ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2502
https://elibrary.ru/VWVPWF

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Ферменты биомассы мицелия грибов *Cordyceps militaris* и *Lentinula edodes* в технологии хлеба

Д. В. Минаков[1], С. И. Конева[2], Е. Ю. Егорова[2,*]

[1] *Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия*

[2] *Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова, Барнаул, Россия*

Поступила в редакцию: 28.08.2023
Принята после рецензирования: 26.09.2023
Принята к публикации: 03.10.2023

**Е. Ю. Егорова: egorovaeyu@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-4990-943X*
Д. В. Минаков: https://orcid.org/0000-0002-4286-7783
С. И. Конева: https://orcid.org/0000-0002-6727-5979

© Д. В. Минаков, С. И. Конева, Е. Ю. Егорова, 2024

Аннотация.
Грибы видов *Cordyceps militaris* и *Lentinula edodes* известны своей внеклеточной протеолитической, амилолитической и лакказной активностями, важными для хлебопечения. Цель работы заключалась в исследовании влияния ферментов грибов *C. militaris* и *L. edodes* на характеристики мучных смесей, связанные с активностью ферментов амилолитического и протеолитического действия, а также на качество и выход выпеченных мучных изделий.
Объектами исследования выступили штаммы грибов *C. militaris* SRG4 и *L. edodes* 3790; порошок биомассы мицелия грибов на стерильном зерновом субстрате (рис и пшеница); смеси пшеничной хлебопекарной муки с порошком биомассы мицелия грибов; образцы хлеба из экспериментальных мучных смесей. Использовали стандартные и отраслевые методы контроля сырья и продукции хлебопекарного производства.
Установили, что биомассу мицелия грибов *C. militaris* и *L. edodes* можно рассматривать как дополнительный хлебопекарный ингредиент благодаря наличию ферментов гидролитического действия, содержанию белка (32,2 ± 1,5 и 26,4 ± 2,0 % соответственно), специфичных полисахаридов (36,7 ± 0,8 и 52,2 ± 1,2 % соответственно) и каротиноидов (1600 ± 40 мкг/г биомассы *C. militaris*). Наличие в мицелии грибов активных амилаз и протеиназ обеспечило повышение сахарообразующей способности, снижение числа падения мучных смесей и увеличение количества отмываемой клейковины при уменьшении упругости, а также приемлемые структуру и вязкость теста при добавлении 1–4 % порошка биомассы мицелия. Выпечка изделий с такой дозировкой обеспечила получение хлеба стандартного качества. С увеличением дозировки отметили потемнение мякиша и повышение его влажности, снижение удельного объема; у изделий с *C. militaris* выявили нарастание кислотности.
Полученные результаты подтверждают возможность использования в условиях хлебопекарного производства биомассы мицелия грибов *C. militaris* и *L. edodes* (в качестве источника ферментов) вместе с зерновым субстратом. Определение оптимальной дозировки и режимов ведения технологического процесса требуют дополнительных исследований.

Ключевые слова. Биотехнология, аскомицеты, базидиомицеты, *Cordyceps militaris*, *Lentinula edodes*, активность ферментов, хлеб, тесто, сахаробразующая способность, клейковина, качество

Для цитирования: Минаков Д. В., Конева С. И., Егорова Е. Ю. Ферменты биомассы мицелия грибов *Cordyceps militaris* и *Lentinula edodes* в технологии хлеба // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 2. С. 222–235. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2502

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2502
https://elibrary.ru/VWVPWF

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Mycelial Biomass Enzymes of *Cordyceps militaris* and *Lentinula edodes* in Baking Technology

Denis V. Minakov[1], Svetlana I. Koneva[2], Elena Yu. Egorova[2,*]

[1] *Altai State University, Barnaul, Russia*

[2] *Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russia*

Received: 28.08.2023
Revised: 26.09.2023
Accepted: 03.10.2023

**Elena Yu. Egorova: egorovaeyu@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-4990-943X*
Denis V. Minakov: https://orcid.org/0000-0002-4286-7783
Svetlana I. Koneva: https://orcid.org/0000-0002-6727-5979

© D.V. Minakov, S.I. Koneva, E.Yu. Egorova, 2024

Abstract.
Cordyceps militaris and *Lentinula edodes* are known for their high extracellular proteolytic, amylolytic, and laccase activity, which is important for bakery production. This article describes the effect of enzymes obtained from mycelial biomass of *C. militaris* and *L. edodes* on such properties of flour mixes as amylolytic and proteolytic enzymic activity during baking, technological costs, and bread quality.
The research featured strains of *C. militaris* SRG4 and *L. edodes* 3790 fungi; mycelial biomass powder of these fungi on a sterile grain substrate (rice, wheat); experimental flour mixes of wheat bread and first-grade baking flour with mycelial biomass powder; bread made from the experimental flour mixes. The experimental part included standard methods used in the bakery industry.
The mycelial biomass of *C. militaris* and *L. edodes* fungi proved to be a promising baking additive because it possessed hydrolytic enzymes and was rich in protein substances (32.2 ± 1.5 and 26.4 ± 2.0%, respectively), specific mushroom polysaccharides (36.7 ± 0.8 and 52.2 ± 1.2%, respectively), and carotenoids (1600 ± 40 mcg/g of *C. militaris* biomass). The active amylases and proteinases in the mycelial biomass powder improved the sugar-forming ability and reduced the falling number. In addition, they raised the amount of washed gluten with a slight decrease in elasticity, as well as provided an acceptable structure and viscosity of the dough at 1–4% of mycelial biomass powder. This dose resulted in an optimal bread formulation of standard quality. A bigger amount caused the crumb to darken and increased its humidity while reducing the specific volume. The bread samples with *C. militaris* were too acid.
Mycelial biomass of *C. militaris* and *L. edodes* proved to be a good source of enzymes to be used with grain substrates in bakery production. Further research is needed to define the optimal dose and processing modes.

Keywords. Biotechnologies, ascomycetes, basidiomycetes, *Cordyceps militaris*, *Lentinula edode*s, enzyme activity, bread, dough, sugar-forming ability, gluten, quality

For citation: Minakov DV, Koneva SI, Egorova EYu. Mycelial Biomass Enzymes of *Cordyceps militaris* and *Lentinula edodes* in Baking Technology. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(2):222–235. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2502

Введение

Высшие грибы отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota* в различных сферах мирового промышленного производства используются не очень активно, найдя основное применение в кулинарии и производстве консервов, шире (с учетом перечня востребованных видов) – в производстве продукции фармацевтического назначения и технологиях биоконверсии [1–4]. Несмотря на то что многие из базидиомицетов продуцируют важные для различных биотехнологических процессов внеклеточные ферменты, относящиеся к классам оксидаз и гидролаз (карбогидразы, лакказы, амилазы и протеазы) и предназначенные для окисления, деполимеризации и более глубокого расщепления компонентов субстрата во время культивирования, в 80 % примеров используются плодовые тела, в 15 % случаев в ход идут экстракты из биомассы мицелия. Примеры целевой переработки субстрата или культуральной жидкости после выращивания грибов единичны [2, 5–7]. В процессе культивирования мицелий грибов выделяет в субстрат не только ферменты, но и специфичные биологически активные метаболиты – стерины, органические кислоты и др., которые представляют интерес для пищевой промышленности [4, 8].

Определенную ценность для переработки могут иметь сами компоненты питательной среды. Например, введенные витамины [9].

Основные углеводные составляющие субстратов, применяемых для культивирования высших грибов в промышленном масштабе, – это увлажненные древесина или древесные опилки, солома злаковых, лузга масличных и лигноцеллюлозные шроты растительного сырья. Наиболее эффективными считаются низколигнифицированные субстраты [4, 10]. При коммерческом производстве кордицепса военного (*Cordyceps militaris*) в качестве субстрата для культивирования используются зерна злаков – пшеницы, риса, кукурузы и проса, а также кукурузные початки [11]. Состав субстрата значительно влияет не только на продуктивность (урожай плодовых тел грибов), но и на состав и выход биологически активных веществ и синтез мицелием специфичных ароматических компонентов [12–14].

В период роста мицелия выделяют две фазы накопления ферментов. Первая фаза сопровождается активным синтезом преимущественно карбогидраз, необходимых для деполимеризации полисахаридов субстрата. Эта фаза продолжается от 1 до 3 недель роста мицелия. Вторая фаза начинается ко времени формирования плодовых тел грибов. Для каждого биологического вида характерен свой временной интервал второй фазы. В этот период гриб вырабатывает ферменты более широкого и специфичного перечня, необходимые как для дальнейшего расщепления субстрата, так и для синтеза-преобразования биохимических компонентов, входящих в состав самого мицелия и плодовых тел [4, 6]. Для шиитаке (*Lentinula edodes*) на ранних стадиях адаптации к субстрату характерна пониженная активность гидролитических ферментов. Активная фаза выработки ферментов наблюдается примерно через 7 суток от начала выращивавания и замедляется с началом снижения метаболической активности мицелия, которое соответствует завершению процесса образования плодовых тел [10]. Более высокая активность гидролитических ферментов – амилазы, пектиназы, ферментов деградации клеточной стенки грибов (β-1,3-глюканазы, β-1,6-глюканазы и хитиназы) и лакказ – выявлена в глубинной части субстрата после его полной колонизации мицелием шиитаке, т. е. на 10–25 сутки в зависимости от состава субстрата [15–17].

Вид *C. militaris* менее требователен к составу субстрата. Его мицелий полностью колонизирует субстрат на 4–7 сутки с момента посева. Высокое содержание в зернах злаков крахмала, как и наличие белка, способствует более интенсивному и эффективному росту мицелия и образованию стром – плодовых тел [11]. Для грибов рода *Cordyceps* характерна высокая внеклеточная амилолитическая активность – «мгновенная», проявляющаяся с момента посева мицелия. У видов *C. militaris* и *L. edodes* обнаружена высокая внеклеточная протеолитическая активность, проявляющаяся уже на 4–7-е сутки развития мицелия. Интенсивная продукция внеклеточных протеиназ мицелием *C. militaris* объясняется активным участием этих ферментов в патогенезе насекомых – одном из основных природных субстратов для этого гриба [18]. *L. edodes* относится также к продуцентам амилаз и наиболее активным продуцентам лакказ (в том числе во внеклеточной среде) и тирозиназ [6, 7, 13, 15–17]. Особенность ферментных комплексов грибов родов *Cordyceps* и *Lentinula* – наличие высокоактивных гидролаз (амилаз и пептидаз) и широко используемых в пищевых биотехнологиях лакказ [19–21] – обуславливает целесообразность исследований возможного влияния ферментов грибного мицелия на активность ферментативных процессов, которые определяют качество продукции в условиях хлебопекарного производства.

К настоящему времени в направлении исследований по использованию высших грибов в хлебопечении имеются некоторые наработки. Есть информация о взаимосвязи стабильности теста с биохимическим составом высших грибов, что связывается с наличием в мицелии специфичных пищевых волокон – бета-глюканов и ферментов протеолитического действия [22–27]. Именно с химическим составом грибов и активностью ферментов связывается снижение стабильности, водопоглощения и модуля упругости пшеничного теста, скорости желатинизации и ретроградации крахмала при введении измельченной сухой, не стерилизованной биомассы высших грибов [28, 29]. В условиях хлебопекарного производства использование рассматриваемых подклассов ферментов как технологических добавок-улучшителей целесообразно при необходимости работы с мукой с пониженной ферментативной активностью. Хлеб с добавлением биомассы грибного мицелия отличается более выраженной интенсивностью вкуса и аромата, обеспеченной внесением с мицелием грибного эрготионина и γ-аминомасляной кислоты, и имеет более интенсивный цвет корок и мякиша, обусловленный ароматическими аминокислотами и полифенолами грибов [30–33].

Обзор научной литературы выявил дефицит информации об использовании в пищевых биотехнологиях ферментов высших грибов и совместном применении ферментов грибной биомассы с субстратом без предварительного выделения, поскольку процесс выделения и очистки ферментов из биомассы высших грибов отличается сложностью или невозможностью реализации [2, 7, 34]. Нет информации о взаимосвязи качества выпеченного хлеба и применения биомассы грибного мицелия вместе с субстратом. Выращенная в искусственных условиях чистая биомасса мицелия съедобных высших грибов не имеет ограничений к использованию в хлебопекарном производстве по микробиологическим и гигиеническим показателям безопасности. Таким же образом можно рассматривать возможность использования субстрата в случаях, когда в этом качестве используется зерно продовольственного качества.

Целью работы стало исследование влияния ферментов биомассы мицелия грибов *C. militaris* и *L. edodes* на активность основных ферментативных процессов в мучных смесях и качество хлеба. Оба вида грибов относятся к съедобным, они успешно культивируются и отличаются не только активной выработкой внеклеточных ферментов, но и синтезом веществ с подтвержденными антиоксидантными свойствами – полифенолов, каротиноидов, эрготанина и др.

Объекты и методы исследования

Объектами исследований на разных этапах работы выступали (рис. 1):

– штаммы грибов *Cordyceps militaris* SRG4 и *Lentinula edodes* 3790 из коллекции кафедры органической химии Алтайского государственного университета;
– порошок биомассы мицелия грибов *C. militaris*, выращенной на зерне красного и бурого риса; дисперсность порошка 0,02–0,10 мм;
– порошок биомассы мицелия грибов *L. edodes*, выращенной на зерне мягкой пшеницы; дисперсность порошка 0,02–0,10 мм;
– экспериментальные мучные смеси на основе муки пшеничной хлебопекарной первого сорта ТМ «Алейка» с добавлением порошка биомассы мицелия грибов *C. militaris* (в дозировке 0–5 % по массе) и *L. edodes* (в дозировке 0–7 % по массе). Количество порошка биомассы мицелия грибов в мучных смесях ограничено с учетом литературных данных о влиянии биомассы некоторых высших грибов на свойства теста и качество мучной продукции, в том числе из-за возможности чрезмерного нарушения структуры клейковины [24, 25, 35];
– образцы хлеба, полученные из экспериментальных мучных смесей.

Посевной мицелий выращивали в стерильной жидкой питательной среде, которая состояла из неохмеленного пшеничного солодового экстракта и дистиллированной воды в соотношении 1:20. Продолжительность культивирования мицелия на зерновом субстрате для каждого вида грибов выбрана с учетом литературных данных о взаимосвязи продолжительности культивирования и активности выработки мицелием внеклеточных ферментов.

Биомассу мицелия нарабатывали методом твердофазного культивирования на зерновой среде в стеклобанках объемом 1 дм^3, оснащенных крышками из полипропилена со фторопластовым фильтром МФФК-1Г (размер пор 0,22 мкм) и инокуляционным портом из резиновой пробки. Зерновой субстрат для культивирования мицелия *C. militaris* готовили следующим образом: 60 г красного или бурого риса (в расчете на банку вместимостью 1 дм^3) промывали водопроводной водой до прозрачных промывных вод. Затем рис отваривали в течение 10 мин при температуре 80 °C и отделяли от остатков воды фильтрованием через сито с последующей естественной сушкой на воздухе. Готовый рис распределяли по банкам, закрывали полипропиленовыми крышками и стерилизовали в автоклаве ВК-75 при 0,07 МПа в течение 45 мин. После остывания банок до температуры 25 ± 1 °C производили засев зерновой среды жидким мицелием.

Культивирование мицелия *C. militaris* осуществляли в термостате при температуре 26 °C в течение 7 суток до полного зарастания зернового субстрата мицелием. После этого мицелий переносили в климатическую камеру, оснащенную кондиционером для поддержания температуры 16 °C и люминисцентными лампами (Philips TL-D 36W/54-765) освещенностью 1000 лк (12 ч в сутки, автоматический электронный таймер IP20 EL-03 Robiton). Процесс культивирования прекращали на 55-е сутки после изменения цвета мицелия с белого на ярко-оранжевый и образования ярко-оранжевых стром (плодовых тел).

В качестве зернового субстрата для культивирования мицелия *L. edodes* использовали мягкую пшеницу, отваренную на медленном огне до состояния размягченных неразрушенных зерен с последующим смешиванием (из расчета на банку объемом 1 дм^3) 250 г отваренного зерна с 0,75 г гипса ($CaSO_4 \times 2H_2O$) и 3 г пищевого мела ($CaCO_3$). Субстрат распределяли по банкам и

a b c

Рисунок 1. Порошок биомассы мицелия грибов: a – *Cordyceps militaris*, выращенной на субстрате из зерна бурого риса; b – *Cordyceps militaris*, выращенной на субстрате из зерна красного риса; c – *Lentinula edodes*, выращенной на субстрате из зерна пшеницы

Figure 1. Biomass powder of mushroom mycelium grown on different substrates: a – *Cordyceps militaris* grown on brown rice; b – *Cordyceps militaris* grown on red rice; c – *Lentinula edodes* grown on wheat

стерилизовали в автоклаве ВК-75 при 0,1 МПа в течение 60 мин. После остывания банок до температуры 25 ± 1 °С производили засев зерновой среды жидким мицелием. Культивирование мицелия *L. edodes* вели в термостате при температуре 26 °С в темноте в течение 20 суток до полного зарастания зернового субстрата мицелием гриба.

После культивирования биомассу мицелия используемых штаммов грибов высушивали в течение 24 ч в лабораторном сушильном шкафу (ES-4620 Экрос) при 40 °С. Для получения порошка высушенный мицелий измельчали на кофемолке (Bosch TSM 6A013B) до размера частиц 0,02–0,10 мм. Субстрат (зерно риса, пшеницы) не отделяли от мицелия перед измельчением.

Определение количества белка в измельченной сухой биомассе мицелия проводили колориметрически по методу Брэдфорда; количественное содержание полисахаридов – спектрофотометрическим методом с пикриновой кислотой; определение суммы каротиноидов – спектрофотометрическим методом, описанным в [36]; массовую долю «свободных» липидов – экстракционно-весовым методом с экстракцией в аппарате Сокслета. Влажность порошка биомассы мицелия грибов устанавливали по ГОСТ 13586.5-2015, зольность – по ГОСТ 10847-2019.

Исследование влияния биомассы мицелия грибов на сахаробразующую способность (свойство, отображающее активность ферментов амилолитического действия), число падения (суммарная активность ферментов) и изменение свойств клейковинного комплекса (влияние протеолитических ферментов грибного мицелия) изучали по принятым в хлебопекарной отрасли методикам. При изучении углеводно-амилазного комплекса мучных смесей использовали методику, изложенную в ГОСТ 27676-88 и основанную на определении времени свободного падения шток-мешалки в клейстеризованной водно-мучной суспензии. Сахарообразующую способность мучных смесей, характеризующую возможность образовывать резерв остаточных сахаров, необходимых для обеспечения процесса расстойки и получения хлеба нормального качества, рассчитывали по количеству мальтозы (мг), образующейся из 10 г муки за 1 ч настаивания с 50 см^3 воды при температуре 27 °С. Состояние белково-протеиназного комплекса мучных смесей оценивали по количеству и качеству сырой клейковины. Клейковину отмывали ручным способом по ГОСТ 27839-2013. Качество клейковины оценивали путем измерения ее упруго-эластичных свойств на приборе ИДК-1М.

Замес теста осуществляли в тестомесилке лабораторной тестомесильной машины У1-ЕТВ. В качестве базовой рецептуры использовали унифицированную рецептуру хлеба из пшеничной муки первого сорта [37]. Контрольные образцы хлеба выпекали без внесения порошка мицелия высших грибов. Тестовые заготовки формовали ручным способом. Выпечку хлеба проводили в лабораторной хлебопекарной печи конвекционного типа UNOX XB 693 (UNOX, Италия) при температуре 200 °С в течение 30–35 мин. Основные технологические параметры процесса приготовления хлеба с добавлением и без добавления порошка мицелия (продолжительность замеса, температуру и продолжительность выпечки) не меняли.

Определение органолептических показателей выпеченных образцов проводили по методикам ГОСТ 5667-2022. Влажность мякиша хлеба анализировали по ГОСТ 21094-2022, его кислотность – по ГОСТ 5670-96, пористость – по ГОСТ 5669-96, удельный объем хлеба – по ГОСТ 27669-88.

Расчет основных технологических затрат и выхода хлеба осуществляли по методикам, принятым в хлебопекарной отрасли.

Все исследования реализовали в 3-кратной повторности. Результаты обработали с использованием программного приложения Microsoft Office Excel.

Результаты и их обсуждение

Биохимический состав биомассы мицелия грибов. В таблице 1 приведены результаты лабораторных исследований, которые характеризуют содержание значимых компонентов химического состава в биомассе мицелия грибов *Cordyceps militaris* и *Lentinula edodes*, выращенных на зерновых субстратах из бурого риса и мягкой пшеницы соответственно.

Таблица 1. Химический состав биомассы мицелия грибов *Cordyceps militaris* и *Lentinula edodes*, выращенной на зерновых субстратах

Table 1. Chemical composition of mycelial biomass of *Cordyceps militaris* and *Lentinula edodes* grown on grain substrates

Компоненты	Содержание компонента в биомассе мицелия грибов	
	Cordyceps militaris	*Lentinula edodes*
Вода, %	13,5 ± 1,2	13,2 ± 1,0
Белок, %	32,2 ± 1,5	26,4 ± 2,0
Липиды, %	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2
Полисахариды, %	36,7 ± 0,8	52,2 ± 1,2
Моно- и дисахариды, %	9,8 ± 0,6	6,1 ± 0,5
Зола, %	5,6 ± 0,2	3,2 ± 0,2
Сумма каротиноидов, мкг/г	1600 ± 40	–

Согласно результатам биохимического анализа для исследуемого порошка биомассы мицелия *C. militaris* характерно более высокое содержание белковых веществ (32,2 % против 26,4 % в мицелии *L. edodes*), что коррелирует с литературными данными (до 36–39 и 26–28 % соответственно). Белки *C. militaris* и *L. edodes* характеризуются повышенным содержанием лизина [38, 39], что важно при оценке влияния грибных белков на усвояемость лимитированных по лизину белков пшеничной муки и готовых мучных изделий. В мицелии культивируемых грибов накапливается больше ароматических аминокислот, чем у выросших в природных условиях [40]. Это может иметь значение при формировании окраски корочки хлеба.

Содержание суммы полисахаридов в мицелии *C. militaris* и *L. edodes* составило 36,7 и 52,2 % соответственно. Высокое содержание полисахаридов в исследуемых порошках биомассы грибов отчасти обусловлено высоким исходным содержанием крахмала в зерновых субстратах (зерна риса и пшеницы), не гидролизуемым полностью внеклеточными ферментами, выделяемыми мицелием грибов. При этом низкое содержание белка в рисе не способствует активному накоплению в мицелии *C. militaris* специфичного биологически активного компонента кордицепина [41]. Для его синтеза необходимо наличие в субстрате достаточных количеств белкового азота и олеиновой кислоты, а также более высокая температура культивирования [42, 43]. Безопасность этого вещества при потреблении в пищу животными и человеком доказана [44–46]. Однако в нашем эксперименте значимые концентрации кордицепина в биомассе мицелия *C. militaris* не нужны, поскольку они могут влиять на дрожжевые клетки при созревании теста и исказить результаты лабораторной выпечки [47].

Исследуемые виды грибов характеризуются пониженной способностью к синтезу основных классов липидов. Однако биологическая ценность извлекаемых липидов обусловлена наличием значимых количеств линолевой и линоленовой кислот, каротиноидов и стеринов [48–50]. По данным лабораторного анализа, содержание общих липидов в биомассе мицелия грибов *C. militaris* и *L. edodes* составило 1,6 и 1,8 % соответственно. В биомассе мицелия *C. militaris* установлено высокое содержание каротиноидов – 1600 мкг/г, в то время как в биомассе мицелия *L. edodes* их не выявлено. Это можно объяснить как спецификой принятых условий культивирования, так и принадлежностью используемых видов грибов к разным систематическим отделам. Известно, что в условиях освещенности мицелий разных штаммов грибов *C. militaris* способен синтезировать от 600–1200 до 3700–6600 мкг каротиноидов на 1 г сухой биомассы, включая специфичные водорастворимые ксантофиллы; в плодовых телах современных гибридных штаммов *C. militaris* – до 13 мг/г и более [51–54]. Для мицелия *L. edodes* к наиболее предпочтительным условиям твердофазного культивирования относится отсутствие света [55], чем можно объяснить неспособность мицелия этого гриба накапливать каротиноиды, синтезирующиеся у *L. edodes* только в плодовых телах и в менее значимых количествах.

Сумма минеральных веществ в составе мицелия грибов *C. militaris* и *L. edodes* составила 5,6 и 3,2 % соответственно. При выращивании мицелия обоих видов грибов компоненты субстрата были утилизированы в значительной степени, именно об этом свидетельствуют приведенные в таблице 1 данные биохимического анализа мицелиальной биомассы грибов с субстратом и их сопоставление с ранее опубликованными данными о биохимическом составе мицелия некоторых штаммов этих видов грибов, выращенных в искусственных условиях [38, 39, 48, 49].

С учетом полученных данных о биохимическом составе выращенный на зерновом субстрате мицелий грибов *C. militaris* и *L. edodes* представляет собой ценность в качестве дополнительного ингредиента для хлебопекарного производства.

Влияние биомассы мицелия грибов на активность ферментативных процессов в мучных смесях. При введении в тесто измельченного воздушно-сухого мицелия грибов *C. militaris* и *L. edodes* пищевая ценность мучных изделий повышается по таким показателям, как содержание общего белка, минеральных веществ, полифенольных веществ и некоторых витаминов [31, 35]. Внесение любых высших грибов в тесто составляет не более 3–7 %, что связано либо с существенным ухудшением технологических свойств муки и теста, либо с неприемлемым изменением органолептических свойств выпечки, либо по обеим из указанных причин [24, 25, 35].

В нашем случае введение в пшеничное тесто порошка биомассы мицелия грибов *C. militaris* и *L. edodes*, ферментные комплексы которых отличаются наличием высокоактивных гидролаз, по всем вариантам дозировки способствовало интенсификации гидролиза полисахаридов. Об этом свидетельствуют значения сахарообразующей способности и числа падения, соответственно, возрастающие или снижающиеся с увеличением дозировки порошка биомассы мицелия грибов (табл. 2). Обнаруженную закономерность можно объяснить тем, что при одновременном воздействии амилаз муки и порошка мицелия грибов на частично деполимеризованный крахмал муки накопление мальтозы происходит более активно и может отразиться на скорости брожения теста, поскольку при созревании теста именно продукты гидролиза мальтозы служат субстратом для дрожжевых клеток.

Известно, что использование в качестве субстрата высококрахмалистого сырья сопровождается значительным снижением протеолитической активности *C. militaris* [18]. Однако этим можно объяснить усиленную выработку ферментов амилолитического действия при культивировании мицелия данного гриба

Таблица 2. Влияние порошка *Cordyceps militaris* и *Lentinula edodes* на сахаробразующую способность и клейковину мучной смеси

Table 2. Effect of *Cordyceps militaris* and *Lentinula edodes* powders on sugar-forming ability and gluten content of flour mixes

Наименование показателя	Значение показателя при дозировке грибного порошка, %													
	Cordyceps militaris (субстрат – бурый рис)						*Lentinula edodes* (субстрат – мягкая пшеница)							
	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	6	7
Сахарообразующая способность, мг мальтозы на 10 г муки	135	189	207	225	279	378	135	144	180	189	186	215	230	252
Число падения, с	310	304	298	286	265	260	310	310	300	302	296	290	289	280
Количество клейковины, %	30,0	30,0	31,0	31,0	32,0	32,0	30,0	30,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	32,0
Качество клейковины, ед. ИДК	60	65	65	75	80	80	60	60	65	72	75	75	75	75

на зерновом субстрате. Активное гидролитическое воздействие ферментов мицелия грибов *C. militaris* и *L. edodes* на структуру крахмальных гранул муки подтверждается снижением значения числа падения мучных смесей от 310 на контроле (пшеничная хлебопекарная мука первого сорта) до 260–280 с.

Протеиназы внесенной в мучные смеси биомассы мицелия грибов *C. militaris* и *L. edodes* повлияли на белковую фракцию муки, вызвав активный протеолиз белковых веществ муки, дезагрегирующее действие которого нарушило пространственную структуру белка и изменило качество клейковины. Как следствие, отметили снижение упругости клейковины, обусловленное образованием продуктов денатурации белка: с 60 ед. ИДК на контроле до 75–80 ед. ИДК по вариантам внесения порошка биомассы мицелия грибов.

Выявленные эффекты можно объяснить присутствием в биомассе мицелия высших грибов и трипсиноподобных протеиназ и пептидаз, обеспечивающих частичный гидролиз клейковины и сопоставимых по проявляемой активности с протеолитическими ферментами низших грибов, обуславливающими изменение пространственной структуры клейковинного белка за счет изменения соотношения вторичных α-спиральных и β-листовых структур [18, 19, 56]. «Относительно слабо выраженные» гидролитические эффекты протеиназ грибов *C. militaris* и *L. edodes* можно объяснить условиями проведения анализа клейковины (18–20 °C), далекими от оптимальных, в частности для специфичных пептидаз *C. militaris*, активность которых максимально проявляется в диапазоне температур 35–55 °C [19]. Подобный эффект – частичный гидролиз белка, который сопровождается облегчением его расщепления и переваривания животными, – был выявлен при использовании мицелия *L. edodes* для ферментации горохового и рисового белка при подтвержденной безопасности потребления белка, ферментированного мицелием этого гриба, людьми [57, 58].

Влияние биомассы мицелия грибов на качество и выход хлеба. Используемая при проведении эксперимента пшеничная хлебопекарная мука (контроль) отличалась низкими значениями сахарообразующей способности (135 мг мальтозы на 10 г муки) и числа падения (310 с), что дало хлеб (контрольный образец) с бледноокрашенной корочкой. В результате этого возрастание значений сахаробразующей способности и снижение числа падения по вариантам внесения в тесто биомассы мицелия грибов обеспечило более активное протекание процессов созревания теста и расстойки тестовых заготовок, а также реакции меланоидинообразования в процессе выпечки. При смешивании пшеничной муки с порошком биомассы мицелия грибов в исследуемых дозировках влагоудерживающая способность клейковины закономерно увеличивалась, но тесто сохраняло приемлемые структуру и вязкость. Это говорит о сохранении нормальной клейковинной сетки теста.

Хлеб, выпеченный с добавлением 3–4 % порошка биомассы мицелия *C. militaris*, выращенной на субстратах из зерна красного и бурого риса (табл. 3–4), отличался хорошо развитой пористостью, ярко выраженными вкусом и ароматом, имел интенсивно окрашенную корочку. Это связано с более интенсивным накоплением в тесте свободных аминокислот – продуктов гидролиза пшеничного и грибного белка, которые являются пластическим материалом для бродильной микрофлоры и относятся к важным компонентам реакции меланоидинообразования. Полученные результаты согласуются с данными зарубежных авторов о более темном цвете корок и мякиша хлеба из пшеничной муки при введении в мучную смесь грибной биомассы [33]. Это связывается с наличием в грибах полифенольных соединений и более интенсивным протеканием реакций Майяра и карамелизации [33, 35].

Порошок биомассы мицелия грибов *C. militaris*, выращенной на субстратах из зерна красного риса, имел более яркий и насыщенный цвет, обусловленный как цветом самого риса, так и выработкой мицелием гриба специфичных пигментов из классов каротиноидов и полифенолов. Подтвержденное результатами биохимических исследований присутствие в мицелии данных пигментов и интенсивное накопление в тесте выделяемых самим мицелием свободных ароматических аминокислот (тирозина), окисляющихся в

Таблица 3. Влияние биомассы мицелия *Cordyceps militaris*, выращенной на субстрате из зерна бурого риса, на качество хлеба и технологические затраты

Table 3. Effect of mycelial biomass of *Cordyceps militaris* grown on brown rice on bread quality and technological costs

Наименование показателя	Значение показателя при дозировке порошка биомассы мицелия грибов *Cordyceps militaris*				
	0 % (контроль)	1 %	2 %	3 %	4 %
Технологические затраты и выход хлеба					
Затраты на брожение, %	1,8	1,8	1,9	1,9	2,0
Затраты на упек, %	9,7	8,5	8,3	8,2	7,7
Затраты на усыхание, %	1,9	1,9	1,9	2,2	2,5
Выход хлеба, %	139,0	140,0	140,0	141,0	141,0
Физико-химические показатели					
Влажность мякиша, %	44,0	44,0	44,0	44,5	44,5
Кислотность мякиша, град.	2,5	2,5	2,5	3,0	3,5
Пористость мякиша, %	77,0	77,0	75,0	74,0	73,0
Удельный объем, см^3/г	2,5	2,3	2,3	2,2	2,1
Органолептические показатели					
Форма	Правильная, соответствует хлебной форме				
Поверхность	Ровная, без трещин и подрывов				Подрывы на поверхности
Корка	Ровная, тонкая				
Размер пор Равномерность распределения пор Толщина стенок пор	Поры средние Пористость равномерная Тонкостенная				
Состояние мякиша	Эластичный	Достаточно эластичный	Уплотненный		
Цвет мякиша	Светлый	Светлый	Более темный с сероватым оттенком		
Крошковатость	Не крошковатый				
Запах	Свойственный для пшеничного хлеба				Свойственный, с привкусом грибов
Вкус	Свойственный для пшеничного хлеба				Пшеничного хлеба

Таблица 4. Влияние биомассы мицелия *Cordyceps militaris*, выращенной на субстрате из зерна красного риса, на качество хлеба и технологические затраты

Table 4. Effect of mycelial biomass of *Cordyceps militaris* grown on red rice on bread quality and technological costs

Наименование показателя	Значение показателя при дозировке порошка биомассы мицелия грибов *Cordyceps militaris*				
	0 % (контроль)	1 %	2 %	3 %	4 %
Технологические затраты и выход хлеба					
Затраты на брожение, %	1,8	2,0	2,0	2,1	2,2
Затраты на упек, %	9,7	8,5	8,0	7,1	7,1
Затраты на усыхание, %	1,9	2,1	2,3	2,4	2,6
Выход хлеба, %	139,0	140,0	139,0	140,0	141,0
Физико-химические показатели					
Влажность мякиша, %	44,0	44,0	44,0	44,0	44,5
Кислотность мякиша, град.	2,5	2,5	3,0	3,0	3,0
Пористость мякиша, %	77,0	77,0	77,0	76,0	76,0
Удельный объем, см^3/г	2,5	2,4	2,4	2,3	2,3
Органолептические показатели					
Форма	Правильная, соответствует хлебной форме				
Поверхность	Ровная, без трещин и подрывов			Шероховатая, без трещин и подрывов	
Корка	Ровная, тонкая				
Размер пор Равномерность распределения пор Толщина стенок пор	Поры средние Пористость равномерная Тонкостенная				
Состояние мякиша	Эластичный				
Цвет мякиша	Светлый		С кремовым оттенком		С сероватым оттенком
Крошковатость	Не крошковатый				
Запах	Свойственный для пшеничного хлеба				Свойственный, с привкусом грибов
Вкус	Свойственный для пшеничного хлеба				Пшеничного хлеба

1 2 3 4 5 6 7

Рисунок 2. Внешний вид выпеченных изделий в разрезе: 1 – контроль; 2 – 2 % порошка *Cordyceps militaris*, выращенного на субстрате из зерна бурого риса; 3 – 4 % порошка *Cordyceps militaris*, выращенного на субстрате из зерна бурого риса; 4 – 2 % порошка *Cordyceps militaris*, выращенного на субстрате из зерна красного риса; 5 – 4 % порошка *Cordyceps militaris*, выращенного на субстрате из зерна красного риса; 6 – 2 % порошка *Lentinula edodes*; 7 – 4 % порошка *Lentinula edodes*

Figure 2. Cross-sections of bread: 1 – control; 2 – 2% *Cordyceps militaris* powder grown on brown rice; 3 – 4% *Cordyceps militaris* powder grown on brown rice; 4 – 2% *Cordyceps militaris* powder grown on red rice; 5 – 4% *Cordyceps militaris* powder grown on red rice; 6 – 2% *Lentinula edodes* powder; 7 – 4% *Lentinula edodes* powder

процессе тестоприготовления и вступающих в реакцию меланоидинообразования, привело к получению более насыщенных оттенков цвета мякиша, интенсивность которых усиливалась с увеличением дозировки порошка биомассы мицелия *C. militaris* (рис. 2) [40].

С дальнейшим увеличением дозировки порошка биомассы мицелия *C. militaris* (5 % и более) отмечено усиливающееся уплотнение мякиша и снижение его эластичности. Это можно связать с чрезмерным протеолизом белковых веществ и изменением их структуры и биохимических свойств (неограниченным набуханием, пептизацией, переходом в жидкую фазу теста), что сопровождалось уменьшением стабильности, консистенции и упругости теста, увеличением его разжижения и изменением органолептических и физико-химических показателей качества выпеченных изделий.

Пропорционально увеличению дозировки порошка биомассы мицелия *C. militaris* отмечено возрастание кислотности мякиша опытных образцов хлеба (с 2,5 до 3,0–3,5 град., табл. 3–4), обусловленное активизацией молочнокислого брожения на фоне повышенного образования простых сахаров.

Характеристика степени разрыхленности выпеченных изделий показывает, что добавление порошка биомассы мицелия *C. militaris* в дозировке 3–4 % привело к снижению значений пористости мякиша хлеба и удельного объема опытных образцов. Это согласуется с приведенной в научных работах информацией о том, что гидролитическое действие протеиназ высших грибов, при возможном сохранении приемлемой микроструктуры клейковинной сетки теста, отрицательно отражается на объеме, высоте, текстуре и внешнем виде хлеба [27]. Следовательно, несмотря на повышенную сахарообразующую способность экспериментальных мучных смесей и прогнозируемое на основании этого увеличение объема изделий, влияние гидролитических ферментов высших грибов при внесении в мучные смеси в дозировке свыше 1 % является основной причиной уменьшения объема хлеба при сохранении равномерной тонкостенной пористости их мякиша.

Применение порошка биомассы мицелия грибов *L. edodes*, выращенной на зерне мягкой пшеницы, демонстрировало менее значительное влияние на физико-химические показатели качества опытных образцов (табл. 5). В вариантах дозировки порошка мицелия, которые обеспечивают хорошие органолептические показатели (1–4 %, рис. 2), кислотность и пористость мякиша оставались на уровне значения контрольного варианта. Однако при этом также зафиксировано снижение удельного объема хлеба с 2,5 до 2,3 см^3/г. Кремовый оттенок мякиша образца с введением 4 % порошка биомассы мицелия обусловлен менее активным (по сравнению с биомассой мицелия *C. militaris*) продуцированием грибами *L. edodes* ароматических аминокислот, которые участвуют в реакции меланоидинообразования при выпечке мучной продукции [40].

Анализ влияния дозировки порошка биомассы мицелия на технологические затраты и выход хлеба показывает, что добавление порошка биомассы мицелия грибов *C. militaris* обусловило повышение затрат сухих веществ на брожение, характеризующихся расходованием сухих веществ муки (в пересчете на сахар) на спиртовое и молочнокислое брожение. Возрастание значений числа падения за счет наличия в мицелии гриба *C. militaris* высокоактивных гидролаз (амилаз и пептидаз) коррелирует с повышением бродильной активности дрожжей и молочнокислых бактерий на этапе брожения теста.

Таблица 5. Влияние биомассы мицелия *Lentinula edodes*, выращенной на субстрате из зерна пшеницы, на качество хлеба и технологические затраты

Table 5. Effect of *Lentinula edodes* mycelial biomass grown on wheat on bread quality and technological costs

Наименование показателя	Значение показателя при дозировке порошка биомассы мицелия грибов *Lentinula edodes*				
	0 % (контроль)	1 %	2 %	3 %	4 %
Технологические затраты и выход хлеба					
Затраты на брожение, %	1,8	1,8	1,7	1,8	1,8
Затраты на упек, %	9,7	9,7	9,8	10,0	10,2
Затраты на усыхание, %	1,9	1,9	1,8	1,8	1,7
Выход хлеба, %	139,0	141,0	141,0	140,0	140,0
Физико-химические показатели					
Влажность мякиша, %	44,0	44,2	44,5	44,5	44,5
Кислотность мякиша, град.	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Пористость мякиша, %	77,0	77,0	77,0	76,0	76,0
Удельный объем, см^3/г	2,5	2,5	2,4	2,3	2,3
Органолептические показатели					
Форма	Правильная, соответствует хлебной форме				
Поверхность	Ровная, без трещин и подрывов				
Корка	Ровная, тонкая			Ровная, утолщенная	
Размер пор Равномерность распределения пор Толщина стенок пор	Поры средние Достаточно равномерная Тонкостенная		Поры средние Достаточно равномерная Тонкостенная		
Состояние мякиша	Эластичный				
Цвет мякиша	Светлый			С кремовым оттенком	
Крошковатость	Не крошковатый				
Запах	Свойственный для пшеничного хлеба				Свойственный, с привкусом грибов
Вкус	Свойственный для пшеничного хлеба				Пшеничного хлеба

Более интенсивное брожение привело к активному расходованию сахаров, отраженному в показателе «Затраты на брожение». Наиболее значительно возросли затраты сухих веществ на брожение при внесении порошка биомассы мицелия грибов *C. militaris*, выращенной на субстрате из зерна красного риса (с 1,8 до 2,2 %).

Добавление порошка биомассы мицелия грибов *L. edodes* практически не влияет на затраты сухих веществ на брожение, что можно связать с незначительным влиянием ферментов этого гриба на сахарообразующую способность (рост при добавлении 4 % *C. militaris* со 135 до 279 мг мальтозы, при добавлении 4 % *L. dodes* со 135 до 205 мг мальтозы, табл. 2).

Затраты на упек при добавлении порошка биомассы мицелия грибов *C. militaris* уменьшались с 9,7 до 7,1–7,7 % за счет меньшего испарения влаги из опытных образцов и образования более тонкой корочки по сравнению с контрольным образцом. Опытные образцы с добавлением порошка биомассы мицелия грибов *L. edodes* отличались более толстой и плотной корочкой и более высоким упеком (рост до 10,2 % по сравнению с образцами на контроле). Таким образом, расчетное увеличение выхода хлеба на 1–2 % при добавлении порошка биомассы мицелия *C. militaris* обусловлено снижением затрат на упек, при добавлении порошка биомассы мицелия *L. edodes* – снижением затрат на усыхание.

Затраты на усыхание, обусловленные испарением части влаги и легколетучих компонентов в процессе остывания и последующего хранения хлеба, при внесении порошка биомассы мицелия грибов *C. militaris* возросли с 1,9 (контроль) до 2,5–2,6 %. Добавление *L. edodes* за счет более медленного испарения влаги через более плотную и толстую корочку снизило потери на усушку с 1,9 до 1,7 %.

Выводы

В условиях хлебопекарного производства использование биомассы мицелия высших грибов вместе с зерновым субстратом обеспечивает достижение результатов, сопоставимых с результатами применения чистой биомассы мицелия.

В составе мучных смесей гидролитические ферменты мицелия грибов *Cordyceps militaris* и *Lentinula edodes* обеспечивают повышение сахарообразующей способности и снижение числа падения, работают на увеличение количества отмываемой клейковины при незначительном снижении ее упругости. Отмеченные

изменения данных показателей находятся в прямой корреляции с количеством вводимого в мучные смеси порошка биомассы грибного мицелия.

При добавлении порошка биомассы мицелия в дозировке 1–5 % тесто сохраняло приемлемые структуру и вязкость, что говорит о сохранении в нем нормальной клейковинной сетки. Выпечка изделий, сформованных из теста с такой дозировкой порошка биомассы мицелия, обеспечила получение хлеба стандартного качества только в вариантах с дозировкой до 4 %. Изделия с добавлением порошка *L. edodes* в процессе выпечки формировали более плотную и толстую корку. Повышение дозировки порошка биомассы мицелия вызывало увеличение влажности мякиша, ухудшение структуры его пор, выраженное потемнение мякиша и появление несвойственных хлебу характерных привкуса и запаха грибов, что сложно считать приемлемыми качествами для продукции хлебопекарного производства.

Критерии авторства

Исследование было задумано, реализовано, проанализировано и описано авторами коллективно. Рукопись вычитана и принята в представленной версии как окончательной всеми авторами.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

The study was conceived, implemented, analyzed, and described by the authors collectively. All authors read and accepted the final manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Arshadi N, Nouri H, Moghimi H. Increasing the production of the bioactive compounds in medicinal mushrooms: An omics perspective. Microbial Cell Factories. 2023;22:11. https://doi.org/10.1186/s12934-022-02013-x

2. Turlo J. The biotechnology of higher fungi – current state and perspectives. Acta Universitatis Lodziensis. Folia Biologica et Oecologica. 2014;10:49–65. https://doi.org/10.2478/fobio-2014-0010

3. Mayolo-Deloisa K, González-González M, Rito-Palomares M. Laccases in food industry: Bioprocessing, potential industrial and biotechnological applications. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2020;8:222. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00222

4. Berger RG, Ersoy F. Improved foods using enzymes from basidiomycetes. Processes. 2022;10(4):726. https://doi.org/10.3390/pr10040726

5. Gannochka E, Kolesnikov B, Salamahina A, Shamtsyan M. Technology of obtaining milk-clotting enzyme from fungal culture *Funalia* sp. for application in cheese production. 13th Baltic Conference on Food Science and Technology "FOOD. NUTRITION. WELL-BEING"; 2019; Jelgava. Jelgava: LLU, Faculty of Food Technology; 2019. p. 247–249. https://doi.org/10.22616/FoodBalt.2019.036

6. Krupodorova T, Ivanova T, Barshteyn V. Screening of extracellular enzymatic activity of macrofungi. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2014;3(4):315–318.

7. Kumar Chandrawanshi N, Koreti D, Kosre A, Kumar A. Proteolytic enzymes derived from a macro fungus and their industrial application. In: Haider S, Haider A, Catalá A, Surguchov A, editors. Hydrolases. IntechOpen; 2022. https://doi.org/10.5772/intechopen.102385

8. Wang Q, Cao R, Zhang Y, Qi P, Wang L, Fang S. Biosynthesis and regulation of terpenoids from basidiomycetes: Exploration of new research. AMB Express. 2021;11:150. https://doi.org/10.1186/s13568-021-01304-7

9. Minakov DV, Sevodina KV, Shadrintseva AI, Sevodin VP. Influence of vitamins on growth and development of mycelium of some basidiomycetes in liquid medium. Food Processing: Techniques and Technology. 2016;43(4):43–49. (In Russ.). [Влияние витаминов на рост и развитие мицелия некоторых базидиомицетов в жидкой среде / Д. В. Минаков [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2016. Т. 43. № 4. С. 43–49.]. https://elibrary.ru/XELEIT

10. Mata G, Salmones D, Pérez-Merlo R. Hydrolytic enzyme activities in shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) strains cultivated on coffee pulp. Revista Argentina de Microbiología. 2016;48(3):191–195. https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.008

11. Lin Q, Long L, Wu L, Zhang F, Wu S, Zhang W, *et al.* Evaluation of different agricultural wastes for the production of fruiting bodies and bioactive compounds by medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2016;97(10):3476–3480. https://doi.org/10.1002/jsfa.8097

12. Usacheva RV. Physiological and biochemical characteristics of some strains of cultivated fungus Lentinus edodes (Berk. Sing.): Cand. sci. biol. dis. Voronezh: K.D. Glinka Voronezh State Agrarian University; 2003. 126 p. (In Russ.). [Усачева Р. В. Физиолого-биохимические особенности некоторых штаммов культивируемого гриба Lentinus edodes (Berk. Sing.): дис. … канд. биол. наук: 03.00.12. Воронеж, 2003. 126 с.].

13. Elkhateeb WA, El-Ghwas DE, Daba GM. Mushrooms as efficient enzymatic machinery. Journal of Biomedical Research. 2022;3(4):423–428. https://doi.org/10.37871/jbres1460

14. Li W, Chen W-C, Wang J-B, Feng J, Wu D, Zhang Z, *et al.* Effects of enzymatic reaction on the generation of key aroma volatiles in shiitake mushroom at different cultivation substrates. Food Science and Nutrition. 2021;9(4):2247–2256. https://doi.org/10.1002/fsn3.2198

15. Kobayashi N, Wada N, Yokoyama H, Tanaka Y, Suzuki T, Habu N, *et al.* Extracellular enzymes secreted in the mycelial block of *Lentinula edodes* during hyphal growth. AMB Express. 2023;13:36. https://doi.org/10.1186/s13568-023-01547-6

16. Baktemur G, Kara E, Yarar M, Yilmaz N, Ağcam E, Akyildiz A, *et al.* Yield, quality and enzyme activity of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) grown on different agricultural wastes. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 2022;50(1):12553. https://doi.org/10.15835/nbha50112553

17. Sousa MAC, Costa LMAS, Pereira TS, Zied DC, Rinker DL, Dias ES. Enzyme activity and biochemical changes during production of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. Food Science and Technology. 2019;39(3):774–780. https://doi.org/10.1590/fst.38517

18. Semenova TA, Belozersky MA, Belakova GA, Borisov BA, Semenova SA, Dunaevsky YaE. Secreted proteinase of entomopathogenic fungus *Cordyceps militaris*. I. Development of cultivation medium and of purification protocol. Mycology and Phytopathology. 2010;44(6):535–541. (In Russ.). [Секретируемая протеиназа энтомопатогенного гриба *Cordyceps militaris*. I. Подбор состава среды и разработка метода очистки / Т. А. Семенова [и др.] // Микология и фитопатология. 2010. Т. 44. № 6. С. 535–541.]. https://elibrary.ru/OITGBB

19. Semenova TA. Extracellular peptidases of fungi that form biotic connections with insects: Cand. sci. biol. dis. Moscow: Lomonosov Moscow State University; 2011. 130 p. [Семенова Т. А. Внеклеточные пептидазы грибов, образующих биотические связи с насекомыми: дис. … канд. биол. наук: 03.02.12, 03.01.04. М., 2011. 130 с.]. (In Russ.).

20. Shrestha B, Zhang W, Zhang Y, Liu X. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: Research and development. Mycological Progress. 2012;11:599–614. https://doi.org/10.1007/s11557-012-0825-y

21. Drozłowska-Sobieraj E. The use of enzymatic fungal activity in the food industry – Review. World Scientific News. 2019;116:222–229.

22. Frioui M, Gaceu L, Oprea O, Shamtsyan MM. The influence of fungal extract containing beta beta-glucans on the rheological characteristics of dough. Journal of International Academy of Refrigeration. 2018;(3):53–61. (In Russ.). https://doi.org/10.17586/1606-4313-2018-17-3-53-61

23. Chiozzi V, Eliopoulos C, Markou G, Arapoglou D, Agriopoulou S, El Enshasy HA, *et al.* Biotechnological addition of β-glucans from cereals, mushrooms and yeasts in foods and animal feed. Processes. 2021;9(11):1889. https://doi.org/10.3390/pr9111889

24. Nie Y, Zhang P, Deng C, Xu L, Yu M, Yang W, *et al.* Effects of *Pleurotus eryngii* (mushroom) powder and soluble polysaccharide addition on the rheological and microstructural properties of dough. Food Science and Nutrition. 2019;7(6):2113–2122. https://doi.org/10.1002/fsn3.1054

25. Kozubaeva LA, Kuzmina SS, Egorova EYu. Prospects for the use of dried Boletus edulis mushroom in the development of functional bakery products. News of KSTU named after I. Razzakov. 2021;60(4):189–195. (In Kyrgyz.). [Козубаева Л. А., Кузьмина С. С., Егорова Е. Ю. Перспективы использования сушеного гриба Boletus edulis при разработке функциональных хлебобулочных изделий // Известия Кыргызского государственного технического университета им. И. Раззакова. 2021. Т. 60. № 4. С. 189–195.]. https://elibrary.ru/WSNCZL

26. Minakov DV, Kozubaeva LA, Kuzmina SS, Egorova EYu. Features of dough maturation and bread quality formation with *Armillaria mellea* mycelium biomass. Storage and Processing of Farm Products. 2022;(1):145–156. (In Russ.). https://doi.org/10.36107/spfp.2022.297

27. Yuan B, Zhao L, Yang W, McClements DJ, Hu Q. Enrichment of bread with nutraceutical-rich mushrooms: Impact of *Auricularia auricula* (mushroom) flour upon quality attributes of wheat dough and bread. Journal of Food Science. 2017;82(9):2041–2050. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13812

28. Zhang Y, Ruan C, Cheng Z, Zhou Y, Liang J. Mixolab behavior, quality attributes and antioxidant capacity of breads incorporated with *Agaricus bisporus*. Journal of Food Science and Technology. 2019;56:3921–3929. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03859-7

29. Nikolić NC, Krasić MS, Šimurina O, Cakić S, Mitrović J, Pešić M, *et al.* Regression analysis in examination the rheology properties of dough from wheat and *Boletus edulis* flour. Journal of Food Composition and Analysis. 2022;115:105022. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.105022

30. Ulziijargal E, Yang J-H, Lin L-Y, Chen C-P, Mau J-L. Quality of bread supplemented with mushroom mycelia. Food Chemistry. 2013;138(1):70–76. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.051

31. Salehi F. Characterization of different mushrooms powder and its application in bakery products: A review. International Journal of Food Properties. 2019;22(1):1375–1385. https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1650765

32. Vlaic RA, Mureșan CC, Muste S, Muresan V, Pop A. *Boletus edulis* mushroom flour-based wheat bread as innovative fortified bakery product. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology. 2019;76(1):52–62. https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:2018.0022

33. Sławinska A, Sołowiej BG, Radzki W, Fornal E. Wheat bread supplemented with *Agaricus bisporus* powder: Effect on bioactive substances content and technological quality. Foods. 2022;11(23):3786. https://doi.org/10.3390/foods11233786

34. Bentil JA. Biocatalytic potential of basidiomycetes: Relevance, challenges and research interventions in industrial processes. Scientific African. 2021;11:e00717. https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00717

35. Chen C, Han Y, Li S, Wang R, Tao C. Nutritional, antioxidant, and quality characteristics of novel cookies enriched with mushroom (*Cordyceps militaris*) flour. CyTA – Journal of Food. 2021;19(1):137–145. https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1864021

36. Jiaojiao Z, Fen W, Kuanbo L, Qing L, Ying Y, Caihong D. Heat and light stresses affect metabolite production in the fruit body of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2018;102:4523–4533. https://doi.org/10.1007/s00253-018-8899-3

37. State standard bakery formulations. Moscow; 1998. 87 p. (In Russ.). [Сборник рецептур на хлебобулочные изделия, вырабатываемые по государственным стандартам. М., 1998. 87 с.].

38. Chan JSL, Barseghyan GS, Asatiani MD, Wasser SP. Chemical composition and medicinal value of fruiting bodies and submerged cultured mycelia of caterpillar medicinal fungus *Cordyceps militaris* CBS-132098 (ascomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms. 2015;17(7):649–659. https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v17.i7.50

39. Chaipoot S, Wiriyacharee P, Phongphisutthinant R, Buadoktoom S, Srisuwun A, Somjai C, *et al.* Changes in physicochemical characteristics and antioxidant activities of dried shiitake mushroom in dry-moist-heat aging process. Foods. 2023;12(14):2714. https://doi.org/10.3390/foods12142714

40. Wei X, Su Y, Hu H, Li X, Xu R, Liu Y. Quantification of aromatic amino acids in Cordyceps fungi by micellar electrokinetic capillary chromatography. Wuhan University Journal of Natural Sciences. 2019;24:245–250. https://doi.org/10.1007/s11859-019-1393-7

41. Turk A, Kim BS, Ko SM, Yeon SW, Ryu SH, Kim YG, *et al.* Optimization of cultivation and extraction conditions of pupae-*Cordyceps* for cordycepin production. Natural Product Sciences. 2021;27(3):187–192. https://doi.org/10.20307/nps.2021.27.3.187

42. Tao S-X, Xue D, Lu Z-H, Huang H-L. Effects of substrates on the production of fruiting bodies and the bioactive components by different *Cordyceps militaris* strains (ascomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms. 2020;22(1):55–63. https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2019033257

43. Turk A, Abdelhamid MAA, Yeon SW, Ryu SH, Lee S, Ko SM, *et al. Cordyceps* mushroom with increased cordycepin content by the cultivation on edible insects. Frontiers in Microbiology. 2022;13:1017576. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1017576

44. Turk A, Kim MH, Jeong SY, Kim BS, Woo S-I, Lee MK. Quality and composition of eggs laid by hens fed with *Cordyceps militaris*-supplemented feed. Journal of Mushrooms. 2022;20(4):254–257. https://doi.org/10.14480/JM.2022.20.4.254

45. Elkhateeb WA, Daba G. Review: The endless nutritional and pharmaceutical benefits of the Himalayan gold, *Cordyceps*; Current knowledge and prospective potentials. Asian Journal of Natural Product Biochemistry. 2020;18(2):74–81. https://doi.org/10.13057/biofar/f180204

46. Ashraf SA, Elkhalifa AEO, Siddiqui AJ, Patel M, Awadelkareem AM, Mejdi S, *et al.* Cordycepin for health and wellbeing: A potent bioactive metabolite of an entomopathogenic medicinal fungus *Cordyceps* with its nutraceutical and therapeutic potential. Molecules. 2020;25(12):2735. https://doi.org/10.3390/molecules25122735

47. Holbein S, Freimoser FM, Werner TP, Wengi A, Dichtl B. Cordycepin-hypersensitive growth links elevated polyphosphate levels to inhibition of poly(A) polymerase in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Research. 2008;36(2):353–363. https://doi.org/10.1093/nar/gkm990

48. Yu C-X, Zhang Y-R, Ren Y-F, Zhao Y, Song X-X, Yang H-L, *et al.* Composition and contents of fatty acids and amino acids in the mycelia of *Lentinula edodes*. Food Science and Nutrition. 2023;11(7):4038–4046. https://doi.org/10.1002/fsn3.3392

49. Nallathamby N, Malek SNA, Vidyadaran S, Phan CW, Sabaratnam V. Lipids in an ethyl acetate fraction of caterpillar medicinal mushroom, *Cordyceps militaris* (ascomycetes), reduce nitric oxide production in BV2 cells via NRF2 and NF-κB pathways. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2020;22(12):1215–1223. https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2020037001

50. Lan L, Wang S, Duan, S, Zhou X, Li Y. *Cordyceps militaris* carotenoids protect human retinal endothelial cells against the oxidative injury and apoptosis resulting from H_2O_2. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2022;2022:1259093. https://doi.org/10.1155/2022/1259093

51. Zheng Q, Wei T, Lin Y, Ye Z-W, Lin J-F, Guo L-Q, *et al.* Developing a novel two-stage process for carotenoid production by *Cordyceps militaris* (ascomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms. 2019;21(1):47–57. https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2018029002

52. Yang Y, Bu N, Wang S, Zhang J, Wang Y, Dong C. Carotenoid production by caterpillar medicinal mushrooms, *Cordyceps militaris* (ascomycetes), under different culture conditions. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2020; 22(12):1191–1201. https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2020036685

53. Zhao Y, Li S-L, Chen H-Y, Zou Y, Zheng Q-W, Guo L-Q, *et al.* Enhancement of carotenoid production and its regulation in edible mushroom *Cordyceps militaris* by abiotic stresses. Enzyme and Microbial Technology. 2021;148:109808. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109808

54. Lin P-J, Ye Z-W, Wei T, Wu J-Y, Zheng Q-W, Chen B-X, *et al.* Cross breeding of novel *Cordyceps militaris* strains with high contents of cordycepin and carotenoid by using *MAT* genes as selectable markers. Scientia Horticulturae. 2021;290:110492. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110492

55. Annepu SK, Sharma VP, Kumar S, Barh A. Cultivation techniques of shiitake (a medicinal mushroom with culinary delight). Chambaghat: ICAR-Directorate of Mushroom Research; 2019. 71 p.

56. Zhao P, Hou Y-C, Wang Z, Liao A-M, Pan L, Zhang J, *et al.* Effect of fermentation on structural properties and antioxidant activity of wheat gluten by *Bacillus subtilis*. Frontiers in Nutrition. 2023;10:1116982. https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1116982

57. Clark AJ, Soni BK, Sharkey B, Acree T, Lavin E, Bailey HM, *et al.* Shiitake mycelium fermentation improves digestibility, nutritional value, flavor and functionality of plant proteins. LWT. 2022;156:113065. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113065

58. Turck D, Bohn T, Castenmiller J, de Henauw S, Hirsch-Ernst KI, Maciuk A, *et al.* Safety of pea and rice protein fermented by Shiitake (*Lentinula edodes*) mycelia as a Novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. EFSA Journal. 2022;20(4):e07205. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7205