. Struktura powierzchni (jednolita, gładka, bez nienaturalnych wgłębień)  
zmieniona naturalna

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

3.2. Struktura mięszu (jednolita, sprężysta, dość twarda, spoista)  
zmieniona naturalna

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

### 4. Smak

4.1. Smak kiszonych pieczarek (smak charakterystyczny dla kiszonych grzybów, lekko kwaskowy bez obcych posmaków)

zmieniony naturalny

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

4.2. Kwaśny (smak podstawowy)

niewyczuwalny bardzo intensywny

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

4.3. Słony (smak podstawowy)

niewyczuwalny bardzo intensywny

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

4.4. Gorzki (smak podstawowy)

niewyczuwalny bardzo intensywny

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

4.5. Obcy (smak obcy, nietypowy, wskazujący na nieprawidłowy przebieg fermentacji)  
niewyczuwalny bardzo intensywny

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

#### 5. Ocena ogólna jakości

##### 5.1. ogólna ocena jakości (zharmonizowanie próbki)

zła

bardzo dobra

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

#### 4.5.4. Ocena efektywności mycia surowych pieczarek wodą dekontaminowaną

Doświadczenia wykonywano według następującej procedury badawczej:

- Odważano odpowiednią ilość porcji pieczarek – po około 10 szt. (tak żeby dla każdego doświadczenia masa była wyrównana) po czym wkładano je do sterylnych zlewek,
- Sporządzano wodę utlenioną o stężeniu 1,5, 3 i 6 %.
- Zalewano pieczarki odmierzoną, jednakową ilością wody utlenionej, po czym przetrzymywano przez 5, 10 i 20 min.,
- Równoległe jedną (oddzielną) porcję pieczarek myto pod strumieniem wody wodociągowej przez 30 s, a następnie traktowano ją tak jak pozostałe próbki,
- Pieczarki surowe, umyte wodą oraz przetrzymywane w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wkładano do sterylnych erlenmajerek, zalano wodą sterylną i wstawiano do wytrząsarki na 30 min w T pokojowej,
- Wykonywano posiew płynu z erlenmajerek.

#### 4.5.5. Analiza statystyczna wyników

Wyniki oceny sensorycznej opracowano statystycznie z wykorzystaniem programu Statistica 13 (TIBCO Software Inc. (2017) Statistica 13). Oceniając istotność wpływu próbki i oceniającego na zróżnicowanie średnich wartości ocen poszczególnych parametrów przeprowadzono czynnikową analizę wariancji; dla zweryfikowania różnic pomiędzy poszczególnymi średnimi zastosowano test post hoc Tukey'a. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono na poziomie istotności = 0,05. Do oceny podobieństw i różnic w jakości sensorycznej pieczarek zastosowano analizę składowych głównych (PCA – Principal Component Analysis) wzajemnych relacji pomiędzy parametrami jakości pieczarek, a także podobieństw i różnic w jakości sensorycznej.

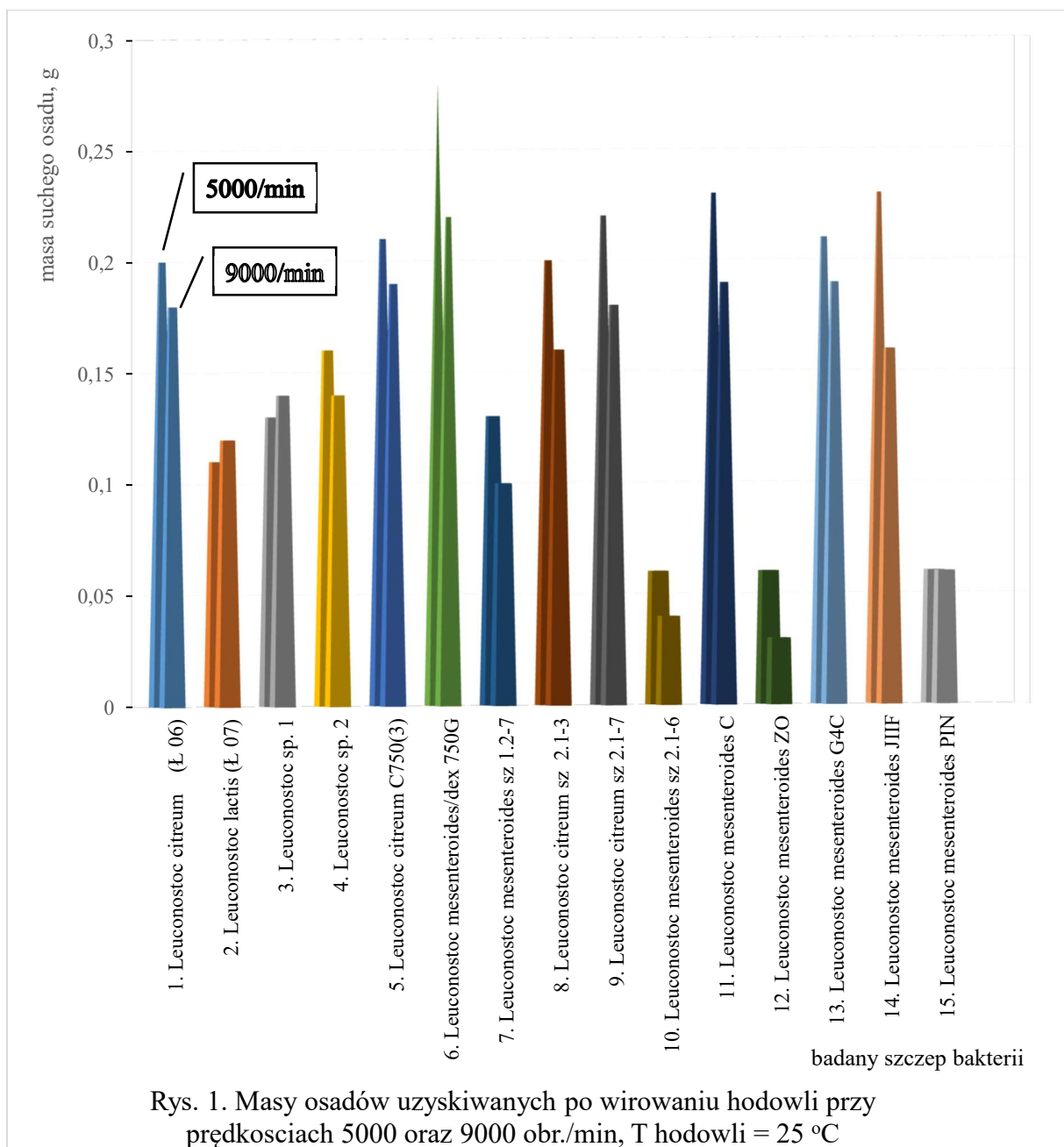
## 5. UZYSKANE WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

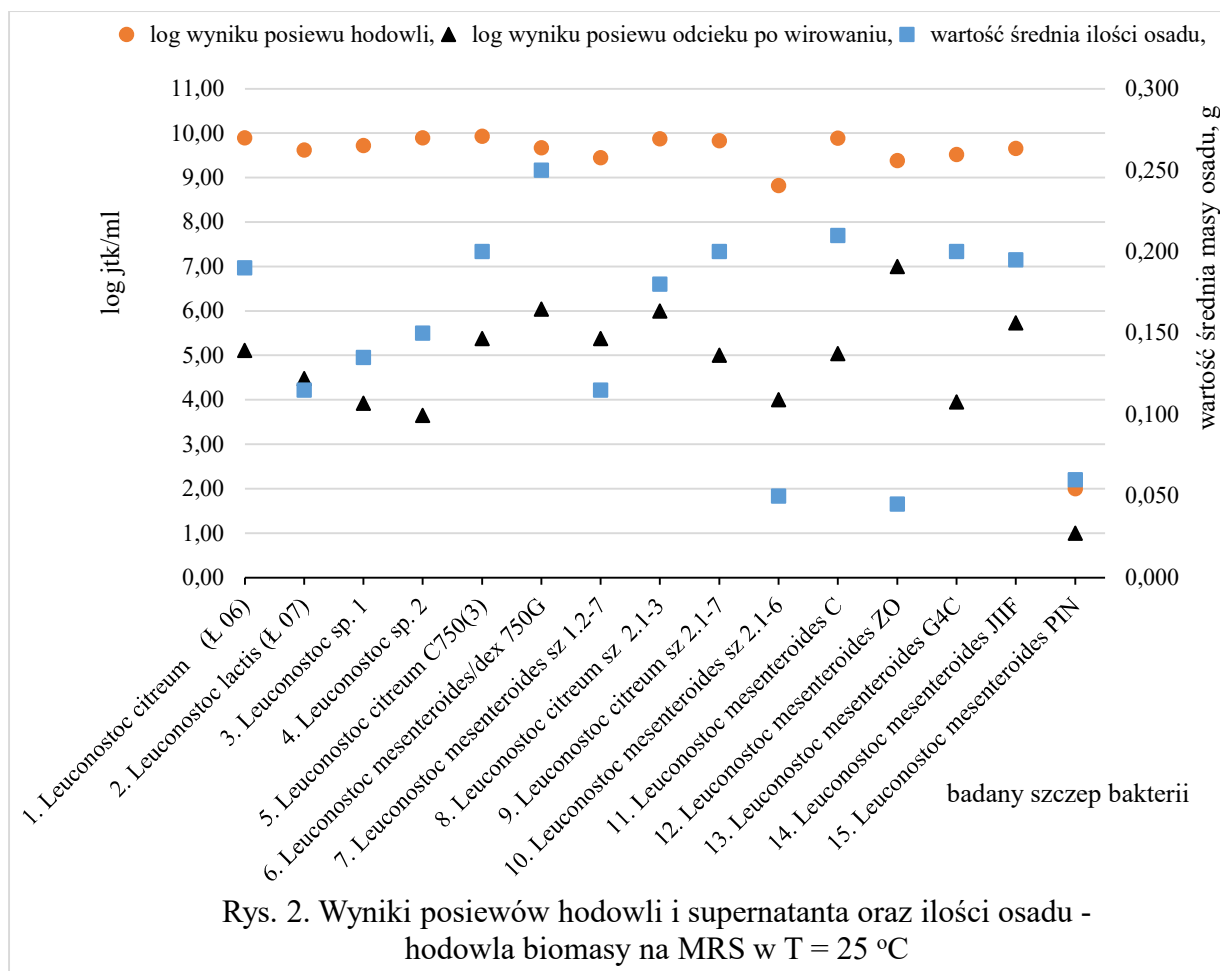
### 5.1. Hodowle na podłożu MRS

W pierwszym etapie badań prowadzono hodowle 15 szczepów bakterii na bogatym podłożu MRS, zawierającym jako jedyne źródło cukrów sacharozę, w celu określenia wzrostu biomasy, sprawności wydzielania biomasy z podłoża drogą wirowania, jakości uzyskiwanego osadu, ewentualnej syntezy EPS przez badane szczepy bakterii oraz wydzielania do podłoża kwasu mlekowego i octowego. Na rysunku 1 przedstawiono masy osadów suchych uzyskiwanych podczas wirowania hodowli przy dwóch prędkościach obrotowych rotora 5000 oraz 9000 obr./min.

Z przedstawionych na rys. 1. danych widać, że zwiększanie szybkości obrotowej rotora, czyli sił działających na cząsteczki osadu w czasie wirowania, miało wpływ odwrotny do oczekiwanego na masę uzyskiwanego osadu. Dla większości szczepów ilość osadu nieznacznie malała z zwiększaniem szybkości obrotowej rotora, co prawdopodobnie wynikało z tego, że wzrost sił działających na komórki bakterii powodował lepsze ich oddzielenie od EPS tworzących śluzowatą część osadu, która w trakcie zlewania płynu z nad osadu odbierana była razem z płynem.

Na rysunku 2 zamieszczono wyniki dotyczące posiewów hodowli oraz supernatantu, a także średnie masy osadów uzyskanych w wyniku wirowania hodowli. W większości hodowli liczba bakterii zawierała się w zakresie od  $2,4$  do  $8,5 \cdot 10^9$  jtk/ml, jedynie w przypadku szczepu Sz.2.1-6 liczba bakterii wynosiła  $6,6 \cdot 10^8$  jtk/ml, a szczep nr 15 (*Leuconostoc mesenteroides* PIN) nie rósł w warunkach tego doświadczenia prawie wcale (liczba bakterii w hodowli rzędu  $10^2$ ). Znacznie bardziej zróżnicowane wartości uzyskano z posiewów supernatantu, gdzie zakres wyników zawierał się w przedziale od  $3,5 \cdot 10^3$  jtk/ml do  $6,1 \cdot 10^6$  jtk/ml i jedynie w supernatancie pochodzącym z hodowli szczepu nr 12 (*Leuconostoc mesenteroides* ZO) stwierdzono liczbę bakterii na wyższym poziomie  $7,0 \cdot 10^7$  jtk/ml, co świadczy o nieco gorszej sprawności wydzielania biomasy tego szczepu w warunkach prowadzonego eksperymentu, co pokrywa się z stosunkowo niską masą uzyskanego osadu. Podobne wyniki uzyskano w przypadku szczepu nr 10 (*Leuconostoc mesenteroides* sz 2.1-6) oraz szczepu nr 15 (*Leuconostoc mesenteroides* PIN).



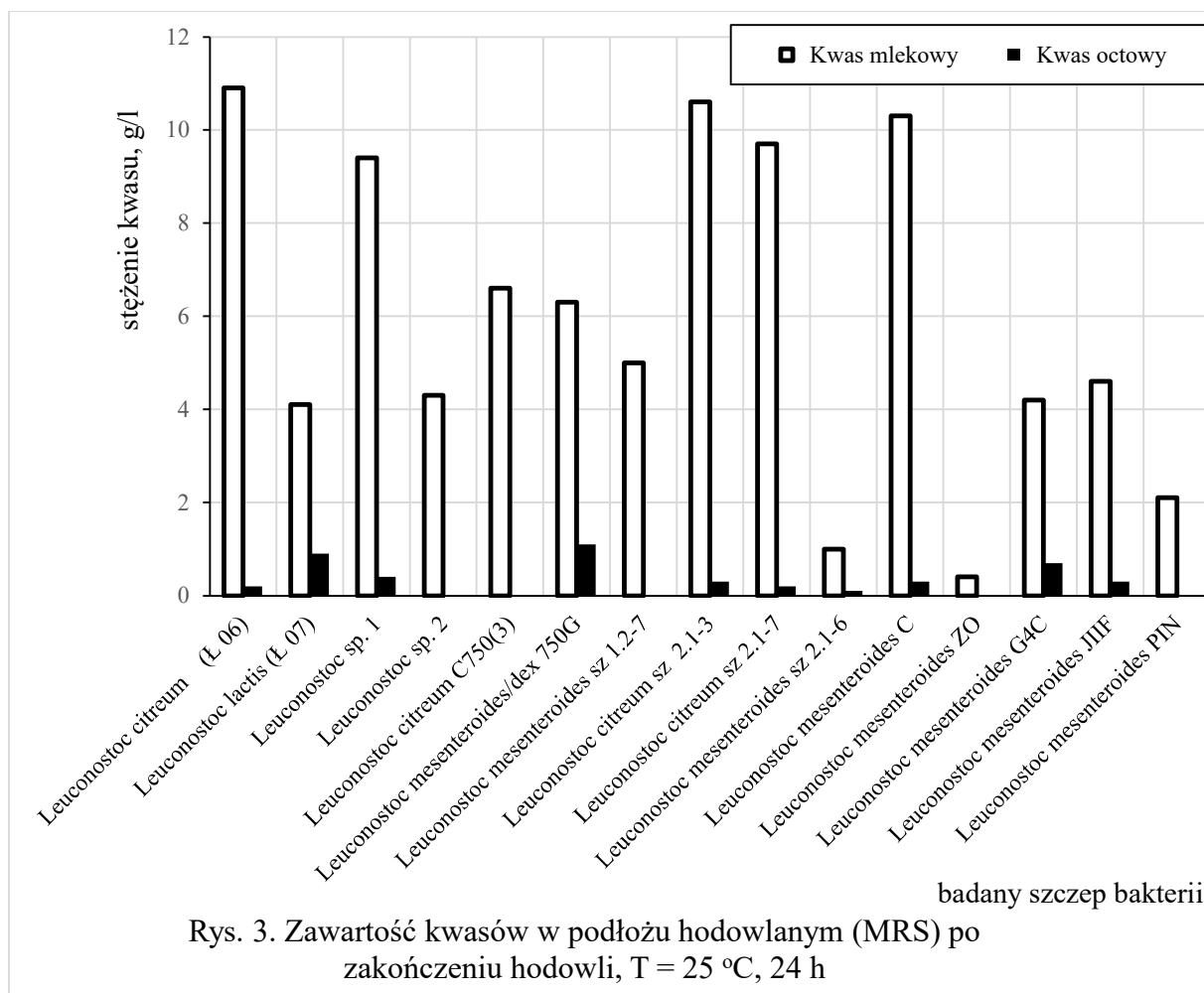


W tabeli 3 przedstawiono wyniki oceny wzrokowej supernatantu oraz osadu powirowaniu hodowli, a także obecność EPS. W przypadku 3 szczepów stwierdzono znaczny stopień produkcji EPS w trakcie hodowli, co korespondowało z obniżoną klarownością supernatanta oraz mniej zwartą postacią uzyskiwanego osadu po wirowaniu hodowli. Wśród tych szczepów znalazł się szczep oznaczony nr 12 (*Leuconostoc mesenteroides* ZO), który, co stwierdzono wcześniej, charakteryzował się niższą sprawnością wydzielania biomasy oraz stosunkowo niską masą uzyskanego osadu.

Na rysunku 3 przedstawiono wyniki oznaczeń kwasu mlekowego oraz kwasu octowego, wykonanych metodą HPLC w supernatancie. Najwyższe stężenia kwasu mlekowego uzyskano w przypadku szczepów oznaczonych numerami 1, 3, 8, 9, i 11, najniższe zaś w przypadku szczepów 10, 12 i 15. W przypadku szczepów nr 1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 13 i 14 stwierdzono syntetyzowanie niewielkich ilości kwasu octowego – najwięcej w przypadku szczepu 6 – 1,1 g/l, natomiast szczepy nr 4, 5, 7, 12 i 15 w ogóle nie syntetyzowały kwasu octowego.

Tabela 3. Wyniki oceny wzrokowej supernatantu oraz osadów po wirowaniu

Nr szczepu	Nazwa szczepu	Synteza EPS	Ocena wzrokowa supernatantu 5000 obr/min (klarowność/osad)	Ocena wzrokowa supernatantu 9000 obr/min (klarowność/osad)
1.	<i>Leuconostoc citreum</i> (Ł 06)		klarowny/osad zwarty	klarowny/osad zwarty
2.	<i>Leuconostoc lactis</i> (Ł 07)		klarowny/osad płynny	klarowny/osad zwarty
3.	<i>Leuconostoc sp. 1</i>		mętny/osad zwarty	mętny/osad zwarty
4.	<i>Leuconostoc sp. 2</i>	+	mętny/trochę galaretowatego osadu	klarowny/osad zwarty
5.	<i>Leuconostoc citreum</i> C750(9)		klarowny/osad zwarty	klarowny/osad zwarty
6.	<i>Leuconostoc mesenteroides/dex 750G</i>	+	klarowny/osad galaretowaty i płynny	klarowny/osad galaretowaty i częściowo płynny
7.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sz 1.2-7		klarowny/osad zwarty	klarowny/osad zwarty
8.	<i>Leuconostoc citreum</i> sz 2.1-3		klarowny/osad zwarty	klarowny/osad zwarty
9.	<i>Leuconostoc citreum</i> sz 2.1-7		klarowny/osad zwarty	klarowny/osad zwarty
10.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sz 2.1-6		klarowny/osad zwarty	klarowny/osad zwarty
11.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> C		klarowny/osad zwarty	klarowny/osad zwarty
12.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ZO	+	b. mętny płyn, mało galaretowatego osadu	b. mętny płyn, osad galaretowaty
13.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> G4C		klarowny/osad zwarty	klarowny/osad zwarty
14.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> JIIF		klarowny/osad zwarty	klarowny/osad zwarty
15.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PIN		klarowny/osad zwarty	klarowny/osad zwarty



W celu oceny przydatności biomasy bakterii poszczególnych szczepów do wykonywania komercyjnych szczepionek przeprowadzono doświadczenie polegające na utrwalaniu biomasy bakterii drogą suszenia sublimacyjnego w skali laboratoryjnej. Wyniki przedstawiono w tabeli 4. Prawie wszystkie bakterie użyte w tym doświadczeniu charakteryzowały się dobrą lub bardzo dobrą przeżywalnością (bliską lub znacznie powyżej 80 %) w trakcie procesu dehydratacji, co kwalifikuje je jako materiał możliwy do wykorzystania w komercyjnych szczepionkach przeznaczonych do kiszenia grzybów, jedynie szczep oznaczony symbolem 15 wyraźnie odbiegał przeżywalnością od pozostałych, co spowodowało wykluczenie tych bakterii z doświadczeń obejmujących kiszenie grzybów.

Tabela 4. Przeżywalność bakterii w procesie suszenia sublimacyjnego

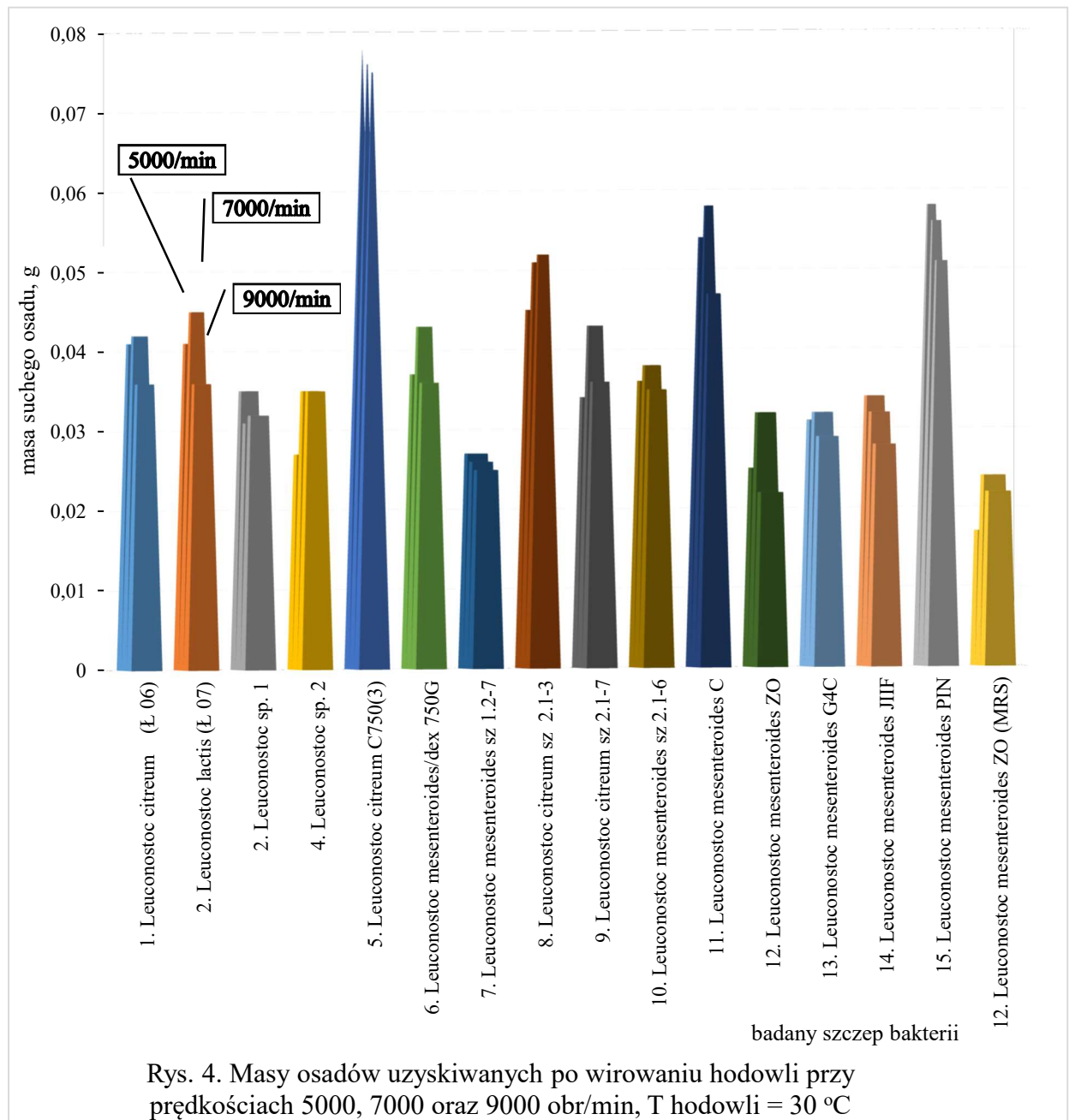
Nr szczepu	Nazwa szczepu	Przeżywalność, %
1	<i>Leuconostoc citreum</i> (Ł 06)	88
2	<i>Leuconostoc lactis</i> (Ł 07)	93
3	<i>Leuconostoc sp. 1</i>	90
4	<i>Leuconostoc sp. 2</i>	88
5	<i>Leuconostoc citreum</i> C750(9)	90
6	<i>Leuconostoc mesenteroides/dex</i> 750G	93
7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sz 1.2-7	91
8	<i>Leuconostoc citreum</i> sz 2.1-3	85
9	<i>Leuconostoc citreum</i> sz 2.1-7	77
10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sz 2.1-6	90
11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> C	92
12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ZO	82
13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> G4C	90
14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> JIIF	89
15	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PIN	39

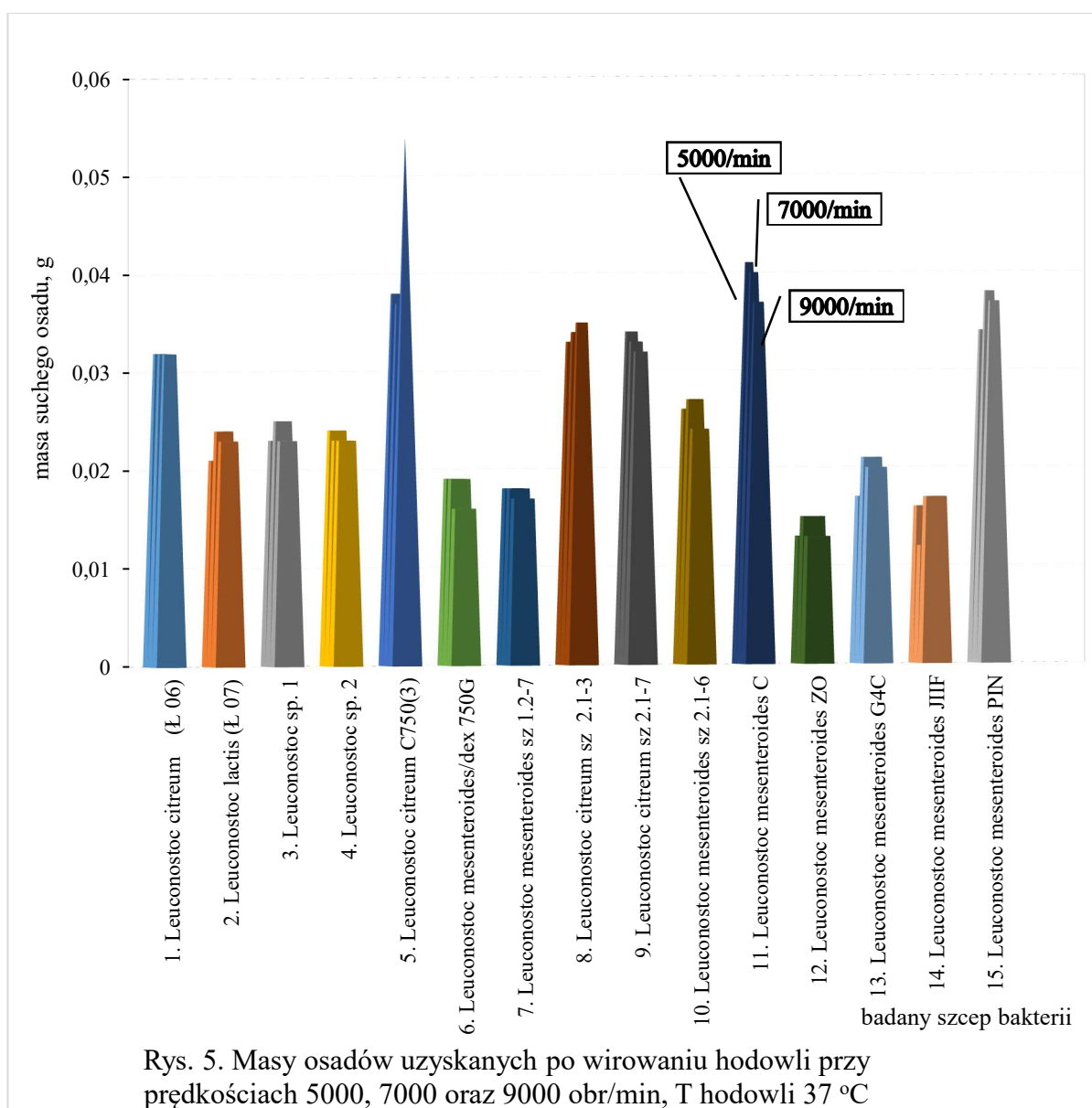
## 5.2. Hodowle na podłożu produkcyjnym

Kolejny etap badań stanowiły hodowle prowadzone w podłożu produkcyjnym, w dwóch temperaturach 30 i 37 °C. Na rysunku 4 przedstawiono wyniki dotyczące masy osadów uzyskanych po wirowaniu hodowli przy trzech prędkościach obrotowych rotora: 5000, 7000 oraz 9000 obr/min, dla hodowli prowadzonej w temperaturze 30 °C, natomiast na rysunku 5 przedstawiono analogiczne wyniki dla temperatury hodowli 37 °C. Wartości liczbowe określające masy osadów na wszystkich rysunkach dotyczą osadów po wysuszeniu preparatów uzyskanych z wirowania 50 ml płynu hodowlanego. W tym przypadku, podobnie jak dla wcześniej omawianych procesów wirowania, nie stwierdzono proporcjonalnej zależności pomiędzy prędkością obrotową rotora a ilością otrzymywanego osadu. Zależności były różne: rosnące, malejące bądź zmienne, co trudne jest do zinterpretowania. Wystąpiła jednak wyraźna zależność od temperatury hodowli – dla temperatury 30 °C masa uzyskiwanych osadów była wyższa dla wszystkich badanych szczepów od 17 do 62 % -

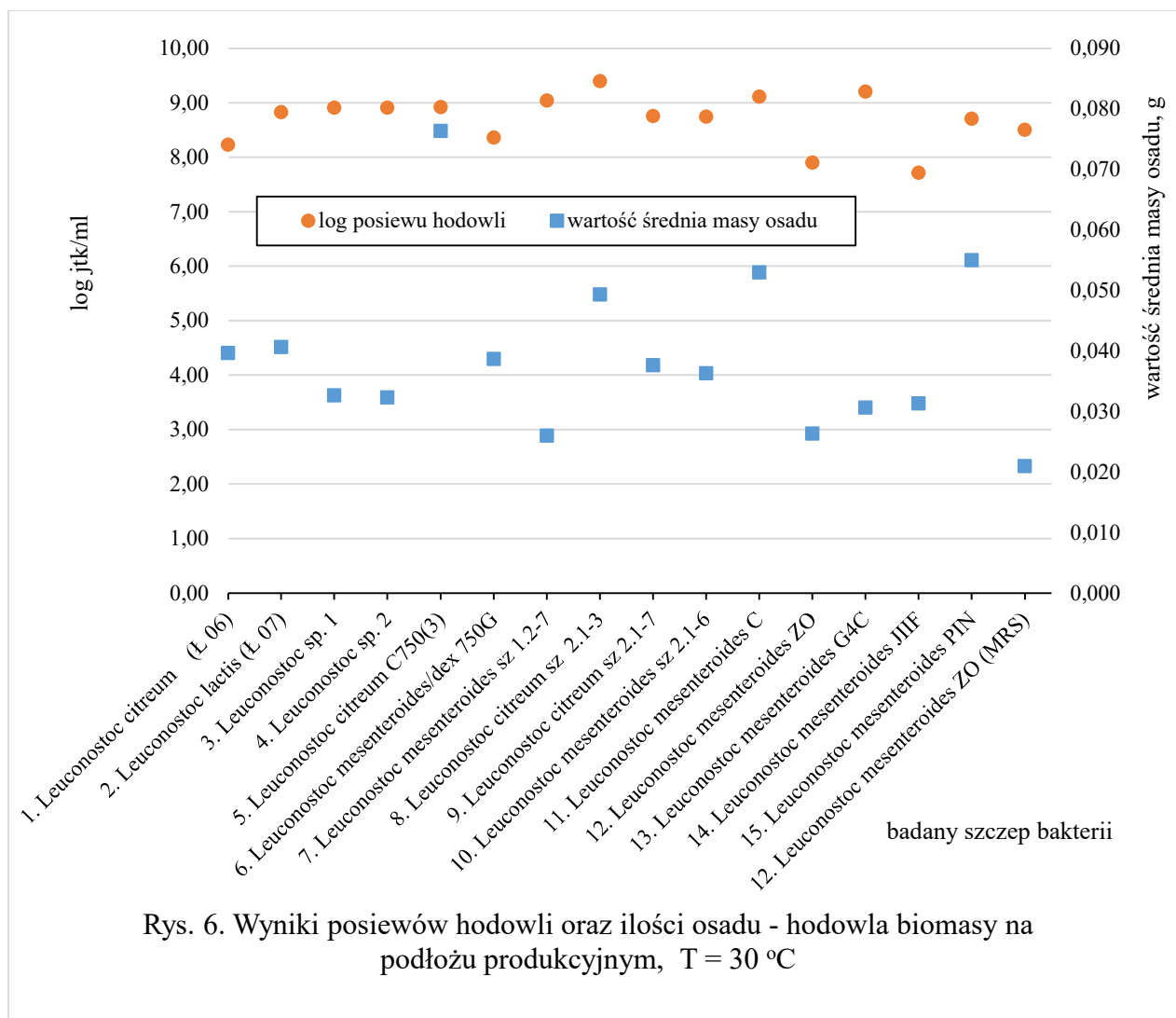


najwyższa w przypadku szczepu nr 2 i 12, a najniższa 9 i 10. Stwierdzone różnice wskazują, że temperatura hodowli 30 °C na pożywce produkcyjnej jest zdecydowanie korzystniejsza niż temperatura 37 °C.

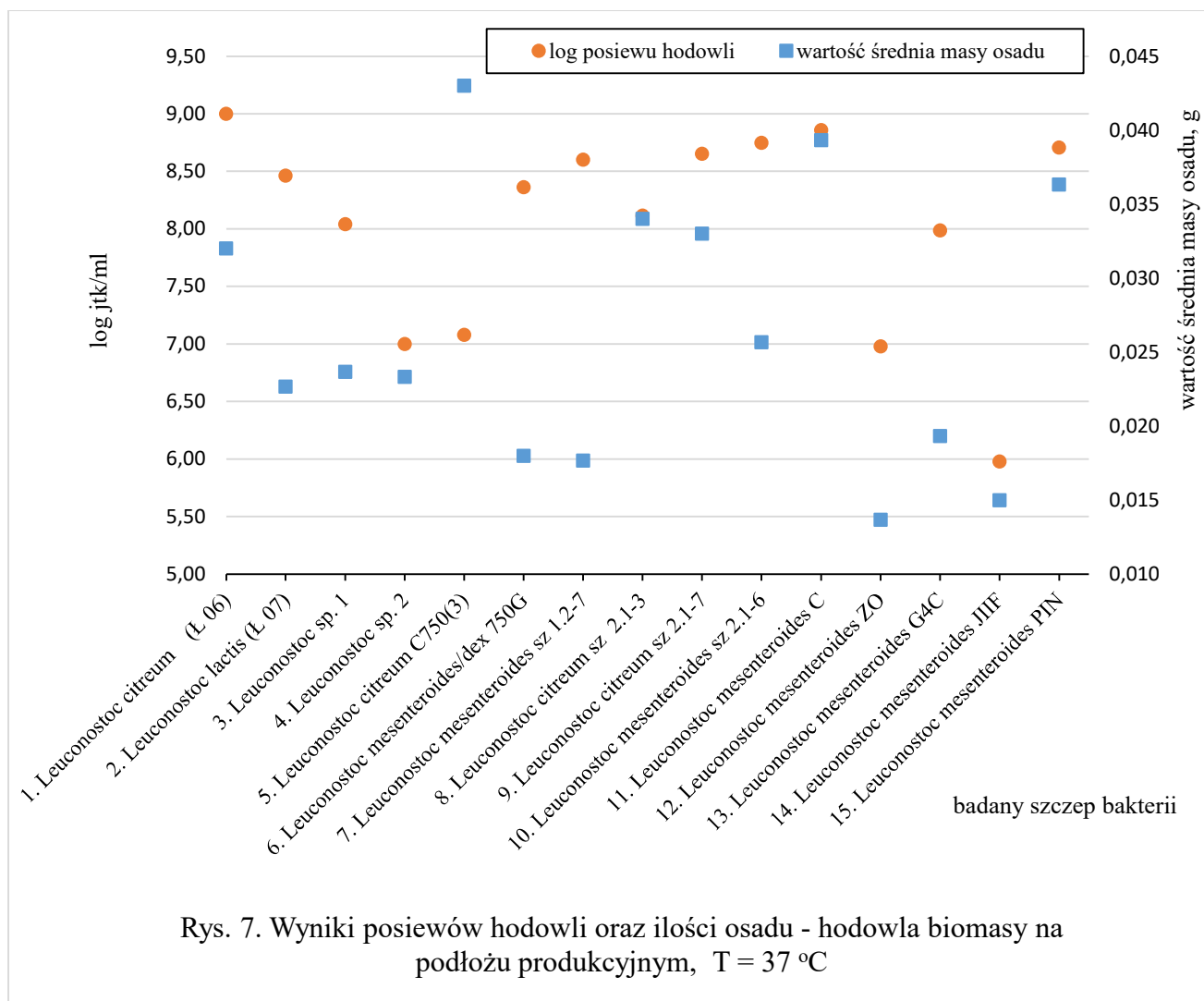




Na rysunkach 6 i 7 przedstawiono wyniki posiewu hodowli oraz ilości uzyskiwanego suchego osadu po wirowaniu hodowli prowadzonej na pożywce produkcyjnej w temperaturze 30 oraz 37°C. Dla większości przebadanych szczepów uzyskano nieco wyższe przyrosty liczby komórek w trakcie hodowli prowadzonej w 30 °C, z wyjątkiem szczepu 1 oraz zdecydowanie wyższe masy osadów po wirowaniu hodowli – o od 17 do 55 %.



Rys. 6. Wyniki posiewów hodowli oraz ilości osadu - hodowla biomasy na podłożu produkcyjnym, T = 30 °C



W tabeli 5 przedstawiono wyniki oznaczania egzopolisacharydów (EPS), syntetyzowanych przez bakterie badanych szczepów w warunkach eksperymentu. Badanie to wykonano w celu określenia potencjalnego wpływu zastosowania konkretnego szczepu do kiszzenia pieczarek na ich strukturę, smak i wygląd. Stwierdzono wpływ temperatury na zdolność syntezy EPS – więcej szczepów syntetyzowało te związki w temperaturze 30 °C. Niezależnie od zastosowanej pożywki stwierdzono, że szczepy oznaczone numerami 4, 12 i 14 syntetyzowały EPS – tab. 3 i tab. 5.

Tabela 5. Synteza EPS w trakcie hodowli na pożywce produkcyjnej w zależności od temperatury

Nr szczepu	Nazwa szczepu	Synteza EPS w T = 30 °C	Synteza EPS w T = 37 °C
1	<i>Leuconostoc citreum</i> (Ł 06)		
2	<i>Leuconostoc lactis</i> (Ł 07)	śląd	
3	<i>Leuconostoc sp. 1</i>	+	
4	<i>Leuconostoc sp. 2</i>	+	+
5	<i>Leuconostoc citreum</i> C750(9)		
6	<i>Leuconostoc mesenteroides/dex</i> 750G	+	
7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sz 1.2-7	+	
8	<i>Leuconostoc citreum</i> sz 2.1-3		
9	<i>Leuconostoc citreum</i> sz 2.1-7		
10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sz 2.1-6		
11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> C		+
12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ZO	mała ilość	+
13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> G4C		
14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> JIIF	mała ilość	+
15	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PIN		
12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ZO/ hodowla na MRS		

W tabeli 6 zamieszczono wyniki oznaczania kwasów organicznych: mlekowego i octowego, w czasie 24 godzinnej hodowli, prowadzonej w temperaturze 30 i 37 °C. W przypadku kwasu mlekowego wpływ temperatury na stężenie kwasu po zakończeniu hodowli był różny w zależności od badanego szczepu. Niektóre szczepy syntetyzowały więcej kwasu mlekowego w temperaturze 37 °C (np. szczepy 1, 5, 8, 12), inne zaś charakteryzowały się przeciwną zależnością (np. szczepy 2, 4, 11, 15), a w przypadku szczepu 9 zmiana temperatury hodowli nie miała wpływu na syntezę kwasu mlekowego. W przypadku kwasu octowego wpływ temperatury na jego syntezę przez bakterie też był różny, jednak większość szczepów syntetyzowała więcej kwasu w temperaturze 30 °C niż w temperaturze 37 °C.

Tabela 6. Stężenia kwasów organicznych w płynie hodowlanym w zależności od temperatury (pożywka produkcyjna)

Nr szczepu	Hodowla w T = 30 °C		Hodowla w T = 37 °C	
	kwas mlekowy, g/l	kwas octowy, g/l	kwas mlekowy, g/l	kwas octowy, g/l
1	4,3	<b>1,09</b>	<b>5,9</b>	0,48
2	4,3	<b>1,22</b>	3,0	<b>0,70</b>
3	3,3	0,34	2,1	0,48
4	3,0	0,40	2,5	-
5	4,2	0,69	<b>10,1</b>	-
6	3,7	0,79	4,6	0,21
7	4,2	0,41	1,9	0,51
8	<b>8,4</b>	-	<b>10,8</b>	-
9	4,3	-	4,2	-
10	<b>5,9</b>	-	5,1	-
11	<b>9,4</b>	-	4,8	-
12	1,6	0,7	<b>5,7</b>	-
13	3,1	<b>1,02</b>	2,3	<b>0,64</b>
14	3,2	<b>0,99</b>	1,5	0,48
15	<b>8,2</b>	-	3,8	0,22
12/MRS	<b>6,7</b>	<b>2,49</b>	Nie oznaczano	Nie oznaczano

W przypadku kwasu octowego symbol (-) oznacza brak piku na chromatogramie.

### 5.3. Aktywność antybakteryjna badanych szczepów

W celu oceny potencjalnego wpływu testowanych szczepów LAB na poprawę bezpieczeństwa produktów spożywczych (kiszone grzyby) wytwarzanych z ich udziałem wykonano testy oznaczania aktywności antybakteryjnej tych szczepów w stosunku do wybranych szczepów bakterii patogennych. Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Testy na aktywność antybakteryjną badanych szczepów wobec pięciu szczepów patogennych

Nr szczepu	<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>Escherichia coli</i> PIWET (nowa)		<i>Salmonella virchor</i>		<i>Salmonella typhimurum</i> ATTC 14028		<i>Listeria monocytogenes</i> SGGW	
	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C
1	7	5	5	5			6	3	6	3
2		6		5						3
3										
4										
5	8	8	6	6	4		6	5	7	6
6	9	3	6						6	
7	9	3	6							
8	9	7	7	4		3			6	4
9	9	3	5							4
10	9	3	6							4
11	9	10	8	4			10	3	8	5
12	7	10	5						3	
13	7	4	7							
14	7		3				5		4	
15	7	10	6	6			6	5	5	5

Liczby podane w rubrykach charakteryzują strefę zahamowania wzrostu podaną w mm.

Spośród przebadanych szczepów najsilniejszą aktywnością antybakteryjną w stosunku do wybranych patogenów, wyrażoną największą strefą zahamowania wzrostu największej liczby szczepów, charakteryzowały się szczepy nr: 1, 5, 8, 11 i 15.

#### 5.4. Kiszenie doświadczalne pieczarek w skali laboratoryjnej

Kiszenie pieczarek przeprowadzono według procedury opisanej w metodyce. Do doświadczeń użyto 14 szczepów bakterii – szczep nr 15 odrzucono, ze względu na niewielki przyrost bakterii w temperaturze 25 °C oraz niskie stężenie kwasu mlekowego i brak kwasu octowego w hodowli prowadzonej w tej temperaturze, a przede wszystkim na słabszą przeżywalność komórek w trakcie utrwalania metodą suszenia sublimacyjnego. Po 4 tygodniach kiszenia (7 dni w temperaturze 25 °C oraz 21 dni w temperaturze chłodniczej 10-12 °C) otwarto słoje i wykonano analizy chemiczne i mikrobiologiczne oraz przeprowadzono ocenę organoleptyczną kiszzonek; wykonano też ocenę wzrokową intensywności fermentacji w pierwszych 12 godzinach od momentu rozpoczęcia doświadczenia. W celu oceny trwałości

próbek po otwarciu przetrzymywano je jeszcze przez 4 tygodnie w warunkach chłodniczych. Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Wyniki obserwacji wzrokowych oraz pomiarów pH kiszonej pieczarek

Nr szczepu	Wygląd próbki po 12 h od szczepienia	pH po 4 tygodniach kiszenia	pH po 4 tygodniach od otwarcia	Wygląd próbki po 4 tygodniach od otwarcia
1	silne zmętnienie, pianki brak	3,40	3,46	Pleśni brak, zalewa mętna
2	silne zmętnienie, pianka duża	3,62	3,60	Pleśni brak, zalewa mętna
3	silne zmętnienie, pianka średnia	3,70	3,68	Pleśni brak, zalewa mętna
4	silne zmętnienie, pianki brak	3,68	3,62	Pleśni brak, zalewa klarowna
5	średnie zmętnienie, pianki brak	3,50	3,42	Pleśnie, zalewa klarowna
6	silne zmętnienie, pianka duża	3,61	3,65	Pleśni brak, zalewa klarowna
7	silne zmętnienie, pianki brak	3,60	3,60	Pleśni brak, zalewa klarowna
8	średnie zmętnienie, pianki brak	3,55	3,43	Duże pleśnie, zalewa klarowna
9	średnie zmętnienie, pianki brak	3,50	3,46	Pleśnie, zalewa klarowna
10	płyn klarowny i brak pianki	3,90	3,85	Pleśni brak, zalewa klarowna
11	średnie zmętnienie, pianki brak	3,70	3,54	Duże pleśnie, zalewa średnio klarowna
12	silne zmętnienie, pianka mała	3,72	3,76	Pleśni brak, zalewa mętna
13	średnie zmętnienie, pianka mała	3,70	3,65	Pleśni brak, zalewa klarowna
14	silne zmętnienie, pianka bardzo mała	4,25	4,13	Pleśni brak, zalewa mętna

Po 12 godzinach od momentu rozpoczęcia doświadczenia w większości próbek dało się zaobserwować objawy fermentacji intensywnej, bądź średnio intensywnej – jedne próbka zaszczipiona bakteriami oznaczonymi nr 10 nie wykazywała objawów fermentacji – po



dwóch dobach wszystkie próbki fermentowały intensywnie. Po 4 tygodniach kiszenia oznaczono pH w próbkach. W wszystkich próbkach pH mieściło się w zakresie od 3,4 do 3,72, wyjątek stanowiła próbka 14, która charakteryzowała się pH na poziomie 4,25. Po otwarciu próbek w celu wykonania analiz, po 4 tygodniach dalszego przechowywania w warunkach chłodniczych, stwierdzono, że pH nie uległo bądź uległo nieznacznym zmianom, co świadczy o stabilności kiszzonek – w większości z nich nie rozwinęły się pleśnie, takie zjawisko wystąpiło jedynie w próbkach o nr: 5, 8, 9 oraz 11. Zalewa w większości próbek była klarowna, z wyjątkiem próbek: 1, 2, 3, 12 i 14, co świadczy o ustaniu fermentacji oraz zbieżne jest częściowo z wynikami dotyczącymi syntezy EPS, zawartymi w tabelach 2, 4 i 8. Po otwarciu kiszzonek wykonano również posiewy zalewy pieczarek. Oznaczono ogólną liczbę LAB, liczbę LAB tworzących EPS, a także liczbę pleśni i/lub drożdży, w zależności od występowania. Wyniki przedstawiono w tabeli 9.

Największa liczba próbek charakteryzowała się liczbą bakterii na poziomie około  $2 \cdot 10^8$  jtk/ml, wyjątek stanowiły próbki: 1, 5, 8 i 14, w których liczba bakterii była rzędu  $10^7$  jtk/ml oraz próbka 2, w której liczba bakterii była na poziomie  $10^9$  jtk/ml. Stwierdzono również, że 6 szczepów LAB syntetyzowało EPS: 2, 3, 4, 7, 12 i 14 – liczba tych bakterii mieściła się w przedziale od 1,6 do  $9,2 \cdot 10^6$  jtk/ml, co zgodne jest z wynikami uzyskanymi w trakcie doświadczalnych hodowli na pożywce produkcyjnej w temperaturze 30 °C. Posiewy na obecność drożdży lub pleśni wykazały, że w próbce 1 występowały komórki drożdży w liczbie  $2,1 \cdot 10^3$  jtk/ml, a w próbkach 5 i 8 zarodniki pleśni w liczbie odpowiednio  $4,0 \cdot 10^1$  i  $4,9 \cdot 10^2$  jtk/ml. Na podstawie przedstawionych wyników, biorąc pod uwagę technologię przygotowywania kiszzonek, można uznać, że ich czystość mikrobiologiczna była na dobrym poziomie.

Wyniki oznaczeń kwasów organicznych: mlekowego, octowego, propionowego i masłowego, w zalewie po zakończeniu kiszenia przedstawiono w tabeli 10.

Analiza kwasów organicznych w zalewie pieczarek po 4 tygodniach kiszenia wykazała zróżnicowany, wysoki poziom zawartości kwasu mlekowego w badanych próbkach. Najwyższe stężenia kwasu mlekowego stwierdzono w próbkach 5 i 11 – odpowiednio około 15,7 oraz 15,6 g/l, a najniższe w próbkach 2 i - odpowiednio około 7,0 oraz 7,3 g/l zalewy. W wszystkich próbkach występował również kwas octowy w zakresie stężeń od około 0,21 do 0,74 g/l. W wszystkich próbkach, oprócz oznaczonej nr 14, wykryto też obecność kwasu propionowego na poziomie od około 0,01 do 0,032 g/l oraz obecność kwasu masłowego na

poziomie od około 0,14 do około 0,64 g/l (kwasu masłowego nie wykryto w próbkach 9, 10 i 11).

Tabela 9. Wyniki posiewów zalewy kiszonych pieczarek po 4 tygodniach kiszenia

Nr szczepu	Nazwa i symbol szczepu	Liczba LAB po zakończeniu kiszenia, jtk/ml	Liczba LAB tworzących EPS, po zakończeniu kiszenia, jtk/ml	Liczba pleśni i/lub drożdży, jtk/ml
1.	Leuconostoc citreum (Ł 06)	$1,0 \cdot 10^7$	-	$2,1 \cdot 10^3$ drożdże
2.	Leuconostoc lactis (Ł 07)	$2,0 \cdot 10^9$	$8,0 \cdot 10^6$	-
3.	Leuconostoc sp. 1	$2,4 \cdot 10^8$	$9,2 \cdot 10^6$	-
4.	Leuconostoc sp. 2	$1,8 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	-
5.	Leuconostoc citreum C750(9)	$1,6 \cdot 10^7$	-	$4,0 \cdot 10^1$ pleśnie
6.	Leuconostoc mesenteroides/dex 750G	$1,2 \cdot 10^8$	-	-
7.	Leuconostoc mesenteroides sz 1.2-7	$1,4 \cdot 10^8$	$8,1 \cdot 10^6$	-
8.	Leuconostoc citreum sz 2.1-3	$8,8 \cdot 10^7$	-	$4,9 \cdot 10^2$ pleśnie
9.	Leuconostoc citreum sz 2.1-7	$1,8 \cdot 10^8$	-	-
10.	Leuconostoc mesenteroides sz 2.1-6	$3,6 \cdot 10^8$	-	-
11.	Leuconostoc mesenteroides C	$1,6 \cdot 10^8$	-	-
12.	Leuconostoc mesenteroides ZO	$2,0 \cdot 10^8$	$5,2 \cdot 10^6$	-
13.	Leuconostoc mesenteroides G4C	$1,2 \cdot 10^8$	-	-
14.	Leuconostoc mesenteroides JIIF	$8,5 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^6$	-
15.	Leuconostoc mesenteroides PIN	-	-	-

Tabela 10. Zawartość kwasów organicznych w próbkach zalewy z pieczarek

Nr szczepu	Kwas organiczny			
	mlekowy, g/l	octowy, g/l	propionowy, g/l	masłowy, g/l
1	<b>14,200</b>	0,329	<b>0,032</b>	<b>0,474</b>
	<b>14,154</b>	0,335	<b>0,032</b>	<b>0,460</b>
2	7,098	<b>0,741</b>	0,025	0,152
	7,018	<b>0,738</b>	0,025	0,135
3	9,545	0,343	0,027	0,226
	9,548	0,341	0,023	0,229
4	7,304	<b>0,536</b>	0,023	0,193
	7,319	<b>0,530</b>	0,023	0,220
5	<b>15,737</b>	0,406	<b>0,028</b>	<b>0,642</b>
	<b>15,738</b>	0,406	<b>0,030</b>	<b>0,647</b>
6	9,546	0,215	0,016	0,257
	9,522	0,214	0,011	0,253
7	10,257	<b>0,568</b>	0,008	0,201
	10,272	<b>0,570</b>	0,010	0,207
8	<b>16,368</b>	<b>0,532</b>	<b>0,033</b>	<b>0,387</b>
	<b>16,353</b>	<b>0,530</b>	<b>0,032</b>	<b>0,394</b>
9	<b>17,612</b>	0,438	0,023	-
	<b>17,604</b>	0,439	0,023	-
10	9,092	0,220	0,022	-
	9,124	0,224	0,021	-
11	<b>15,588</b>	0,241	0,010	-
	<b>15,580</b>	0,241	0,011	-
12	10,406	0,288	0,019	0,200
	10,461	0,297	0,014	0,197
13	11,489	0,314	0,024	0,188
	11,485	0,313	0,023	0,191
14	11,266	0,339	-	0,150
	10,885	0,379	-	0,138

### 5.5. Analiza sensoryczna kiszonych pieczarek

Sensoryczna ocena jakości żywności jest oceną uzupełniającą w stosunku do metod fizykochemicznych. Metody instrumentalne charakteryzują właściwości samego produktu, natomiast metody sensoryczne przekazują informację o tym, jak te właściwości są odbierane przez zmysły człowieka i jakie wrażenie wywołują podczas spożycia. Do dokładnego scharakteryzowania właściwości produktu najczęściej stosuje się metodę profilowania

sensorycznego QDA (Quantitative Descriptive Analysis). Głównym celem tej metody jest znalezienie minimalnej liczby określeń, przekazujących maksymalną liczbę informacji o sensorycznych właściwościach produktu. W analizie profilowej przyjmuje się umowne założenie, że smakowitość (lub tekstura) jest kompleksem kilku lub nawet kilkunastu cząstkowych cech smakowo-zapachowych. Zespół wszystkich tych cech, ich natężenie i wzajemne proporcje dają szczegółowy wizerunek sensoryczny ocenianego produktu, w którym można dokładnie śledzić zmiany zachodzące pod wpływem różnych czynników surowcowych, technologicznych lub przechowalniczych (Wrzodak i Korzeniowski, 2012).

Sześciosobowy zespół oceniający wykonał ocenę sensoryczną w ciągu trzech kolejnych dni, oceniając pierwszego i drugiego dnia po 5 próbek, a trzeciego dnia 3 próbki pieczarek kiszonych. Ocenie nie poddano próbki 11, na powierzchni której wystąpiło ognisko pleśni, co stwarzało zagrożenie obecności w próbce toksyn pleśniowych. Zastosowane wyróżniki oceny opisano w tabeli 2. Należą do nich zapach, barwa, tekstura/konsystencja i smak. Oceniano też ogólną jakość kiszonych pieczarek wyrażoną jako stopień zharmonizowania próbki, którego waga w sumie wag wyróżników była bardzo wysoka, bo wynosiła 0,5.

Wyniki w trakcie oceny zapisywane były w programie komputerowym na indywidualnych stanowiskach oceny, a następnie automatycznie przenoszone do programu zbiorczego; następnie wyniki oceny sensorycznej poddano analizie statystycznej.

#### 5.6. Analiza statystyczna wyników

W celu określenia istotności różnic średnich dla poszczególnych wyróżników kiszonych pieczarek, wyniki poddano analizie wariancji, a następnie różnice między średnimi oszacowano za pomocą testu post-hoc (Tukeya), którego wyniki zamieszczono w tabeli 11. Wpływ obu czynników tj. „badanej próbki” oraz „eksperta” – osoby oceniającej, na średnie wartości ocen kiszonych pieczarek okazał się istotny statystycznie. Średnie dla próbek różniły się istotnie w przypadku zapachu obcego i smaku kwaśnego. Średnie dla pozostałych wyróżników również różniły się jednak różnice te okazały się nieistotne statystycznie.

Analizując średnie stwierdzono, że zapach obcy negatywnie wyróżniał próbkę nr 7, w której był on najbardziej wyczuwalny (1,28), natomiast próbki nr 6 i 10 charakteryzowały się śladowym poziomem tego zapachu (odpowiednio 0,06 i 0,09) w porównaniu do pozostałych próbek pieczarek. Najbardziej kwaśne w smaku okazały się próbki 5, 9, 1 i 8, dla których

średnie wynosiły od 6,28 (próbka nr 5) do 5,66 (próbka nr 8). Spośród wszystkich próbek pieczarek najmniej kwaśna była próbka nr 10 ze średnią oceną 2,68.

Tabela 11. Średnie wartości ocen poszczególnych wyróżników kiszonych pieczarek oraz sumy ocen.

oznaczenie	Zapach kiszonych pieczarek	Zapach obcy	Barwa skórki	Barwa mięszu	Struktura powierzchni	Struktura mięszu	Smak kiszonych pieczarek	Smak kwaśny	Smak słony	Smak gorzki	Smak obcy	Ogólne harmonizowanie próbki	Suma (ważona)
próbka 1	5,88 a	0,44 ab	9,06 a	9,20 a	9,11 a	6,95 a	8,01a	6,03 b	2,81a	0,09a	0,10 a	7,98a	9,67 ab
próbka 2	6,99 a	0,21 a	9,29 a	9,39 a	7,96 a	9,35 a	6,89a	3,56 ab	2,64a	0,11 a	0,14 a	7,44a	9,11 ab
próbka 3	6,00 a	0,16 a	8,98 a	7,70 a	7,91 a	9,15 a	6,03a	3,96 ab	3,15 a	0,16 a	0,19 a	7,06a	8,48 ab
próbka 4	6,56 a	0,13 a	8,53 a	9,36 a	7,95 a	8,35 a	6,21a	4,11 ab	3,63 a	0,29 a	0,33a	6,48a	8,38 ab
próbka 5	6,78 a	0,16 a	8,55 a	8,46 a	9,09 a	9,33 a	8,36a	6,28 b	3,39 a	0,14 a	0,05a	7,83a	10,00 b
próbka 6	6,00 a	0,06 a	8,81 a	8,68 a	8,93 a	8,84 a	6,51a	4,16 ab	2,68 a	0,08a	0,05 a	7,26a	8,80 ab
próbka 7	5,60 a	1,28 b	8,11 a	8,11 a	6,90 a	8,23 a	5,34a	4,09 ab	2,84 a	0,30 a	0,43a	5,33a	7,04 ab
próbka 8	5,73 a	0,41 ab	7,96 a	7,34 a	7,69 a	6,93 a	6,13a	5,66 b	2,30 a	0,08a	0,13 a	5,41a	7,55 ab
próbka 9	4,35 a	0,11 a	7,86 a	7,76 a	7,23 a	7,30 a	7,09a	6,14 b	2,24 a	0,00a	0,01 a	6,24a	8,09 ab
próbka 10	4,86 a	0,09 a	7,89 a	7,01 a	8,53 a	8,36 a	4,41a	2,68 a	1,70 a	0,08a	0,08 a	5,31 a	6,61 a
próbka 12	5,45 a	0,19 a	8,20 a	8,44 a	7,30 a	7,61 a	5,93a	4,09 ab	2,60 a	0,03a	0,16 a	6,55a	7,96 ab
próbka 13	5,94 a	0,20 a	8,41 a	8,43 a	9,00 a	8,89 a	6,24a	5,09 ab	2,74 a	0,20a	0,21 a	7,80a	9,01 ab
próbka 14	5,76 a	0,18 a	9,09 a	9,23 a	9,00 a	9,24 a	6,45a	4,83 ab	2,49 a	0,08a	0,14 a	7,49a	8,92 ab

Ważnym parametrem ocenianej próbki jest jej ogólne zharmonizowanie. Analiza statystyczna nie wskazała na występowanie istotnych różnic pomiędzy średnimi w zakresie tego wyróżnika, jednak uzyskano oceny w zakresie 5,31 – 7,98, a najbardziej

zharmonizowaną okazała się próbka nr 1 uzyskując najwyższą ocenę tj. 7,98. Najniższe oceny uzyskały próbki nr 10 – ocena 5,31 oraz próbka nr 7 – ocena 5,33. Na niską wartość zharmonizowania próbki nr 10 prawdopodobnie duży wpływ miał niski poziom smaku kwaśnego, natomiast w przypadku próbki nr 7 – dość mocno wyczuwalny zapach obcy.

Suma ważona jest wartością stanowiącą średnią sumę ocen danej próbki uwzględniającą wagi przyjęte dla poszczególnych wyróżników (tab. 2). Najwyższą średnią sumę ocen (10,00) uzyskała próbka nr 5 a najniższą (6,61) próbka nr 10.

W kompleksowej ocenie produktu ważne są również wzajemne relacje pomiędzy wyróżnikami (tab. 12.), a także całkowita ocena kiszonych pieczarek (suma ważona - SW).

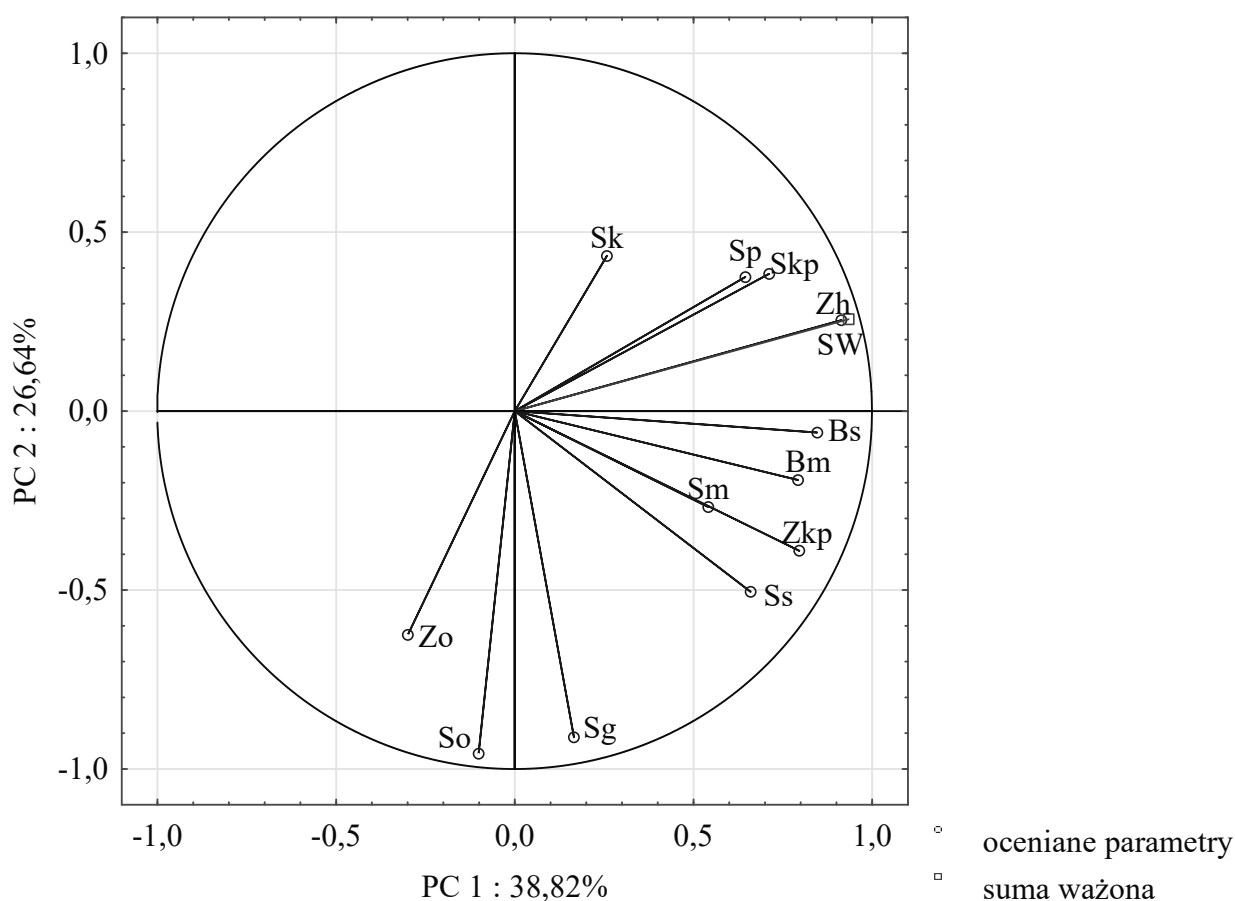
Tabela 12. Korelacje pierwotnych zmiennych z wybranymi składowymi głównymi

Parametr	Wybrane składowe główne		
	PC1	PC2	PC3
<b>Zkp</b>	0,80	-0,39	0,06
<b>Zo</b>	-0,30	-0,62	-0,46
<b>Bs</b>	0,85	-0,06	0,22
<b>Bm</b>	0,79	-0,19	-0,08
<b>Sp</b>	0,65	0,37	0,26
<b>Sm</b>	0,54	-0,27	0,62
<b>Skp</b>	0,71	0,38	-0,55
<b>Sk</b>	0,26	0,43	-0,81
<b>Ss</b>	0,66	-0,50	-0,31
<b>Sg</b>	0,17	-0,91	-0,09
<b>So</b>	-0,10	-0,96	-0,13
<b>Zh</b>	0,91	0,25	-0,00
<b>SW</b>	0,93	0,26	-0,21

W tym celu wykorzystano analizę składowych głównych (PCA - *Principal Component Analysis*), która pozwala na wizualizację wielowymiarowych danych w układzie dwu- lub trójwymiarowej przestrzeni składowych głównych. Każda składowa główna powinna wyjaśniać co najmniej tyle zmienności ile zawarte było w jednej pierwotnej zmiennej. Spośród 12 pierwotnych zmiennych (12 wyróżników) na podstawie analizy korelacji (tzw. wartości własnych) oraz wykresu osypiska Catella do dalszej analizy wybrano trzy składowe główne (PC1, PC2, PC3). Wybrano te składowe, których wartość własna była większa od 1.

Składowe główne tworzą abstrakcyjną wielowymiarową przestrzeń, w której każda z nich łączy w sobie zmienność kilku pierwotnych zmiennych. Analiza PCA pozwoliła zmniejszyć wymiarowość przestrzeni z 12 do 3 wymiarów, zachowując jednocześnie możliwie najwięcej informacji zawartych w analizowanych danych. Wszystkie trzy składowe główne wyjaśniają łącznie 80,4% całkowitej zmienności.

Na podstawie wyliczonych korelacji zmiennych i składowych głównych sporządzono wykres (rys. 8) przedstawiający parametry jakościowe pieczarek w przestrzeni dwóch pierwszych składowych (PC1 x PC2), z których PC1 wyjaśnia niemalże 39% całkowitej zmienności i wykazuje wysoką, dodatnią korelację z „oceną wizualną pieczarek” czyli barwą skórki i mięszu oraz strukturą powierzchni a także smakiem i zapachem kiszonych pieczarek.

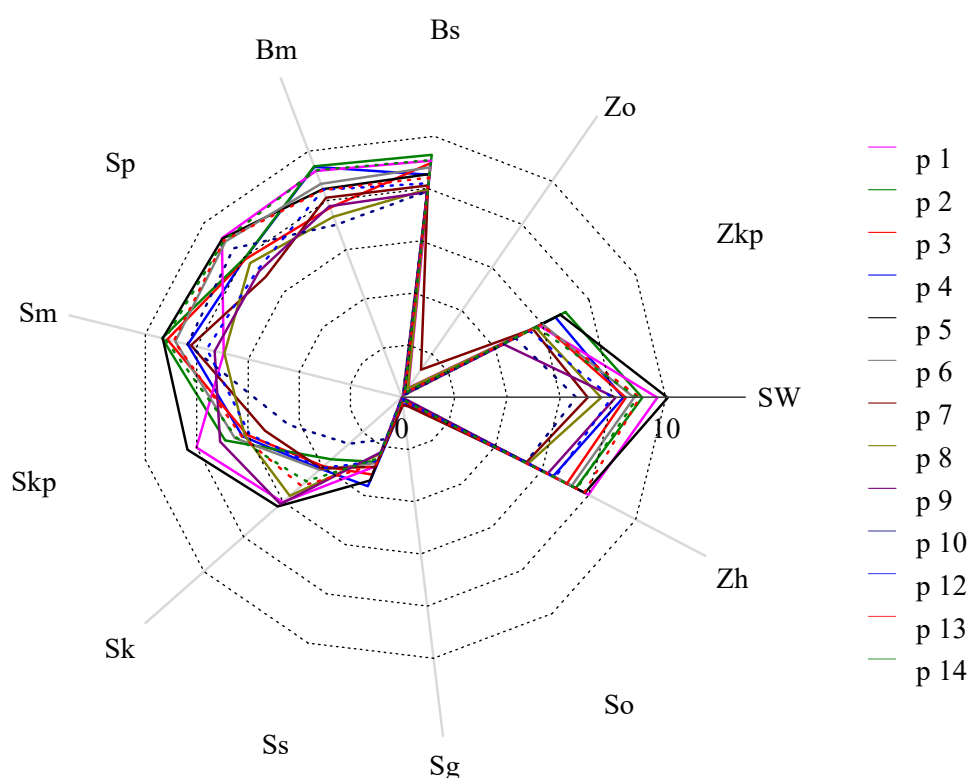


Rys. 8. Projektja PCA jakości sensorycznej kiszonych pieczarek.

Zkp - zapach kiszonych pieczarek; Zo - zapach obcy; Bs - barwa skórki; Bm - barwa mięszu; Sp - struktura powierzchni; Sm - struktura mięszu; Skp - smak kiszonych pieczarek; Sk - smak kwaśny; Ss - smak słony; Sg - smak gorzki; So - smak obcy; Zh – zharmonizowanie; SW- Suma ważona

Natomiast „odczucia nieprzyjemne” czyli smak i zapach obcy oraz smak gorzki wykazują silną, ujemną korelację z drugą składową (PC2), wyjaśniającą prawie 27% całkowitej zmienności. PC3 to przede wszystkim smak kwaśny, o czym świadczy silna wzajemna korelacja tego parametru z trzecią składową (-0,81). Ogólna ocena zharmonizowania próbek (0,91) oraz suma ważona wszystkich wyróżników (0,93) są wysoce dodatnio skorelowane z PC1 (tab. 2.). Na wykresie można zaobserwować wzajemne korelacje pomiędzy wyróżnikami jakości sensorycznej kiszonych piezarek. Cechy takie jak smak i zapach kiszonych piezarek są silnie skorelowane z cechą „zharmonizowanie próbki” a także z oceną wizualną piezarek. Natomiast „odczucia nieprzyjemne” tworzą oddzielną grupę cech wzajemnie ze sobą skorelowanych.

Na rys. 9. przedstawiono profilogram jakości sensorycznej wszystkich przebadanych próbek piezarek kiszonych, na którym wyraźnie widać, w jaki sposób oceniano próbki w zakresie cech wpływających na jakość sensoryczną badanych piezarek.



Rys. 9. Profilogram jakości sensorycznej kiszonych piezarek

p 1 ÷ p 14 – kolejne oceniane próbki

Zkp - zapach kiszonych piezarek; Zo - zapach obcy; Bs - barwa skórki; Bm - barwa mięszu; Sp - struktura powierzchni; Sm - struktura mięszu; Skp - smak kiszonych piezarek; Sk - smak kwaśny; Ss - smak słony; Sg - smak gorzki; So - smak obcy; Zh – zharmonizowanie; SW- Suma ważona



Widać wyraźnie, że cechy niepożądane określane jako „odczucia nieprzyjemne” dla większości próbek wyczuwalne były na niskim lub bardzo niskim poziomie, poza próbką nr 7, która charakteryzowała się najbardziej wyraźnym zapachem obcym. Na podstawie poniższego wykresu można stwierdzić, że sumaryczna ocena dla większości próbek wynosiła 8-10 pkt. Najwyższą ocenę uzyskała próbka nr 5, którą oceniono wysoko w zakresie wszystkich pożądanых cech kiszonych pieczarek, a nisko dla parametrów powodujących „odczucia nieprzyjemne”. Ponadto próbki nr 1 i 2 uzyskały również całkowitą ocenę powyżej 9. Natomiast najniższą sumaryczną oceną charakteryzowała się próbka 10, którą wysoko oceniono jedynie za strukturę mięszu i powierzchni, natomiast za smak i zapach kiszonych pieczarek uzyskała jedne z niższych not.

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że najbardziej pożądanymi cechami charakteryzowała się próbka nr 5, która w zakresie ocenianych parametrów jakości sensorycznej uzyskała najwyższe lub wysokie oceny. Natomiast próbka nr 10 była najmniej słona oraz najmniej kwaśna i prawdopodobnie to było przyczyną niskiej oceny sumarycznej. Ogólnie można stwierdzić, że oceniającym bardziej odpowiadają kiszone pieczarki o zdecydowanym smaku, nawet o niezbyt niskim poziomie „słoności”, niż pieczarki, które można by określić jako „nijakie”, „mdłe”, a więc niezbyt kwaśne i niedosolone.

Spośród badanych szczepów *Leuconostoc* do kiszenia pieczarek, w celu otrzymania produktu o cechach pożądanых przez oceniających, najbardziej odpowiedni jest szczep *Leuconostoc citreum* C750(9), wyizolowany z piekarskiego zakwasu żytniego, użyty do zakiszania próbki nr 5, ponieważ uzyskała ona najwyższą ocenę sumaryczną oraz wysokie oceny w zakresie poszczególnych pożądanых cech, a niskie w zakresie niepożądanых.

Nieco niższe, ale również wysokie oceny, uzyskały próbki nr 1 i 2, do kiszenia których użyto szczepy *Leuconostoc citreum* (Ł 06) oraz *Leuconostoc lactis* (Ł 07), wyizolowane również z piekarskiego zakwasu żytniego.

Natomiast nieodpowiedni wydaje się szczep *Leuconostoc mesenteroides* sz 2.1-6 użyty w próbce nr 10 oraz szczep *Leuconostoc mesenteroides* sz 1.2-7 zastosowany w próbce nr 7 – również wyizolowane z piekarskiego zakwasu żytniego.

## 5.7. Badania nad doborem zestawu przypraw i badania przechowalnicze

Po dokonaniu wyboru szczepów bakterii najodpowiedniejszych do sporządzania kiszonek z pieczarek, przystąpiono do doświadczeń mających na celu dobór zestawu przypraw poprawiających (podnoszących atrakcyjność produktu) walory smakowe kiszonek, co ma ogromne znaczenie w aspekcie ich odbioru przez ewentualnych konsumentów. W tej części pracy największe znaczenie miały badania organoleptyczne, uzupełnione analizami fizyko-chemicznymi.

Badania nad doborem mieszanek przyprawowych wykonano w trzech układach:

- układ I: kiszenie z udziałem szczepów *Leuconostoc citreum* (Ł 06) i *Leuconostoc lactis* Sp. 1 oraz przyprawami, których skład podano w metodyce - kiszonek nie poddawano pasteryzacji a wszystkie próbki przechowywano w warunkach chłodniczych.
- układ II: kiszenie z udziałem szczepów *Leuconostoc citreum* (Ł 06) oraz *Leuconostoc citreum* C750(9) (identyfikacja jako *Lactobacillus plantarum*), których skład podano w metodyce - kiszonki poddawano pasteryzacji i wszystkie próbki przechowywano w warunkach chłodniczych.
- układ III - kiszenie z udziałem szczepów *Leuconostoc citreum* (Ł 06) oraz *Leuconostoc citreum* C750(9) (identyfikacja jako *Lactobacillus plantarum*), których skład podano w metodyce - w zmiennych warunkach przechowywania próbek (temperatura pokojowa i warunki chłodnicze) niepasteryzowanych oraz poddanych pasteryzacji.

Uzyskane kiszonki były przedmiotem ocen organoleptycznych, wykonywanych zarówno bezpośrednio po zakończeniu procesu kiszenia, jak i w trakcie badań przechowalniczych. Oceny wykonywał zespół sześciu ekspertów, analizy prowadzone były w Pracowni Sensorycznej Zakładu Technologii Fermentacji IBPRS. Prace zespołu oceniającego zilustrowano poniższymi zdjęciami.



Fot. 1. Ocena organoleptyczna kiszonych pieczarek



Fot. 2. Ocena organoleptyczna kiszonych pieczarek



Fot. 3. Ocena organoleptyczna kiszonych pieczarek

#### 5.7.1 Badania w układzie I

Wyniki doświadczeń prowadzonych w układzie I, dotyczących zmian pH oraz kwasowości ogólnej, w trakcie przechowywania próbek przez 6 miesięcy przedstawiono w tabeli 13. W doświadczeniach tych oprócz podstawowych szczepów oznaczonych skrótowo Ł06 i Sp. 1, jako szczepy porównawcze zastosowano dodatkowo szczep *Leuconostoc citreum* C750(9) oraz szczep *Weissella cibaria* KKP 2043, w wariantcie doświadczenia wykonanego bez dodatków przyprawowych. W próbkach oznaczonych symbolami W1 (fermentacja

spontaniczna) oraz W11 (szcep Sp. 1, czosnek i ziele angielskie) nie wykonano dalszych oznaczeń pH, ponieważ wystąpiły w nich pleśnie, co dyskwalifikowało te próbki jako przedmiot oceny organoleptycznej. W pozostałych próbkach obserwowano mniej lub bardziej dynamiczny spadek pH w trakcie sześciomiesięcznego przechowywania w temperaturze pokojowej. Najniższym poziomem pH charakteryzowała się próbka W10, natomiast najwyższe pH oznaczono w próbkach W5 i W10. Stwierdzono też zaskakującą korelację pomiędzy pH a dodatkiem przypraw bądź ich brakiem - dodatek przypraw stymulował szybszy spadek pH w czasie kiszenia.

Tabela 13. Wyniki oznaczeń pH i kwasowości ogólnej próbek w trakcie przechowywania (układ I)

Ozn. próbek	Szczep bakterii	Dodane przyprawy	Po 7 dniach		Po 30 dniach		Po 6 miesiącach	
			pH	Kwasowość ogólna	pH	Kwasowość ogólna	pH	Kwasowość ogólna
W1	Fermentacja spontaniczna	Bez dodatków	5,40	-	pleśnie			
W2	Ł06	Bez dodatków	5,21	0,49	5,15	0,48	5,01	0,49
W3	Sp. 1		5,11	0,60	5,08	0,49	4,95	0,37
W4	750(9)		5,11	0,59	5,05	0,44	4,87	0,39
W5	KKP 2043		5,17	0,61	5,00	0,64	4,44	0,58
W6	Ł06	Marchew, liść laurowy	4,92	0,77	4,82	0,97	4,52	1,02
W7	Sp. 1		4,98	0,73	4,88	0,60	4,50	0,65
W8	Ł06	Cebula, pieprz	4,93	0,55	4,82	0,71	4,48	0,80
W9	Sp. 1		4,67	0,58	4,56	0,73	4,49	0,91
W10	Ł06	Czosnek, ziele angielskie	4,69	0,58	4,57	0,75	4,20	0,88
W11	Sp. 1		4,71	0,60	pleśnie			
W12	Ł06	Gorzycza, ziele angielskie	4,75	0,62	4,69	0,71	4,57	0,91
W13	Sp. 1		4,82	0,49	4,60	0,69	4,49	0,82

Wszystkie próbki nie porażone pleśniami poddano analizie sensorycznej, a jej wyniki przedstawiono na rys. 10 w postaci profilogramu określającego poziom poszczególnych wyróżników jakościowych oraz związaną z nimi ocenę ogólną. Najwyższe oceny ogólne uzyskały próbki oznaczone numerami W4, W9 i W13, które charakteryzowały się: słabo

wyczuwalnym zapachem obcym, ładną strukturą powierzchni oraz mięszu, wyraźnie wyczuwalnym smakiem kiszonych pieczarek, słabo wyczuwalnym smakiem gorzkim i obcym. Najlepsze oceny sensoryczne odpowiadały następującym konfiguracjom doświadczeń: zastosowanie szczepu „750(9)” bez dodatku przypraw, szczepu „Sp. 1” z dodatkiem cebuli i pieprzu bądź z dodatkiem gorczycy i ziela angielskiego.



	Zapach kiszonych pieczarek	Zapach obcy	Barwa skórki	Barwa mięszu	Struktura powierzchni	Struktura mięszu	Smak kiszonych pieczarek	Smak kwaśny	smak słony	Smak gorzki	Smak obcy	Ogólna ocena
w2	4,1	1,0	8,5	9,6	9,5	9,4	8,3	4,3	3,6	1,9	1,0	6,9
w3	3,6	1,0	8,3	9,4	9,3	9,1	7,7	6,1	3,7	2,8	1,1	5,3
w4	5,0	1,3	9,4	9,3	9,4	9,1	8,0	6,1	4,8	1,9	1,3	7,6
w5	3,4	1,4	9,1	9,3	9,8	9,4	7,9	6,7	3,0	2,9	1,1	6,6
w6	4,6	1,1	9,4	9,8	9,9	9,8	6,7	5,0	3,6	3,6	1,7	5,3
w7	5,0	1,9	8,6	9,5	9,9	9,6	4,5	5,8	5,1	6,4	4,5	4,6
w8	4,6	2,5	8,9	9,0	9,9	9,5	6,6	5,9	4,8	1,6	1,1	7,3
w9	5,7	1,0	9,4	9,1	9,9	9,9	9,0	6,0	2,4	1,4	1,0	8,2
w10	3,7	1,4	9,9	9,8	10,0	10,0	6,0	6,6	3,3	1,5	1,3	6,4
w12	5,4	1,4	8,4	7,9	9,3	9,3	4,4	4,0	2,9	1,1	1,2	5,6
w13	4,3	1,1	8,9	8,5	9,3	9,3	7,3	5,1	2,3	1,3	1,3	7,5

Rys. 10. Profilogram jakości sensorycznej kiszonych pieczarek (układ I)

W tym etapie doświadczenia wykonano również analizy HPLC zalewy w trzech próbkach: W4, która uzyskała stosunkowo dobrą ocenę ogólną oraz próbkach W6 i W7, które uzyskały słabe oceny ogólne. Wyniki zamieszczono w tabeli 14. Okazało się, że niska ocena ogólna

wyraźnie związana była z wysoką zawartością kwasu masłowego, przy jednocześnie relatywnie wysokiej zawartości kwasu mlekowego i octowego w przypadku próbki W7 i dość wysokiej zawartości kwasu masłowego i mlekowego w przypadku próbki W6. Natomiast ponad dwukrotnie niższa zawartość kwasu masłowego w próbce W4 w porównaniu z próbką W7, stosunkowo niska zawartość kwasu mlekowego oraz octowego miała związek z wysoką oceną próbki W4.

Tabela 14. Wyniki analizy HPLC wybranych próbek po 180 dniach kiszenia (układ I).

Ozn. próbek	Szczep bakterii	kwas mlekowy [mg/l]	kwas octowy [mg/l]	1,2-propandiol [mg/l]	kwas propionowy [mg/l]	kwas masłowy [mg/l]
W4	750(9)	2203,8 ± 66,1	86,9 ± 1,0	0,0	40,6 ± 1,8	401,5 ± 22,4
W6	Ł06	4291,2 ± 57,2	0,0	0,0	66,4 ± 5,0	455,6 ± 19,8
W7	SP1	6947,1 ± 173,9	486,6 ± 28,9	0,0	107,7 ± 25,3	903,7 ± 39,9

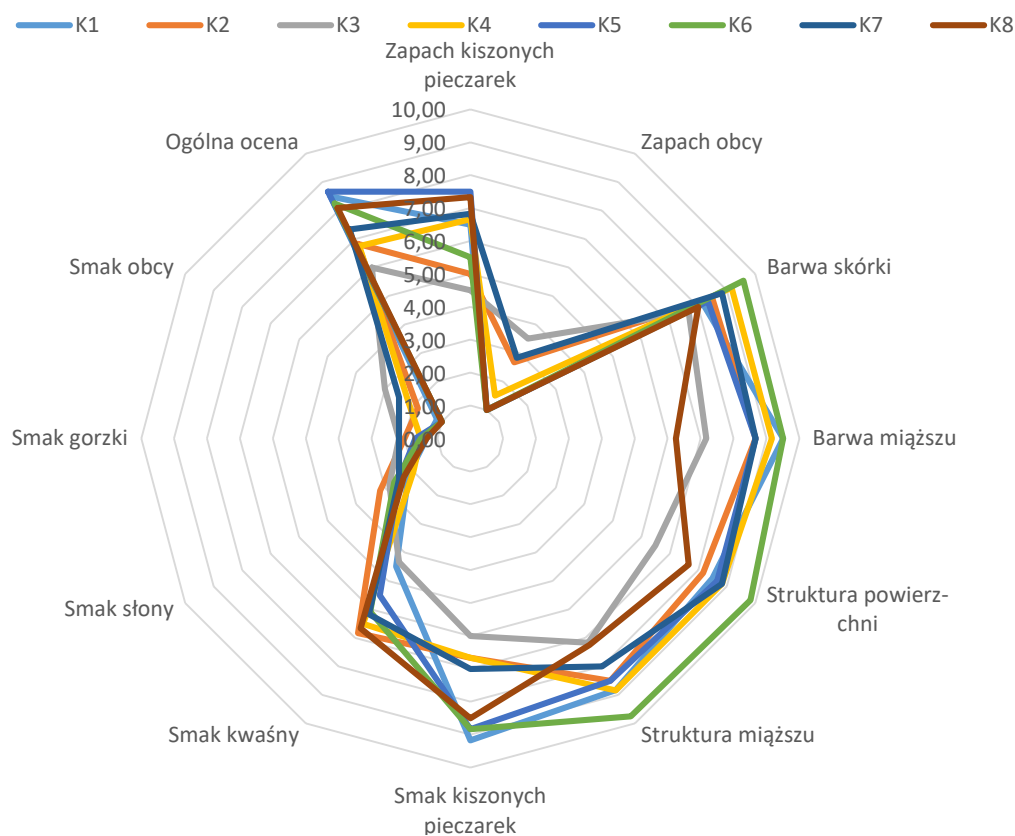
### 5.7.2. Badania w układzie II

Wyniki oceny sensorycznej kiszonek pochodzących z doświadczeń prowadzonych w układzie II, z udziałem szczepów *Leuconostoc citreum* (Ł06) oraz *Leuconostoc citreum* C750(9), w którym wszystkie próbki przechowywano w warunkach chłodniczych, a w każdym wariancie doświadczenia połowę kiszonek poddawano pasteryzacji, a drugiej połowy nie pasteryzowano, przedstawiono na rys. 11. Wyniki zaprezentowane na tym rysunku dotyczą próbek pasteryzowanych, ponieważ charakteryzowały się one znacznie lepszą jakością sensoryczną od tych, które pasteryzacji nie zostały poddane. Spośród nich najgorszą oceną ogólną charakteryzowała się próbka K3, z wyróżnikami takimi jak: zapach kiszonych pieczarek, struktura powierzchni, smak kiszonych pieczarek, smak kwaśny, na stosunkowo niskim poziomie przy jednocześnie relatywnie wysokich wskaźnikach, takich jak: zapach obcy, smak gorzki, smak obcy. Była to próbka pochodząca z wariantu doświadczenia przeprowadzonego z udziałem szczepu „Ł06” oraz dodatkiem gorczycy i liścia laurowego. W tym doświadczeniu najlepsze oceny ogólne osiągnęły próbki K1 (szczep Ł06 + marchewka + ziele angielskie), K5 (szczep 750(9) + marchewka + ziele angielskie) oraz K6 (szczep 750(9) + marchewka + imbir + liść laurowy).



W celu potwierdzenia potrzeby prowadzenia pasteryzacji kiszonek po zakończeniu czterotygodniowego procesu kiszenia, przeprowadzono analizy chemiczne próbek, które charakteryzowały się najlepszymi ocenami ogólnymi – porównanie wyników analiz HPLC próbek K1, K5 i K6 zamieszczono w tabeli 15.

Przedstawione wyniki wyraźnie wskazują na potrzebę pasteryzacji kiszonek, również tych przechowywanych w warunkach chłodniczych. I tak w próbkach nie pasteryzowanych, po 180 dniach przechowywania, stwierdzono bardzo niski poziom kwasu mlekowego w porównaniu z próbkami pasteryzowanymi. Z kolei próbki niepasteryzowane charakteryzowały się wielokrotnie wyższym poziomem kwasu octowego oraz kwasu masłowego od próbek pasteryzowanych, co z pewnością miało wpływ na ich jakość sensoryczną.



	Zapach kiszonych pieczarek	Zapach obcy	Barwa skórki	Barwa mięszu	Struktura powierzchni	Struktura mięszu	Smak kiszonych pieczarek	Smak kwaśny	Smak słony	Smak gorzki	Smak obcy	Ogólna ocena
K1	6,50	1,00	8,17	9,50	8,50	8,83	9,17	4,50	2,17	1,33	1,17	8,50
K2	5,00	2,67	8,50	8,67	8,17	8,50	6,67	6,83	3,17	2,00	1,83	6,83
K3	4,50	3,50	7,67	7,17	6,50	7,17	6,00	4,33	2,83	2,17	3,00	6,00
K4	6,67	1,50	9,17	9,17	8,83	8,83	6,67	6,50	2,00	1,50	2,17	6,75
K5	7,50	1,00	8,33	8,67	8,67	8,50	8,83	5,50	2,50	1,67	1,00	8,67
K6	5,50	1,00	9,58	9,50	9,83	9,75	8,83	6,08	2,67	1,50	1,00	8,25
K7	6,83	2,83	8,83	8,67	8,83	8,00	7,00	6,17	2,50	2,17	2,50	7,33
K8	7,33	1,00	8,00	6,25	7,67	7,25	8,50	6,67	2,33	1,33	1,00	8,08

Rys. 11. Profilogram jakości sensorycznej kiszonych pieczarek (układ II).

Tabela 15. Wyniki analizy HPLC wybranych próbek po 180 dniach kiszenia (układ II).

Próbka	kwas mlekowy [mg/l]	kwas octowy [mg/l]	1,2-propandiol [mg/l]	kwas propionowy [mg/l]	kwas masłowy [mg/l]
<b>K1</b> Bez pasteryzacji	312,0 ± 22,4	3310,0 ± 22,4	0,0	117 ± 14,9	4119,6 ± 182,5
<b>K1</b> pasteryzacja	4378,6 ± 144,2	331,2 ± 19,4	0,0	285,4 ± 1,8	451,5 ± 19,9
<b>K5</b> bez pasteryzacji	228,0 ± 11,7	1944,6 ± 43,1	0,0	1553,0 ± 18,2	3766,6 ± 203,5
<b>K5</b> pasteryzacja	3130,6 ± 25,1	0,0	0,0	1126,8 ± 18,0	1156,7 ± 40,4
<b>K6</b> bez pasteryzacji	118,0 ± 32,4	2985,5 ± 19,9	0,0	1895,8 ± 1,0	3178,8 ± 40,8
<b>K6</b> pasteryzacja	2560,6 ± 39,8	260,5 ± 21,0	249,7 ± 10,7	189,1 ± 4,6	635,5 ± 10,6

### 5.7.3. Badania w układzie III

W układzie III sporządzano kiszonki według schematu zamieszczonego w tabeli 16. Dobór przypraw w doświadczeniach prowadzonych w tym układzie nawiązywał do wyników uzyskanych w układzie II, tzn. w przypadku szczepu Ł06 dodatek stanowiła marchew + ziele angielskie (próbki oznaczone symbolem P1), a w przypadku szczepu 750(9) stosowano marchew + ziele angielskie (próbki oznaczone symbolem P5) lub marchew + imbir + liść laurowy (próbki oznaczone symbolem P6). Dwa szczepy bakterii Ł06 oraz 750(9) zostały wytypowane w efekcie badań w układzie I, gdzie w przypadku szczepu Sp. 1 uzyskiwano dobre wyniki ale w kompozycji z takimi przyprawami jak gorczyca czy czosnek, które dawały

zbyt intensywny efekt smakowy, co miało negatywny wpływ na ocenę ogólną uzyskiwanych kiszonek.

W tym układzie we wszystkich wariantach stosowano pasteryzację lub nie oraz próbki przetrzymywano w temperaturze pokojowej bądź chłodniczej.

Wszystkie próbki poddano analizie metodą HPLC po 60 dniach jego trwania. Wyniki zamieszczono w tabeli nr 17. Oznaczano stężenie w zalewie: stężenie kwasu mlekowego, octowego, propionowego, masłowego oraz 1,2- propandiolu i poziom pH. Zawartość kwasu mlekowego w zalewie mieściła się w przedziale od niemal 7400 mg/l do zera. Oczywiście zerowe stężenie kwasu mlekowego w zalewie (próbki P5(9) , P5(10), P6(11), P6(12)) wskazywało, że fermentacja przebiegła w zupełnie niewłaściwym kierunku – temu zjawisku towarzyszyło podwyższone stężenie kwasu masłowego do poziomu w zakresie od 3150 do do 4500 mg/l oraz obecność kwasu propionowego o stężeniu od 1780 do 2800 mg/l i kwasu octowego od 0,0 do 3180 mg/l. Znajdowało to swoje odzwierciedlenie w poziomie pH w zakresie 4,74 do 5,22, stosunkowo wysokim jak na kiszonki. Szczególnie negatywnie wyróżniała się tutaj kiszonka oznaczona symbolem P6(11), w której nie wykryto zarówno kwasu mlekowego jak i octowego, za to było w niej dużo kwasu masłowego. Należało się spodziewać, że te kiszonki nie uzyskają dobrych ocen w trakcie analiz sensorycznych.

Omawiane próbki, które charakteryzowały się niekorzystnymi wynikami oznaczeń fizykochemicznych, były pasteryzowane ale też niepasteryzowane i przetrzymywane zarówno w temperaturze pokojowej jak i w warunkach chłodniczych, w związku z czym na podstawie uzyskanych wyników nie można w sposób logiczny powiązać warunków przechowywania i obróbki termicznej z uzyskanymi negatywnymi wynikami. Natomiast może mieć to związek z połączeniem szczepu bakterii z określonym zestawem przypraw.

Z kolei zbyt wysoki poziom kwasu mlekowego w zakresie od 5250 do nawet 7370 mg/l i związany z nim niski poziom pH, niewiele przekraczający 3,7 (próbki P1(1), P1(5), P5(7) i P5(8)) wskazywał na prawdopodobne przekwaszenie kiszonek, a zatem również ich ewentualne niskie oceny w analizie sensorycznej.

Tabela 16. Identyfikacja analizowanych próbek (układ III)

Identyfikacja próbek				
Próbka	Szczep bakterii	Przyprawy	Bez pasteryzacji/pasteryzacja	T przechowywania
<b>P1(1)</b>	Ł06	Marchew + ziele angielskie	Bez pasteryzacji	Pokojowa
<b>P1(2)</b>	Ł06	Marchew + ziele angielskie	Bez pasteryzacji	Chłodnicza
<b>P1(3)</b>	Ł06	Marchew + ziele angielskie	Pasteryzacja	Chłodnicza
<b>P1(4)</b>	Ł06	Marchew + ziele angielskie	Pasteryzacja	Pokojowa
<b>P1(5)</b>	Ł06	Marchew + ziele angielskie	Bez pasteryzacji	Chłodnicza
<b>P5(7)</b>	750(9)	Marchew + ziele angielskie	Bez pasteryzacji	Chłodnicza
<b>P5(8)</b>	750(9)	Marchew + ziele angielskie	Pasteryzacja	Pokojowa
<b>P5(9)</b>	750(9)	Marchew + ziele angielskie	Bez pasteryzacji	Pokojowa
<b>P5(10)</b>	750(9)	Marchew + ziele angielskie	Pasteryzacja	Chłodnicza
<b>P6(11)</b>	750(9)	Marchew + imbir + liść laurowy	Bez pasteryzacji	Chłodnicza
<b>P6(12)</b>	750(9)	Marchew + imbir + liść laurowy	Pasteryzacja	Pokojowa
<b>P6(13)</b>	750(9)	Marchew + imbir + liść laurowy	Bez pasteryzacji	Pokojowa
<b>P6(14)</b>	750(9)	Marchew + imbir + liść laurowy	Bez pasteryzacji	Chłodnicza
<b>PK(15)</b>	Kontrola*)	Marchew + imbir + liść laurowy	Pasteryzacja	Chłodnicza

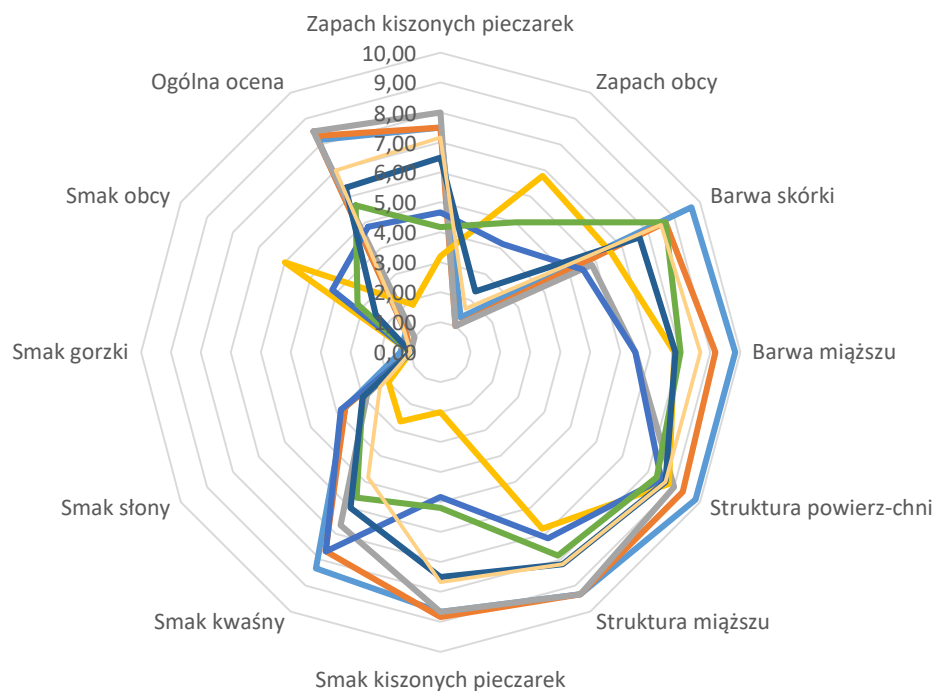
\*) - fermentacja spontaniczna

Tabela 17. Wyniki analizy HPLC wybranych próbek po 60 dniach kiszenia (układ III).

Próbka	kwask mlekowy [mg/l]	kwask octowy [mg/l]	1,2-propandiol [mg/l]	kwask propionowy [mg/l]	kwask masłowy [mg/l]	pH
<b>P1(1)</b>	6237,9 ± 20,1	720,7 ± 11,2	605,8 ± 5,5	1280,6 ± 4,1	708,1 ± 38,6	3,71
<b>P1(2)</b>	5248,7 ± 190,3	212,2 ± 18,1	0,0	263,4 ± 14,8	349,8 ± 208,6	3,91
<b>P1(3)</b>	3288,6 ± 18,0	285,5 ± 5,9	0,0	351,4 ± 17,2	326,1 ± 4,9	4,11
<b>P1(4)</b>	5031,9 ± 38,1	421,1 ± 7,3	0,0	582,7 ± 0,1	513,0 ± 5,8	3,94
<b>P1(5)</b>	6294,3 ± 95,8	81,0 ± 14,6	0,0	302,3 ± 44,4	582,5 ± 54,9	3,74
<b>P5(7)</b>	7369,3 ± 56,0	194,4 ± 5,2	0,0	1265,8 ± 15,1	1902,0 ± 44,0	3,78
<b>P5(8)</b>	6353,6 ± 0,3	0,00	0,0	1937,2 ± 44,5	1771,1 ± 18,6	3,72
<b>P5(9)</b>	0,0	3177,5 ± 66,0	0,0	1782,7 ± 46,1	4484,8 ± 115,1	4,74
<b>P5(10)</b>	0,0	600,2 ± 41,4	0,0	2357,6 ± 42,6	3145,5 ± 7,2	5,22
<b>P6(11)</b>	0,0	0,0	0,0	1922,2 ± 13,8	4476,3 ± 0,2	5,00
<b>P6(12)</b>	0,0	1284,0 ± 31,0	0,0	2813,0 ± 23,8	3797,4 ± 4,2	4,97
<b>P6(13)</b>	2530,0 ± 45,0	115,8 ± 30,3	0,0	1747,3 ± 11,1	1394,4 ± 13,5	4,54
<b>P6(14)</b>	5397,3 ± 37,2	170,0 ± 17,3	0,0	800,5 ± 2,2	1160,3 ± 47,2	3,96
<b>PK(15)</b>	1795,1 ± 6,8	545,4 ± 7,7	0,0	969,1 ± 23,1	1118,0 ± 33,9	4,50

Pozostałe próbki, tzn. P1(2), P1(3), P1(4), P6(13) i P6(14) charakteryzowały się zawartością kwasu mlekowego na poziomie 2530 do 5400 mg/l, kwasu octowego 115 do 420 mg/l, kwasu propionowego od 350 do 1750 mg/l, kwasu masłowego od 326 do 1400 mg/l oraz poziomem pH w zakresie od 3,94 do 4,54. Oznaczone parametry wskazywały, że próbki te kwalifikują się do dalszych analiz.

— P1(2) — P1(3) — P1(4) — P5(9) — P5(10) — P6(13) — P6(14) — kontrola PK(15)



	Zapach kiszonych pieczarek	Zapach obcy	Barwa skórki	Barwa mięszu	Struktura powierz-chni	Struktura mięszu	Smak kiszonych pieczarek	Smak kwaśny	Smak słony	Smak gorzki	Smak obcy	Ogólna ocena
P1(2)	7,50	1,33	9,67	9,83	9,83	9,33	8,67	8,33	3,67	1,33	1,33	8,17
P1(3)	7,50	1,00	8,67	9,17	9,33	9,33	8,83	7,67	3,67	1,00	1,33	8,33
P1(4)	8,00	1,00	5,83	6,50	9,00	9,33	8,67	6,67	2,83	1,00	1,00	8,50
P5(9)	3,20	6,80	6,60	7,80	8,80	6,80	2,00	2,67	2,00	1,00	6,00	1,83
P5(10)	4,67	4,17	5,50	6,50	8,50	7,17	4,83	7,67	3,83	1,00	4,17	4,83
P6(13)	4,17	5,00	8,67	8,00	8,33	7,83	5,20	5,60	3,00	1,00	3,20	5,67
P6(14)	6,50	2,33	7,67	7,83	8,67	8,17	7,50	6,00	3,00	1,00	2,50	6,33
P6(11)	dyskwalifikacja ze względu na smak i zapach											
kontrola kontrola	dyskwalifikacja ze względu na smak i zapach (bez pasteryzacji, T pokojowa)											
PK(15)	7,17	1,67	8,50	8,67	8,67	8,17	7,67	4,83	2,33	1,00	1,40	7,00

Rys. 11. Profilogram jakości sensorycznej kiszonych pieczarek (układ III)

Próbka kontrolna (PK(15) - surowiec poddany fermentacji spontanicznej; próbka pasteryzowana a następnie przetrzymywana w warunkach chłodniczych) charakteryzowała się niezbyt wysokim stężeniem kwasu mlekowego 1800 mg/l, przeciętnym stężeniem kwasu masłowego 1120 mg/l w porównaniu z pozostałymi próbkami oraz pH na dość wysokim poziomie 4,5, co mogło sugerować niezbyt korzystny przebieg fermentacji.

Wyniki analiz HPLC znalazły swoje odzwierciedlenie w analizie sensorycznej.

Po 6 miesiącach przechowywania wybrane próbki poddano analizie sensorycznej, której wyniki przedstawiono na rys. 11. Do analizy wytypowano 8 próbek na podstawie wcześniejszej analizy HPLC – 7 kiszonek z dodatkiem szczepów L06 i 750(9) oraz próbkę kontrolną poddaną fermentacji spontanicznej. Spośród ocenianych próbek najlepsze oceny ogólne, na poziomie przekraczającym 8 punktów, uzyskały kiszonki wykonane z udziałem szczepu Ł06 oznaczone symbolami P1(1), P1(2), P1(3). Próbki te charakteryzowały się wyrazistym zapachem oraz smakiem kiszonych pieczarek, dobrą strukturą i barwą mięszu, dobrą barwą skórki, ładną strukturą powierzchni, dość intensywnym smakiem kwaśnym, przy jednocześnie niewyczuwalnym smaku i zapachu obcym i smaku gorzkim. Można więc uznać, że kiszonki wykonane przy zastosowaniu tego szczepu z dodatkiem marchwi i ziela angielskiego mogą znaleźć uznanie wśród ewentualnych przyszłych konsumentów.

Złe oceny ogólne na poziomie 1,83 i 4,83 punktu uzyskały odpowiednio próbki oznaczone symbolami P5(9) i P5(10), które charakteryzowały się intensywnym zapachem i smakiem obcym, przy jednoczesnym dość słabym zapachu i smaku kiszonych pieczarek.

Próbki P6(13) i P6(14) uzyskały przeciętne oceny odpowiednio 5,67 i 6,33 punktu, co koreluje z wynikami ich analiz fizyko-chemicznych. Natomiast zaskakująco dobrą ocenę (7 punktów) uzyskała próbka PK(15) pochodząca z fermentacji spontanicznej pieczarek pomimo stosunkowo niskiej zawartości kwasu mlekowego na poziomie 1800 mg/l (pH 4,5).

Analizie organoleptycznej nie poddano próbek P6(11) oraz próbki kontrolnej nie poddanej pasteryzacji i przetrzymywanej w temperaturze pokojowej, ze względu na ich smak i zapach. Wiele próbek nie zostało poddawanych analizom fizyko-chemicznym oraz sensorycznym, ponieważ zostały one zdyskwalifikowane już na etapie oceny wizualnej – pojawiające się silne zmętnienie, piana na powierzchni i ogniska pleśni.

#### 5.8. Ocena wpływu zastosowania wody dekontaminowanej na liczbę bakterii na powierzchni pieczarek surowych.

W badaniach stosowano wodę dekontaminowaną jako roztwory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o stężeniach 1,5%, 3,0% oraz 6,0%, przetrzymując pieczarki w tych roztworach przez 5, 10 oraz 20 min. kontrolowano również ogólną liczbę bakterii w pieczarkach surowych oraz mytych w strumieniu wody wodociągowej przez 30 s. Uśrednione wyniki doświadczeń przedstawiono w tabeli 18.

Tabela 18. Mycie pieczarek wodą dekontaminowaną przy zastosowaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Czas przetrzymywania	0 min	5 min	10 min	20 min
Bez H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Stężenie H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Wynik posiewu (jtk/ml)		
Pieczarki brudne (surowe)	7,26 x 10 <sup>7</sup>	-	-	-
Myte w strumieniu H <sub>2</sub> O	2,73 x 10 <sup>7</sup>	-	-	-
1,5 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	9,54 x 10 <sup>6</sup>	8,09 x 10 <sup>6</sup>	4,54 x 10 <sup>6</sup>
3,0 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	8,81 x 10 <sup>6</sup>	6,03 x 10 <sup>6</sup>	4,54 x 10 <sup>6</sup>
6,0 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	8,51 x 10 <sup>6</sup>	3,66 x 10 <sup>6</sup>	2,53 x 10 <sup>6</sup>

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że liczba bakterii na surowych pieczarkach z badanych próbek była rzędu 7 x 10<sup>7</sup>jtk/g. Proces mycia w wodzie wodociągowej powodował obniżenie liczby bakterii o około pół rzędu wielkości, a zastosowanie wody dekontaminowanej obniżało liczbę bakterii do poziomu 10<sup>6</sup> jtk/g, z efektywnością zależną od stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz czasu jej działania, jednak różnica pomiędzy stężeniem 1,5% i czasem działania 5 min a stężeniem 6% i czasem działania 20 min nie była zbyt istotna – obniżenie liczby bakterii o około pół rzędu wielkości. Wobec powyższego, biorąc pod uwagę skomplikowanie procesu technologicznego oraz mierną efektywność procesu dekontaminacji uznano za problematyczne wprowadzanie tej operacji do ciągu technologicznego produkcji pieczarek kiszonych.

#### 5.9. Testowanie pilotażowej linii do kiszenia pieczarek

Pilotażowa linia do produkcji kiszonych pieczarek na niewielką skalę powstała w zaadaptowanym do tego celu budynku (poddanym gruntownemu remontowi i przebudowie) gospodarczym/mieszkalnym położonym w miejscowości Cyrusowa Wola Kolonia/Dmosin. Budynek został wyposażony w nowe instalacje elektryczne, hydrauliczne i kanalizacyjne. Ściany wykończono glazurą a posadzki wykończono terakotą wyposażoną w kratki odpływowe w celu umożliwienia zachowania higieny. W pomieszczeniu zainstalowano również podwójną instalację wyciągową w miejscach powstawania oparów wyposażoną w okapy ze stali kwasoodpornej w celu zapobieżenia gromadzeniu się nadmiernej ilości wilgoci i rozwoju pleśni. Wyposażenie stałe pomieszczenia stanowią zlewy głębokie ze stali



kwasoodpornej usytuowane w części „brudnej” oraz „czystej” pomieszczenia w celu wyeliminowania krzyżowania się dróg produktu surowego oraz przetworzonego, wyposażone w baterie spożywcze umożliwiające obsługę bez potrzeby dotykania dłońmi. Oświetlenie stanowią panele wbudowane w sufit bez możliwości gromadzenia się kurzu na obudowach. Pomieszczenie ogrzewane jest przy zastosowaniu ekologicznej pompy ciepła.

Obok pomieszczenia technologicznego znajduje się pomieszczenie piwniczne, charakteryzujące się stałą temperaturą 14-15 °C, przeznaczone do magazynowania surowych pieczarek oraz w wydzielonej części do przechowywania (dojrzewania) produktu gotowego – po zakończeniu czterotygodniowego procesu kiszenia.

W skład linii pilotażowej wchodzi wyposażenie i urządzenia umożliwiające kolejno realizację poszczególnych etapów cyklu technologicznego.

Wyposażenie ruchome to kilka stołów o różnej wysokości (w zależności od przeznaczenia), wykonanych w całości ze stali kwasoodpornej. Są to stoły manipulacyjne do prac wykonywanych ręcznie lub przeznaczone do ustawienia urządzeń na ergonomicznej wysokości, zapewniającej łatwiejszą ich obsługę.

Na ścianach zawieszono szafki zamknięte bądź półki regałowe otwarte, również w całości wykonane ze stali kwasoodpornej, służące do przechowywania słoików, drobnego wyposażenia, przypraw itp.

Ponadto linię wyposażono w:

- blanszownik – pojemnik ze stali kwasoodpornej z ażurowym, wyjmowanym wkładem, umożliwiający precyzyjne ustalenie czasu tej operacji technologicznej, a także szybkie odsączenie pieczarek po zakończeniu procesu blanszowania,
- elektryczny podgrzewacz wody z regulatorem temperatury podgrzewania do przygotowywania zalewy,
- elektryczną indukcyjną płytę grzewczą dużej mocy (3 kW) do prowadzenia procesu blanszowania pieczarek i pasteryzacji słoików po zakończeniu procesu kiszenia, wyposażoną w regulator temperatury i mocy grzania,

- urządzenie do automatycznego napełniania zalewą słoików z pieczarkami z możliwością precyzyjnego regulowania pojemności zalewy, tak aby słoiki nie były przepełnione ale jednocześnie ich zawartości w całości pokrywała zalewa,
- chłodziarka pozioma do przechowywania surowców bądź dodatków technologicznych.

Cykl obejmuje następujące operacje technologiczne (ilustrację stanowią zdjęcia wykonane w trakcie prowadzenia jednego z testów):

- pierwszy etap cyklu technologicznego stanowi przyjęcie i mycie surowca – pieczarek dostarczanych w skrzynkach. Mycie odbywa się w zlewie w strumieniu bieżącej wody (fot.1.),
- drugi etap to selekcja grzybów – odrzucenie owocników uszkodzonych bądź nadwymiarowych (fot. 2.),
- trzeci etap – przygotowanie pieczarek do blanszowania – napełnianie pojemnika odpowiednią ilością surowca (fot. 3.),
- czwarty etap – załadunek blanszownika – wstawianie ażurowego wkładu wypełnionego pieczarkami do wody o temperaturze 95 °C (fot. 4.),
- piąty etap – blanszowanie – przetrzymywanie pieczarek w wodzie o temperaturze 92-93 °C przez 20 min (fot. 5.),
- szósty etap – przygotowanie mieszanek przyprawowych, w tym przypadku stosowano marchew + ziele angielskie lub marchew + ziele angielskie + ziarno gorczycy (fot. 6.),
- etap siódmy – po ścisłym ułożeniu pieczarek w słoikach (tak aby nie poruszały się w trakcie zmian pozycji słoja) za pomocą dozownika automatycznego dozowano wcześniej przygotowaną zalewę zawierającą 1,5% cukru oraz 1,5% soli (NaCl) (fot. 7.),
- etap ósmy – kontrola prawidłowości napełnienia słoików zalewą – poziom zalewy powinien być taki aby wszystkie pieczarki były w niej zanurzone w całości (fot. 8.),
- etap dziewiąty – szczepienie kulturą starterową – dodawanie do zalewy ściśle odmierzonej ilości kultury starterowej namnożonej w podłożu płynnym – w tym przypadku szczepiono bakteriami *Leuconostoc citreum* (Ł 06) lub *Leuconostoc citreum* C750(9). Po

zaszczepieniu słoiki dokładnie zamykano, a następnie ustawiano na półkach w celu przeprowadzenia 7-dniowej fermentacji w temperaturze pokojowej.

Przeprowadzone testy potwierdziły przydatność pilotażowej linii produkcyjnej w procesie kiszenia pieczarek, a skompletowane wyposażenie stałe oraz urządzenia zapewniają właściwy przebieg procesu zgodnie z opracowaną technologią kiszenia i uzyskanie produktów charakteryzujących się dobrą jakością.



Fot. 1. Mycie pieczarek



Fot. 2. Selekcja surowca



Fot. 3. Przygotowanie do blanszowania



Fot. 4. Załadunek blanszownika



Fot. 5. Blanszowanie



Fot. 6. Przygotowanie mieszanki przyprawowej



Fot. 7. Napełnianie słoików zalewą



Fot. 8. Kontrola prawidłowości napełnienia słoików



Fot. 9. Szczepienie kulturą starterową

Wytworzenie jakiegokolwiek handlowego produktu z żywymi kulturami drobnoustrojów wymaga odpowiedniego ich rozmnożenia a następnie zaszczepienia kulturą starterową w odpowiedniej ilości umożliwiającej opanowanie środowiska i właściwe ukierunkowanie procesu fermentacji.

Bardzo ważną czynnością, od której zależy finalna jakość wytwarzanego produktu jest kontrolowanie czystości używanych urządzeń na każdym etapie produkcji. Zakażenie hodowli rozmnażanego drobnoustroju innymi mikroorganizmami, np. w kulturze matecznej, może bowiem doprowadzić do zdominowania, a nawet całkowitego wyeliminowania z hodowli właściwego drobnoustroju w dalszych etapach procesu produkcyjnego.

Oprócz zachowania czystości w trakcie prowadzenia poszczególnych operacji jednostkowych w procesie produkcyjnym istotne jest również kontrolowanie standardów czystości mikrobiologicznej poszczególnych urządzeń, które występują w linii technologicznej. Biorąc powyższe pod uwagę, w trakcie testów technologicznych linii pilotażowej, przeprowadzono kontrole czystości mikrobiologicznej poszczególnych urządzeń. Wyniki zamieszczono w tabeli 19.

Tabela 19. Wyniki kontroli mikrobiologicznej przeprowadzonej w poszczególnych etapach procesu technologicznego

Etap – operacja jednostkowa, surowiec, urządzenie	Wynik posiewu – jtk/g				
	Mlekowe (kwaszące) MRS 37/2d	Ogólna liczba bakterii PC 30/3d	Drożdże i pleśnie (YPG) 28-30/4d	Paciorkowce kałowe (Compass Enterococcus agar) 44/1d	Enterobacter (VRBD) 35/1d
Pieczarki surowe	$1,6 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^1$	0	0
Błat stołu roboczego - wymaz	$2,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1$	3	0	0
Pieczarki po blanszowaniu	$8,1 \times 10^2$	$6,7 \times 10^3$	0	0	0
Przyprawy (ziele angielskie, gorczyca)	$2,0 \times 10^1$	$8,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	0	0
Zalewa gotowa	$2,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	0	0	0
Słoiki czyste - wymaz	0	0	0	0	0



Zalewa po zaszczepieniu	6,0 x 10 <sup>6</sup>	6,3 x 10 <sup>6</sup>	0	0	0
Woda z kranu	0	3	0	0	0
Kontrola powietrza w hali	-	8	-	-	-

Wykonane posiewy mikrobiologiczne wykazały zadowalającą czystość linii oraz liczbę drobnoustrojów w zalewie, która nie stanowi przeszkody w całkowitym opanowaniu środowiska przez bakterie pochodzące z kultury starterowej, a zatem pozwalający na prawidłowy, ukierunkowany przebieg fermentacji i w konsekwencji otrzymanie produktu o dobrej jakości.

## 6. PODSUMOWANIE

W trakcie realizacji pracy poddano badaniom 15 szczepów bakterii fermentacji mlekowej, z których jeden, oznaczony numerem 12 (*Leuconostoc mesenteroides* ZO) został wyizolowany z fermentujących pieczarek w Zakładzie Technologii Przetworów Owocowych i Warzywnych, traktowany był jako szczep odniesienia, natomiast pozostałe szczepy zostały wyizolowane w Zakładzie Technologii Fermentacji, głównie z piekarskich zakwasów żytnich, ale też z fermentowanych jabłek, papryki, cydru i piekarskiego zakwasu gryczanego.

Badane szczepy bakterii testowane były w różnych aspektach, obejmujących cechy technologiczne, takie jak: ilość biomasy namnażającej się w określonych warunkach hodowli (różne podłoża i temperatury), sprawność wydzielania biomasy w czasie wirowania hodowli, ilości kwasów organicznych wydzielanych przez bakterie do podłoża, zdolność do wytwarzania EPS i przeżywalność procesu liofilizacji biomasy oraz cechy aplikacyjne obejmujące szeroko pojętą jakość kiszzonek (jakość sensoryczną kiszonych pieczarek, ilości kwasów organicznych w zalewie, zmiany pH zalewy w czasie przechowywania). Do cech aplikacyjnych zaliczyć należy też aktywność antybakteryjną w stosunku do szczepów patogennych oraz trwałość w czasie przechowywania i po otwarciu.

W wyniku hodowli bakterii na MRS zawierającym sacharozę, prowadzonej w T = 25°C, stwierdzono, że nie występowała korelacja pomiędzy wzrostem prędkości obrotowej rotora a ilością uzyskiwanego osadu. Największe ilości osadu uzyskano w przypadku szczepów nr: 6, 9, 11, 14, a najmniejsze w przypadku szczepów: 10, 12 i 15 (rys. 1.). Najmniejszą liczbę komórek bakterii/ml uzyskiwano w hodowli szczepów nr: 7, 10, 12 i 13,

a najwięcej bakterii zostawało w supernatancie w przypadku szczepu 12; najmniejsze różnice pomiędzy liczbą komórek bakterii/ml hodowli i liczbą komórek bakterii/ml supernatantu wystąpiły w przypadku szczepów: 5, 6, 11, 13, 14, 15. W efekcie hodowli na MRS stwierdzono, że najgorszymi parametrami technologicznymi charakteryzowały się szczepy: 10, 12 i 15. (rys. 2). Największą ilość kwasu mlekowego syntetyzowały szczepy: 1, 8, 11, co wiąże się z największą liczbą komórek bakterii/ml w hodowli (rys. 3.). Szczepy oznaczone numerami: 2, 3, 5, 6, 7, 10, 11, 13, charakteryzowały się przeżywalnością powyżej 90% w procesie liofilizacji, ale przeżywalność pozostałych szczepów, oprócz 9 i 15, była wyższa niż 80 %, co również kwalifikuje je jako dobry materiał technologiczny (tab. 4).

Kolejny etap badań stanowiły hodowle prowadzone w podłożu produkcyjnym, w dwóch temperaturach hodowli 30 i 37 °C, które wirowano przy trzech prędkościach obrotowych rotora: 5000, 7000 oraz 9000 obr/min. Również w tym doświadczeniu, podobnie jak dla wcześniej omawianych procesów wirowania, nie stwierdzono bezpośredniej korelacji pomiędzy prędkością obrotową rotora a ilością otrzymywanego osadu (rys. 4. i 5.). Wystąpiła jednak wyraźna zależność od temperatury hodowli – w przypadku temperatury 30 °C masa uzyskiwanych osadów była wyższa dla wszystkich badanych szczepów. Stwierdzone różnice wskazują, że temperatura hodowli 30 °C na pożywce produkcyjnej jest zdecydowanie korzystniejsza niż temperatura 37 °C. Wyniki posiewu hodowli oraz ilości uzyskiwanego suchego osadu po wirowaniu hodowli prowadzonej w pożywce produkcyjnej w temperaturze 30 oraz 37 °C. wykazały, dla większości przebadanych szczepów, nieco wyższe przyrosty liczby komórek w trakcie hodowli prowadzonej w 30 °C oraz zdecydowanie niższe masy osadów po wirowaniu hodowli – o od 17 do 55 %. Największą liczbę komórek bakterii/ml hodowli stwierdzono w przypadku szczepów: 4, 5, 7, 8, 11 i 13, a zdecydowanie największą ilość osadu uzyskano w przypadku szczepu 5 (rys. 6. i 7.).

Stwierdzono wpływ temperatury na zdolność syntezy EPS. Niezależnie od zastosowanej pożywki stwierdzono, że EPS syntetyzowały szczepy oznaczone numerami 4, 6 i 12 (tab. 3 i tab. 5).

Najwięcej kwasu mlekowego w temperaturze hodowli 30 °C syntetyzowały szczepy 8, 10, 11, 15, a kwasu octowego szczepy 1, 2, 13, 14 (tab. 6.)

Spośród przebadanych szczepów najsilniejszą aktywnością antybakteryjną w stosunku do wybranych patogenów, wyrażoną największą strefą zahamowania wzrostu największej liczby szczepów, charakteryzowały się szczepy nr: 1, 5, 8, 11 i 15 (tab. 7.).

Ostateczną odpowiedź na pytanie, które z przebadanych szczepów charakteryzują się cechami kwalifikującymi je do zastosowania w komercyjnych szczepionkach do kiszenia grzybów dała ocena sensoryczna wykonanych kiszonek oraz uzupełniająca je analiza instrumentalna zalewy w kiszoncek i posiewy mikrobiologiczne. W celu określenia istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi dla poszczególnych wyróżników kiszonych pieczarek, wyniki poddano analizie wariancji, a następnie różnice między średnimi oszacowano za pomocą testu post-hoc (test Tukeya, tab. 11). Uzupełnieniem wykonanego testu jest suma ważona będąca wartością średnią sumy ocen danej próbki, uwzględniającą wagi przyjęte dla poszczególnych wyróżników (tab. 2). Najwyższą średnią sumę ocen (10,00) uzyskała próbka nr 5 a najniższą (6,61) próbka nr 10.

W kompleksowej ocenie produktu ważne są również wzajemne relacje pomiędzy wyróżnikami (tab. 12.), a także całkowita ocena kiszonych pieczarek (suma ważona). W tym celu wykorzystano analizę składowych głównych (PCA - *Principal Component Analysis*), która pozwoliła na wizualizację wielowymiarowych danych w układzie trójwymiarowej przestrzeni składowych głównych. Wybrane trzy składowe główne wyjaśniają łącznie 80,4% całkowitej zmienności. Na podstawie wyliczonych korelacji zmiennych i składowych głównych sporządzono wykres przedstawiający parametry jakościowe pieczarek w przestrzeni dwóch pierwszych składowych (PC1 x PC2) (rys. 8). Na wykresie można zaobserwować wzajemne korelacje pomiędzy wyróżnikami jakości sensorycznej kiszonych pieczarek. Cechy takie jak smak i zapach kiszonych pieczarek są silnie skorelowane z cechą „zharmonizowanie próbki” a także z oceną wizualną pieczarek. Natomiast „odczucia nieprzyjemne” tworzą oddzielną grupę cech wzajemnie ze sobą skorelowanych. Na rys. 9. przedstawiono profilogram jakości sensorycznej wszystkich przebadanych próbek pieczarek kiszonych. Wykres ten wyraźnie uwidacznia, w jaki sposób oceniano próbki w zakresie cech wpływających na jakość sensoryczną badanych pieczarek. Widać wyraźnie, że cechy niepożądane określane jako „odczucia nieprzyjemne” dla większości próbek wyczuwalne były na niskim lub bardzo niskim poziomie, poza próbką nr 7, która charakteryzowała się najbardziej wyraźnym zapachem obcym. Na podstawie poniższego wykresu można stwierdzić, że sumaryczna ocena dla większości próbek wynosiła 8-10 pkt. Najwyższą ocenę uzyskała próbka nr 5, którą oceniono wysoko w zakresie wszystkich pożądanych cech kiszonych pieczarek, a nisko dla parametrów powodujących „odczucia nieprzyjemne”. Ponadto próbki nr 1 i 2 również uzyskały całkowitą ocenę powyżej 9. Natomiast najniższą sumaryczną oceną charakteryzowała się próbka 10, która uzyskała wysokie oceny jedynie za

strukturę mięszu i powierzchni, natomiast za smak i zapach kiszonych pieczarek uzyskała jedne z niższych not.

Reasumując analizę statystyczną oceny sensorycznej można stwierdzić, że spośród badanych szczepów *Leuconostoc* do przeprowadzenia kiszenia pieczarek w celu otrzymania produktu o cechach pożądanых przez oceniających najbardziej odpowiedni byłby szczep *Leuconostoc citreum* C750(9), wyizolowany z piekarskiego zakwasu żytniego, użyty do zakiszania próbki nr 5, ponieważ uzyskała ona najwyższą ocenę sumaryczną oraz wysokie oceny w zakresie poszczególnych pożądanых cech, a niskie w zakresie niepożądanых. Nieco niższe ale również wysokie oceny uzyskały próbki nr 1 i 2, do kiszenia których użyto szczepy *Leuconostoc citreum* (Ł 06) oraz *Leuconostoc lactis* (Ł 07), wyizolowane również z piekarskiego zakwasu żytniego. Natomiast nieodpowiedni byłby szczep *Leuconostoc mesenteroides* sz 2.1-6 użyty w próbce nr 10 oraz szczep *Leuconostoc mesenteroides* sz 1.2-7 zastosowany w próbce nr 7 – oba wyizolowane z piekarskiego zakwasu żytniego.

Analiza kwasów organicznych w próbkach zalewy z pieczarek wykazała, że w próbkach, które uzyskały najlepsze oceny sensoryczne, stwierdzono wysokie stężenie kwasu mlekowego oraz wysokie lub dość wysokie stężenie kwasu octowego oraz obecność kwasu propionowego i masłowego – próbki 1, 2, 5, 13, natomiast próbka nr 8, w której stwierdzono najwyższą zawartość kwasu mlekowego oraz wysoką zawartość pozostałych trzech oznaczanych kwasów organicznych, uzyskała stosunkowo słabą ocenę sensoryczną. W najlepiej ocenionych próbkach ogólna liczba LAB w zalewie wahała się w zakresie  $1,0 \cdot 10^7$  jtk/ml do  $2,0 \cdot 10^9$  jtk/ml, a więc w dużym zakresie, a liczba LAB tworzących EPS w zakresie od 0 do  $1,2 \cdot 10^8$  jtk/ml – tu rozrzut też był bardzo duży. Ponadto w najlepiej ocenionych próbkach stwierdzono obecność niewielkich ilości drożdży (nr 1) i zarodników pleśni (nr 5), co jednak nie miało wpływu na zapleśnienie próbek w trakcie 4 tygodni kiszenia, natomiast po 4 tygodniach od otwarcia w próbkach tych zaobserwowano znaczny rozwój pleśni na powierzchni kiszzonek.

Podsumowując przedstawione wcześniej wyniki można stwierdzić, że ze względu na wysokie oceny jakości sensorycznej oraz korzystne parametry technologiczne jako szczepy odpowiednie do wykorzystania w szczepionce komercyjnej do kiszenia pieczarek można zarekomendować szczepy (1) *Leuconostoc citreum* (Ł 06), (5) *Leuconostoc citreum* C750(9), (2) *Leuconostoc lactis* (Ł 07). W toku przeprowadzonej oceny szczep odniesienia *Leuconostoc mesenteroides* ZO, oznaczony nr 12, wypadł dość słabo w porównaniu z większością ocenianych szczepów.

Po dokonaniu wyboru szczepów bakterii najodpowiedniejszych do sporządzania kiszonek z pieczarek, przystąpiono do doświadczeń mających na celu dobór zestawu przypraw poprawiających (podnoszących atrakcyjność produktu) walory smakowe kiszonek, co ma ogromne znaczenie w aspekcie ich odbioru przez ewentualnych konsumentów. W tej części pracy największe znaczenie miały badania organoleptyczne, uzupełnione analizami fizykochemicznymi. Doświadczenia prowadzono w trzech układach, wykorzystując trzy szczepy: *Leuconostoc citreum* (Ł 06) oraz *Leuconostoc citreum* C750(9) i *Leuconostoc sp.* 1 (oraz w układzie I dla porównania szczep *Weissella cibaria* KKP 2043) stosując różne mieszanki przypraw. W układzie I kiszonek nie poddawano pasteryzacji, a wszystkie próbki przechowywano w warunkach chłodniczych. W układzie II, w każdym wariantcie, połowę kiszonek poddawano pasteryzacji, a drugiej połowy nie pasteryzowano i wszystkie próbki przechowywano w warunkach chłodniczych. W układzie III próbki niepasteryzowane oraz poddawane pasteryzacji przechowywano w temperaturze pokojowej bądź w warunkach chłodniczych.

W układzie I po 6 miesiącach przechowywania próbek pH mieściło się w granicach 4,2-5,01 i stwierdzono, że dodatek przypraw stymulował szybszy spadek pH w czasie kiszenia. Najlepsze oceny sensoryczne odpowiadały następującym konfiguracjom doświadczeń: zastosowanie szczepu „750(9)” bez dodatku przypraw, szczepu „Sp. 1” z dodatkiem cebuli i pieprzu bądź z dodatkiem gorczycy i ziela angielskiego. Okazało się, że niska ocena ogólna wyraźnie związana była z wysoką zawartością kwasu masłowego, przy jednocześnie relatywnie wysokiej zawartości kwasu mlekowego i octowego w przypadku próbki W7 i dość wysokiej zawartości kwasu masłowego i mlekowego w przypadku próbki W6. Natomiast ponad dwukrotnie niższa zawartość kwasu masłowego w próbce W4 w porównaniu z próbką W7, stosunkowo niska zawartość kwasu mlekowego oraz octowego miała związek z wysoką oceną próbki W4 („750(9) bez dodatków).

W układzie II najlepsze oceny ogólne osiągnęły próbki K1 (szczep Ł06 + marchewka + ziele angielskie), K5 (szczep 750(9) + marchewka + ziele angielskie) oraz K6 (szczep 750(9) + marchewka + imbir + liść laurowy). Analiza kiszonek metodą HPLC wykazała potrzebę pasteryzacji kiszonek, również tych przechowywanych w warunkach chłodniczych.

W układzie III wszystkie próbki poddano analizie metodą HPLC po 60 dniach jego trwania. Próbki, które charakteryzowały się niekorzystnymi wynikami oznaczeń fizykochemicznych, były pasteryzowane ale też niepasteryzowane i przetrzymywane zarówno w temperaturze pokojowej jak i w warunkach chłodniczych, w związku z czym na podstawie

uzyskanych wyników nie można w sposób logiczny powiązać warunków przechowywania i obróbki termicznej z uzyskanymi negatywnymi wynikami. Natomiast może mieć to związek z połączeniem szczepu bakterii z określonym zestawem przypraw. Po 6 miesiącach przechowywania wybrane próbki poddano analizie sensorycznej której wyniki korelowały z wynikami analiz metodą HPLC. Spośród ocenianych próbek najlepsze oceny ogólne, na poziomie przekraczającym 8 punktów, uzyskały kiszunki wykonane z udziałem szczepu Ł06 oznaczone symbolami P1(1), P1(2), P1(3), które charakteryzowały się wyrazistym zapachem oraz smakiem kiszonych pieczarek, dobrą strukturą i barwą mięszu, dobrą barwą skórki, ładną strukturą powierzchni, dość intensywnym smakiem kwaśnym, przy jednocześnie niewyczuwalnym smaku i zapachu obcym i smaku gorzkim. Można więc uznać, że kiszunki wykonane przy zastosowaniu tego szczepu z dodatkiem marchwi i ziela angielskiego mogą znaleźć uznanie wśród ewentualnych przyszłych konsumentów.

Przeprowadzono ocenę wpływu zastosowania wody dekontaminowanej na liczbę bakterii na powierzchni pieczarek surowych. W najbardziej korzystnym układzie uzyskano obniżenie liczby bakterii o około pół rzędu wielkości. W związku z tym, biorąc pod uwagę skomplikowanie procesu technologicznego oraz mierną efektywność procesu dekontaminacji uznano za problematyczne wprowadzanie tej operacji do ciągu technologicznego produkcji pieczarek kiszonych.

W końcowym etapie prac badawczych przeprowadzono testy pilotażowej linii do kiszenia pieczarek na niewielką skalę, która powstała w zaadaptowanym do tego celu budynku (poddanym gruntownemu remontowi i przebudowie) gospodarczym/mieszkalnym położonym w miejscowości Cyrusowa Wola Kolonia/Dmosin. Test przeprowadzono trzykrotnie. W trakcie ich trwania wykonywano pełne cykle produkcyjne z wykorzystaniem wszystkich urządzeń linii i przy zastosowaniu szczepów bakterii oraz przypraw wytypowanych do tego celu w części badawczej projektu. Przeprowadzono też analizy mikrobiologiczne zarówno urządzeń jaki produktu powstałego w czasie prowadzenia testów. Wykonane posiewy mikrobiologiczne wykazały zadowalającą czystość linii oraz liczbę drobnoustrojów w zalewie, która nie stanowi przeszkody w całkowitym opanowaniu środowiska przez bakterie pochodzące z kultury starterowej, a zatem pozwalający na prawidłowy, ukierunkowany przebieg fermentacji i w konsekwencji otrzymanie produktu o dobrej jakości.

## 7. WNIOSKI

1. Przeprowadzone badania umożliwiły wytypowanie szczepów spełniających wymogi komercyjnej szczepionki do kiszenia grzybów. Najkorzystniejszymi cechami technologicznymi i aplikacyjnymi charakteryzowały się szczepy: *Leuconostoc citreum* C750(9) i *Leuconostoc citreum* (Ł 06).
2. Właściwości wyizolowanych szczepów umożliwiają ich hodowlę w półtechnicznej linii produkcyjnej biopreparatów ZF IBPRS.
3. Najkorzystniejsze wyniki ocen organoleptycznych kiszonych pieczarek uzyskano wykorzystując jako dodatki marchewkę i ziele angielskie oraz marchewkę, imbir i liść laurowy.
4. Celowe jest przeprowadzenie pasteryzacji produktu p czterotygodniowym procesie kiszenia w celu utrwalenia jego cech organoleptycznych.
5. Pilotażowa linia do kiszenia pieczarek umożliwia prowadzenie procesu produkcyjnego zgodnie z przyjętymi założeniami technologicznymi.
6. Jakość produktów (kiszonych pieczarek) otrzymywanych przy wykorzystaniu opracowanej technologii pozwala na podjęcie prób komercjalizacji w terenowych wytwórniach przetwórczych branży owocowo-warzywnej.

## 8. LITERATURA

1. Adamiak E. A., Kalembasa S., Kuziemska B., 2013. Zawartość metali ciężkich w wybranych gatunkach grzybów jadalnych. *Acta Agrophys.* 20, 7-16.
2. Aday, M.S. Application of electrolyzed water for improving postharvest quality of mushroom. *LWT Food Sci. Technol.* 2016, 68, 44–51.
3. Aguirre, L.; Frias, J.M.; Barry-Ryan, C.; Grogan, H. Assessing the effect of product variability on the management of the quality of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Postharvest Biol. Technol.* 2008, 49, 247–254.
4. Akata, I.; Torlak, E.; Erci, F. Efficacy of gaseous ozone for reducing microflora and foodborne pathogens on button mushroom. *Postharvest Biol. Technol.* 2015, 109, 40–44.
5. Anjaly, S.M.; Khanashyam, A.C.; Balasubrahmanyam, B.V.S.; Yadav, B.K. Potentials of Ozone Pre-treatment in Prolonging the Freshness of Oyster Potentials of Ozone Pre-treatment in Prolonging the Freshness of Oyster Mushrooms (*Pleurotus Florida*). *Malaysian J. Med. Heal. Sci.* 2020, 16, 119–120.
6. Ares, G.; Parentelli, C.; Gámbaro, A.; Lareo, C.; Lema, P. Sensory shelf life of shiitake mushrooms stored under passive modified atmosphere. *Postharvest Biol. Technol.* 2006, 41, 191–197.
7. Atarés, L.; Chiralt, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* 2016, 48, 51–62.

8. Azevedo, S.; Cunha, L.M.; Fonseca, S.C. Modelling the influence of time and temperature on the respiration rate of fresh oyster mushrooms. *Food Sci. Technol. Int.* 2015, *21*, 593–603.
9. Balasubramaniam, V.M.; Farkas, D.; Turek, E.J. Preserving foods through high-pressure processing. *Food Technol.* 2008, *62*, 32–38.
10. Barba, F.J.; Koubaa, M.; do Prado-Silva, L.; Orlie, V.; Sant'Ana, A.d.S. Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2017, *66*, 20–35.
11. Barros L., Baptista P., Correia D. M., Sá Morais J., Ferreira I. C., 2007. Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4781-4788.
12. Bernas E., Jaworska G., 2010. Zawartość aminokwasów w mrożonkach i konserwach sterylizowanych z borowika szlachetnego - *Boletus edulis* (Bull. Fr.). *Żywność Nauka Technologia Jakość* 6, 134-145.
13. Bernas E., Jaworska G., Maciejaszek I., Biernacka A., 2007. Wpływ obróbki wstępnej, zamrażania i zamrażalniczego składowania na teksturę pieczarek. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 5, 165-172.
14. Brennan, M.; Le Port, G.; Gormley, R. Post-harvest Treatment with Citric Acid or Hydrogen Peroxide to Extend the Shelf Life of Fresh Sliced Mushrooms. *LWT Food Sci. Technol.* 2000, *33*, 285–289.
15. Buckenhüskes, H.J., 1997. Fermented vegetables. In: Doyle, P.D., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, second ed. ASM Press, Washington, DC, 595-609.
16. Cardoso, R.V.C.; Fernandes, Â.; Barreira, J.C.M.; Verde, S.C.; Antonio, A.L.; González-Paramás, A.M.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R. Effectiveness of gamma and electron beam irradiation as preserving technologies of fresh *Agaricus bisporus* Portobello: A comparative study. *Food Chem.* 2019, *278*, 760–766.
17. Castellanos-Reyes, K.; Villalobos-Carvajal, R.; Beldarrain-Iznaga, T. Fresh Mushroom Preservation Techniques. *Foods* 2021, *10*, 2126. DOI: 10.3390/foods10092126.
18. Chanprasartsuk, O., Prakitchaiwattana, C., Sanguandeeikul, R., Fleet, G.H., 2010. Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. *Bioresource Technology* 101, 7500-7509.
19. Ciafardini, G., Di Cagno, R., 2012. Olive da mensa ed altri prodotti vegetali. In: Farris, A., Gobbetti, M., Neviani, E., Vincenzini, M. (Eds.), *Microbiologia dei prodotti alimentari*. CEA Casa Editrice Ambrosiana, Milan, Italy, pp. 365-382.
20. Czapski J., *Mushrooms quality as affected by washing and storage conditions*, Vegetable Corps Research Bulletin 2002, *58*, 135-141.
21. Dauchet, L., Kesse-Guyot, E., Czernichow, S., Bertrais, S., Estaquio, C., Peneau, S., Vergnaud, A.C., Chat-Yung, S., Castetbon, K., Deschamps, V., Brindel, P., Hercberg, S., 2007. Dietary patterns and blood pressure change over 5-y follow-up in the SU.VI.MAX cohort. *American Journal of Clinical Nutrition* 85, 1650-1656.
22. Demir, N., Bachçeci, K.S., Acar, J., 2006. The effects of different initial *Lactobacillus plantarum* concentrations on some properties of fermented carrot juice. *Journal of Food Processing and Preservation* 30, 352-363.
23. de São José, J.F.B.; de Andrade, N.J.; Ramos, A.M.; Vanetti, M.C.D.; Stringheta, P.C.; Chaves, J.B.P. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. *Food Control* 2014, *45*, 36–50.



24. Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J., 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal* 14, 273-285.
25. Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C.G., Ricciuti, P., Gobbetti, M., 2010a. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiology* 27, 381-389.
26. Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C.G., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2011a. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology* 28, 1062-1071.
27. Di Cagno, R., Surico, R.F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon, J.-C., Buchin, S., De Gara, L., Gobbetti, M., 2008b. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. *International Journal of Food Microbiology* 128, 473-483.
28. Di Cagno, R., Surico, R.F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., De Gara, L., Gobbetti, M., 2008a. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology* 127, 220-228.
29. Ding, T.; Rahman, S.M.E.; Oh, D.H. Inhibitory effects of low concentration electrolyzed water and other sanitizers against foodborne pathogens on oyster mushroom. *Food Control* 2011, 22, 318–322.
30. Elmasser N., Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A., Federighi, M., 2007. Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 58, 813-821.
31. Endrizzi, I., Framondino, V., Ciaghi, R., Gasperi, F., 2006. Towards a new fruit juice line with a high healthy power. *Ingredienti Alimentari* V, 1-7.
32. Fan L., Truelstrup Hansen, L., 2012. Fermentation and biopreservation of plantbased foods with lactic acid bacteria. In: Hui, Y.H. (Ed.), *Handbook of Plantbased Fermented Food and Beverage Technology*, second ed. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 35-48.
33. FAO Statistical Yearbook. Production and trade [on-line], 2009. Dostępne w Internecie: <http://www.fao.org/corp/statistics/en>.
34. Farokhian, F.; Jafarpour, M.; Goli, M.; Askari-Khorasgani, O. Quality Preservation of Air-Dried Sliced Button Mushroom (*Agaricus bisporus*) by Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) Essential Oil. *J. Food Process Eng.* 2017, 40, e12432.
35. FDA. CFR—Code of Federal Regulations Title 21. Part 179: Irradiation in the Production, Processing and Handling of Food. Ultraviolet Radiation for the Processing and Treatment of Food. 21CFR179.39. Available online: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=50.25> (accessed on 7 April 2021).
36. Fernandes, Â.; Antonio, A.L.; Barreira, J.C.M.; Botelho, M.L.; Oliveira, M.B.P.P.; Martins, A.; Ferreira, I.C.F.R. Effects of Gamma Irradiation on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Lactarius deliciosus* L. Wild Edible Mushroom. *Food Bioprocess Technol.* 2013, 6, 2895–2903.
37. Fernandes, Â.; Barreira, J.C.M.; Antonio, A.L.; Santos, P.M.P.; Martins, A.; Oliveira, M.B.P.P.; Ferreira, I.C.F.R. Study of chemical changes and antioxidant activity variation induced by gamma-irradiation on wild mushrooms: Comparative study through principal component analysis. *Food Res. Int.* 2013a, 54, 18–25.
38. Fernandes, Â.; Barreira, J.C.M.; Günaydi, T.; Alkan, H.; Antonio, A.L.; Oliveira, M.B.P.P.; Martins, A.; Ferreira, I.C.F.R. Effect of gamma irradiation and extended storage on selected chemical constituents and antioxidant activities of sliced mushroom. *Food Control* 2017, 72, 328–337.

39. Fresh-market 2023. Eksport i import pieczarek w 2023 r. <https://www.fresh-market.pl/informacje/wiadomosci/eksport-i-import-pieczarek-w-2023-r->
40. Gajewski M., Radzikowska J., Jeznach M., Jariene E., Danilcenko H., 2015. Ocena profilowa i konsumentencka jakości sensorycznej chrupek kukurydzianych z dodatkiem dyni, topinamburu i amarantusa. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, Inżynieria Żywności*, 2, 15-21.
41. Gao, M.; Feng, L.; Jiang, T. Browning inhibition and quality preservation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment. *Food Chem.* 2014, *149*, 107–113.
42. Gebbers, J.O., 2007. Atherosclerosis, cholesterol, nutrition, and statins e a critical review. *German Medical Science* 5, 1-11.
43. Golianek A., Mazurkiewicz-Zapałowicz K. 2016.: GRZYBY W DIECIE CZŁOWIEKA – WARTOŚĆ ODŻYWCZA I PROZDROWOTNA. *Cosmos Problemy Nauk Biologicznych. Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika.* 2016, t. 65, 4(313), 513-522.
44. Gomes, M.R.A.; Ledward, D.A. Effect of high-pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases. *Food Chem.* 1996, *56*, 1–5.
45. Gómez-López, V.M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., Debevere, J., 2005. Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. *International Journal of Food Microbiology* 103, 79-89.
46. Guan, W.; Fan, X.; Yan, R. Effect of combination of ultraviolet light and hydrogen peroxide on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, native microbial loads, and quality of button mushrooms. *Food Control* 2013, *34*, 554–559.
47. Gupta, P.; Bhat, A. Efficacy of Different Washing Treatments on Quality of Button Mushrooms (*A.bisporus*). *J. Food Process. Technol.* 2016, *7*, 590.
48. Han Lyn, F.; Maryam Adilah, Z.A.; Nor-Khaizura, M.A.R.R.; Jamilah, B.; Nur Hanani, Z.A. Application of modified atmosphere and active packaging for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Food Packag. Shelf Life* 2019, *23*, 100451.
49. He, F.J., Nowson, C.A., Lucas, M., MacGregor, G.A., 2007. Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: metaanalysis of cohort studies. *Journal of Human Hypertension* 21, 717-728.
50. <http://www.odzywianie.info.pl/przydatne-informacje/artykuly/art.pieczarki-kalorie-wartosci-odzywcze-i-ciekawostki.html>. 18.10.2016.
51. <http://www.who.int/>; [www.fao.org/](http://www.fao.org/)
52. Jabłońska-Ryś E., Sławińska a., Radzki W., Gustaw W. 2016. Evaluation of the potential use of probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v in lactic fermentation of button mushroom fruiting bodies. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 15(4), 399–407.
53. Jabłońska-Ryś, E., Kalbarczyk, J., Sztaba, A., 2005. Zastosowanie kultur starterowych bakterii mlekowych i propionowych w procesie kwaszenia owocników pieczarki (The use of starter cultures of lactic and propionic acid bacteria in the process of button mushrooms fermentation). Abstracts: 5th Jubilee Scientific Conference, Food quality and safety: determinants of raw materials, technology, manufacturing and legal. 17–18 November, Białobrzegi, Poland, 23–24 (in Polish).
54. Jaworska G., Bernaś E., Cichoń Z., Possinger P., Establishing the optimal period of storage for frozen *Agaricus bisporus*, depending on the preliminary processing applied, *International Journal of Refrigeration* 2008, 31(6), 1042-1050.
55. Jaworska G., Biernacka A., Wybraniec S., Bernaś, E., 2007. Porównanie zawartości witamin B1 i B2 w mrożonkach i sterylizowanych konserwach z bocznika, borowika i pieczarki. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 6, 177- 185.

56. Jiang, T.; Jahangir, M.M.; Jiang, Z.; Lu, X.; Ying, T. Influence of UV-C treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and texture of postharvest shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms during storage. *Postharvest Biol. Technol.* 2010, *56*, 209–215.
57. Jiang, T.; Feng, L.; Zheng, X. Effect of chitosan coating enriched with thyme oil on postharvest quality and shelf life of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J. Agric. Food Chem.* 2012, *60*, 188–196.
58. Jiang, T. Effect of alginate coating on physicochemical and sensory qualities of button mushrooms (*Agaricus bisporus*) under a high oxygen modified atmosphere. *Postharvest Biol. Technol.* 2013, *76*, 91–97.
59. Jiang, T.; Feng, L.; Wang, Y. Effect of alginate/nano-Ag coating on microbial and physicochemical characteristics of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) during cold storage. *Food Chem.* 2013a, *141*, 954–960.
60. Johannessen, G.S.; Loncarevic, S.; Kruse, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *Int. J. Food Microbiol.* 2002, *77*, 199–204.
61. Joshi V.K., Kaur M., Thakur N.S. Lactic acid fermentation of mushroom (*Agaricus bisporus*) for preservation and preparation of sauce. *Acta Aliment.* 1996; *25*:1–11.
62. Kalbarczyk J., Radzki W.: Uprawiane grzyby wyższe jako cenny składnik diety oraz źródło substancji aktywnych. *Herba Polonica*, 2009; *55*(4): 224-232.
63. Karovicová, J., Kohajdová, Z., 2003. Lactic acid fermented vegetable juices. *Horticultural Science* *30*, 152-158.
64. Kerch, G. Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2015, *46*, 159–166.
65. Khan, M.K.; Ahmad, K.; Hassan, S.; Imran, M.; Ahmad, N.; Xu, C. Effect of novel technologies on polyphenols during food processing. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2018, *45*, 361–381.
66. Ko, J.A.; Lee, B.H.; Lee, J.S.; Park, H.J. Effect of UV-B exposure on the concentration of vitamin D2 in sliced shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) and white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *J. Agric. Food Chem.* 2008, *56*, 3671–3674.
67. Koorapati, A.; Foley, D.; Pilling, R.; Prakash, A. Electron-beam Irradiation Preserves the Quality of White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*) Slices. *J. Food Sci.* 2004, *69*, 25–29.
68. Kumar, A.; Singh, M.; Singh, G. Effect of different pretreatments on the quality of mushrooms during solar drying. *J. Food Sci. Technol.* 2013, *50*, 165–170.
69. Lagnika, C.; Zhang, M.; Mothibe, K.J. Effects of ultrasound and high pressure argon on physico-chemical properties of white mushrooms (*Agaricus bisporus*) during postharvest storage. *Postharvest Biol. Technol.* 2013, *82*, 87–94.
70. Lee, H., Yoon, H., Ji, Y., Kim, H., Park, H., Lee, J., 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains from kimchi. *International Journal of Food Microbiology* *145*, 155-161.
71. Lee, N.Y.; Kim, N.H.; Jang, I.S.; Jang, S.H.; Lee, S.H.; Hwang, I.G.; Rhee, M.S. Decontamination efficacy of neutral electrolyzed water to eliminate indigenous flora on a large-scale of cabbage and carrot both in the laboratory and on a real processing line. *Food Res. Int.* 2014, *64*, 234–240.
72. Lentas K., Witrowa-Rajchert D., Hankus M., 2011. Wpływ parametrów blanszowania oraz metody suszenia na właściwości mechaniczne suszonych pieczarek. *Acta Agrophys.* *17*, 359- 368.

73. Lin, Q.; Lu, Y.; Zhang, J.; Liu, W.; Guan, W.; Wang, Z. Effects of high CO<sub>2</sub> in-package treatment on flavor, quality and antioxidant activity of button mushroom (*Agaricus bisporus*) during postharvest storage. *Postharvest Biol. Technol.* 2017, *123*, 112–118.
74. Liu, J.; Chang, M.C.; Meng, J.L.; Liu, J.Y.; Cheng, Y.F.; Feng, C.P. Effect of ozone treatment on the quality and enzyme activity of *Lentinus edodes* during cold storage. *J. Food Process. Preserv.* 2020, *44*, 1–11.
75. Liu, Q.; Cui, X.; Song, Z.; Kong, W.; Kang, Y.; Kong, W.; Ng, T.B. Coating shiitake mushrooms (*Lentinus edodes*) with a polysaccharide from *Oudemansiella radicata* improves product quality and flavor during postharvest storage. *Food Chem.* 2021, *352*, 129357.
76. Ma, L.; Zhang, M.; Bhandari, B.; Gao, Z. Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* 2017, *64*, 23–28.
77. Mahajan, P.V.; Rodrigues, F.A.S.; Motel, A.; Leonhard, A. Development of a moisture absorber for packaging of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Postharvest Biol. Technol.* 2008, *48*, 408–414.
78. Mahajan, P.V.; Oliveira, F.A.R.; Macedo, I. Effect of temperature and humidity on the transpiration rate of the whole mushrooms. *J. Food Eng.* 2008a, *84*, 281–288.
79. Mannozi, C.; Cecchini, J.P.; Tylewicz, U.; Siroli, L.; Patrignani, F.; Lanciotti, R.; Rocculi, P.; Dalla Rosa, M.; Romani, S. Study on the efficacy of edible coatings on quality of blueberry fruits during shelf-life. *LWT Food Sci. Technol.* 2017, *85*, 440–444.
80. Manzi P., Marconi S., Aguzzi A., Pizzoferrato L., 2004. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chem.* 84, 201-206.
81. Matilla P., Salo-Vaananen P., Konko K., Aro H., Jalava T., *Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland*, Journal of Agriculture and Food Chemistry 2002, 50, 6419-6422.
82. Matser, A.M.; Knott, E.R.; Teunissen, P.G.M.; Bartels, P.V. Effects of high isostatic pressure on mushrooms. *J. Food Eng.* 2000, *45*, 11–16.
83. McFeeters, R.F., 2004. Fermentation microorganisms and flavor changes in fermented food. *Journal of Food Science* 69, 35-37.
84. Mishra, B.B.; Gautam, S.; Sharma, A. Free phenolics and polyphenol oxidase (PPO): The factors affecting post-cut browning in eggplant (*Solanum melongena*). *Food Chem.* 2013, *139*, 105–114.
85. Misra, N.N.; Koubaa, M.; Roohinejad, S.; Juliano, P.; Alpas, H.; Inácio, R.S.; Saraiva, J.A.; Barba, F.J. Landmarks in the historical development of twenty first century food processing technologies. *Food Res. Int.* 2017, *97*, 318–339.
86. Nasiri, M.; Barzegar, M.; Sahari, M.A.; Niakousari, M. Tragacanth gum containing *Zataria multiflora* Boiss. essential oil as a natural preservative for storage of button mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Food Hydrocoll.* 2017, *72*, 202–209.
87. Nasiri, M.; Barzegar, M.; Sahari, M.A.; Niakousari, M. Application of Tragacanth gum impregnated with *Satureja khuzistanica* essential oil as a natural coating for enhancement of postharvest quality and shelf life of button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Int. J. Biol. Macromol.* 2018, *106*, 218–226.
88. Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, S., Holzapfel, W.H., 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentation analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* 114, 168-186.
89. Nyanga, L.K., Nout, M.J.R., Gadaga, T.H., Theelen, B., Boekhout, T., Zwietering, M.H., 2007. Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus*

- mauritiana) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology* 120, 159-166.
90. Oms-Oliu, G.; Aguiló-Aguayo, I.; Martín-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, R. Effects of pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of fresh-cut mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Postharvest Biol. Technol.* 2010, 56, 216–222.
  91. Paramithiotis, S., Doulgeraki, A.I., Tsilikidis, I., Nychas, G.-J.E., Drosinos, E.H., 2012. Fate of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* during spontaneous cauliflower fermentation. *Food Control* 27, 178-183.
  92. Pilet M-F., Dousset X., Barré R., Novel G., Desmazeaud M., Piard J-Ch., 1995. Evidence for Two Bacteriocins Produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* Isolated from Fish and Active Against *Listeria monocytogenes*, *Journal of food protection*, Vol. 58, No.3, Pages 256-262.
  93. PN-EN 15787:2009, Pasze. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Lactobacillus spp.*
  94. PN-ISO 11035:1999, Analiza sensoryczna – Identyfikacja i wybór deskryptorów do ustalenia profilu sensorycznego z użyciem metod wielowymiarowych.
  95. PN-ISO 21527-1:2009. Mikrobiologia - Ogólne zasady oznaczania drożdży i pleśni - Metoda płytkowa w 25 stopniach C.
  96. PN-ISO 8589:1998, Analiza sensoryczna – Ogólne wytyczne projektowania pracowni analizy sensorycznej.
  97. Quevedo, R.; Díaz, O.; Valencia, E.; Pedreschi, F.; Bastias, J.M.; Siche, R. Differences Between the Order Model and the Weibull Model in the Modeling of the Enzymatic Browning. *Food Bioprocess Technol.* 2016, 9, 1961–1967.
  98. Rahman, S.; Khan, I.; Oh, D.H. Electrolyzed Water as a Novel Sanitizer in the Food Industry: Current Trends and Future Perspectives. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016, 15, 471–490.
  99. Ranganathan, K.; Subramanian, V.; Shanmugam, N. Effect of Thermal and Nonthermal Processing on Textural Quality of Plant Tissues. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2016, 56, 2665–2694.
  100. Raport końcowy z realizacji projektu celowego o nr. 6 ZR7 2007 C/06871, zatytułowanego: „Opracowanie i wdrożenie technologii kiszonych warzyw i grzybów metodą kontrolowanej fermentacji mlekowej”. IBPRS, Warszawa, 31.12.2009.
  101. Rhee, S.J., Lee, J.-E., Lee, C.-H., 2011. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microbial Cell Factories* 10, 55-68.
  102. Royse, D.J. A Global Perspective on the High Five: *Agaricus*, *Pleurotus*. In *Proceedings of the International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, New Delhi, India, 19–22 November 2014; pp. 2010–2015.
  103. Sapers, G.M.; Miller, R.L.; Choi, S.W.; Cooke, P.H. Structure and composition of mushrooms as affected by hydrogen peroxide wash. *J. Food Sci.* 1999, 64, 889–892.
  104. Singh, P.; Langowski, H.-C.; Wani, A.A.; Saengerlaub, S. Recent advances in extending the shelf life of fresh *Agaricus* mushrooms: A review. *J. Sci. Food Agric.* 2010, 90, 1393–1402.
  105. Siwulski M., Sobieralski K., Sas-Golak I.: Wartość odżywcza i prozdrowotna grzybów. *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, 1 (92), 16 – 28.
  106. Sławińska, A.; Fornal, E.; Radzki, W.; Skrzypczak, K.; Zalewska-Korona, M.; Michalak-Majewska, M.; Parfieniuk, E.; Stachniuk, A. Study on Vitamin D2 stability in dried mushrooms during drying and storage. *Food Chem.* 2016, 199, 203–209.
  107. Spurr, H.W., 1994. The microbial ecology of fruit and vegetable surfaces, its relationship to postharvest biocontrol. In: Wilson, C., Wisniewski, M. (Eds.), *Biological*

- Control of Postharvest Diseases: Theory and Practice. CRC Press, Boca Raton FL, pp. 11-23.
108. Steinbuch E., 1979. Quality retention of unblanched frozen vegetables by vacuum packing. I. Mushrooms. *J. Food Technol.* 14, 321-323.
  109. Steinkraus, K.H., 1996. Handbook of Indigenous Fermented Foods. Revised and Enlarged, second ed. Marcel Dekker, New York, NY, 776.
  110. Sun, N.K.; Song, K.B. Effect of nonthermal treatment on the molecular properties of mushroom polyphenoloxidase. *J. Food Sci.* 2003, 68, 1639–1643.
  111. Takeshita, K.; Shibato, J.; Sameshima, T.; Fukunaga, S.; Isobe, S.; Arihara, K.; Itoh, M. Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 85, 151–158.
  112. Taofiq, O.; Fernandes, Â.; Barros, L.; Barreiro, M.F.; Ferreira, I.C.F.R. UV-irradiated mushrooms as a source of vitamin D2: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2017, 70, 82–94.
  113. Titus, D., 2008. Smoothies! The Original Smoothies Book. Juice Gallery, Chino Hills, CA, USA.
  114. Trajer M., Dyngus M., 2013. Krajowa produkcja, spożycie oraz promocja owoców i warzyw. *Biul. Inf. Agencji Rynku Rolnego* 3, 14-25.
  115. Verma, A.K.; Shivani, P.C.S.; Kumar, M.; Rani, N. Processing of mushrooms: A viable option to sustain the growing population of the developing countries. *Int. J. Chem. Stud.* 2020, 8, 1416–1423.
  116. Watanabe, T.; Tsuchihashi, N.; Takai, Y.; Tanaka, K.; Suzuki, A. Effects of ozone exposure during cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on chemical components of the fruit bodies. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 1994, 41, 705–708.
  117. Watzl, B., 2008. Smoothies e wellness aus der Flasche? *Ernährungsumschau* 6, 352-353.
  118. Whitaker, J.R. Enzymes: Monitors of food stability and quality. *Trends Food Sci. Technol.* 1991, 2, 94–97.
  119. Wrona, M.; Bentayeb, K.; Nerín, C. A novel active packaging for extending the shelf-life of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Food Control* 2015, 54, 200–207.
  120. Wrzodak A., Korzeniowski M., 2012, Jakość sensoryczna ogórków kwaszonych z owoców traktowanych fungicydami w uprawie polowej. *Nowości Warzywnicze*. 0208-6255. [Nr] 54/55 (2012), s. 5-13.
  121. Xu, Y.; Tian, Y.; Ma, R.; Liu, Q.; Zhang, J. Effect of plasma activated water on the postharvest quality of button mushrooms, *Agaricus bisporus*. *Food Chem.* 2016, 197, 436–444.
  122. Xue, Z.; Hao, J.; Yu, W.; Kou, X. Effects of Processing and Storage Preservation Technologies on Nutritional Quality and Biological Activities of Edible Fungi: A Review. *J. Food Process Eng.* 2017, 40, e12437.
  123. Yang, H.; Yu, X.R.; Qian, D.K.; Liu, L.J.; Qi, X.Y. Effect of high hydrostatic pressure treatment on the quality of *Pleurotus eryngii*. *Mod. Food Sci. Technol.* 2014, 30, 164–169.
  124. Yi, J.; Dong, P.; Ding, G.; Wang, T.-T.; Hu, X.S.; Zhang, Y. Study on effect of high hydrostatic pressure on microbial inactivation and inactivation kinetics in mushroom. *Sci. Technol. Food Ind.* 2012, 9, 78–81.
  125. Yi, J.; Jiang, B.; Zhang, Z.; Liao, X.; Zhang, Y.; Hu, X. Effect of ultrahigh hydrostatic pressure on the activity and structure of mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.* 2012a, 60, 593–598.
  126. Zagórska K.: Jak przechowywać pieczarki aby zachowały wartość handlową? [www.sadyogrody.pl](http://www.sadyogrody.pl), 05 listopada 2015.

127. Zalewska, M.; Górską-Horczyzak, E.; Marcinkowska-Lesiak, M. Effect of Applied Ozone Dose, Time of Ozonization, and Storage Time on Selected Physicochemical Characteristics of Mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Agriculture* 2021, *11*, 748.
128. Zhang, D.L., Hamazu, Y., 2004. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry* 88, 503-509.
129. Zhang, K.; Pu, Y.Y.; Sun, D.W. Recent advances in quality preservation of postharvest mushrooms (*Agaricus bisporus*): A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2018, *78*, 72–82.
130. Zhu, D.; Guo, R.; Li, W.; Song, J.; Cheng, F. Improved Postharvest Preservation Effects of *Pholiota nameko* Mushroom by Sodium Alginate–Based Edible Composite Coating. *Food Bioprocess Technol.* 2019, *12*, 587–598.
131. Zia-ur-Rehman, Z., Islam, M., Shah, W.H., 2003. Effect of microwave and conventional cooking on insoluble dietary fibre components of vegetables. *Food Chemistry* 80, 237-240.