

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
W LUBLINIE**

**WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOŚCI I BIOTECHNOLOGII
DYSCYPLINA TECHNOLOGIA ŻYWNOŚCI I ŻYWIENIA**

mgr Magdalena Szydłowska-Tutaj

Rozprawa doktorska

**Jakość odżywcza i prozdrowotna makaronów z pszenicy durum
wzbogaconych suszem z grzybów posiadających
udokumentowany potencjal prozdrowotny**

***Nutritional and health-promoting quality of durum wheat pasta
enriched with dried mushrooms with documented health-
promoting potential***

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Biochemii i Chemii Żywności

Promotor: dr hab. Urszula Złotek profesor uczelni

Promotor pomocniczy: dr Maciej Combrzyński

Opiekun pomocniczy: mgr inż. Marta Czajka

Praca doktorska powstała w ramach finansowania z projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa
Wzszego (DWD/3/58/2019), w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy

Lublin 2023

*Składam serdeczne podziękowania
dr hab. Urszuli Złotek profesor uczelni
za zaufanie, cierpliwość, nieocenioną pomoc i opiekę merytoryczną na każdym etapie
realizacji doktoratu wdrożeniowego*

Niniejszą pracę doktorską dedykuję swoim Rodzicom Zofii i Antoniemu

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 06.03.2023 Podpis promotora Mrszule Ziutek

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/ Promotorów/Promotora pomocniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data 06.03.2023 Podpis autora Szymon Michał Tulej Hapolek

*niepotrzebne skreślić

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

Numer publikacji	Tytuł	Impact Factor (IF)	Punkcja MNiSW (MEiN)
Publikacja I	Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Złotek, Maciej Combrzyński; Influence of addition of mushroom powder to semolina on proximate composition, physicochemical properties and some safety parameters of material for pasta production; 2021, Lwt, 151, 112235, doi 10.1016/j.lwt.2021.112235	6,056	100
	<i>Indywidualny wkład pracy w publikację 70%: Udział w opracowaniu koncepcji pracy, udział w opracowaniu założeń metodycznych, wykonanie analiz laboratoryjnych, opis i interpretacja wyników badań, redagowanie manuskryptu, udział w korekcie po recenzjach.</i>		
Publikacja II	Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Złotek, Agnieszka Wójtowicz; Maciej Combrzyński; The Effect of the Addition of Various Species of Mushrooms on the Physicochemical and Sensory Properties of Semolina Pasta, 2022, Food Funct, 13, 8425–8435, doi.10.1039/d2fo00856d	6,1	100
	<i>Indywidualny wkład pracy w publikację – 60%: Udział w opracowaniu koncepcji pracy, udział w opracowaniu założeń metodycznych, wykonanie analiz laboratoryjnych, opis i interpretacja wyników badań, redagowanie manuskryptu, udział w korekcie po recenzjach.</i>		

Numer publikacji	Tytuł	Impact Factor (IF):	Punktacja MNiSW (MEiN)
Publikacja III	Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Szymanowska, Krzysztof Tutaj, Dorota Domagała, Urszula Złotek; The Addition of Reishi and Lion's Mane Mushroom Powder to Pasta Influences the Content of Bioactive Compounds and the Antioxidant, Potential Anti-Inflammatory, and Anticancer Properties of Pasta; 2023; Antioxidants, 12, 738, doi.org/10.3390/antiox12030738	7.0	140
<i>Indywidualny wkład pracy w publikację – 60%: Udział w opracowaniu koncepcji pracy, udział w opracowaniu założeń metodycznych, wykonanie analiz laboratoryjnych, opis i interpretacja wyników badań, redagowanie manuskryptu, udział w korekcie po recenzjach.</i>			
Publikacja IV	Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Szymanowska, Krzysztof Tutaj, Dorota Domagała, Urszula Złotek, U Influence of Addition of Dried Maitake and Enoki Mushrooms on Antioxidant, Potentially Anti-Inflammatory, and Anti-Cancer Properties of Enriched Pasta, 2023; Applied Science, 13, 8183, doi.org/10.3390/app13148183	2.7	100
<i>Indywidualny wkład pracy w publikację – 60%: Udział w opracowaniu koncepcji pracy, udział w opracowaniu założeń metodycznych, wykonanie analiz laboratoryjnych, opis i interpretacja wyników badań, redagowanie manuskryptu, udział w korekcie po recenzjach.</i>			
SUMA		21.856	440

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE	6
2. SUMMARY	7
3. WSTEP	8
3.1. Makaron jako potencjalny produkt funkcjonalny	9
3.2. Dane rynkowe dotyczące makaronu	10
3.3. Charakterystyka grzybów jadalnych	11
3.4. Zawartość substancji pokarmowych w grzybach	12
3.5. Związki bioaktywne występujące w grzybach	15
3.6. Charakterystyka wybranych grzybów leczniczych	18
3.7. Fortyfikacja produktów zbożowych	21
4. HIPOTEZA I CEL BADAŃ	25
5. MATERIAŁY I METODY	26
5.1. Materiał badawczy	26
5.2. Skład surowcowy (receptura)	26
5.3. Produkcja makaronu	27
5.4. Schemat badań	28
5.5. Metody badań	29
5.6. Analiza statystyczna	35
6. OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja	36
6.1. Podstawowy skład semoliny i mieszanek semoliny z suszem z grzybów	36
6.2. Parametry fizykochemiczne i technologiczne semoliny i mieszanek semoliny z suszem z grzybów	37
6.3. Parametry bezpieczeństwa semoliny i mieszanek semoliny z suszem z grzybów	41
6.4. Wpływ dodatku suszu z grzybów na skład i wartości odżywcze makaronu	42
6.5. Właściwości kulinarne i hydratacyjne makaronu	43
6.6. Ocena sensoryczna makaronu	45
6.7. Barwa makaronu	46
6.8. Ocena tekstury makaronu	48
6.9. Zawartość związków bioaktywnych	51
6.10. Aktywność przeciwutleniająca	56
6.11. Właściwości potencjalnie przeciwzapalne	59
6.12. Właściwości przeciwnowotworowe	61
7. WNIOSKI	63
8. BIBLIOGRAFIA	66
9. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW (Załącznik 1)	82
10. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD PRACY DOKTORSKIEJ (Załącznik 2)	83

1. STRESZCZENIE

	<p>Streszczenie</p> <p>Ze względu na rosnącą świadomość konsumentów na temat składu żywności i zdrowej diety, badania naukowców, z różnych ośrodków badawczych, koncentrują się na poszukiwaniu żywności o wysokim potencjale odżywczym, a także zwiększonej zawartości związków biologicznie czynnych. Wiele publikacji opisuje próby wzbogacania makaronu różnymi dodatkami, np. warzywami, owocami, przyprawami, ziołami, grzybami itp. Makaron jest doskonałym źródłem węglowodanów, jest popularny na całym świecie ze względu na prosty skład (mąka/semolina i woda), dobrą stabilność podczas długiego przechowywania (żywność sucha), niskie koszty produkcji, prosty sposób przygotowania i stosunkowo niski indeks glikemiczny. Również rosnące zainteresowanie spożyciem grzybów, które mają udokumentowane właściwości prozdrowotne, a także wartość leczniczą skłoniło nas do podjęcia badań nad dodawaniem grzybów do żywności. Grzyby jadalne stanowią cenne źródło związków odżywczych i biologicznie aktywnych. Wynika to z zawartości w nich białek o dużej przyswajalności, polisacharydów, składników mineralnych czy witamin. Do fortyfikacji semoliny wykorzystano dodatek, w ilości 2,5-10%, suszu z grzybów o udokumentowanych właściwościach prozdrowotnych tj. Lion's Mane (L), Maitake (M), Reishi (R) i Enoki (E) i określono wpływ na wybrane właściwości makaronu. Ocenie poddano skład chemiczny, właściwości fizyczne, teksturę i właściwości sensoryczne makaronu jak również zbadano wpływ dodatku suszonych grzybów na zawartość związków bioaktywnych i niektóre właściwości prozdrowotne makaronu (zwłaszcza przeciwutleniające, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe).</p>
Słowa kluczowe:	fortyfikacja makaronu, grzyby jadalne, substancje bioaktywne, składniki odżywcze, żywność funkcjonalna

2. SUMMARY

	<p>Summary</p> <p>Given the growing consumers' awareness of the food composition and healthy diet, investigations conducted by scientists from various research centers are focused on the search for food with high nutritional potential and increased content of biologically active compounds. Many publications have described attempts to enrich pasta with various additives, e.g. vegetables, fruits, spices, herbs, mushrooms, etc. Pasta is an excellent source of carbohydrates and is popular worldwide due to its simple composition (flour/semolina and water), good stability during long storage (dry food), low production costs, easy preparation, and a relatively low glycemic index. The growing interest in the consumption of mushrooms, which have documented pro-health properties as well as medicinal value, has encouraged us to undertake research on supplementation of food with mushrooms. Edible fungi are a valuable source of nutrients and bioactive compounds. This is associated with the content of highly digestible proteins, polysaccharides, minerals, and vitamins. The semolina used in the study was fortified with 2.5-10% of dried mushrooms with documented pro-health properties, i.e. Lion's Mane (L), Maitake (M), Reishi (R), and Enoki (E), and their effect on selected pasta properties was determined. The chemical composition, physical properties, texture, and sensory properties of the pasta were evaluated and the effect of the dried mushroom supplementation on the content of bioactive compounds and some health-enhancing properties of the pasta (especially antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer activity) was assessed.</p>
Key words:	pasta fortification, edible mushrooms, bioactive substances, nutrients, functional foods

3. WSTĘP

W dzisiejszych czasach społeczeństwo jest zainteresowane zdobywaniem wiedzy odnośnie zależności zdrowia od diety i wyborem właściwej diety dostosowanej do swoich indywidualnych potrzeb. Konsument coraz bardziej chroniony jest również prawnie w tych kwestiach.

W białej księdze Komisji Wspólnot Europejskich z dnia 30 maja 2007 r. zatytułowanej „Strategia dla Europy w sprawie zagadnień zdrowotnych związanych z odżywianiem, nadwagą i otyłością” („biała księga Komisji”) zauważono, że podawanie wartości odżywczej jest jedną z ważnych metod informowania konsumentów na temat składu środków spożywczych i pomagania im w dokonywaniu świadomych wyborów [1]. Natomiast w komunikacie Komisji do Rady, Parlamentu Europejskiego i Europejskiego Komitetu Ekonomiczno-Społecznego z dnia 13 marca 2007 r. zatytułowanym „Strategia polityki konsumenckiej UE na lata 2007–2013 – wzmocnienie pozycji konsumentów, polepszenie ich dobrobytu oraz zapewnienie ich skutecznej ochrony” podkreślono, że umożliwienie konsumentom dokonywania świadomych wyborów jest niezbędne zarówno dla zapewnienia skutecznej konkurencji, jak i dla dobra konsumentów [2]. Znajomość podstawowych zasad żywienia oraz odpowiednich informacji żywieniowych na temat środków spożywczych, przyczyniłoby się istotnie do umożliwienia konsumentom podejmowania świadomych wyborów.

W związku z rosnącą świadomością współczesnych konsumentów coraz częściej sięgają oni po produkty mało przetworzone, nie zawierające konserwantów, sztucznych barwników itp. Coraz bardziej powszechne jest pojęcie żywności funkcjonalnej. Koncepcja żywności funkcjonalnej zrodziła się w Japonii w latach 80 ubiegłego wieku, gdzie naukowcy odkryli znaczenie błonnika pokarmowego w diecie człowieka. Wyprodukowany w 1988 japoński napój fortyfikowany błonnikiem pokarmowym o nazwie: Fibe Mini, jest uważany za pierwszy produkt z kategorii żywności funkcjonalnej [3]. Dostępnych jest wiele definicji dotyczących żywności funkcjonalnej. W oparciu o dostępne w literaturze liczne definicje, opinie ekspertów i po konsultacjach z grupą północnoamerykańskich i europejskich ekspertów, przy użyciu techniki Delphi, stworzono definicję żywności funkcjonalnej. Żywność funkcjonalna jest lub wydaje się być podobna do żywności konwencjonalnej. Jest częścią standardowej diety i jest spożywana regularnie, w normalnych ilościach. Posiada udowodnione korzyści zdrowotne, wpływając na poprawę zdrowia, samopoczucia lub

redukując ryzyko wystąpienia pewnego rodzaju chorób, zwłaszcza tzw. chorób cywilizacyjnych [4].

Obserwuje się, że rozwój żywności funkcjonalnej to proces długoterminowy z tendencją do rosnącego znaczenia na rynku spożywczym, na którym znajduje się sporo żywności definiowanej jako funkcjonalna. Głównymi substancjami nadającymi żywności cechę "funkcjonalności" są witaminy, flawonoidy, polifenole, błonnik, kwasy omega-3, składniki mineralne i kultury bakterii np. *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* (LC1), *Streptococcus salvarius* [5]. Rosnące zapotrzebowanie na zdrowy styl życia staje się ważnym czynnikiem dla konsumentów a firmy produkujące żywność muszą nadążać za tymi nowymi trendami [6].

3.1. Makaron jako potencjalny produkt funkcjonalny

Makaron jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych w diecie źródłem węglowodanów, to podstawowe danie tradycyjnej kuchni włoskiej, po raz pierwszy wprowadzony we Włoszech w XIII wieku, obecnie znany na całym świecie. Produkcja i spożycie makaronów jest zróżnicowane w zależności od regionu świata oraz tradycji kulinarnych społeczeństwa. Przed rewolucją przemysłową większość makaronów była wytwarzana ręcznie. Obecnie większość makaronów jest wytwarzana przez profesjonalne linie produkcyjne o dużej wydajności, które działają na zasadzie mieszania składników (mąka i woda) w warunkach próżniowych, następnie wytlaczania ciasta przez różnego rodzaju matryce, formując różne kształty, które następnie podlegają suszeniu w automatycznych suszarniach [7]. Makaron jest bogatym źródłem węglowodanów złożonych (74-77%) i białka (11-15%) oraz ubogim źródłem sodu i tłuszczu. Najlepszej jakości makaron otrzymuje się z semoliny (mąki pochodzącej z przemiału pszenicy durum *Triticum durum*). Pszenica durum charakteryzuje się wysoką szklistością, twardością ziarniaka, wysokim poziomem białka i glutenu, dzięki czemu semolina przeznaczona do produkcji makaronu, pozwala otrzymać makaron o bardzo wysokiej jakości. Dodatkowo wysoka zawartość karotenoidów w semolinie i gruba granulacja powodują, że w porównaniu do makaron z pszenicy zwyczajnej, makaron na bazie semoliny ma bardziej atrakcyjny, pożądany przez konsumentów żółty, naturalny kolor [8].

3.2. Dane rynkowe dotyczące makaronu

Z raportu opublikowanego przez firmę Mintel Group Ltd, w 2022 roku wynika, że sprzedaż makaronów w Polsce rośnie i w 2021 roku wzrost ten wyniósł 2,9% w porównaniu do roku poprzedniego, przy całkowitej wielkości rynku w 2021 roku 0,23 mln ton. Na podstawie aktualizacji danych z sierpnia 2022 r. prognozuje się, że w 2026 r. produkcja makaronu w Polsce osiągnie 0,244 mln ton (Tabela 1), jednak będzie to mniejszy wzrost względem lat poprzednich (Wykres 1)[9].

Tabela 1. Wartości dotyczące wielkości sprzedaży oraz spożycia na osobę makaronu w latach 2015-2023

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026
Całkowita wielkość rynku [x1000 ton]	210.7	214.1	214.7	216.9	219.7	224.0	230.4	237.5	240.9	242.4	243.2	243.9
Wielkość spożycia per capita [kg]	5.466	5.557	5.572	5.631	5.708	5.829	6.014	5.982	6.130	6.219	6.201	6.216
Wskaźnik wzrostu [%]		1,60	0,30	1,00	1,30	2,00	2,90	3,10	1,40	0,60	0,30	0,30

Wykres 1. Roczny procentowy wskaźnik wzrostu sprzedaży detalicznej makaronów w Polsce w latach 2015-2023



Dane z cytowanego powyżej raportu firmy Mintel (Tabela 2) wskazują, że Firma Maspex Sp. z o.o. jest liderem na rynku polskim w sprzedaży makaronu i z roku na rok sprzedaż makaronu przez tą firmę rośnie, osiągając w 2021 roku udział na poziomie 21,70%, zostawiając innych producentów makaronów na poziomie 1-6%. Systematyczny wzrost

spożycia makaronu w Polsce w przeliczeniu na spożycie w kg/osobę, jego prosty skład surowcowy, zrodził koncepcję rozszerzenia portfolio Firmy Maspex Sp. z o.o. o makaron fortifikowany suszem z grzybów o udokumentowanych właściwościach prozdrowotnych.

Tabela 2. Udział sprzedaży makaronu na rynku detalicznym w Polsce (%) dla poszczególnych producentów makaronu

	2019	2020	2021
Maspex Sp. z o.o.	20,80	21,40	21,70
Eko Mak Makarony Babuni Ryszard Kaczorowski	5,60	5,70	5,70
Pol-Mak S.A.	5,30	5,50	5,60
Czanieckie Makarony Sp. z o. o.	5,20	4,90	4,50
Goliard Sp. z o.o	4,00	3,70	3,60
Makarony Polskie S.A.	3,10	3,30	3,40
Barilla Group S.p.A	3,00	3,10	2,80
Melissa Kikizas Food Products S.A	2,40	2,50	2,20
Raisio Plc.	1,10	1,00	1,10
Marki własne	32,90	32,30	32,60
Inne	16,60	16,60	16,80

3.3. Charakterystyka grzybów jadalnych

Termin „grzyb” sam w sobie nie jest kategorią taksonomiczną, ale jest używany w odniesieniu do owocników, które pojawiają się poniżej (hipogeniczne) lub powyżej (epigeniczne) podłoża oraz są wystarczająco duże, aby być widziane gołym okiem i zbierane rękami [10].

Pierwsze grzyby pojawiły się na powierzchni ziemi już 800 milionów lat temu, znacznie wcześniej niż pierwsi przedstawiciele królestwa zwierząt i roślin. Obecnie szacuje się, że może istnieć ponad 5 milionów gatunków grzybów, z których do tej pory opisano około 100 000 gatunków, a wiele innych jeszcze czeka na odkrycie [11]. Występuje ponad 2000 gatunków grzybów, które uważa się za jadalne i/lub o potencjale leczniczym. Spośród nich zaledwie 100 gatunków jest wykorzystywanych w celach kulinarnych. Tylko 35 gatunków grzybów jadalnych jest uprawianych komercyjnie na całym świecie. Kraje azjatyckie posiadają wielowiekową tradycję uprawy grzybów. Do najbardziej popularnych powszechnie uprawianych komercyjnie grzybów zaliczamy: *Agaricus bisporus* (pieczarka dwuzarodnikowa), *Lentinula edodes* (shiitake), *Pleurotus ostreatus* (bocznik ostrygowaty),

Volvariella volvacea (pieczarka słomiana), *Hericium erinaceus* (soplówka jeżowata), *Boletus edulis* (borowik szlachetny), *Grifola frondosa* (maitake), *Agrocybe aegerita* (pioppini) [12,13]. Obok owoców i warzyw, grzyby jadalne są przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków naukowych na całym świecie ze względu na fakt, że są one bogatym źródłem składników odżywczych i prozdrowotnych tj. białka, węglowodany (w tym błonnik pokarmowy), składniki mineralne, witaminy a jednocześnie zawierają niewiele tłuszczu i są niskokaloryczne [14].

W literaturze można spotkać różne dane dotyczące wykazu gatunków grzybów jadalnych np. są to listy poradnikowe lub specjalistyczne. W Polsce obowiązuje Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 3 listopada 2022 zmieniające rozporządzenie (Ministra Zdrowia z dnia 17 maja 2021) w sprawie grzybów dopuszczonych do obrotu lub produkcji przetworów grzybowych, środków spożywczych zawierających grzyby oraz uprawnień klasyfikatora grzybów i grzyboznawcy, w którym wyszczególniono 72 gatunki grzybów dopuszczonych do obrotu. Aktualna lista ministerialna została uzupełniona o 25 gatunków. Powodem była dostępność w aptekach i sklepach produktów, w skład których wchodziły grzyby, których nie było na liście ministerialnej, a więc nie były dopuszczone do obrotu. Na liście znajdziemy nie tylko powszechnie znane gatunki grzybów, takie jak borowiki szlachetne, pieczarki, kurki, maślaki, mleczaje, podgrzybki czy koźlarze ale również gatunki znane węższemu gronu smakoszy, m.in. ucho bżowe, twarżoszek przydrożny czy trzęsak morszczynowaty. Nowe gatunki na zaktualizowanej liście to min. grzyby orientalne tj. soplówka jeżowata (Lion's Mane), żagwica listkowata (Maitake), płomiennica zimowa (Enoki), lakownica żółtawa (Reishi) i inne [15].

3.4. Zawartość substancji pokarmowych w grzybach

Grzyby są powszechnie cenione na całym świecie głównie ze względu na swoje wartości odżywcze. Owocniki wielu gatunków grzybów są dobrym uzupełnieniem podstawowego pokarmu człowieka (Rysunek 1). W wielu kulturach, w tym w Polsce, grzyby cieszą się ogromną popularnością ze względu na swoje walory zapachowe i smakowe. Ciężkostrawność grzybów wynika ze struktury ściany komórkowej zbudowanej z chityny, tj. polisacharydu zawierającego azot, który nie jest trawiony w przewodzie pokarmowym człowieka. W związku z tym grzyby powinny być zawsze dobrze rozdrobnione, ugotowane i dokładnie przeżute.



Rysunek 1. Główne składniki chemiczne grzybów

Zawartość wody w owocnikach grzybów waha się w granicach 70-95%. Owocniki grzybów zawierają 4,7-6,9% węglowodanów ogółem (około 50% s.m.). Wśród występujących w grzybach węglowodanów występują monosacharydy (np. glukoza, mannoza, fruktoza), disacharydy (np. trehaloza) jednak w ścianie komórkowej grzybów najbardziej liczną grupę związków stanowią polisacharydy (w tym błonnik pokarmowy stanowi 2,7-3,9%, który jest aktywnym polisacharydem) oraz kompleksy polisacharydowo - białkowe. Polisacharydy stanowią bardzo liczną grupę związków, którym przypisuje się właściwości przeciwnowotworowe, immunostymulujące, antyoksydacyjne.

W skład błonnika wchodzi włókna nierozpuszczalne w wodzie: chityna, celuloza, lignina oraz włókna rozpuszczalne w wodzie głównie β -glukany - najbardziej interesujący składnik funkcjonalny. Związki te to polimery glukozy, homo- i hetero-glukany z wiązaniami glikozydowymi β (1 \rightarrow 3), i β (1 \rightarrow 6), natomiast β -glukany w produktach zbożowych takich jak owies charakteryzują się β (1 \rightarrow 4) wiązaniami glikozydowymi. β -glukany nie są trawione przez enzymy w przewodzie pokarmowym człowieka i z tego powodu są one klasyfikowane jako błonnik pokarmowy, dodatkowo mają odgrywać kluczową rolę w niektórych prozdrowotnych właściwościach grzybów [16]. Na aktywność biologiczną β -glukanów wpływa ilość rozgałęzień, masa cząsteczkowa, rozpuszczalność w wodzie i struktura III rzędowa. Największą aktywność przeciwnowotworową posiadają glukany β (1 \rightarrow 3) z rozgałęzieniami β (1 \rightarrow 6) i β (1 \rightarrow 4) o dużej masie cząsteczkowej [17-19].

Z grzybów wyizolowano również kilka polisacharydów o właściwościach przeciwnowotworowych, z których najważniejszym jest lentinan, rozgałęziony β -D-glukan, wyizolowany z twardziaka jadalnego (*Lentinula edodes*) stosowany klinicznie w Japonii w terapii przeciwnowotworowej. Innymi polisacharydami o działaniu przeciwnowotworowym są grifolan z zagwicy listkowej (*Grifola frondosa*) czy schizofylan z rozszczepki pospolitej (*Schizophyllum commune*) oraz krestin (PSK-polisacharyd i PSP - kompleks wielocukier – białko) wyizolowany z *Trametes versicolor*. Polisacharydy te w organizmie człowieka nie wywołują działań niepożądanych, nie są alergizujące ani toksyczne [20,21]. W ścianie komórkowej występują również inne związki

jak ligniny (o wysokiej masie cząsteczkowej, nierozpuszczalne w wodzie), triterpenoidy (o niskiej masie cząsteczkowej) oraz związki fenolowe [17].

Kolejnym składnikiem, który występuje w grzybach w dużej ilości są białka. W powszechnie spożywanych grzybach zawartość białka waha się w ilości 1,5-3,6% świeżej masy, co stanowi 10-40% w przeliczeniu na suchą masę. Białka grzybów jadalnych, jednocześnie zaliczanych do leczniczych, charakteryzują się korzystnym składem aminokwasowym zawierają bowiem komplet aminokwasów egzogennych. Ponadto białka te cechuje bardzo duża przyswajalność, susz grzybowy może zawierać nawet do 25% przyswajanych białek. Wśród takich gatunków, których owocniki zawierają dużą ilość łatwo przyswajalnego białka wyróżniamy: pieczarkę dwuzarodnikową czy borowika szlachetnego. Zawartość białka w grzybach zależy od składu podłoża, wielkości okrywy, czasu zbioru i gatunku grzybów [14,22,23].

Grzyby zaliczane są do żywności niskokalorycznej i charakteryzują się stosunkowo niską zawartością tłuszczu, przeciętnie od 0,5 - 3,5% w suchej masie. Tłuszcz ten zawiera nienasycone kwasy tłuszczowe, których zawartość wynosi ponad 70% całkowitej ilości kwasów tłuszczowych [23].

Grzyby są jednym z najlepszych naturalnych źródeł witamin, szczególnie witamin z grupy B: tiaminy (B₁), ryboflawiny (B₂), niacyny (B₃) oraz kwasu askorbinowego (C), kwasu pantotenowego i kwasu foliowego. W mniejszym stopniu grzyby stanowią też źródło witamin rozpuszczalnych w tłuszczach: A, D, E i K [22]. Spośród gatunków uprawnych szczególnie bogate w witaminy z grupy B są pieczarka dwuzarodnikowa, bocznik ostrygowaty, zimówka aksamintotrzonowa i twardziak jadalny, natomiast spośród dzikorosnących grzybów maślak zwyczajny [24]. Owocniki grzyba *Lentinula edodes* (shiitake) zawierają witaminę B₁ na poziomie porównywalnym do zawartości tej witaminy w ziarnach zbóż, natomiast większym niż w jajach [21].

Grzyby mają również dużą zdolność do kumulowania w owocnikach różnych pierwiastków, które są potrzebne człowiekowi jako biopierwiastki. Ich zawartość w grzybach różni się w zależności od gatunku, wieku, średnicy owocnika i rodzaju podłoża. Zawartość składników mineralnych w dziko rosnących grzybach jadalnych jest wyższa niż w grzybach uprawnych. Główne składniki mineralne to K, P, Na, Ca, Mg oraz pierwiastki śladowe jak Cu, Zn, Fe, Mo, Se. Największą zawartość sodu (26,80 mg /100 g) dwukrotnie wyższą niż w pozostałych gatunkach *Basidiomycota*, stwierdzono w powszechnie występującym gatunku gąska zielonka. Twardziak jadalny z kolei zawiera duże ilości wapnia. W owocnikach wielu gatunków grzybów, szczególnie tych rosnących dziko wzdłuż

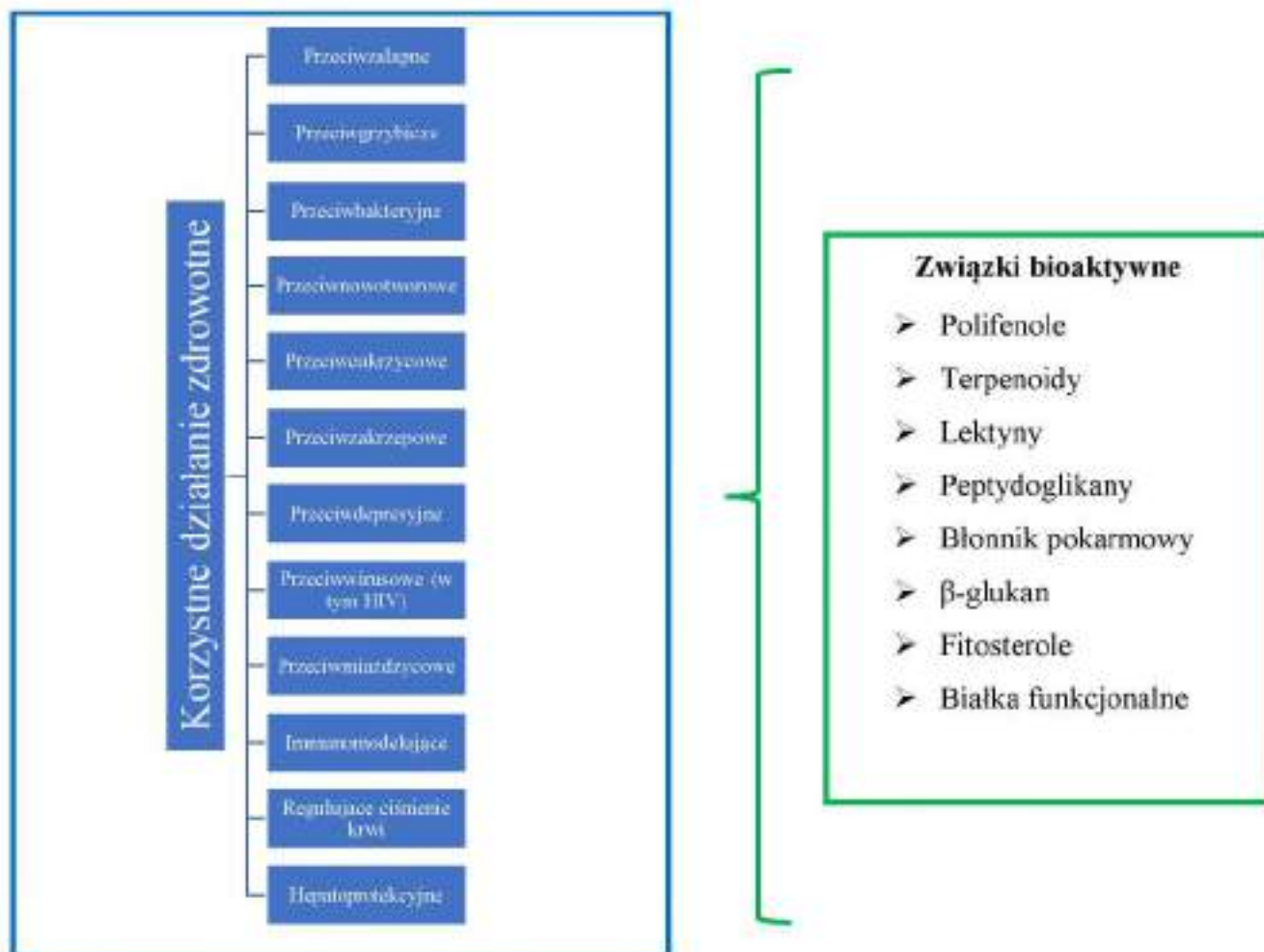
ruchliwych dróg stwierdzono znacznie większą ilość ołowiu. W okolicach przemysłowych stwierdza się zwiększoną zawartość rtęci. Aby uniknąć dostarczenia do organizmu metali ciężkich wraz z grzybami nie należy ich zbierać przy ruchliwych trasach, w okolicach przemysłowych, poligonach wojskowych, na terenach nawożonych ściekami i na wysypiskach śmieci [20,23,25].

Podsumowując, grzyby są bogate w składniki odżywcze. Zawierają więcej białka w porównaniu z innymi pokarmami zwierzęcymi i roślinnymi, charakteryzują się niską ilością tłuszczu oraz wysoką zawartością witamin i minerałów, wyższą niż warzywa i owoce. Są dobrym źródłem wysokiej jakości błonnika. Istnieje zatem możliwość wykorzystania grzybów jako alternatywnej żywności i zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego dla ludzi [14,22,24].

3.5. Związki bioaktywne występujące w grzybach

Obecne zastosowanie grzybów jest zupełnie inne niż tradycyjne. Liczne badania naukowe nad właściwościami grzybów zarówno w krajach azjatyckich jak i w Europie wskazują, że związki biologicznie aktywne obecne w grzybach wykazujących różnorodne działania prozdrowotne. Zapobiegają w powstawaniu niektórych chorób cywilizacyjnych oraz wspomagają proces leczenia chorób nowotworowych czy miażdżycy (Rysunek 2). Można zatem stwierdzić, że spożywanie grzybów jadalnych lub żywności zawierającej dodatek grzybów o właściwościach prozdrowotnych jest zalecane w naszych jadłospisach. O właściwościach leczniczych grzybów po raz pierwszy możemy dowiedzieć się z opisów Hipokratesa około 400 r. p.n.e., który zalecał do kauteryzacji ran stosować grzyba hubiaka pospolitego, zwanego żywym opatrunkiem [14].

Kilka tysięcy lat temu uznano, że wiele jadalnych grzybów, jak również te nienadające się do spożycia, mogą posiadać właściwości korzystne dla zdrowia człowieka. Spośród jadalnych grzybów, które wykazują potencjalne właściwości lecznicze i użytkowe wymienić można: *Lentinus*, *Hericium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus* i *Tremella*. Wyróżniamy też takie gatunki grzybów, które ze względu na niekorzystne walory smakowe: twardszą konsystencję, wyczuwalny gorzki smak wykorzystywane są jedynie ze względu na właściwości lecznicze np. *Ganoderma*, *Trametes* [10].



Rysunek 2. Wybrane grzybowe składniki bioaktywne i ich właściwości prozdrowotne

Ważną grupę związków aktywnych pochodzenia grzybowego stanowią terpenoidy. Przypisuje się im działanie przeciwwirusowe szczególnie przeciwko wirusowi HIV1 i wirusowi opryszczki. Posiadają one również zdolność do hamowania syntezy cholesterolu, obniżania ciśnienia krwi i zmniejszenia ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Spośród terpenoidów na uwagę zasługują seskwiterpenoidy o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwnowotworowym. W owocnikach jadalnego gatunku opieńki miodowej (*Armillaria mellea*) naukowcy stwierdzili występowanie szeregu związków, będących pochodną protoilludanu, z kolei z owocników strocznika trzęsakowatego (*Merulius tremellosus*) wyizolowano kwasy merulinowe, wykazujące aktywność przeciwbakteryjną wobec np. *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter citreus*. Kolejnym przykładem związku wyizolowanego z grzyba lakownica lśniąca (*Ganoderma lucidum*) jest ganodermanontriol o działaniu przeciwwirusowym działającym szczególnie na wirusa HIV [26,27]. Grzyb ten jest bogatym

źródłem terpenoidów, wyizolowano z niego ok 120 związków m. in. ganoderol B, kwas ganoderowy G i C2 [28].

Kolejną grupą związków aktywnych występujących licznie w grzybach są związki fenolowe, które można sklasyfikować jako proste fenole i kwasy fenolowe (np. kwas galusowy, kwas benzoesowy, kwas syringowy, kwas chlorogenowy) oraz polifenole, które są podzielone na wiele grup, takich jak flawonoidy, garbniki, stilbeny itp. Flawonoidy to grupa związków polifenolowych o znanych właściwościach korzystnych dla zdrowia, które obejmują neutralizowanie wolnych rodników, hamowanie enzymów hydrolitycznych i prooksydacyjnych oraz działanie przeciwzapalne. Utlenianie jest niezbędne dla wielu żywych organizmów do produkcji energii potrzebnej dla wszelkich procesów biologicznych. Jednak liczne procesy fizjologiczne i czynniki zewnętrzne, w tym wiele czynników środowiskowych, prowadzą do wytwarzania wolnych rodników tlenowych i innych reaktywnych form tlenu, które mogą przyczyniać się do rozwoju chorób, w tym miażdżycy, cukrzycy, raka i marskości wątroby. Większość organizmów rozwinęła antyoksydacyjne systemy obronne i naprawcze, aby chronić tkanki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi; jednak systemy te są niewystarczające, aby całkowicie zapobiec uszkodzeniom. Poszukiwanie przeciwutleniaczy w żywności jest więc bardzo aktywnym obszarem badań [29].

Związki fenolowe zawarte w owocnikach grzybów jadalnych decydują o ich właściwościach antyoksydacyjnych, wykazują również działanie przeciwzapalne i przeciwnowotworowe [30]. Z pieczarki dwuzarodnikowej (*Agaricus bisporus*) i twarziaka jadalnego (*Lentimula edodes*) wyizolowano kwasy fenolowe: hydroksybenzoesowy, protokatechowy oraz kawowy. Grzyby soplówka jeżowata (*Hericium erinaceus*), zagwica listkowata (*Grifola frondosa*), płomiennica zimowa (*Flammulina velutipes*), twarziak jadalny (*Lentimula edodes*) są również bogate w związki fenolowe o silnej aktywności przeciwutleniającej. Zatem gatunki grzybów jadalnych mogą być stosowane jako łatwo dostępne źródło naturalnych przeciwutleniaczy, jako suplementy diety a także mogą mieć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym. Związki fenolowe wydają się być głównymi składnikami odpowiedzialnymi za aktywność przeciwutleniającą wszystkich gatunków grzybów [31].

Grzyby są dobrze znane jako naturalne źródło składników immunoterapeutycznych. Mogą być one wykorzystywane jako środki immunostymulujące i immunomodulujące w leczeniu niektórych chorób związanych z brakiem lub słabą odpornością, takich jak nowotwory, wirus HIV czy gruźlica. Bioaktywne składniki wyekstrahowane z grzybów

rodzaju *Pleurotus* są w stanie wzmocnić lub zrównoważyć odpowiedź immunologiczną w organizmie człowieka. Takie bioaktywne składniki obejmują kompleksy polisacharydowo-białkowe, polisacharopeptydy, białka funkcjonalne (peptyd podobny do ubikwityny, ubichinon-9, glikoproteinę i nebrodeolizynę), proteoglikany i glukany [32].

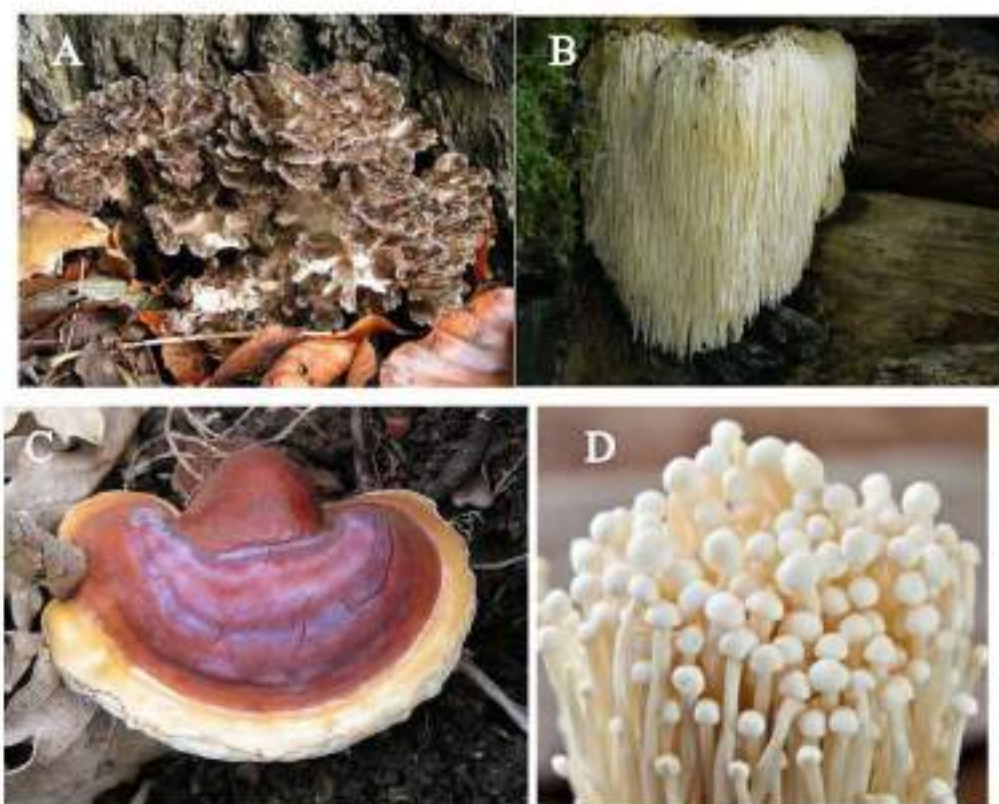
Grzyby są również źródłem naturalnych antybiotyków. Kilka związków wyekstrahowanych z grzybów wykazało aktywność przeciwgrzybiczą i przeciwbakteryjną zwalczając m. in: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*. Europejski gatunek *Ganoderma* - *Ganoderma pfeifferi* hamował wzrost opornego na metycylinę *Staphylococcus aureus* oraz innych bakterii dzięki obecności hydrochinonów seskwiterpenoidowych. Poza tym stwierdzono, że ekstrakty z tego grzyba hamują wzrost mikroorganizmów odpowiedzialnych za problemy skórne (*Pityrosporum ovale*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes*) [33].

Spośród związków indolowych występujących w grzybach (w owocnikach) przede wszystkim wyróżnia się związki halucynogenne np.: psylocybina, psylocyna, bufotenina. W grzybach jadalnych istnieją związki indolowe, które nie posiadają właściwości halucynogennych i zaliczamy do nich m. in.: melatoninę, serotoninę, tryptoaminę, indol. Największą różnorodność związków indolowych oznaczono w *Cantharellus cibarius* (pieprznik jadalny), natomiast najwięcej w tym gatunku wykryto serotoniny, która odgrywa bardzo ważną rolę w regulowaniu snu, temperatury ciała, nastroju. W grzybach obecne są również różne enzymy, szczególnie hemicelulazy, celulazy, ligninazy rozkładające ścianę komórkową roślin. W owocnikach opieńki miodowej (*Amillaria mellea*) obecne są również proteazy, enzymy które mają zastosowanie w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej [23].

3.6. Charakterystyka wybranych grzybów leczniczych

W związku z korzystnymi właściwościami grzybów naukowcy zainteresowali się owocnikami grzybów jadalnych. Najpierw w Japonii i Chinach, później w Europie, gdzie przeprowadzono szczegółowe badania naukowe, których wyniki miały być podstawą do potwierdzenia prawdziwości przekazów tradycyjnej medycyny chińskiej na temat leczniczych właściwości niektórych grzybów [34]. Grzyby można podzielić na trzy kategorie: jadalne, lecznicze i trujące. Grzyby jadalne (głównie owocniki) mogą być spożywane świeże, suszone, marynowane lub przyrządzane jeszcze w inny sposób. Grzyby lecznicze to grzyby, które nie są przeznaczone do celów kulinarnych, ale zawierają

bioaktywne składniki, które mają zastosowanie lecznicze (np. *Ganoderma lucidum*). Grzyby trujące to te, którym udowodniono lub podejrzewa się, że wykazują działanie szkodliwe dla zdrowia ludzi (np. trujące *Amanita phalloides*) [18]. W tabeli 3 przedstawiono charakterystykę wybranych grzybów leczniczych (*Grifola frondosa*, *Heridium erinaceus*, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*) wykorzystanych do badań w niniejszej pracy. Powyższe gatunki grzybów (Rysunek 3) wybrano głównie ze względu na ich liczne udowodnione działania prozdrowotne.



Rysunek 3. Wybrane grzyby lecznicze: A- *Grifola frondosa* (Maitake), B - *Heridium erinaceus* (Lion's Mane), C- *Ganoderma lucidum* (Reishi), D- *Flammulina velutipes* (Enoki) (źródło: <https://en.wikipedia.org>)

Tabela 3. Charakterystyka wybranych grzybów leczniczych

Gatunek	Nazwa polska	Polska nazwa	Sucha masa g/100g				Substancje bioaktywne	Działanie terapeutyczne																	
			Białko (N x 4,38)	Popiół	Tłuszcz	Wielkość surowe frakcja nierozpuszczalna w wodzie		Przeciegrybiczne	Przecieczapalne	Przecieroznowotworowe	Przeciw wirusowe (w tym HIV)	Przeciw bakteryjne	Regulujące ciśnienie krwi	Przeciwskurczowe	Immunomodulacyjne	Neurotoniczne	Hepatoprotekcyjne	Neuronalne	Antyoksydacyjne	Przeciwko starzeniu się	Bibliografia				
A																									
<i>Guthriea tricholista</i>	Manioka	Zagwieca liatkowata	21,1	7,0	3,1	10,1	Griofoln, lektyny	v	x	x	x	x	x	x	v	v								[12,21,35,36]	
B																									
<i>Hericium erinaceus</i>	Leonia Mane	Sopłówka jeżowata	22,3	9,4	3,5	7,8	Polifenole, terpenony, etaktydy			v					x	x									[12,21,36]
C																									
<i>Ganoderma lucidum</i>	Reishi	Laktaria żółtawa	8,8	1,7	5,7	73,4	Interpenoide: kwasy ganoderanowe, ganodermanotriol, ganoderol, ganoderol, polisacharydy: ganoderan, nukleotydy, nukleozydy, β-glukan		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						[12,17,21,35-37]
D																									
<i>Flammulina velutipes</i>	Enoki	Plonieniec zimowy	18,42	6,33	2,94	7,81	Peptydoglikan, polisacharydy, β-mannano, FVP (flammutina polisacharyd-białko), profilamina (glikoproteina), profilamina (aktywne białko cukrowe)	v	x	x	x	v		x											[12,17,35]

X - działanie znane, wykazujące w lekach lub suplementach diety

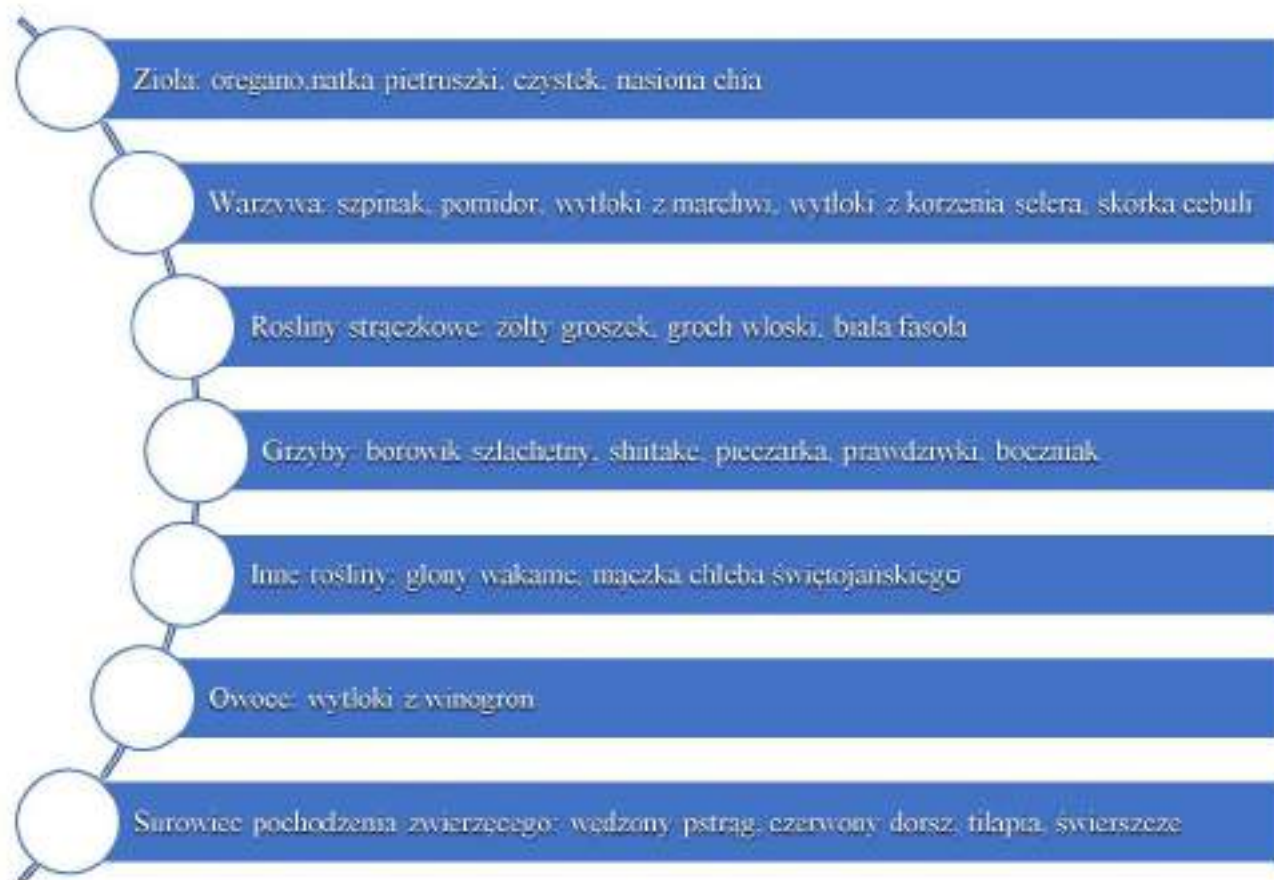
V - działanie znane, brak wykorzystania w lekach lub suplementach diety

3.7. Fortyfikacja produktów zbożowych

Produkty zbożowe (makaron/kluski, produkty piekarnicze: pieczywo/ciastka itp.) są spożywane codziennie na całym świecie. Z produktów piekarniczych chleb jest najczęściej spożywany, zazwyczaj wytwarzany z mąki pszennej, wody, cukru, soli, drożdży i tłuszczu. Jest to produkt naturalnie ubogi w białko, witaminy, składniki mineralne i błonnik pokarmowy i nie stanowi zbilansowanej żywności. Chleb jest potencjalnie doskonałą matrycą żywnościową do wzbogacania w składniki odżywcze i prozdrowotne w celu poprawy zdrowia konsumentów [38]. Powszechność i wzrost spożycia makaronu sprawiły, że również stał się on dobrą matrycą do projektowania żywności o charakterze prozdrowotnym poprawiając wartości odżywcze i właściwości funkcjonalne. Producenci żywności, w tym makaronu, starają się coraz to bardziej uatrakcyjnić proponowane wyroby poprzez poprawę cech sensorycznych i prozdrowotnych. Zaletą wyboru makaronu do fortyfikacji jest prosty skład: (mąka z pszenicy zwyczajnej lub semolina, woda, ewentualnie masa jajowa), długi termin przydatności do spożycia, niska wilgotność i krótki czas przygotowania makaronu [39]. W rzeczywistości makaron był jednym z pierwszych produktów spożywczych, w przypadku których US FDA (The United States Food and Drug Administration – Amerykańska Agencja Żywności i Leków), w latach 40-tych XX wieku, zezwoliła na wzbogacanie witaminami i żelazem. Dodatek różnych surowców do makaronu (Rysunek 4) np. roślinnych (główne źródło nutraceutyków), tj. różnych części warzyw i owoców, przypraw, ziół oraz zwierzęcych mogą być bardzo atrakcyjną alternatywą dla prozdrowotnych zachowań konsumpcyjnych konsumentów [8,40].

Owoce i warzywa są cennym źródłem wielu związków prozdrowotnych m.in. witamin, błonnika, składników mineralnych, karotenoidów a w szczególności polifenoli o silnych właściwościach przeciwutleniających i przeciwzapalnych [8]. Nasiona i ziarna, produkty uboczne lub izolaty, mogą być także cennym dodatkiem. Interesującym trendem w ostatnich latach było dodawanie do makaronów surowców zwierzęcych jak ryby, owady lub mięsne produkty uboczne. Tego typu materiały są uważane za zdrowe i pożywne, ponieważ charakteryzują się dużą zawartością białka, korzystnego tłuszczu, błonnika, witamin i składników mineralnych [8]. W ostatnich latach popularne stało się również wzbogacanie makaronów produktami ubocznymi przetwórstwa rybnego. Proszek rybny jest tanim źródłem wysokiej jakości składników odżywczych o wysokim poziomie niezbędnych aminokwasów, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, witamin i składników mineralnych [8]. Kolejnym

surowcem, który może być wykorzystywany do fortifikacji produktów zbożowych są sproszkowane grzyby jadalne, które są bogatym źródłem białka, błonnika pokarmowego, jak również związków bioaktywnych [39].



Rysunek 4. Przykładowe surowce wykorzystywane do wzbogacenia produktów zbożowych (makaronu, pieczywa)

W literaturze można spotkać bardzo różny skład recepturowy dla makaronu, chleba, z dodatkami w/w składników bioaktywnych [43]. Jeśli chodzi o grzyby, w fortifikacji produktów mącznych najczęściej stosowane dotąd były: bocznik (*Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus sajorcaju*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostearus*), pieczarka (*Agaricus bisporus*) oraz shiitake (*Lentinus edodes*) [44] – Tabela 4.

Tabela 4. Przykłady fortyfikacji wyrobów zbożowych

Makaron/kluski				
Surówka (proszek)	Udział %	Główne właściwości wyrobu fortyfikowanego		Literatura
Czystek szary <i>Cistus incanus</i> L.	1	Wzrost zawartości związków fenolowych, najlepsza ocena kulinarna makaronu z dodatkiem 1 i 2%		[41]
	2			
	3			
	4			
	5			
Pietruszka natka <i>Petroselinum crispum</i>	1	Wzrost zawartości związków fenolowych		[42]
	2			
	3			
	4			
Mąka z fasoli	15	Wzrost zawartości kwasów fenolowych, wzrost strąty po ugotowaniu, jedność makaronu maleje wraz ze wzrostem dodatku mąki z fasoli		[43]
	30			
Proszek z wysuszonej skórki z cebuli	2,5	Wzrost całkowitej zawartości związków fenolowych, flawonoidów		[44]
	5			
	7,5			
Mąka z żółtego grochu	10	Zmniejszenie owalniańa glukozy i zwiększona strawność białka		[45]
	20			
	30			
Produkty uboczne produkcji oliwy z oliwek	10	Wzrost zawartości fenoli, aktywności przeciwutleniającej, negatywny wpływ na właściwości sensoryczne, ze względu na bardzo gorzki i ostry smak		[46]
Pieczarka <i>Agaricus bisporus</i> , shiitake <i>Lentinus edodes</i> , borowik szlachetny <i>Boletus edulis</i>	5	Makaron wzbogacony w błonnik pokarmowy, białko i inne bioaktywne składniki		[47]
	10			
	15			
Borowik szlachetny <i>Boletus edulis</i>	10	Wzrost zawartość białka		[48]
	20	Wzrost właściwości antyoksydacyjnych		
Shiitake <i>Lentinus edodes</i> , pieczarka <i>Agaricus bisporus</i> , bocznik osrygowaty <i>Pleurotus ostreatus</i>	5	Spadek wskaźnika absorpcji wody		[49]
	10			
	15			
Bocznik osrygowaty <i>Pleurotus ostreatus</i>	2	Wzrost właściwości odżywczych, wzrost zawartości białka i błonnika, ponad 4% dłuższy czas gotowania, wytrzymałość na rozciąganie		[50,51]
	4			
	5			
	6			
	10			

Produkty piekarnicze: chleb (P), ciastka i herbatniki (C)			
Surawiec (proszek)	Udział %	Główne właściwości wyrobu fertyfikowanego	Literatura
Produkty uboczne produkcji oliwy z oliwek (P)	10	Wzrost zawartości fenoli, aktywność przeciwutleniająca, negatywny wpływ na właściwości sensoryczne ze względu na bardzo gorzki i osyry smak	[46]
Zagwica listkowata <i>Grifola frondosa</i> (P)	0.14 0.17 0.1	Drastycznie spadła wytrzymałość ciasta, pogorszenie właściwości wypiekowych	[52]
Pieczarka <i>Agaricus bisporus</i> , shiitake <i>Lentinus edodes</i> , borowik szlachetny <i>Boletus edulis</i> (P)	5 10 15	Zwiększone wchłanianie wody, zmniejszona objętość, wysokość i sprężystość bochenka	[53]
Bocznak liźkowy <i>Pleurotus pulmonarius</i> (P)	5 10 15 20 25	Nastąpił wzrost zawartości białka w chlebie i jakości odżywczej	[38]
Roczniak: <i>Pleurotus sajorajju</i> (C) Herbatniki z cynamonem	4 8 12	Odpowiedź glikemiczna została zmniejszona przez ingerencję grzybów w integralność granulek skrobi	[54]
Gęśnica (mleczny grzyb) <i>Calocybe indica</i> (C) ciastka	5 10 15 20	Zwiększenie zawartości białka, błonnika pokarmowego, β -glukanów i właściwości przeciwutleniających o 10%, akceptowalne wyniki sensoryczne	[55]
Pieczarka <i>Agaricus bisporus</i> (C) biszkopt	5 10 15	Wzrost zawartości białka, minerałów, wzrost lepkości, ciemniejszy kolor, 10% poprawa właściwości sensorycznych	[56]

4. HIPOTEZA I CEL BADAŃ

Hipoteza badawcza zakładała, że makaron z semoliny wzbogacony suszem z grzybów o udokumentowanych właściwościach prozdrowotnych tj. sopłówka jeżowata (*Hericium erinaceus*), żagwica listkowata (*Grifola frondosa*), lakownica żółtawa (*Ganoderma lucidum*), płomiennica zimowa (*Flammulina velutipes*) będzie charakteryzował się zwiększonym potencjałem nutraceutycznym oraz akceptowalnym poziomem cech organoleptycznych i fizykochemicznych.

Celem badań było opracowanie receptury makaronów z semoliny z dodatkiem suszu z wybranych grzybów (Lion's Mane, Reishi, Enoki, Maitake) oraz określenie wpływu dodatku suszu z wybranych grzybów do makaronu z pszenicy durum na jakość sensoryczną, cechy fizykochemiczne oraz właściwości odżywcze i prozdrowotne wytworzonych produktów.

Hipotezę badawczą weryfikowano poprzez realizację szczegółowych celów badań:

1. Określenie przydatności technologicznej mieszanki surowców sypkich do produkcji makaronu.
2. Określenie właściwości odżywczych, cech fizykochemicznych i akceptowalności konsumenckiej uzyskanych makaronów.
3. Określenie wpływu dodatku badanych grzybów na zawartość związków bioaktywnych oraz wybrane właściwości prozdrowotne (właściwości antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe).
4. Ocenę potencjalnej biodostępności składników prozdrowotnych w modelu *in vitro*.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. Materiał badawczy

Głównym surowcem użytym do produkcji makaronu była semolina, która pochodziła bezpośrednio z przemiału pszenicy durum (*Triticum durum*) w Młynie Durum w PZZ Lubella Sp. z o.o. w Lublinie.

W niniejszej pracy do badań użyto grzyby: lakownica złotawa (*Ganoderma lucidum*) - Reishi, sopłówka jeżowata (*Herichium erinaceus*) - Lion's Mane, żagwica listkowata (*Grifola frondosa*) - Maitake, płomiennica zimowa (*Flammulina velutipes*) - Enoki. Wszystkie grzyby zakupione zostały w sklepie internetowym NANGA Przemysław Figura. Reishi, Lion's Mane i Maitake jako komercyjnie dostępne mielone grzyby, natomiast grzyb (Enoki) w postaci całego suszonego grzyba. Grzyby posiadały numer partii, datę przydatności do spożycia oraz do każdego grzyba dołączony był certyfikat jakości. Grzyb Enoki przed sporządzeniem mieszanki został zmielony w młynku laboratoryjnym Retsch GM200. Wszystkie proszki grzybowe następnie zostały poddane analizie na przesiewaczu laboratoryjnym Bühlera MLI 300 do uzyskania granulacji 100% przesiewu przez sito 500 μm .

Surowce do produkcji makaronu (semolina, sproszkowane grzyby) były przechowywane w laboratorium w kontrolowanych warunkach temperatury max. 25 °C i wilgotności względnej powietrza max. 65%.

5.2. Skład surowcowy (receptura)

Do semoliny, podstawowego składnika do produkcji makaronu, dodano zmielony surowiec grzybowy Lion's Mane (L), Maitake (M), Reishi (R), and Enoki (E) w ilości: 2,5% (w/w), 5,0% (w/w), 7,5% (w/w) i 10% (w/w) i sporządzono jednorodną mieszankę surowców sypkich. Skrótów oznaczeń prób używanych w pracy zaprezentowano w tabeli nr 5.

Tabela 5. Skróty oznaczeń prób badawczych

	2,5%	5%	7,5%	10%
Lion's mane	L2.5	L5	L7.5	L10
Reishi	R2.5	R5	R7.5	R10
Maitake	M2.5	M5	M7.5	M10
Enoki	E2.5	E5	E7.5	E10
Semolina			C	

5.3. Produkcja makaronu

Makaron tagliatelle przygotowano w powtarzalnych warunkach laboratoryjnych z semoliny wzbogaconej czterema rodzajami suszonych grzybów według ustalonej receptury. Do produkcji makaronu wykorzystano urządzenie kuchenne (Kitchen Aid 5KSM45 USA), do którego dodano surowce sypkie (Rysunek 5) oraz wodę z ujęcia wodociągu miejskiego. Następnie surowce mieszano przez 10 minut przy 150 obr. /min, uzyskując jednorodne ciasto. Następnie za pomocą zestawu do wałkowania i krajalnicy KitchenAid Fettuccine formowano płaty ciasta i uzyskując makaron tagliatelle o grubości 2 mm. Makaron tagliatelle suszono w suszarce laboratoryjnej (Selecta) w temperaturze 55°C przez 2h. Po wysuszeniu i schłodzeniu makaron zapakowano w worki foliowe, szczelnie zamknięto i przechowywano w laboratorium w kontrolowanych warunkach temperatury max. 25°C i wilgotności względnej powietrza max. 65%.



Rysunek 5. Surowce sypkie do produkcji makaronu (źródło M. Szydłowska-Tutaj)

5.4. Schemat badań

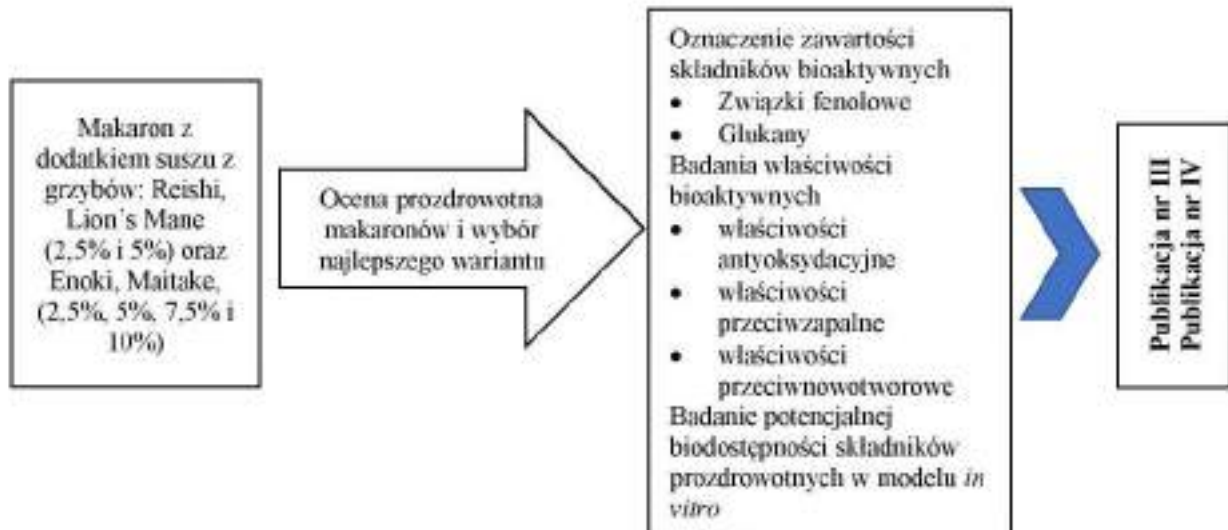
Etap I: Ocena surowców do produkcji makaronów funkcjonalnych (semolina oraz mieszanki semoliny z suszem grzybowym).



Etap II: Badanie cech fizykochemicznych oraz ocena jakości sensorycznej wytworzonych makaronów.



Etap III: Ocena jakości prozdrowotnej makaronów fortifikowanych suszem z grzybów. Badanie potencjalnej biodostępności składników prozdrowotnych w modelu *in vitro*.



5.5. Metody badań

W zależności od etapu oraz rodzaju wykonywanych badań materiał badawczy stanowiły: surowce sypkie (semolina, mieszanka semoliny z suszem z grzybów), makaron przed i po ugotowaniu. Makaron po ugotowaniu zamrażano, liofilizowano (LABCONCO, Kansas City, MO, USA), zmielono (MRC GRINDING MACHINE, SM-450, Holon, Izrael) i wykorzystywano do dalszych badań. Dodatkowo przeprowadzono trawienie wybranych makaronów w warunkach symulowanego przewodu pokarmowego. Szczegółowy opis warunków ekstrakcji i poszczególnych metod badawczych został uwzględniony w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe.

A. Skład chemiczny (surowce, wyrób gotowy przed ugotowaniem)

- Wilgotność, zawartość popiołu, zawartość tłuszczu określono za pomocą metod standardowych wg ISO (odpowiednio norma ISO 712, norma ISO 2171, norma ISO 11085) [57,58] zawartość białka ogólnego określono metodą Kjeldahla (Nx5,7) [59]
- Zawartość węglowodanów oszacowano na podstawie tzw. różnicy, wartość energetyczną obliczono przy użyciu współczynników Atwatera (4 kcal/g dla węglowodanów; 9 kcal/g dla tłuszczu i 4 kcal/g dla białka)

- Zawartość skrobi określono za pomocą urządzeń szybkościowych pracujących w technice NIR (ang. near-infrared diode array) z wykorzystaniem odpowiedniej kalibracji producenta [60]
- Oznaczanie błonnika pokarmowego przeprowadzono metodą wagową z wykorzystaniem termostabilnych enzymów α -amylazy, pepsyny i pankreatyny zgodnie z metodami standardowymi PN-A-79011-15 [61]

B. Analiza fizykochemiczna (surowce)

- Aktywność α -amylazy określono za pomocą aparatu do liczby opadania Falling Number 1305 (Perten Instruments) zgodnie z normą ISO 3093 [62]
- Zawartość glutenu i indeks glutenu oznaczono za pomocą urządzenia do mechanicznego wmywania glutenu Glutomatic 2200 (Perten Instruments). Indeks glutenu (GI) jest miarą proporcji mokrego glutenu, który nie przechodzi przez sito podczas wirowania [63]
- Oznaczenie uszkodzonej skrobi przeprowadzono za pomocą analizatora SDmatic (CHOPIN Technologies, Francja), który mierzy absorpcję jodu z uszkodzonej skrobi w rozcieńczonej zawieszynie (Ai%) [64]
- Pomiar barwy surowców i wyrobu gotowego (przed i po ugotowaniu) mierzono kolorymetrem Konica Minolta CR-410 w skali LAB CIE (Commission Internationale de l'Eclairage). W wyniku pomiarów wyznaczono wartości chromatyczne L^* , a^* i b^* . Wartość L^* opisuje jasność w zakresie od 0 do 100 (od czerni do bieli). Wartość a^* opisuje równowagę czerwono-zieloną (in-minus dla koloru zielonego i in-plus dla koloru czerwonego). Wartość b^* opisuje równowagę między żółcieniem a błękitem (in-minus dla koloru niebieskiego i in-plus dla koloru żółtego). Do pomiarów zastosowano illuminant C, stałą średnicę szczeliny \varnothing 50 mm oraz kąt pomiaru 0 [65].

C. Właściwości reologiczne mieszanek semoliny z suszem grzybowym określono przy użyciu Alveografu (CHOPIN Technologies, Francja) zgodnie z normą ISO 27971. Wyznaczono wytrzymałość ciasta (P), rozciągliwość (L), energię odkształcenia (W) oraz całkowitą powierzchnię pod krzywą. Dodatkowo obliczono stosunek P/L, aby porównać wytrzymałość na rozciąganie z rozciągliwością [66].

D. Tekstura

Teksturę makaronu przed i po ugotowaniu oceniono przy użyciu uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej Zwick/Roell BDO-FB0,5TH (Zwick GmbH & Co., Ulm, Niemcy). Makaron przed ugotowaniem oceniono za pomocą trzypunktowego testu łamania.

Maksymalną siłę łamania pojedynczej próbki makaronu określono przy stałej prędkości badania 100 mm/min. Odległość między podporami wynosiła 50 mm. Wyznaczono następujące parametry wytrzymałościowe makaronu: siłę niszczącą zarejestrowaną w momencie złamania próbki makaronu, siłę niszczącą w momencie największego odkształcenia bezpośrednio przed zniszczeniem próby, odkształcenie w momencie uszkodzenia jako procent ugięcia/odkształcenia do momentu uszkodzenia próbki. Pomiarów wykonano w min. 5 powtórzeniach zgodnie z metodyką dostępną w literaturze [67] z własnymi modyfikacjami. Do oceny cech tekstury ugotowanych makaronów wykorzystano przystawkę OTMS Ottawa. Oceniono twardość, kleistość i elastyczność próbek gotowanych makaronów z każdego przebiegu projektu eksperymentalnego. Do określenia twardości (N), kleistości (mJ) i elastyczności gotowanych produktów makaronowych zastosowano test podwójnego ściskania. W tym celu 50 g ugotowanego i odsączonego makaronu umieszczano w komorze OTMS i ściskano z prędkością testową 3,3 mm/s [68]. Do rejestracji danych wykorzystano oprogramowanie TestXpert® 10.11 które jest zalecane przez producenta do obsługi urządzenia badawczego.

E. Właściwości kulinarne makaronu

- Ocenę cech sensorycznych makaronu przed ugotowaniem przeprowadzono zgodnie z PN-93/A-74130 w zakresie jego wyglądu, koloru i zapachu. Natomiast ocena makaronu po ugotowaniu obejmowała wygląd, barwę, smak, zapach i konsystencję zgodnie z PN-87/A-74131. Ocenę przeprowadzono przy użyciu 5-punktowej skali. Każdą cechę oceniano w skali od 1 do 5 punktów czyli od jakości bardzo dobrej (5) do jakości nieakceptowalnej (1). Średnie arytmetyczne z dziesięciu ocen dawały wynik dla makaronu z każdego wariantu. Panel oceniający składał się z dziesięciu ekspertów sensorycznych, przeszkolonych i posiadających profesjonalne certyfikaty [69].
- Optymalny czas gotowania (OCT), straty suchej masy podczas gotowania (CL), współczynnik przyrostu wagowego (CWI)

W celu oceny właściwości kulinarnych 10 g każdej próbki makaronu gotowano w 300 ml wrzącej wody destylowanej. Zmierzono optymalny czas gotowania (OCT) (min) dla każdej próbki. Makaron tagliatelle uznano za ugotowany, gdy jego biały rdzeń zniknął po zgnieceniu między dwoma przezroczystymi plastikowymi płytkami [70]. Straty podczas gotowania (CL) mierzono poprzez całkowite odparowanie wody z gotowania makaronu w szklanej zlewce Erlenmeyera do sucha, w piecu powietrznym (SLW 53 STD POL-EKO APARATURA, Polska) w temperaturze 105°C. Pozostałość wazono, a

wynik wyrażano jako procent masy suchej próbki przed gotowaniem [70]. Współczynnik przyrostu wagowego (CWI) makaronu obliczono dzieląc jego masę po ugotowaniu, w optymalnym czasie gotowania, przez masę nieugotowanego makaronu [71].

- Właściwości hydratacyjne badanych próbek makaronów określono w temperaturze otoczenia poprzez obliczenie współczynnika absorpcji wody (WAI) oraz współczynnika rozpuszczalności wodnej suchej masy (WSI). Próbki zmielonego makaronu (0,7 g) mieszano w probówkach wirówkowych z 7 ml wody destylowanej. Po 5-minutowej przerwie próbki nawadniano przez 10 minut i mieszano co minutę do uzyskania jednolitej zawiesiny, którą następnie odwirowano (15 000 obr/min, 10 minut, 21°C) w wirówce Ortoalresa Digicen 21. Supernatant wysuszono do stałej masy w temperaturze 110°C. Wartości WAI i WSI obliczono stosując równania (a) i (b) wg Wójtowicz i Mościckiego [72].

a) $WAI (g/g) = mz/ms$

gdzie: mz – masa żelu (g), ms – masa suchej próbki (g)

b) $WSI (\%) = mc/ms \times 100\%$

gdzie: mc – masa cząstek po suszeniu (g), ms – masa suchej próbki (g)

F. Bezpieczeństwo (surowce)

- Mikrobiologia
Czystość mikrobiologiczną semoliny i suszu z grzybów sprawdzono w dwóch kierunkach: na obecność *Salmonella* spp. wg metody standardowej ISO 6579 w 25g oraz na obecność gronkowca koagulazo-dodatniego w 1g zgodnie z metodą ISO 6888 [73,74].
- Zawartość poziomą metali ciężkich oznaczono metodą ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry) [75], natomiast zawartości rtęci przy użyciu atomowego spektrometru absorpcyjnego [76].

G. Zawartość wybranych związków bioaktywnych

- Oznaczanie zawartości kwasów fenolowych (PAC), całkowitej zawartości flawonoidów (TFC), całkowitej zawartości polifenoli (TPC) wykonano w ekstraktach etanolowych, PBS (Phosphate-buffered saline) oraz w próbkach po trawieniu *in vitro*. PAC oznaczono według metody Arnova [77] i wyrażono jako ekwiwalent kwasu kawowego (CAE) w μg na g suchej masy. TFC oznaczono zgodnie z metodą opisaną

przez Lamaison & Carnet (1990) [78]. Obliczono ją jako ekwiwalent kwercetyny (QE) w mg na g suchej masy.

- TPC oznaczono przy użyciu odczynnika Folina-Ciocalteu stosowanego do oznaczania wszystkich frakcji polifenoli zawartych w ekstrakcie [79]. Całkowitą zawartość związków fenolowych obliczono jako ekwiwalent kwasu galusowego (GAE) w mg na g suchej masy.
- Analiza jakościowo-ilościowa związków fenolowych z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS (chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas) Związki fenolowe uwalniano z formy zestryfikowanej oraz ze ściany komórkowej za pomocą hydrolizy alkalicznej, a następnie ekstrahowano octanem etylu w kwaśnym pH, zgodnie z opisem Żuchowskiego i wsp. z modyfikacjami [80]. Stężenie związków fenolowych oznaczono przy użyciu wysokosprawnego chromatografu cieczowego (ExionLC AD, AB Sciex, Framingham, USA) sprzężonego ze spektrometrem mas (QTRAP 6500+, AB Sciex, Framingham, USA). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Kinetex Biphenyl (100 mm × 3 mm, 2,6 μm) (Phenomenex, Torrance, USA). W przypadku ekstraktów etanolowych, PBS i próbek trawionych analizowano je bezpośrednio w warunkach rozdziału identycznych jak w przypadku prób z hydrolizy alkalicznej.
- Zawartość glukanów całkowitych, alfa- i beta-glukanów oznaczono przy użyciu zestawu K-YBGL β-glukan Assay Kit (Megazyme, Bray, Irlandia) zgodnie z instrukcją producenta. Do procedury ekstrakcji wykorzystano wysuszone i zmielone próbki makaronu (100 mg). Wyniki obliczono zgodnie z instrukcją producenta i wyrażono w g/100g suchej masy.

H. Aktywność antyoksydacyjna

Oznaczenie aktywności antyoksydacyjnej wykonano w ekstraktach etanolowych, PBS oraz w próbkach po trawieniu *in vitro*.

- Potencjał antyrodnikowy
Aktywność zmiatania wolnych rodników mierzono przy użyciu 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylu (DPPH) według Brand-Williamsa, Cuveliera i Berseta (1995) oraz kwasu 2,2'-azino-bis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego (ABTS^{•+}) według Re i wsp. (1999) jako źródła wolnych rodników [81,82]. Aktywność przeciworodnikową wyrażano w ekwiwalentach Troloxu (mg Troloxu na gram suchej masy).
- Potencjał redukcyjny

Silę redukcji (RP) oznaczono zgodnie z metodami opisanymi przez Oyaizu [83]. Aktywność została wyrażona jako ekwiwalent Troloxu (TE) (mg Troloxu na gram suchej masy).

- Zdolność do chelatowania jonów Fe^{2+} (CHP) oznaczono metodą opracowaną przez Guo i wsp. [84]. Aktywność została wyrażona jako ekwiwalent EDTA (μg EDTA na g suchej masy).

I. Właściwości przeciwzapalne

Oznaczenia potencjalnych właściwości przeciwzapalnych dokonano w ekstraktach etanolowych, PBS oraz w próbkach po trawieniu *in vitro*.

- Aktywność hamująca LOX

Wpływ ekstraktów z próbki kontrolnej i makaronów fortyfikowanych suszonymi grzybami na aktywność lipooksygenazy (LOX) mierzono spektrofotometrycznie według metody opisanej przez Szymanowską i wsp., która została dostosowana do czytnika mikroplitek BioTek (Winooski, VT, USA) [85]. Jedna jednostka aktywności LOX została zdefiniowana jako wzrost absorbancji o 0,001 na minutę przy 234 nm. Odpowiednia kontrola zawierała to samo stężenie enzymu w nieobecności inhibitora. Stężenie ekstraktu (mg DW / ml) zapewniające 50% inhibicję (EC50) otrzymano przez wykreślenie procentu inhibicji LOX w stosunku do stężenia próbki.

- Aktywność hamująca COX2

Wpływ analizowanych ekstraktów na aktywność cyklooksygenazy-2 określono spektrofotometrycznie przy długości fali 590 nm, mierząc aktywność podjednostki peroksydazy COX przy użyciu NNN'N'-tetrametylo-p-fenylendiaminy (TMPDA) jako donoru elektronów, z wykorzystaniem zestawu COX Activity Assay firmy Cayman Chemical (Cayman Chemical Michigan, USA). Aktywność COX oznaczano zgodnie z instrukcją dołączoną do zestawu. Stężenie ekstraktu (mg DW / ml) zapewniające 50% inhibicję COX2 (EC50) uzyskano poprzez wykreślenie procentu inhibicji względem stężenia próbki.

J. Właściwości przeciwnowotworowe

Potencjalne właściwości przeciwnowotworowe badanych makaronów testowano z wykorzystaniem dwóch nowotworowych linii komórkowych: AGS - Human Caucasian gastric adenocarcinoma (ECACC No. 89090402) oraz HT 29 - Human Caucasian colon adenocarcinoma (ATCC HTB-38). Do oceny cytotoksyczności zastosowano zestaw do oznaczania WST-1 (BioVision, Inc., San Francisco, USA) zgodnie z procedurą producenta.

Cytotoksyczność określano jako procent żywych komórek w porównaniu z kontrolą. Wyniki oceniano poprzez określenie wartości EC50 (stężenie skuteczne dla 50% żywotności komórek), które wyrażano w mg DW / ml.

5.6. Analiza statystyczna

Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach, o ile nie zaznaczono inaczej. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica wersja oprogramowania 13.3 (StatSoft, Kraków, Polska). Do wykrycia statystycznie istotnych różnic między próbami stosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ lub test t-Studenta, a w przypadku niespełnienia założeń dotyczących jednorodności wariancji stosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Jednorodne grupy wyznaczone za pomocą testu Tukeya (przy zastosowaniu ANOVA) lub testu Dunna (przy zastosowaniu testu Kruskala-Wallisa). Dane podano jako średnią \pm odchylenie.

6. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

I. Mieszanka surowców- receptura

6.1. Podstawowy skład semoliny i mieszanek semoliny z suszem z grzybów

Na podstawie danych literaturowych do fortyfikacji makaronu wykorzystano proszek z suszonych grzybów o udokumentowanych właściwościach prozdrowotnych: Lion's Mane, Reishi, Maitake, Enoki. Zaprojektowano różne receptury z dodatkiem każdego grzyba w różnym udziale procentowym: 2,5, 5,0, 7,5 i 10%.

W pierwszej kolejności mieszanki zostały poddane ocenie podstawowych parametrów fizykochemicznych. Wyniki badań składu podstawowego semoliny i semoliny z dodatkiem suszonych grzybów przedstawiono w **PI, Tabela 1**. Zawartość składników mineralnych (popiołu) we wszystkich mieszankach surowcowych była istotna statystycznie, wyższa niż zawartość popiołu w próbie kontrolnej ($\alpha = 0,05$). Dodatkowo wraz ze wzrostem procentowego udziału suszonych grzybów zawartość popiołu wzrastała. Najwyższą wartość 1,48% wykazała próba E10. Zaobserwowano obniżenie wilgotności mieszanki surowcowej wraz ze wzrostem procentowego dodatku suszonych grzybów. Najwyższą wartość wilgotności 14,65% wykazano dla próby kontrolnej (100% semolina). Zawartość tłuszczu w badanych próbach wahała się od 1,00 (próba M2.5) do 1,13% (próba L10). Należy zauważyć, że dodanie 7,5% i 10% każdego z badanych suszonych grzybów spowodowało około 10% wzrost zawartości tłuszczu w mieszankach. W przypadku zawartości białka w surowcach, najniższy poziom, tj. 14,56%, stwierdzono dla próby M2.5, a najwyższą wartość oznaczono dla próby R10 (17,59%). Dodatkowo należy zauważyć, że mieszanki semoliny z dodatkiem Reishi (w każdym udziale procentowym) wykazywały najwyższą zawartość białka. Najniższą zawartość białka wykazano dla mieszanki semoliny z suszonym grzybem Lion's Mane. We wszystkich mieszankach zaobserwowano jedną wspólną zależność, tj. zawartość białka wzrastała wraz ze wzrostem procentowego udziału suszonych grzybów. Najwyższą zawartość węglowodanów w zakresie od 69,06% do 69,61% stwierdzono w mieszankach semoliny z grzybami Enoki. Z kolei najniższą zawartość oznaczono w mieszankach z suszonymi grzybami Reishi, a najniższa wartość dla wszystkich prób wyniosła 66,64% dla próby R10. Wartość energetyczna była na podobnym poziomie we wszystkich próbach i wahała się od 342,67 kcal/100 g do 349,25 kcal/100 g.

6.2. Parametry fizykochemiczne i technologiczne semoliny i mieszanek semoliny z suszem z grzybów

Parametry fizykochemiczne próby kontrolnej (semolina 100%) i semoliny wzbogaconej suszonymi grzybami podano w **PI Tabela 2**. Otrzymane wyniki wskazują, że najwyższą zawartość mokrego glutenu zawiera próba kontrolna (semolina), osiągając wartość 30,77%. Dodatkowo w mieszaninie semoliny z grzybami Maitake, Lion's Mane i Enoki zaobserwowano spadek zawartości mokrego glutenu wraz ze wzrostem procentowego udziału suszonych grzybów. Aktywność amylolityczna surowców została określona przez liczbę opadania. Jak pokazano w **PI Tabela 2**, osiągnęła ona najwyższą wartość, tj. 442 s, w próbie E10. Mieszanki semoliny z różnym udziałem procentowym suszonych grzybów Reishi były jedynymi mieszankami, w których liczba opadania obniżała się wraz ze zwiększeniem dodatku suszonych grzybów. W pozostałych mieszankach semoliny z grzybami: Enoki, Maitake, Lion's Mane parametr ten mieścił się w zakresie 389-442 s. Zawartość skrobi w próbie kontrolnej oraz mieszankach z grzybami Maitake, Lion's Mane i Enoki była stabilna w zakresie 56-57%. Z kolei w przypadku semoliny suplementowanej suszem z grzyba Reishi (próby R2.5-R10) zaobserwowano istotnie statystycznie niższe wartości zawartości skrobi w porównaniu do kontroli - **PI Tabela 2**. Najniższą zawartość skrobi, tj. 53,83%, oznaczono w próbie R10. Indeks glutenu w semolinie kontrolnej i mieszankach semoliny z suszonymi grzybami wahał się od 43% dla próby R5 do 80% dla próby L7.5 (**PI Tabela 3**).

Jakość produktu w dużej mierze zależy od jakości surowca i metod jego przetwarzania. Analizy wartości odżywczej materiału wyjściowego do produkcji wyrobów mącznych powinny uwzględniać wpływ fortyfikacji na zawartość głównych składników odżywczych. Typowa zawartość białka w semolinie z pszenicy durum mieści się w zakresie 11-16% [86]. Mieszanki semoliny z suszem z grzybów analizowane w niniejszej pracy charakteryzowały się zadowalającym poziomem białka (**PI Tabela 1**), a znacznie wyższe zawartości białka zaobserwowano w przypadku fortyfikacji proszkiem z grzybów Reishi. Podobnie Parvin i wsp. [50] zaobserwowali wyższe zawartości białka w makaronach po fortyfikacji proszkiem z bocznika ostrygowatego. Jednak w badaniu przeprowadzonym przez Chauhana i wsp. [87] dodanie pieczarki białej do semoliny spowodowało zmniejszenie zawartości białka w makaronie. Porównanie zawartości innych składników odżywczych (węglowodany, tłuszczy) przedstawione w **PI Tabela 1** pokazuje, że wartość odżywcza mieszanki semoliny z dodatkiem

badanych grzybów jest podobna lub nawet wyższa niż w przypadku kontroli. Ciasto przygotowane z mąki (lub mąki z pewnym dodatkiem) i jego właściwości są podstawą do produkcji większości produktów zawierających pszenicę [88] Wcześniejsze badania Lu i wsp. (2016) [89] wykazały, że fortyfikacja semoliny niektórymi proszkami grzybowymi (pieczarka biała, shiitake i prawdziwki) miała wpływ na wartość odżywczą oraz właściwości reologiczne i strukturalne ciasta. W związku z tym niektóre cechy, np. skład białkowy lub zawartość i jakość skrobi są istotne dla właściwości funkcjonalnych ciasta z mąki (w tym tych decydujących o dobrej jakości wytwarzanego chleba lub makaronu) [90] Białka glutenowe (gliadyny i gluteniny) mieszają się z wodą podczas wytwarzania ciasta z semoliny i tworzą gluten, tj. lepkosprężystą substancję, która wiąże ze sobą ziarna skrobi i inne składniki mąki [90,91].

Białka glutenowe odgrywają znaczącą rolę w określaniu jakości mąki pszennej, nadając ciastu zdolność absorpcji wody, spoistość, lepkość i elastyczność. Indeks glutenu (GI - Gluten Index) jest popularnym wskaźnikiem jakości glutenu określającym jego siłę. Wartość GI klasyfikuje jakość glutenu jako słabą (GI < 30%), normalną (GI = 30-80%) lub silną (GI > 80%) [64,92]. Zaobserwowany w niniejszej pracy wzrost zawartości białka w mieszankach semoliny wzbogaconych suszonymi grzybami nie był skorelowany ze wzrostem zawartości białek glutenowych. Wręcz przeciwnie, dodatek grzybów zmniejszał zawartość glutenu (**PI Tabela 1 i 2**), podczas gdy dla wszystkich badanych prób odnotowano zadowalające wartości GI, najwyższe wartości indeks glutenu określono dla mieszanki z grzybami Lion's Mane (**PI Tabela 3**). Rodzaj interakcji białko-skrobia, który może wpływać na lepkosprężyste właściwości ciasta, odgrywa istotną rolę w kształtowaniu cech reologicznych ciasta przygotowanego z mąki z pszenicy durum.

Kolejnym parametrem określającym jakość surowca do produkcji makaronu jest liczba opadania. Parametr ten powinien być wysoki dla surowców do produkcji makaronu. Spadek liczby opadania powoduje wzrost aktywności enzymów amylolitycznych, które rozkładają skrobię dlatego niewystarczająca wartość liczby opadania zwiększy straty podczas gotowania i zwiększy kleistość makaronu [62,91]. W porównaniu do kontroli istotną statystycznie niższą liczbę opadania stwierdzono dla prób z dodatkiem grzyba Reishi R7.5 i R10, a wyższe wartości odnotowano dla prób z dodatkiem grzybów M2.5, L2.5, L7.5 i E10 (**PI Tabela 2**). Obserwacje te mogą wskazywać, że wzbogacanie semoliny suszonymi grzybami Reishi może pogarszać przydatność takiej mieszanki surowców do produkcji makaronu, dlatego konieczne było określenie dodatkowych parametrów jakości ciasta za pomocą testów reologicznych [90]. W celu scharakteryzowania właściwości reologicznych ciasta sprawdzono parametry

alweograficzne, tj. stosunek P/L i wartość W (**PI Tabela 3**). Wartości W (wytrzymałość ciasta) mieściły się w zakresie od 146×10^{-4} J dla kontroli (C) do 206×10^{-4} J dla próby L5. Wartość P/L (określająca stosunek wytrzymałości na rozciąganie do rozciągliwości ciasta) w ocenie alweograficznej wykazała bardzo zróżnicowaną wytrzymałość glutenu, wzrastającą od 0,75 dla E2.5 do 5,37 dla M10. Najwyższe wartości tego parametru odnotowano dla ciasta wykonanego z mąki wzbogaconej Maitake (próby M7.5 i M10) i Lion's Mane (próby L7.5 i L10). Jak sugerują niektórzy badacze, parametr W i stosunek P/L wskazują poziomy wytrzymałości glutenu [86]. Parametr W jest jednym z najczęściej stosowanych w przemyśle zbożowym parametrów alweograficznych, ponieważ służy do przewidywania zachowania mąki podczas przetwarzania. Wysoki P/L wskazuje na odporne i nierozciągliwe ciasto, podczas gdy niski P/L wskazuje na słabe i rozciągliwe ciasto. Parametr P/L jest często wykorzystywany przemysłowo wraz z parametrem W do oceny jakości mąki, ponieważ P/L wskazuje na równowagę między wytrzymałością a rozciągliwością [93]. Do produkcji produktów piekarniczych zalecana jest mąka charakteryzująca się wartością parametru P/L niższą od 0,5 [94]. Natomiast sugerowanymi przez Dapcevic i wsp. [95] wartościami parametrów pszenicy durum wskazującymi na jej przydatność do produkcji makaronu są: P/L w przedziale 1,5-2,5, a wartość parametru W w przedziale 200-250 ($\times 10^{-4}$ J). Należy wspomnieć, że wartość parametru W wskazuje na zalecaną formę produkcji makaronu. Pszenica twarda charakteryzująca się wartością W poniżej 200 nie nadaje się zbyt do produkcji długich makaronów, takich jak spaghetti, ale nie musi przeszkadzać w produkcji innych form makaronu [96]. Jak wskazują dane w **PI Tabela 3**, fortyfikacja semoliny grzybami generalnie spowodowała wzrost parametrów W i P/L, co może sugerować poprawę właściwości reologicznych analizowanych mieszanek. Wartość tych parametrów może wskazywać, że ciasto uzyskane z badanych mieszanek semoliny z suszonymi grzybami będzie odpowiednie do produkcji makaronu. Niemniej jednak, przy wartościach $P/L > 2,5$ (jak dla prób R10, M5-10 i L7.5-10), w zachowaniu ciasta obserwuje się niezrównoważoną proporcję rozciągliwości i elastyczności - ciasto nie ma elastyczności, co może powodować problemy w produkcji makaronu [96]. W badaniu przeprowadzonym przez Nie i wsp. [88], dodatek proszku *Pleurotus eryngii* wpłynął na właściwości reologiczne ciasta pszennego a dokładniej większy dodatek suszonego grzyba do mąki pszennej spowodował bardziej elastyczne i twardsze, ale mniej lepkie ciasto.

Stopień uszkodzenia skrobi jest coraz częściej wykorzystywany jako parametr opisujący właściwości skrobi. Jest on związany z mechanicznym uszkodzeniem ziaren skrobi podczas procesu mielenia ziarna. W badaniu semoliny i mieszanek stopień uszkodzenia skrobi

wyrażony jest w jednostkach A_i (absorpcja jodu) i wahał się od 76,59% dla próby M5 do 84,14% dla próby R10 (**PI Tabela 3**). Należy również zauważyć, że wysoki stopień uszkodzenia skrobi zaobserwowano w próbach semoliny uzupełnionej proszkiem Reishi (próby R2.5-R10) charakteryzujących się niskimi wartościami indeksu glutenu – **PI Tabela 3**. W produkcji makaronu uszkodzenie skrobi jest bardzo niekorzystne, ponieważ może zwiększyć straty podczas gotowania oraz zmniejszyć jędrność i wchłanianie wody przez makaron. Dlatego najniższy stopień uszkodzenia skrobi decyduje o najwyższej przydatności przygotowanego ciasta do produkcji makaronu [64,90]. Fortyfikacja semoliny zastosowana w tych badaniach spowodowała statystycznie istotny wzrost tego parametru w porównaniu z kontrolą tylko w przypadku dodania 5% i 10% suszonych grzybów Reishi, podczas gdy niższy stopień uszkodzenia skrobi wykryto w próbach M5, M10 i E2.5-10 (**PI Tabela 3**).

Z punktu widzenia konsumenta, bardzo ważnym parametrem jakości produktów spożywczych jest barwa. Najbardziej odpowiednim parametrem do oceny barwy semoliny jest pomiar wartości b^* i L^* (zażółcenie i jasność). Żółty kolor pochodzi z naturalnych pigmentów obecnych w ziarnach pszenicy durum (karotenoidy i ksantofile). Ich ilość może się różnić w zależności od pochodzenia botanicznego, warunków uprawy, rozmieszczenia w ziarnie i procesów technologicznych [97]. Niektóre dodatki stosowane w produkcji wyrobów pszennych mogą wywoływać zmiany barwy [41,98].

Instrumentalna ocena barwy badanych mieszanek wykazała statystycznie istotny spadek parametru L^* we wszystkich próbach suplementowanych grzybami co wskazuje, że mieszanki przygotowane z semoliny wzbogaconej grzybami były ciemniejsze. Ponadto, pozostałe parametry oceny barwy mieszanek na bazie semoliny suplementowanej grzybami (a^* i b^*) różniły się i były istotne statystycznie w porównaniu do kontroli - zaobserwowano istotny wzrost parametru a^* i spadek parametru b^* . Zastosowanie grzybów Reishi do suplementacji semoliny spowodowało największe zmiany barwy ciasta, co pokazano w **PI Tabela 3**. Próba R10 najbardziej różniła się w tym zakresie od kontroli spośród wszystkich prób. Próba kontrolna wykazała najwyższe wartości parametrów L^* (jasność) i b^* (zażółcenie), które są najczęściej oczekiwane dla semoliny. Zaobserwowane zmiany barwy dotyczące w szczególności mieszanek z dodatkiem dwóch grzybów: Reishi i Maitake (szczególnie znaczny spadek wartości b^*) może mieć istotny wpływ na ocenę przez konsumentów barwy produktów wytworzonych z takiej mieszanki.

6.3. Parametry bezpieczeństwa semoliny i mieszanek semoliny z suszem z grzybów

Zawartość metali szkodliwych i jakość mikrobiologiczną analizowanych mieszanek zestawiono w **PI Tabela 4**. Zawartość Pb, As, Cd i Hg w semolinie i wszystkich mieszankach semoliny z grzybami była poniżej granicy oznaczalności metody i wszystkie były zgodne z wymogami Rozporządzenia Komisji (WE) nr 1881/2006 ustalającego najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych [99]. W dniu 5 maja 2023 r. zostało opublikowane Rozporządzenie Komisji (UE) 2023/915 z dnia 25 kwietnia 2023 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów niektórych zanieczyszczeń w żywności oraz uchylające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006. Nowe rozporządzenie weszło w życie i jest stosowane od 25 maja 2023 roku. W przypadku zawartości metali ciężkich tj. Pb, Cd nie ma limitów dla przetworów zbożowych (makaron, mąka) tylko dla surowców, jakimi są pszenica durum i grzyby [100].

Wszystkie badane w niniejszej pracy surowce wykazywały odpowiednią czystość mikrobiologiczną i były wolne od mikroorganizmów patogennych tj. *Salmonella* i gronkowców (**PI Tabela 4**).

Jakość środków spożywczych, w tym produktów zbożowych fortyfikowanych dodatkiem niemącznym, musi również spełniać wymagania dotyczące bezpieczeństwa żywności. Oczywiście jest zatem, że jakość mikrobiologiczna i brak zanieczyszczeń chemicznych surowców wyjściowych, np. metalami ciężkimi, będą determinowały jakość i bezpieczeństwo produktów finalnych. Jak wskazują dane przedstawione w **PI Tabela 4**, wszystkie badane mieszanki semoliny z suszonymi grzybami spełniają wymagania prawa i mogą być zakwalifikowane do produkcji wyrobów spożywczych [100].

Podsumowując ten etap badań należy stwierdzić, że pomimo zaobserwowanych różnic w niektórych badanych parametrach (zwłaszcza tych wskazujących na gorsze parametry reologiczne ciasta - próby z 10% dodatkiem Maitake, Reishi i Lion's Mane), ocena żadnej z badanych mieszanek nie wskazała parametrów jednoznacznie wykluczających możliwość produkcji z niej makaronu dobrej jakości. Dlatego też do kolejnego etapu, tj. produkcji makaronu, zostały zakwalifikowane wszystkie mieszanki.

II. Określenie właściwości odżywczych, cech fizykochemicznych i akceptowalności konsumenckiej makaronów przygotowanych z mieszanek semoliny z suszonymi grzybami

Na podstawie badań dotyczących oceny surowców sypkich (semolina, mieszanka semoliny ze sproszkowanymi grzybami) wyprodukowano makaron typu tagliatelle zgodnie z założeniami w warunkach laboratoryjnych. Wyprodukowane makarony zostały poddane badaniom w celu określenia ich wartości odżywczej, właściwości fizycznych, tekstury, właściwości kulinarnych oraz organoleptycznych (**PII**).

6.4. Wpływ dodatku suszu z grzybów na skład i wartości odżywcze makaronu

Skład chemiczny makaronu wyprodukowanego z semoliny i semoliny wzbogaconej suszem z grzybów przedstawiono w **PII Tabela 1**. Wilgotność we wszystkich próbach makaronu przed ugotowaniem była zbliżona do wartości dopuszczalnej tj. 12,5%, z wyjątkiem próby R10, dla którego wartość ta wynosiła 12,71%. Wilgotność makaronu jest jednym z najważniejszych parametrów wpływających na jego przydatność do przechowywania. Zawartość wody w makaronie powyżej 12,5% może przyczynić się do rozwoju pleśni i pogorszenia jakości makaronu, podczas gdy niewystarczająca wilgotność poniżej 6% może przyczynić się do wzrostu jego kruchości [101]. Wszystkie wyniki wilgotności makaronu uzyskane w niniejszym badaniu mieściły się w wymaganych wartościach, z wyjątkiem jednego wariantu (próba R10) (**PII Tabela 1**). Z badań wstępnych dotyczących surowców (**PI, Tabela 1**), wynika że mieszanka semoliny z grzybem Reishi charakteryzowała się obniżoną wilgotnością w porównaniu do próby kontrolnej. Dlatego wynik uzyskany w tym badaniu jest trudny do wyjaśnienia. Prawdopodobnie najwyższa zawartość białka w tej mieszance (w próbie makaronu R10) spowodowała wzrost wilgotności próby makaronu R10 w wyniku interakcji białko-woda opisanych w literaturze [102].

Wyniki analiz składu chemicznego badanych makaronów podsumowane w **PII Tabela 1** wskazują, że suplementacja suszonymi grzybami spowodowała wzrost zawartości popiołu, białka i błonnika pokarmowego. Zawartość popiołu w każdej wzbogaconej próbie makaronu była istotna statystycznie wyższa niż w próbie kontrolnej. Ponadto, w każdej próbie makaronu ze wzbogaconej mieszanki zawartość popiołu wzrastała wraz z ilością dodanego suszu z grzybów, osiągając maksymalną wartość 1,54% w próbie R10. Zawartość białka również

wzrastała wraz z ilością dodawanych suszonych grzybów, osiągając najwyższą wartość 17,60% w próbie R10. Zawartość tłuszczu była podobna we wszystkich próbach, tj. około 1%. Zawartość węglowodanów w makaronie zmniejszała się wraz ze wzrostem dodatku suszonych grzybów, osiągając najniższą wartość 67,04% w próbie R10. Wartość energetyczna makaronu fortyfikowanego badanymi grzybami przed gotowaniem była podobna do wartości energetycznej próby kontrolnej i wahała się od 348,63 kcal na 100 g w próbie R10 do 356,41 kcal na 100 g w próbie kontrolnej. Całkowita zawartość błonnika pokarmowego (TDF) w próbie z semoliny wynosiła 8,56%. Dodatek grzybów Reishi i Enoki (we wszystkich ilościach) zwiększył zawartość błonnika w makaronie. W przypadku grzybów Maitake i Lion's Mane, zawartość TDF była zwiększona w próbach zawierających co najmniej 5% suszonych grzybów.

Opisane powyżej wyniki są prawdopodobnie związane ze składem dodanych grzybów, które są bogatym źródłem białka i błonnika pokarmowego. Podobne wyniki uzyskali Nordiana i wsp. (2019), Parvin i wsp. (2020) oraz Lu i wsp. (2016) którzy badali suplementację makaronu grzybami: pieczarka biała, bocznik ostrygowaty, shiitake [50,89,103].

6.5. Właściwości kulinarne i hydratacyjne makaronu

Ocena kulinarna makaronu wzbogaconego suszonymi grzybami po ugotowaniu została przedstawiona w **PII Tabela 2**. Optymalny czas gotowania (OCT) wahał się od 4,50–4,54 min w próbie R7.5 do 4,60 minut w próbie kontrolnej, jednak różnice między próbami nie były istotne statystycznie. Parametr straty suchej masy podczas gotowania (CL – cooking loss), wskazujący na wypłukiwanie substancji stałych do wody podczas gotowania, był najwyższy w makaronie wzbogaconym grzybami Enoki - E10 (6,25% vs. 3,37% w kontroli). Co więcej, straty podczas gotowania wzrastały wraz z ilością dodawanych suszonych grzybów (wszystkich gatunków). Wartość parametru CL dla makaronu R2.5 była zbliżona do próby kontrolnej (3,37%). Najniższą wartość CL (3,05%) zaobserwowano dla próby M2.5. Współczynnik przyrostu wagowego po ugotowaniu (CWI - cooking weight index) wahał się od 2,01 do 2,50. Dodatek grzybów Lion's Mane wpłynął na najniższe wartości CWI spośród wszystkich grzybów użytych w badaniu, od 2,01 w próbie L7.5 do 2,06 w próbie L5, co stanowiło 18% spadek w porównaniu z kontrolą (2,46). Najwyższe wartości CWI uzyskano dla makaronu wzbogaconego grzybami Enoki: wartość w próbach E2.5 i E10 wynosiła 2,50, co było nieznacznie wyższe niż CWI w próbie kontrolnej C (wzrost o 1,6%).

Zawartość i jakość niektórych składników, np. białka lub skrobi, może wpływać na jakość ugotowanego makaronu, ponieważ rodzaj interakcji białko-skrobia może wpływać na tworzenie się matrycy skrobiowo-białkowej. Jak wskazano w niektórych badaniach, dodanie błonnika i nieglutenowych składników bogatych w białko do mąki może wywierać znaczący negatywny wpływ na integralność i wytrzymałość sieci białkowo-skrobiowej, powodując zmiany w jakości kulinarnej makaronu [50,104]. Fortyfikacja wszystkimi badanymi suszonymi grzybami miała niewielki wpływ na optymalny czas gotowania, skracając go tylko nieznacznie (**PII Tabela 2**). Podobnie, jak wykazali Biernacka i wsp. (2017) [71] oraz Parvin i wsp. (2020) [50], dodatek odpowiednio błonnika chleba świętojańskiego i sproszkowanych grzybów do mąki skrócił optymalny czas gotowania makaronu. Odwrotną tendencję odnotowano w badaniu przeprowadzonym przez Krawęcką i wsp. (2021) [104], w którym makaron został suplementowany pokrzywą o wysokiej zawartości błonnika. W niniejszym badaniu wraz ze wzrostem poziomu suplementacji straty podczas gotowania (CL) makaronu wzbogaconego badanymi grzybami wzrastały. Nie zaobserwowano jednak wzrostu tego parametru w próbach suplementowanych 2,5% Reishi, Maitake i Lion's Mane w porównaniu do kontroli. Z drugiej strony, najwyższą wartość CL odnotowano w makaronie wzbogaconym Enoki (CL od 3,63 do 6,25% s.m. odpowiednio w próbach E2.5-E10 (**PII Tabela 2**)). Wzrost CL był prawdopodobnie związany z interakcją niektórych składników grzybów (błonnika), które wpłynęły na zakłócenie formowania siatki skrobiowo-glutenowej, umożliwiając wyplukiwanie większych ilości skleikowanej skrobi z makaronu podczas gotowania, co sugerowali również inni badacze [71]. Należy również zauważyć, że wszystkie badane próby charakteryzowały się CL poniżej 8% s.m., powyżej którego jakość makaronu jest uważana za niedopuszczalną [105].

Badanie odporności makaronów na działanie wody jest istotne ze względu na możliwość optymalizacji procesu ich produkcji, transportu, przechowywania i przygotowania do spożycia. Wchłanianie wody przez makaron można uznać za cechę pozytywną, przyczyniającą się do skrócenia czasu gotowania produktu. W innych przypadkach właściwość ta jest wadą, zwłaszcza gdy ochrona produktu przed działaniem wody jest bardzo pożądana lub gdy materiał opakowaniowy chroniący makaron przed wilgocią zewnętrzną ulega rozszczelnieniu [106].

Wartości WAI (współczynnik wodochłonności) i WSI (współczynnik rozpuszczalności wodnej suchej masy) uzyskane podczas badania makaronów z semoliny wzbogacanych dodatkiem suszonych grzybów są podobne do wyników zgłoszonych przez innych autorów Marti i wsp. (2013) [107]. Wartości tych parametrów są nawet niższe w porównaniu do makaronów błyskawicznych wytwarzanych metodą ekstruzji [72,108] lub innych produktów

ekstrudowanych [67]. Pomiar WAI wykazał, że dodatek każdego z grzybów nie miał istotnego wpływu na wartość tego parametru, w porównaniu do próby kontrolnej. Niewielkie zmiany tego parametru w zależności od ilości danego grzyba nie były istotne statystycznie (**PII Tabela 2**). Podobnie w badaniu przeprowadzonym przez Lu i wsp. (2016) [89], wartość WAI w makaronach suplementowanych pieczarką białą i shiitake nie różniła się istotnie od kontroli, choć występowała tendencja do niższego WAI w próbach wzbogaconych w grzyby w porównaniu do kontroli.

Stwierdzono, że dodatek każdego z grzybów spowodował znaczny wzrost wartości WSI w porównaniu z próbą kontrolną. Wartość WSI wzrastała wraz ze wzrostem poziomu dodatku każdego z grzybów. Najwyższą wartość (9,22%) uzyskano w makaronie wzbogaconym 10% dodatkiem grzybów Reishi, podczas gdy najniższą wartość WSI stwierdzono w próbie kontrolnej (3,37%). Wartości uzyskane dla makaronu wzbogaconego są wyższe niż wyniki otrzymane przez innych badaczy analizujących makaron ekstrudowany [72,107,108]. W przytoczonych powyżej przykładach wszystkie składniki były lepiej związane z matrycą skrobiowo-białkową. Skrobia była skleikowana pod wpływem obróbki ciśnieniowo-termicznej podczas procesu ekstruzji w temperaturze powyżej temperatury kleikowania skrobi. W badaniach prezentowanych w pracy **PII** makaron z dodatkiem grzybów został przygotowany w temperaturze pokojowej i wysuszony w temperaturze około 55°C, co ostatecznie dało jego stabilną strukturę. Tworzenie stabilnej matrycy opartej na uwodnionym białku glutenowym zostało zakłócone przez wprowadzenie dodatków grzybowych, które charakteryzowały się wyższą zawartością błonnika i białka nieglutenowego. W ten sposób ograniczyły one ilość białka glutenowego i węglowodanów niezbędnych do utworzenia prawidłowej struktury makaronu. Można to zaobserwować w wynikach WSI w porównaniu z makaronem kontrolnym zawierającym tylko semolinę. Podobne wyniki uzyskano w badaniach nad makaronem wzbogaconym białymi pieczarkami przeprowadzonymi przez Chauhan i wsp. (2017) [87].

6.6. Ocena sensoryczna makaronu

Dodatek 2,5-10% suszu z grzybów nie spowodował znaczącego pogorszenia wyglądu, barwy i zapachu makaronu przed gotowaniem (**PII Rysunek 2a**) oraz wyglądu, barwy, zapachu, konsystencji i smaku ugotowanego makaronu wzbogaconego Enoki i Maitake (**PII Rysunek 2b**). Jednak w przypadku pozostałych dwóch grzybów dodanych do makaronu (Reishi i Lion's Mane) smak ugotowanego makaronu z suplementacją 7,5 i 10% znacznie się

pogorszył w porównaniu z próbą kontrolną (**PII Rysunek 2b**). Smak tych prób ugotowanego makaronu został oceniony jako nieprzyjemny i gorzki, a zatem próby te zostały ocenione jako nieakceptowalne. Jak wskazuje ocena sensoryczna (**PII Rysunek 2**) najwyższy wynik akceptowalności uzyskał makaron kontrolny (surowy i ugotowany). Wzrost ilości suplementacji makaronu z użyciem wszystkich badanych suszonych grzybów skutkowało niższymi wynikami oceny zarówno przed jak i po ugotowaniu makaronu. Takie same obserwacje zgłosili Lisiecka i wsp. (2019) wraz ze wzrostem dodatku *C. incanus* do suchego makaronu wyniki oceny sensorycznej były niższe [41]. Podobne wnioski dotyczące oceny sensorycznej sformułowano w badaniu przeprowadzonym przez Hong i wsp. (2005), w którym boczniki ostrygowate (*Pleurotus ostreatus*) dodano do chleba w ilości 1-4% [109]. Pod względem ogólnej akceptowalności chleba, poziom dodatku przekraczający 1% spowodował znaczny spadek wyników jakości sensorycznej. Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez Kaur i wsp. (2013) dodatek 6 i 8% suszonych pieczarek do makaronu zwiększył ocenę ogólnej akceptowalności ugotowanego makaronu w porównaniu z próbą kontrolną. Makaron z dodatkiem 8% sproszkowanych grzybów został wybrany jako najlepszy [110]. Jednak dodatek 12% i 15% pieczarek spowodował niższy wynik oceny sensorycznej w porównaniu z próbą kontrolną. Również w badaniu przeprowadzonym przez Muresan i wsp. (2017), w którym do makaronu dodano 10 i 20% borowików szlachetnych, najwyższe wyniki oceny sensorycznej (również smaku) uzyskała próba z 10% dodatkiem [48]. Na podstawie wyników prezentowanych w pracy **PII** można stwierdzić, że suplementacja makaronu badanymi grzybami spowodowała, że jest on o dobrej jakości sensorycznej, szczególnie w przypadku oceny próbek przed gotowaniem. Należy również dodać, że ugotowane makarony (z wyjątkiem próbek wzbogaconych o 7,5% i 10% grzybów Lion's Mane i Reishi) uzyskały akceptację konsumentów, ponieważ średnie wyniki dla wszystkich ocenianych cech były powyżej 3 (w skali 5-cio punktowej).

6.7. Barwa makaronu

Z punktu widzenia konsumenta barwa jest jedną z bardzo ważnych cech makaronu, często decydującą o ostatecznym zakupie produktu. Producenci makaronów tradycyjnych powinni spełniać kryteria i oczekiwania Włochów, którzy są czołowymi konsumentami makaronów w Europie. Zgodnie z ich oczekiwaniami makaron powinien mieć barwę bursztynowo-żółtą

bez odcieni szarości i czerwieni [111]. Wyniki oceny barwy makaronów przed i po ugotowaniu wzbogaconych suszem z grzybów przedstawiono w **PII Tabeli 3**.

W przypadku makaronu przed ugotowaniem wartość parametru b^* dla kontroli wynosiła 24,43. Najbardziej zbliżoną wartość, tj. 23,54, stwierdzono w próbie L2.5. Najniższe skrajne wyniki zaobserwowano w próbie makaronu fortyfikowanego 10% suszonego grzyba Reishi, gdzie wartość parametru b^* wyniosła zaledwie 3,76. Analiza wartości b^* w gotowanym makaronie wykazała, że dodatek grzybów Lion's Mane i Enoki spowodował znaczny wzrost tego parametru, znacznie zintensyfikował odcień żółty, podczas gdy suplementacja grzybami Reishi i Maitake spowodowała spadek wartości b^* w porównaniu z makaronem kontrolnym. Największy spadek odnotowano w makaronie po ugotowaniu R10 ($b^*= 3,17$). Mogło to być spowodowane brązowo-czerwonym odcieniem dodanego materiału, ponieważ dodanie ciemnych suszonych grzybów najprawdopodobniej zamaskowało żółty kolor. Podobnie w badaniu przeprowadzonym przez Nordina i wsp. [103], dodatek boczników i pieczarek białych spowodował spadek parametru b^* badanego makaronu.

Makaron fortyfikowany suszem z grzyba Reishi charakteryzował się również największą zmianą parametru L^* tzn. wskazującego na jasność makaronu. W porównaniu do kontroli, spadek wartości tego parametru o 31,59-42,48% odnotowano odpowiednio w próbach R2.5 - R10. W pracy **PII Rysunek 1** przedstawiono wizualizację barwy analizowanych wariantów makaronu. Podsumowując, makaron wzbogacony grzybami Enoki i Lion's Mane charakteryzował się najbardziej zbliżoną barwą do kontroli, podczas gdy dodatek Reishi spowodował największe zmiany w barwie makaronu (**PII Tabela 3 i Rysunek 1**). Najwyższą wartość jasności (L^* 79,86 i 70,76 odpowiednio dla makaronu przed i po ugotowaniu) zaobserwowano w próbie kontrolnej. Podobnie jak w przypadku makaronu przed ugotowaniem, wartość L^* obniżyła się we wszystkich próbach z dodatkiem suszonych grzybów. Najniższą wartość L^* odnotowano w makaronie gotowanym z 10% dodatkiem suszonych grzybów Reishi.

W makaronach fortyfikowanych badanymi grzybami odnotowano również znaczny wzrost parametru a^* (tj. zaczerwienienie) w stosunku do próby kontrolnej po ugotowaniu, w której osiągnął najniższą wartość 0,06. Najwyższą wartość a^* określono dla makaronu gotowanego z dodatkiem 7,5% Lion's Mane. W porównaniu do próby kontrolnej, wzrost parametru a^* zaobserwowano zarówno w próbach makaronu przed jak i po ugotowaniu (**PII Tabela 3**). Podsumowując, wartość parametru a^* była znacznie wyższa we wszystkich próbach (makaron przed i po ugotowaniu) suplementowanych grzybami niż w próbie kontrolnej,

osiągając maksymalną wartość a^* w surowym makaronie E10 ($a^* = 7,00$) i gotowanym makaronie L7.5 ($a^* = 5,62$). Było to prawdopodobnie związane z barwą dodanych grzybów. Wyniki te są zgodne z badaniami dotyczącymi makaronu z dodatkiem mąki z boczniaka ostrygowatego [103] i liści *Cistus incanus L.*, [41].

6.8. Ocena tekstury makaronu

Określając teksturę makaronu przed ugotowaniem należy zbadać m.in. jego odporność na deformację, pękanie i zniszczenie. Cechy te są istotne zarówno z punktu widzenia optymalizacji procesu produkcyjnego (warunki suszenia, sposób pakowania wyrobu gotowego) oraz procesów dystrybucji i logistyki. Niewystarczająca odporność na uszkodzenia i niska wartość siły niszczącej makaronu może utrudniać proces pakowania i skutkować utratą wartości sprzedażowej i konsumenckiej (produkt jest niestabilny podczas przechowywania, zbyt delikatny w transporcie, o gorszych właściwościach funkcjonalnych, w tym zmienionym wyglądzie i kształcie) [112].

W **PII Tabela 4** przedstawiono wyniki oceny tekstury makaronów przed i po ugotowaniu. Dla makaronów przed ugotowaniem wyniki wskazują na pozytywny wpływ niemal wszystkich odmian i ilości grzybów na badane parametry. Wyższą odporność na zginanie i odkształcenia przy zniszczeniu, zaobserwowano w większości prób makaronów z dodatkiem grzybów, co świadczy o większej odporności na deformację, pękanie połączonej z mniejszą kruchością i większą odpornością makaronu na uszkodzenia. Najwyższą wartość odporności na zginanie (24,30 MPa) i jednocześnie najwyższą maksymalną siłą niszczącą (2,810 N) niezbędną do złamania próby oraz najwyższą wartość odkształcenia przy zniszczeniu uzyskano w makaronie przygotowanym z 10% dodatkiem Lion's Mane. Należy również zauważyć, że odporność na zginanie w zdecydowanej większości badanych wariantów makaronów wzrastała wraz ze wzrostem ilości grzybów w recepturze mieszanki (**PII Tabela4**). Wyniki te były znacznie niższe niż w przypadku innych produktów spożywczych, np. wafli [112] czy ekstrudowanych przekąsek zbożowych [67]. Wyższa wytrzymałość na uszkodzenie i niższa kruchość analizowanych próbek wynika prawdopodobnie z właściwości dodatków grzybowych. Charakteryzują się one wysoką zawartością błonnika pokarmowego, np. nierozpuszczalnych włókien, które bezpośrednio przyczyniają się do wzmocnienia/usztywnienia tekstury gotowego produktu, w porównaniu do makaronu kontrolnego na bazie samej semoliny.

Twardość ugotowanego makaronu wahała się od 97,10 N w próbie z 5% dodatkiem grzybów Reishi do 237 N w próbie M5, podczas gdy wartość tego parametru w próbie kontrolnej wynosiła 221 N. Uogólniając, fortyfikacja badanymi grzybami, spowodowała spadek twardości ugotowanego makaronu (z wyjątkiem prób M5 i E10) – **PII Tabela 4**. Najwyższy wynik kleistości, tj. 4,69 mJ, odnotowano dla próby L5, a najniższą wartość (0,18 mJ) uzyskano w próbie R5. Najwyższą wartość parametru elastyczności (0,91) zaobserwowano w próbie L5, podczas gdy próba R10 wykazywała najniższą wartość tego parametru (0,52) i mniejszą wartość, tym bardziej elastyczny makaron. Należy również zauważyć, że tylko próba L5 charakteryzowała się niższą elastycznością niż próba kontrolna.

Właściwości tekstury makaronu po ugotowaniu są bardzo ważne ze względu na ich wpływ na akceptację konsumentów. Jak donoszą Lu i wsp. (2016) [89], na parametry tekstury gotowanego makaronu z dodatkiem grzybów wpływa specyficzny skład proszku grzybowego (zarówno rodzaj jak i poziom suplementacji). W badaniach zaprezentowanych w pracy **PII** fortyfikacja badanymi grzybami spowodowała spadek twardości ugotowanego makaronu (z wyjątkiem prób M5 i E10) i wzrost elastyczności (z wyjątkiem próby L5). Jak sugerują inni badacze, na te parametry tekstury ugotowanego makaronu wpływa specyficzny skład proszku grzybowego dodanego do semoliny, a także rodzaj błonnika, białek, lipidów a nawet ich masa cząsteczkowa [87,89]. Wysoka zawartość błonnika w recepturze makaronu może powodować wyższą twardość po ugotowaniu. Może to wynikać z konkurencji o cząsteczki wody między skrobią, białkami i błonnikiem oraz różnym poziomem uwodnienia składników, co z kolei może wpływać na wytrzymałość utworzonej sieci glutenowej [87,89]. W badaniu przeprowadzonym przez Chauhan i wsp. (2017) [87], suplementacja semoliny białymi pieczarkami spowodowała obniżenie twardości makaronu ugotowanego. Podobnie w badaniach przeprowadzonych przez Nordiana i wsp. (2019) [103], fortyfikacja makaronu 5%, 10% i 15% bocznika, spowodowała 4-11% spadek twardości makaronu i 50-76% wzrost elastyczności makaronu. W powyższych badaniach fortyfikacja grzybami zmniejszyła również kleistość makaronu o 12-30%, podczas gdy wartość tego parametru, w badaniach w niniejszej pracy doktorskiej, w ugotowanych makaronach z semoliny była zależna od rodzaju dodanych grzybów. Zmniejszyła się w próbach E2.5-E10, L5 i R2.5 i wzrosła w pozostałych próbach z dodatkiem grzybów – **PII Tabela 4**.

Podsumowując ten etap badań możliwe było wyprodukowanie makaronu wzbogaconego suszonymi sproszkowanymi grzybami o udokumentowanych właściwościach prozdrowotnych (*Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Hericiium erinaceus* i *Grifola frondose*), co nie było

dotychczas badane. Makaron fortyfikowany grzybami niemal we wszystkich badanych wariantach wykazał zadowalające właściwości kulinarne, odżywcze i organoleptyczne jak również odpowiednią teksturę, w szczególności odporność na złamanie i deformację przy zniszczeniu. Ocena parametrów jakości kulinarnej i sensorycznej wskazuje na konieczność optymalnego doboru poziomu dodatku poszczególnych grzybów. W przypadku suplementacji makaronów grzybami Lion's Mane i Reishi, badania wskazały, że makarony z 7,5% i 10% dodatkiem grzybów nie powinny być wykorzystywane w dalszych badaniach ze względu na negatywną ocenę sensoryczną, w szczególności intensywnie gorzki smak, który wyraźnie różnił się od oceny próby kontrolnej.

III. Badania zawartości związków bioaktywnych i niektórych właściwości prozdrowotnych makaronu

Grzyby ze względu na wartości odżywcze (zawierają białko, węglowodany, błonnik pokarmowy, witaminy i minerały), ale także udokumentowane właściwości prozdrowotne, takie jak działanie immunomodulujące, przeciwnowotworowe a nawet zapobiegające demencji [17] oraz cechy sensoryczne i teksturę mogą być stosowane w przemyśle spożywczym jako możliwe substytuty niektórych składników lub jako dodatki do żywności [51]. Podejmowane są próby dodawania grzybów do produktów zbożowo-mącznych, takich jak chleb, babeczki czy makaron [51,113]. Istnieje wiele badań potwierdzających właściwości prozdrowotne, które przypisuje się związkowi bioaktywnym zawartym w grzybach, tj. triterpenoidom, polifenolom i biologicznie aktywnym polisacharydom [114,115].

Dodatek składników nie zawierających białek glutenowych lub składników o wysokiej zawartości błonnika (na przykład proszku grzybowego) jako zamienników powszechnie stosowanej mąki może wpłynąć na niektóre właściwości ciasta. Dlatego na podstawie badań przeprowadzonych w poprzednich etapach (PI i PII) wybrano makaron z odpowiednim udziałem procentowym suszu z grzybów, który zapewnił zadowalające właściwości fizykochemiczne, kulinarne i sensoryczne makaronu. Jak wynika z badań zawartych w publikacji PII optymalny poziom suplementacji suszonymi grzybami Reishi i Lion's Mane jako zamiennika mąki z pszenicy durum wynosi: 2,5 i 5% natomiast dla grzybów Enoki i Maitake 2,5%, 5%, 7,5% i 10%. Makaron o takim składzie surowcowym został poddany badaniom dotyczącym zawartości wybranych związków bioaktywnych i niektórych właściwości prozdrowotnych.

W literaturze można znaleźć kilka przykładów prozdrowotnego potencjału grzybów Enoki i Maitake wskazujących, że surowiec ten jest dobrym źródłem związków biologicznie czynnych i może być potencjalnie wykorzystywany w produkcji żywności funkcjonalnej [116]. Natomiast zastosowanie grzybów Lion's Mane i Reishi w produkcji żywności było dotychczas ograniczone [113,117]. Jednak korzystna aktywność biologiczna Reishi i Lion's Mane wzbudziła zainteresowanie badaczy wykorzystaniem tych grzybów jako dodatków do żywności. Jak dotąd istnieje niewiele danych na temat wpływu dodatku grzybów do produktów mącznych na właściwości prozdrowotne.

6.9. Zawartość związków bioaktywnych

Zawartość związków fenolowych ogółem (TPC), flawonoidów ogółem (TFC) i kwasów fenolowych (PAC) po ekstrakcji etanolem i PBS oraz po symulowanym trawieniu (próby trawione w przewodzie pokarmowym - GID) w badanych makaronach przedstawiono w publikacjach **PIII** i **PIV** (**PIII Tabela 1**; **PIV Tabela 1**).

Całkowita zawartość polifenoli (TPC) osiągnęła najwyższą wartość 5,45 mg/g DW w próbie R5 po trawieniu żołądkowo-jelitowym (**PIII Tabela 1**). Wyższą zawartość TPC odnotowano we wszystkich ekstraktach PBS makaronu suplementowanego badanymi grzybami w porównaniu do próby kontrolnej.

Warto zauważyć, że najwyższą zawartość kwasów fenolowych, flawonoidów i związków fenolowych ogółem odnotowano w próbach po trawieniu *in vitro* (w porównaniu do ekstraktów etanolowych i PBS) i z pewnymi wyjątkami. Trend ten był statystycznie istotny (**PIII Tabela 1**, **PIV Tabela 1**).

W przypadku całkowitej zawartości flawonoidów (TFC), wraz ze zwiększeniem dodatku suszu z grzyba Reishi obserwowano wzrost TFC we wszystkich ekstraktach. Podobną tendencję zaobserwowano w próbach z dodatkiem suszonego grzyba Lion's Mane, z wyjątkiem próby poddanej trawieniu, gdzie wyższą wartość zaobserwowano dla próby L2.5. Wartość TFC w ekstraktach PBS była wyższa w próbach makaronu wzbogaconego suszem z grzybów Enoki, Maitake niż w próbie kontrolnej. Próba E10 zawierała znacznie więcej TFC niż wariant M2.5 i kontrola. Jednakże, jak wykazała analiza potencjalnie biodostępnej frakcji flawonoidów (próby GID), większe ilości flawonoidów w porównaniu z kontrolą odnotowano tylko w próbach M2.5, M5 i M7.5 z najwyższą zawartością flawonoidów w próbie M5 (**PIV Tabela 1**). Dla prób z dodatkiem suszu z grzybów Enoki i Maitake, niezależnie od stężenia użytych

suszonych grzybów, zawartość kwasów fenolowych (PAC) we wszystkich ekstraktach etanolowych była podobna (nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między badanymi próbkami, oscylowały one wokół wartości odnotowanej w próbie kontrolnej). Po symulowanym procesie trawienia, próby makaronu wzbogaconego grzybami Enoki i Maitake wykazywały wyższą zawartość PAC (z wyjątkiem E10 i M2.5) w porównaniu do próby kontrolnej. Największy wzrost zawartości PAC, tj. o 12,9% i 11,3%, zaobserwowano w trawionych *in vitro* próbach makaronu wzbogaconego odpowiednio 7,5 i 10% Maitake w porównaniu z próbą kontrolną.

W próbie kontrolnej makaronu, przed ugotowaniem, wykryto cztery polifenole: kwas *p*-kumarynowy, wanilinę, kwas ferulowy i kwas synapinowy. Za pomocą techniki LC-MS/MS zidentyfikowano 15 związków fenolowych w badanych próbach makaronu przed ugotowaniem z dodatkiem suszonych grzybów Reishi, Lion's Mane, Enoki i Maitake (**PIII Tabela 2 i PIV Tabela 2A**). We wszystkich próbach makaronu surowego, fortyfikowanego suszem z grzybów, kwas ferulowy był dominującym kwasem fenolowym (zawartość od 140,91 $\mu\text{g/g DW}$ w próbie R2.5 do 213,88 $\mu\text{g/g DW}$ w próbie E10, podczas gdy dla próby kontrolnej zawartość tego związku wynosiła 154,13 $\mu\text{g/g DW}$). Fortyfikacja Reishi wpłynęła na wzrost ilości kwasu syringowego, a z kolei dodanie suszonego proszku Lion's Mane spowodowało wzrost zawartości waniliny w stosunku do makaronu kontrolnego (**PIII Tabela 2**). Polifenole tj. rutyna, kwas salicylowy, kwas rozmarynowy i kwas *t*-cynamonowy zostały wykryte we wszystkich próbach makaronu (**PIII Tabela 2, PIV Tabela 2A**). Największe ilości związków fenolowych w makaronie przed ugotowaniem oznaczono w próbie z dodatkiem suszonego grzyba Maitake (M2.5, M5, M7.5 i M10) i były one reprezentowane aż przez osiem związków. W porównaniu do wszystkich prób suplementowanych grzybami i kontroli, w próbie M10 wykryto następujące związki o najwyższych stężeniach: kwas kawowy $0,83 \pm 0,14 \times 10^3 \text{ ng / g DW}$, kwas syringowy $1,70 \pm 0,24 \times 10^3 \text{ ng / g DW}$, kwas elagowy $1,22 \pm 0,09 \times 10^3 \text{ ng / g DW}$ - **PIV Tabela 2A**. Kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy został zidentyfikowany we wszystkich próbach suplementowanych suszem z grzybów Enoki i Maitake, z najwyższą zawartością $2,13 \pm 0,52 \times 10^3 \text{ ng/g DW}$ w próbie E10.

W przypadku makaronu po ugotowaniu, który był suplementowany suszem z grzybów Enoki i Maitake, analiza chromatograficzna wykazała szeroką gamę związków fenolowych obecnych w ekstraktach etanolowych, PBS i GID.

Warto zauważyć, że największą ilość związków fenolowych zidentyfikowano we wszystkich ekstraktach (etanolowym, PBS i GID) z próby makaronu M10. Najwięcej

związków, bo aż jedenaście, oznaczono w ekstraktach etanolowych z próby M10, podczas gdy w ekstrakcie etanolowym z próby kontrolnej oznaczono sześć związków fenolowych (**PIV Tabela 2B, 2C, 2D**). Dodatkowo, w ekstraktach etanolowych, zawartość kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego w próbach makaronu z dodatkiem grzybów Resihi, Lion's Mane, Enoki i Maitake była wyższa niż w próbie kontrolnej ($13,73 \pm 0,12$ ng/g DW), osiągając najwyższą wartość w próbie R5 ($316,60 \pm 0,69$ ng/g DW) oraz M10 ($148,37 \pm 3,67$ ng/g DW). Ilość kwasu syringowego w ekstraktach etanolowych z makaronu wzbogaconego suszem z grzyba Reishi wzrastała wraz ze wzrostem dodatku suszu grzyba, osiągając najwyższy poziom w próbie R10 ($1242,43 \pm 77,31$ ng/g DW) podczas gdy dla kontroli wyniosła ona $153,03 \pm 3,37$ ng/g DW (**PIII Tabela S2A, PIV Tabela 2B**).

Tylko cztery związki fenolowe zidentyfikowano w ekstraktach PBS we wszystkich próbach makaronów wzbogaconych suszem z grzyba Enoki i Lion's Mane.

W próbach po symulowanym trawieniu statystycznie istotne różnice odnotowano tylko w zawartości kwasu syringowego i kwasu synapinowego (odpowiednio $p = 0,0112$ i $0,0122$), wyższą zawartość w porównaniu z kontrolą zaobserwowano odpowiednio dla prób R5 i R2.5.

Na uwagę zasługuje fakt, że w próbach makaronu wzbogaconych suszonymi grzybami Maitake wykryto dodatkowe związki fenolowe, które nie były obecne w próbie kontrolnej (**PIV Tabela 2**). Były to kwas elagowy, który został zidentyfikowany tylko w próbach makaronu wzbogaconego Maitake (makaron surowy i ekstrakty etanolowe) oraz naryngenina.

Na podstawie danych literaturowych można zauważyć, że zawartość związków fenolowych oznaczonych w grzybach zależy od rodzaju ekstrakcji. Zawartość TPC w Reishi waha się od 86 do 139 mg/g dla ekstraktu etanolowego, natomiast w ekstraktach wodnych waha się od 33 do 47 mg/g [118], podczas gdy w Lion's Mane, według Gąseckiej i wsp. (2016) [119] zawartość TPC wynosiła 17,10 mg/g. Kwasy fenolowe są główną frakcją tej grupy związków obecnych w grzybach użytych w niniejszym badaniu [115,120]. Kwasy galusowy, *p*-kumarowy i *p*-hydroksybenzoesowy są najczęściej opisywanymi kwasami fenolowymi w ekstraktach z Lion's Mane [120,121], podczas gdy kwasy protokatechowy, *p*-hydroksybenzoesowy, *p*-kumarowy, syringowy i cynamonowy są najczęściej identyfikowane w ekstraktach Reishi [115,122]. Istnieją również doniesienia o wykryciu kwasów protokatechowego, 4-hydroksybenzoesowego, chlorogenowego, wanilinowego, kawowego, syringowego, *p*-kumarowego, ferulowego, synapinowego, salicylowego, galusowego i *t*-cynamonowego, a także rutyny, kwercetyny i kemferolu w Lion's Mane [119,123]. W badaniu przeprowadzonym przez Gąsecką i wsp.(2016) ekstrakcie z Reishi

zidentyfikowano również związki fenolowe a mianowicie: kwasy 4-hydroksybenzoesowy, chlorogenowy, wanilinowy, kawowy, synapinowy i *t*-cynamonowy, rutynę, kwercetynę i kemferol [119].

Lu i wsp. (2018) [124] zasugerowali, że makaron może być odpowiednim środkiem spożywczym, który można fortyfikować dodatkami posiadającymi właściwości bioaktywne (w tym przeciwutleniające). Istnieją pewne doniesienia na temat stosowania bogatego w związki fenolowe proszku lub ekstraktów z roślin lub grzybów jako strategii w produkcji funkcjonalnego makaronu [125]. Grzyby mogą być również cennym źródłem polifenoli w diecie. W badaniu przeprowadzonym przez Lu i wsp. (2018) badano wpływ suplementacji proszkiem grzybowym na zawartość polifenoli w makaronie [53]. W badaniu tym do makaronu dodawano proszek z białych pieczarek, grzybów shiitake i borowików, w trzech udziałach procentowych 5, 10 i 15%. Wszystkie makarony wzbogacone proszkiem grzybowym charakteryzowały się znacznie wyższą zawartością TPC niż w próbie kontrolnej, z wyjątkiem wariantów makaronu z grzybami shiitake 5% i 10%. Podobny efekt uzyskano w niniejszych badaniach prowadzonych nad dodatkiem suszu z grzybów Reishi i Lion's Mane. Analiza jakościowo-ilościowa związków fenolowych wykazała, że ekstrakty etanolowe makaronu wzbogaconego suszem z grzybów Reishi charakteryzowały się wyższą zawartością kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego i kwasu kawowego w porównaniu do makaronu kontrolnego (**PIII Tabela S2**).

Kwasy fenolowe są głównymi związkami fenolowymi zawartymi w ekstraktach z grzybów Enoki, a w szczególności cztery kwasy fenolowe (galusowy, protokatechowy, chlorogenowy i kawowy) oraz kwercetyna i zostały stwierdzone w próbach Enoki przy użyciu metody HPLC [126]. Z kolei, jak donoszą Krsmanović i wsp. (2023) [127], za pomocą techniki LC-MS/MS w ekstraktach z Enoki wykryto obecność kwasów *p*-hydroksybenzoesowego, protokatechowego, *p*-kumarowego i chinowego, a także daidzeiny i genisteiny. W niniejszej pracy doktorskiej profil związków fenolowych oznaczony przy użyciu analizy LC-MS/MS w makaronie wzbogaconym suszem z grzyba Enoki, częściowo potwierdził powyższe dane, ponieważ stwierdzono wzrost zawartości kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego (makaron przed ugotowaniem i ekstrakty etanolowe), kwasu *p*-kumarowego (makaron przed ugotowaniem), kwas ferulowy (makaron przed ugotowaniem, próby GID), kwas synapinowy (makaron przed ugotowaniem, ekstrakty etanolowe i próby GID) oraz genisteina (próby GID) w makaronie wzbogaconym tym grzybem w porównaniu z kontrolą (**PIV Tabela 2**).

Wykazano również, że ekstrakty Maitake są dobrym źródłem przeciwutleniających związków fenolowych. Analiza związków fenolowych techniką UHPLC-DAD wykazała obecność kwasu protokatechowego, katecholu i waniliny w ekstraktach z grzybów Maitake [128]. W badaniu przeprowadzonym przez Kim i wsp. [129] przy użyciu UPLC zidentyfikowano w Maitake: kwas kawowy, kwas chlorogenowy i kwas *p*-kumarowy, a także kemferol, narynginę i hesperydynę. Z kolei w badaniu przeprowadzonym metodami HPLC Lee i wsp. [130] zidentyfikowali duże ilości związków fenolowych w Maitake, tj, kwas protokatechowy, kwas kawowy, kwas *p*-kumarowy, hesperedyna, kwas benzoesowy, kwas *o*-kumarowy, mirycetyna, kwas *t*-cynamonowy, naryngenina, formononetyna, biochanina A, kwas *b*-rezorcyłowy, naryngina, kemferol, kwas weratrowy oraz bardzo małe ilości waniliny i rutyny. Analiza LC-MS/MS przeprowadzona w niniejszej pracy potwierdziła zawartość dwunastu związków fenolowych w Maitake: kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego, kawowego, syringowego, elagowego, *p*-kumarowego, salicyłowego, ferulowego, synapinowego oraz rutyny, waniliny, genisteiny i naryngeniny (**PIV Tabela S2**). W tym badaniu suplementacja makaronu Maitake przyczyniła się do wzrostu zawartości dużej liczby związków fenolowych (kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy, kwas kawowy, kwas syringowy, kwas *p*-kumarowy); ponadto związki, których nie wykryto w kontroli, wykryto w makaronie wzbogaconym suszem z grzyba Maitake (kwas elagowy i naryngenina) (**PIV Tabela 2**). Chociaż zawartość tych związków w próbach makaronu fortyfikowanego wzrosła w porównaniu z próbą kontrolną, nie było statystycznie istotnych różnic między próbami wzbogaconymi różnymi dawkami grzybów, co jest zastanawiającym odkryciem. Wyraźnie zależną od dawki zależność odnotowano tylko w przypadku zawartości naryngeniny, a próba M2.5 różniła się statystycznie od próby M10 (**PIV Tabela 2**).

Kolejną ważną grupą związków bioaktywnych obecnych w grzybach są glukany. Dane literaturowe wskazują, że użyte w niniejszej pracy grzyby również są źródłem tej grupy związków [118,131–133]. Fortyfikacja suszonymi grzybami Reishi i Lion's Mane oraz Maitake nie spowodowała statystycznie istotnych różnic w zawartości glukanów w badanych makaronach, to wszystkie próby wzbogacone Enoki (E2.5, E5, E7.5 i E10) wykazywały statystycznie istotne wyższe ilości α -glukanów w porównaniu z kontrolą (**PIII Tabela 3; PIV Tabela 3**). Wyniki te są trudne do wyjaśnienia; być może dodatek suszonych grzybów użytych w tym badaniu okazał się zbyt mały.

6.10. Aktywność przeciwutleniająca

Aktywność przeciwutleniająca mierzona aktywnością zmiatania rodników DPPH i ABTS^{•+}, zdolnością do chelatowania jonów żelaza i siłą redukcji, oznaczono w ekstraktach etanolowych, PBS oraz w próbach po trawieniu *in vitro*, z makaronu z 2,5% i 5% dodatkiem suszonych grzybów Reishi i Lion's Mane (**PIII Tabela 4**) oraz z makaronu z 2,5%, 5%, 7,5%, 10% dodatkiem suszonych grzybów Enoki i Maitake (**PIV Tabela 4**).

Zdolność zmiatania rodników ABTS^{•+} ekstraktów ETOH i PBS dla wszystkich prób makaronu z dodatkiem grzybów była znacznie niższa niż w próbach trawionych *in vitro*. Próby GID makaronów z dodatkiem suszonych grzybów Maitake i Enoki wykazały nieco wyższą aktywność hamującą ABTS^{•+} niż próba kontrolna ($12,47 \pm 1,34$ mg TE/g DW) z wyjątkiem prób E2.5 i M2.5. Najwyższą aktywność stwierdzono dla próby M7.5 ($14,15 \pm 1,54$ mg TE/g DW). W próbach GID z dodatkiem suszu z grzybów Reishi i Lion's Mane, zaobserwowano wzrost aktywności przeciwrodnikowej wobec ABTS^{•+} wraz ze zwiększoną ilością dodatku suszu z grzybów.

Wszystkie ekstrakty EtOH z makaronu wzbogaconego suszonymi grzybami Reishi, Lion's Mane, Enoki i Maitake wykazywały wyższą, niż próba kontrolna, zdolność neutralizacji rodników ABTS^{•+}. Najwyższą aktywność inhibicji ABTS^{•+} wykazywała próba R5 ($1,04 \pm 0,08$ mg TE/g DW) i M7.5 ($0,90 \pm 0,14$ mg TE/g DW).

W przypadku ekstraktów PBS z badanych makaronów najwyższą aktywność przeciwrodnikową wobec ABTS^{•+} odnotowano dla próby R2.5 ($1,35 \pm 0,12$ mg TE/g DW).

W przypadku potencjału przeciwrodnikowego wobec DPPH, najwyższą aktywność zaobserwowano dla prób GID z wartościami w zakresie od 2,65 do 4,06 mg TE/g DW. Makaron z dodatkiem 10% suszonych grzybów Maitake wykazywał nieco wyższą aktywność niż próba kontrolna ($4,06 \pm 0,57$ mg TE/g DW). Najniższą aktywność hamowania DPPH lub jej brak zaobserwowano dla prób ETOH.

W przypadku potencjału chelatującego (CHP), ekstrakty PBS wszystkich prób (kontrolnych i z dodatkiem suszonych grzybów), a także próby R5 i L5 po ekstrakcji etanolowej nie wykazały żadnej aktywności. Najwyższą aktywność CHP, tj. $302,30 \pm 11,82$ mg EDTA/g DW, stwierdzono w próbie M7.5 po symulowanym trawieniu. Wszystkie próby wzbogacone suszem Maitake i próba wzbogacona 10% suszem z grzybów Enoki wykazały wyższą zdolność do chelatowania jonów metali przejściowych niż próba kontrolna. Warto zauważyć, że ta

aktywność prób E10, M7.5 i M10 była istotna statystycznie, wyższa niż próby kontrolnej (PIV Tabela 4). Ekstrakty etanolowe prób makaronu z dodatkiem suszonych grzybów Enoki i Maitake miały wyższą aktywność chelatującą niż próba kontrolna. Aktywność próby kontrolnej ($0,26 \pm 0,16$ mg EDTA/g DW) była istotna statystycznie, niższa niż aktywność próby E10, która osiągnęła najwyższą wartość ($3,54 \pm 0,94$ mg EDTA/g DW).

Wszystkie ekstrakty etanolowe z makaronów wzbogaconych suszem z grzybów Reishi, Lion's Mane, Enoki i Maitake charakteryzowały się wyższą wartością RP w porównaniu do próby kontrolnej (**PIII Tabela 4, PIV Tabela 4**). Próba M10 wykazywała wartość RP ($0,53 \pm 0,08$ mg TE/g DW) o 165% wyższą niż w przypadku próby kontrolnej. Najwyższą wartość RP stwierdzono dla próby R5 ($0,66 \pm 0,03$ mg TE/g DW).

Niektóre próby po trawieniu *in vitro* z makaronu wzbogaconego grzybami wykazywały wyższą siłę redukującą niż próba kontrolna. Wartość RP w próbach E5, E7.5 i M10 była istotna statystycznie wyższa niż wartość RP w próbie kontrolnej. Najwyższą wartość RP wykazywały próby R5, M10 i E7.5 (odpowiednio $1,52 \pm 0,24$ mg TE/g DW, $1,38 \pm 0,07$ mg TE/g DW i $1,34 \pm 0,06$ mg TE/g DW). Należy również zauważyć, że wszystkie ekstrakty GID z badanych prób z dodatkiem suszu z grzybów Enoki i Maitake miały istotną statystycznie wyższą wartość RP niż ekstrakty PBS (**PIV Tabela 4**).

Niewiele jest danych literaturowych dotyczących właściwości prozdrowotnych (głównie aktywności antyoksydacyjnej związanej ze zmianami zawartości związków fenolowych) produktów mącznych wzbogaconych proszkiem grzybowym. Jak donoszą Lu i wsp. [134], wzbogacenie pieczywa proszkiem z trzech grzybów (pieczarki białej, shiitake i prawdziwka) w ilości 5%, 10% i 15% przyczyniło się do wzrostu aktywności przeciwutleniającej (DPPH i ORAC) oraz zawartości związków fenolowych w analizowanym produkcie. Podobnie w swoim badaniu Lu i wsp. [124] dodali do makaronu grzyby białe, shiitake i borowiki w ilości 5%, 10% i 15%. Nie stwierdzono wzrostu TPC w przypadku makaronu wzbogaconego o 5% i 10% shiitake, natomiast zawartość związków fenolowych we wszystkich pozostałych wariantach makaronu wzbogaconego grzybami była wyższa niż w kontroli [124]. Wszystkie warianty dodatku proszku grzybowego do makaronu spowodowały wzrost aktywności przeciwutleniającej (ORAC), ale metoda DPPH wykazała wzrost aktywności przeciwutleniającej tylko w makaronie z 10% i 15% dodatkiem białych pieczarek oraz 15% suplementacją grzybami shiitake i borowikami [124]. W badaniach tych nie uwzględniono jednak wpływu trawienia *in vitro* na te właściwości. Podobnie w badaniach w niniejszej pracy, ekstrakty etanolowe i PBS ze wzbogaconego makaronu miały wyższą zawartość TPC

(z pewnymi wyjątkami) niż próba kontrolna. Ekstrakty etanolowe z makaronu wzbogaconego Maitake i Enoki również wykazywały wyższą aktywność przeciwutleniającą (zwłaszcza siłę chelatującą i siłę redukcyjną) niż próba kontrolna (**PIV Tabela 4**). Choć analizy prób poddanych symulowanemu trawieniu są cenniejszymi narzędziami do badania wpływu na organizm ludzki, analiza innych ekstraktów, tj. etanolowych, tzw. "ekstraktów chemicznych" również dają pewną wiedzę, ponieważ inne związki mogą być również ekstrahowane z analizowanego w ten sposób produktu spożywczego. Ekstrakty PBS z kolei traktowane są jako próby "przed trawieniem" pokazujące wpływ symulowanego trawienia na działania prozdrowotne. Symulowane trawienie *in vitro* zostało wykorzystane przez Wang i wsp. [49], którzy badali właściwości makaronu wzbogaconego grzybami shiitake. Podobnie jak w badaniach niniejszego doktoratu, symulowany proces trawienia spowodował wzrost zawartości związków fenolowych i właściwości przeciwutleniających (z wyjątkiem ABTS w próbach wzbogaconych o 5% i 10%) w próbie kontrolnej i próbach wzbogaconych dodatkiem grzyba shiitake. W przypadku badania makaronu wzbogaconego białymi pieczarkami i bocznikami taki sam trend zaobserwowali Wang i wsp. [135], którzy tłumaczą ten efekt symulowanym uwalnianiem związków bioaktywnych (zwłaszcza związków fenolowych) związanych ze ścianą komórkową lub sprzężonych z makroskładnikami odżywczymi w matrycy żywności. Prawdopodobnie podobny efekt związany z aktywnością przeciwutleniającą i potencjalnie przeciwzapalną zaobserwowano w niniejszych badaniach (**PIII Tabela 4 i 5; PIV Tabela 4 i 5**). Dodatek grzybów shiitake, pieczarki białej i bocznika ostrygowatego do makaronu, w próbach poddanych symulowanemu trawieniu w stosunku do prób kontrolnych, zwiększył zawartość TPC i aktywność przeciwutleniającą (ABTS i FRAP) [49,135].

Analiza prób makaronu po trawieniu *in vitro*, w niniejszej pracy doktorskiej, wykazała, że dodatek suszu z grzybów Enoki i Maitake spowodował wzrost TPC tylko w próbie E5. W przypadku PAC, większość wzbogaconych prób makaronu (z wyjątkiem E7.5, E10 i M2.5) zawierała większe ilości kwasów fenolowych niż kontrola (najwyższą zawartość PAC odnotowano w M7.5) (**PIV Tabela 1**). Potencjalnie biodostępna frakcja fenoli (próby GID) z makaronu wzbogaconego Maitake i Enoki wykazała również istotną statystycznie wyższą aktywność przeciwutleniającą, tj. siłę chelatującą (próby E10, M7.5 i M10) i siłę redukcyjną (próby E5, E7.5 i M10), w porównaniu do kontroli (**PIV Tabela 4**). Podobnie, w badaniu przeprowadzonym przez Ibrahima i wsp. [136], całkowita zawartość fenoli, całkowita zawartość flawonoidów, aktywność zmiatania DPPH i wartości FRAP gofrów, paluszków

chlebowych i kremu sałatkowego uzupełnionych proszkiem z grzyba bocznika ostrygowatego były wyższe niż w próbie kontrolnej.

Dong i wsp. [137] wykazali silne korelacje między aktywnością antyoksydacyjną DPPH i FRAP a zawartością polifenoli w grzybach Reishi. Podobnie Saltarelli i wsp. [138] stwierdzili pozytywną korelację między zawartością związków fenolowych w ekstraktach Reishi, a właściwościami przeciwutleniającymi, tj. DPPH i siłą chelatującą, a także hamowaniem lipooksygenazy.

6.11. Właściwości potencjalnie przeciwzapalne

Zdolność badanych prób makaronu z dodatkiem suszu z grzybów, do hamowania enzymów zaangażowanych w stan zapalny, tj. lipooksygenazy (LOX) i cyklooksygenazy 2 (COX2), przedstawiono w **PIII Tabela 5** i **PIV Tabela 5**.

Ekstrakty etanolowe z makaronu wzbogaconego grzybami Lion's Mane (próba L5) wykazały istotną statystycznie wyższą zdolność do hamowania LOX ($EC_{50} = 0,15$ mg / ml) niż kontrola ($EC_{50} = 0,52$ mg / ml) - $p = 0,0349$. Należy również zauważyć, że ekstrakt PBS z próby kontrolnej nie wykazywał zdolności do hamowania aktywności lipooksygenazy, podczas gdy ekstrakty PBS z makaronu wzbogaconego suszem z badanych grzybów charakteryzowały się zdolnością do hamowania LOX na poziomie EC_{50} w zakresie od 0,329 mg/mL dla M10 do 0,830 mg/mL dla E7.5 (**PIII Tabela 5** i **PIV Tabela 5**). Z kolei ekstrakty GID dla prób z dodatkiem suszu z grzyba Enoki i Maitake wykazywały wyższą aktywność hamującą LOX niż ekstrakty etanolowe i PBS. Dodatkowo, makaron wzbogacony Enoki (E7.5 i E10) i Maitake (M2.5 i M10) poddany symulowanemu trawieniu wykazywał istotną statystycznie wyższą zdolność hamowania LOX niż kontrola ($p = 0,0035$) – **PIV Tabela 5**. Ponadto, z wyjątkiem prób C i E10, różnica w zdolności hamowania LOX między ekstraktami PBS i GID była statystycznie istotna.

Ekstrakty PBS z próby kontrolnej i wzbogaconej suszem z grzybów Reishi, Lion's Mane, Enoki i Maitake nie wykazywały zdolności do hamowania COX-2 (**PIII Tabela 5**, **PIV Tabela 5**).

Zadna z prób GID makaronu wzbogaconego suszem z badanych grzybów nie wykazywała istotnej statystycznie wyższej aktywności hamującej COX-2 w porównaniu do kontroli. Ponadto nie stwierdzono różnic w zdolności do hamowania COX-2 między

ekstraktami etanolowymi, a próbami poddanymi symulowanemu trawieniu (**PIII Tabela 5; PIV Tabela 5**).

Wśród mechanizmów działania przeciwzapalnego, takich jak hamowanie czynników transkrypcyjnych związanych ze stanem zapalnym i cytokin prozapalnych, należy podkreślić hamowanie enzymów prozapalnych (lipooksygenazy, cyklooksygenazy-2 i indukowalnej syntazy tlenku azotu) [139,140]. W oparciu o badania niniejszej pracy na uwagę zasługuje fakt, że próby poddane symulowanemu trawieniu wykazywały znacznie wyższą potencjalną aktywność przeciwzapalną niż ekstrakty PBS i etanolowe. Różnice te są najprawdopodobniej związane z różnicami w zawartości związków fenolowych w ekstraktach. W próbach po trawieniu *in vitro* znajduje się więcej związków fenolowych, ponieważ są one uwalniane w wyniku działania enzymów trawiennych w symulowanych warunkach przewodu pokarmowego [80]. Podobne wyniki zaobserwowano w innych badaniach wykorzystujących symulowane trawienie [141,142]. Dodatkowo, w przypadku ekstraktów etanolowych, próby z makaronu wzbogaconego grzybami Lion's Mane (próba L5) wykazały istotną statystycznie wyższą zdolność do hamowania LOX w porównaniu z próbą kontrolną (**PIII Tabela 5**). Dissanayake i wsp. [143] wykazali, że grzyby Maitake wykazywały właściwości przeciwzapalne poprzez hamowanie aktywności COX-2, a także aktywność antyoksydacyjną (LPO). Podobnie, niektóre badania wykazały właściwości przeciwzapalne Enoki poprzez hamowanie produkcji NO oraz TNF- α [144]. Badania w niniejszej pracy doktorskiej potwierdziły potencjalne zdolności przeciwzapalne makaronu wzbogaconego suszem z grzybów Enoki i Maitake mierzone jako hamowanie LOX i COX-2 (**PIV Tabela 5**).

Niektóre badania wykazały, że pojedyncze związki i mieszaniny związków bioaktywnych mogą różnić się pod względem aktywności biologicznej, a aktywność ekstraktów nie może być traktowana jako suma aktywności poszczególnych składników. W związku z tym wnioskowanie o bioaktywności ekstraktów, biorąc pod uwagę jedynie ich skład, może prowadzić do błędnych wniosków, ponieważ ważną rolę w przewidywaniu aktywności biologicznej mogą odgrywać zmiany zachodzące podczas trawienia i/lub interakcje z różnymi składnikami matrycy żywności. Choć konieczne są dalsze badania nad mechanizmami działania związków biologicznie aktywnych (w tym związków fenolowych), dotychczasowe próby wyjaśnienia tych zjawisk wskazują na wzajemne interakcje (synergistyczne, addytywne lub antagonistyczne) pomiędzy związkami determinującymi aktywność biologiczną ekstraktów [145,146]. Ponieważ dodatkowo zakładamy możliwość interakcji z matrycą (semoliną), aktywność biologiczna ekstraktów z makaronów

wzbogaconych suszem z grzybów może być modyfikowana przez takie interakcje pomiędzy różnymi związkami bioaktywnymi i to prawdopodobnie jest przyczyną braku bezpośredniej zależności pomiędzy ilością dodatku grzybów, a analizowanymi aktywnościami biologicznymi (w tym aktywnością antyoksydacyjną czy przeciwzapalną odzwierciedloną w inhibicji LOX i COX2).

Brak bezpośredniego związku aktywności biologicznej z dawką składnika bogatego w związki bioaktywne, tj. związki fenolowe, odnotowali również inni badacze. Przykładowo, w badaniu przeprowadzonym przez Jakubczyk i wsp. dodatek kawy do pieczywa w ilości 1-5 g /100 g pozytywnie wpływał na inhibicję enzymów zaangażowanych w patogenezę syndromu metabolicznego, ale nie wykazano efektu zależnego od dawki. Najwyższą inhibicję ACE (angiotensin converting enzyme - enzym konwertujący angiotensynę) osiągnięto po dodaniu 4% kawy, podczas gdy największą inhibicję lipazy wykazano w wariacie suplementacji 2% kawy [147]. Podobnie, w badaniach nad chlebem fortyfikowanym liśćmi komosy ryzowej, analizy przeprowadzone po trawieniu *in vitro* wykazały nieoczekiwany wpływ na kilka aktywności przeciwutleniających (tj. większe dawki nie zwiększały aktywności) [148]. Zmiany między przewidywanymi a eksperymentalnymi wynikami wyjaśniono jako możliwość interakcji matrycy chleba z białkami i skrobią, co zostało potwierdzone przez analizy chromatograficzne przeprowadzone przez autorów. Ponieważ makaron jest produktem mącznym bogatym w białka i węglowodany, mechanizm opisany przez Świecę i wsp. [148], może być również odpowiedzialny za zależności zaobserwowane w badaniach niniejszej pracy doktorskiej.

6.12. Właściwości przeciwnowotworowe

Wśród prozdrowotnych właściwości grzybów Reishi, Lion's Mane, Enoki i Maitake na szczególną uwagę zasługują ich udokumentowane właściwości przeciwnowotworowe. Aktywność przeciwnowotworowa wykazywana przez *Ganoderma lucidum* jest związana z indukcją zaprogramowanej śmierci komórki, o czym donosi wiele badań [149–151]. Przykładowo, metanolowy ekstrakt z owocników *Ganoderma lucidum* zapobiegał wzrostowi ludzkiej linii komórek nowotworowych żołądka, jak donoszą Reis i wsp. oraz Oliveira i wsp. [150,151]. Dodatkowo, badania przeprowadzone przez Kolniak-Ostek i wsp. [114] potwierdziły potencjalną aktywność przeciwnowotworową bioaktywnych związków *Ganoderma lucidum* przeciwko rakowi piersi i jelita grubego. Niektóre doniesienia wskazywały również na

przeciwnowotworowe właściwości ekstraktów z *Hericium erinaceus* poprzez zmniejszenie proliferacji komórek, indukcję apoptozy w komórkach nowotworowych [152] oraz hamowanie migracji i inwazji komórek nowotworowych poprzez zmniejszenie ekspresji metaloproteinaz macierzy MMP-2 i MMP-9 w komórkach nowotworowych [153]. W swojej publikacji Kolniak-Ostek i wsp. [114] zasugerowali, że znaczna część aktywności antyproliferacyjnej ekstraktu z *Ganoderma lucidum* wobec komórek nowotworowych może być przypisywana wysokiej zawartości związków fenolowych (zwłaszcza resweratrolu i apigeniny). Z kolei, badania przeprowadzone przez Ukaegbu i wsp. [154] dowodzą, że acetonowe ekstrakty z Enoki wykazywały silną aktywność przeciwko liniom komórkowym raka piersi. Niektóre badania wskazują, że niektóre właściwości przeciwnowotworowe Enoki mogą być związane z zawartością związków fenolowych, np. kwasów protokatechowego, *p*-kumarowego i elagowego [155].

Próby badanego w niniejszej pracy makaronu (kontrolnego i wzbogaconego) poddanego trawieniu żołądkowemu (GD) i trawieniu żołądkowo-jelitowemu (GID) wykorzystano do badania aktywności cytotoksycznej wobec linii komórek nowotworowych AGS i HT 29 (**PIII Tabela 6 i PIV Tabela 6**). Dodatek badanych grzybów jedynie w przypadku próbek makaronu R2.5 i L2.5 po trawieniu w żołądkowym zwiększał zdolność hamowania proliferacji linii nowotworowej AGS (**PIII Tabela 6**). Natomiast fortyfikacja makaronu grzybami Enoki i Maitake nie skutkowała zwiększonymi właściwościami przeciwnowotworowymi, chociaż niektóre wzbogacone makarony (zwłaszcza próby wzbogacone Maitake) zawierały większe ilości niektórych związków fenolowych (**PIV Tabela 2 i 6**).

7. WNIOSKI

1. Parametry semoliny wzbogaconej suszem w proszku z grzybów o udokumentowanych właściwościach prozdrowotnych (*Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus* i *Grifola frondosa*) wskazują, że ciasto z tych mieszanek może być wykorzystywane do produkcji makaronów. Chociaż niektóre parametry mogą sugerować potencjalnie gorsze właściwości reologiczne mieszanek, to żadna z badanych mieszanek nie powinna być wykluczona z produkcji makaronu na podstawie otrzymanych wyników badań.
2. Wszystkie badane mieszanki semoliny z suszonymi grzybami były bezpieczne pod względem jakości mikrobiologicznej i braku zanieczyszczeń metalami ciężkimi.
3. Dodatek badanych grzybów spowodował wzrost zawartości składników odżywczych w badanych makaronach - głównie białka i błonnika pokarmowego a wzrost ilości tych składników był skorelowany z poziomem suplementacji.
4. Dodatek badanych grzybów wpłynął również na poprawę właściwości teksturalnych makaronów suchych, w szczególności odporności na łamanie i deformację po zniszczeniu.
5. Ocena parametrów jakości kulinarnej i sensorycznej wskazywała jednak na konieczność doboru optymalnego poziomu dodatku poszczególnych grzybów. W przypadku suplementacji makaronów grzybami Lion's Mane i Reishi badania wskazały, że makarony z 7,5% i 10% dodatkiem tych grzybów ze względu na negatywną ocenę sensoryczną, zwłaszcza intensywnie gorzki smak oraz wzrost parametru straty suchej masy podczas gotowania, nie spełniają założonych wymogów odnośnie wymagań konsumenckich.
6. W przypadku stosowania dodatku grzyba Enoki makaron po ugotowaniu z 10% udziału Enoki charakteryzował się zwiększoną twardością, dlatego zalecany poziom suplementacji Enoki wynosi 7,5%.
7. Najwyższy poziom suplementacji makaronu (10%) może być zalecany tylko w przypadku grzybów Maitake, ponieważ próba M10 charakteryzowała się wysoką wartością odżywczą oraz zadowalającymi właściwościami kulinarnymi i organoleptycznymi.
8. Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu sugerują, że fortyfikacja makaronów stosowanymi grzybami wpływa pozytywnie na zawartość związków bioaktywnych (głównie związków fenolowych) oraz na niektóre właściwości prozdrowotne, głównie pod względem właściwości przeciwutleniających i potencjalnie przeciwzapalnych przy czym nie zawsze wzrost aktywności był skorelowany z poziomem suplementacji.

9. Przeprowadzone badania dowodzą, że wśród wszystkich stosowanych dodatków w postaci suszów grzybowych można znaleźć wariant możliwy do potencjalnego wdrożenia w warunkach przemysłowych. Jednakże po analizie wszystkich badanych parametrów do wdrożenia w zakładzie produkcyjnym firmy PZZ Lubella Sp. z o.o. w Lublinie rekomenduje się makaron fortyfikowany suszem z grzyba Maitake w ilości 10% (próba M10).

Makaron wzbogacony 10% suszem z grzyba Maitake charakteryzował się w szczególności:

- wysoką wartością odżywczą (głównie związaną ze zwiększoną zawartością białka oraz błonnika pokarmowego w stosunku do makaronu kontrolnego)
- zadowalającymi właściwościami kulinarnymi i organoleptycznymi
- zwiększoną zawartością związków fenolowych (głównie kwasów fenolowych ogółem oraz zwiększeniem ilości zidentyfikowanych związków fenolowych)
- zwiększoną aktywnością prozdrowotną związaną głównie z aktywnością antyoksydacyjną (zdolność do chelatowania jonów metali przejściowych i siła redukcji) oraz potencjalnie przeciwzapalną (inhibicja lipoksygenazy) potencjalnie biodostępnej frakcji związków bioaktywnych (próby po trawieniu *in vitro*)

Z uwagi na powyższe w firmie PZZ Lubella Sp. z o.o. w Lublinie rozpoczęto prace związane z ewentualnym wdrożeniem, rekomendowanego w niniejszej pracy makaronu, czego efektem jest zaprezentowany poniżej wzór opakowania (Rysunek 6).



Rysunek 6. Render opakowania makaronu gniazda wstęgi z dodatkiem sosu z grzyba Maitake (źródło: Dział Graficzny, Grupa Maspex Sp. z o.o. Sp.k.)

8. BIBLIOGRAFIA

1. Komisja Wspólnot Europejskich. Biała Księga: Strategia Dla Europy w Sprawie Zagadnień Zdrowotnych Związanych z Odżywianiem, Nadwagą i Otyłością; **2007**.
2. Komisja do Rady, P.E. i E.K.E.-S. Strategia Polityki Konsumenckiej UE Na Lata 2007-2013 Wzmocnienie Pozycji Konsumentów, Polepszenie Ich Dobrobytu Oraz Zapewnienie Ich Skutecznej Ochrony; **2007**.
3. Hanus, G. Prozdrowotne Zachowania Konsumentów Na Światowym Rynku Żywnościowym. *Stud. Ekon. Zesz. Nauk. Uniw. Ekon. w Katowicach* **2017**.
4. Doyon, M.; Labrecque, J.A. Functional Foods: A Conceptual Definition. *Br. Food J.* **2008**, *110*, 1133–1149, doi:10.1108/00070700810918036.
5. Keservani, R.K.; Kesharwani, R.K.; Vyas, N.; Jain, S.; Raghuvanshi, R.; Sharma, A.K. Nutraceutical and Functional Food As Future Food: A Review. *Der Pharm. Lett.* **2010**, *2*, 106–116.
6. Vicentini, A.; Liberatore, L.; Mastrocola, D. Functional Foods : Trends and Development. *Ital. J. Food Sci.* **2016**, *28*, 338–352.
7. Bashir, K. Physio-Chemical and Sensory Characteristics of Pasta Fortified With Chickpea Flour and Defatted Soy Flour. *IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.* **2012**, *1*, doi:10.9790/2402-0153439.
8. Dziki, D. Current Trends in Enrichment of Wheat Pasta: Quality, Nutritional Value and Antioxidant Properties. *Processes* **2021**, *9*, doi:10.3390/pr9081280.
9. Mintel Group Ltd. Pasta – Poland. Generated by Mintel Market Sizes. <https://portal.mintel.com/portal/> **2023**.
10. Ganeshpurkar, A.; Rai, G.; Jain, A. Medicinal Mushrooms: Towards a New Horizon. *Pharmacogn. Rev.* **2010**, *4*, 127–135, doi:10.4103/0973-7847.70904.
11. Bonneville, S.; Delpomdor, F.; Preat, A.; Chevalier, C.; Araki, T.; Kazemian, M.; Steele, A.; Schreiber, A.; Wirth, R.; Benning, L.G. Molecular Identification of Fungi Microfossils in a Neoproterozoic Shale Rock. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, doi:10.1126/sciadv.aax7599.
12. Das, A.K.; Nanda, P.K.; Dandapat, P.; Bandyopadhyay, S.; Gullón, P.; Sivaraman, G.K.; McClements, D.J.; Gullón, B.; Lorenzo, J.M. Edible Mushrooms as Functional Ingredients for Development of Healthier and More Sustainable Muscle Foods: A

- Flexitarian Approach. *Molecules* **2021**, *26*, 1–25, doi:10.3390/molecules26092463.
13. Kumar, N.; Nath, N.; Arora, S.K. Process Optimization and Characterization of ‘Sev’ (Traditional Indian Extruded Snack) with the Incorporation of Mushroom Powder. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 1723–1731, doi:10.1007/s13197-019-03599-8.
 14. Rajewska, J.; Bałasińska, B. Biologically Active Compounds of Edible Mushrooms and Their Beneficial Impact on Health. *Post Hig Med Dosw* **2004**, *58*, 352–357.
 15. Minister Zdrowia. Rozporządzenia Ministra Zdrowia z Dnia 3 Listopada 2022 w Sprawie Grzybów Dopuszczonych Do Obrotu Lub Produkcji Przetworów Grzybowych, Środków Spożywczych Zawierających Grzyby Oraz Uprawnień Klasyfikatora Grzybów i Grzyboznawcy. *Dz.U.2022.2365* **2022**, 1–15.
 16. Manzi, P.; Aguzzi, A.; Pizzoferrato, L. Nutritional Value of Mushrooms Widely Consumed in Italy. *Food Chem.* **2001**, *73*, 321–325, doi:10.1016/S0308-8146(00)00304-6.
 17. Kumar, K.; Mehra, R.; Guiné, R.P.F.; Lima, M.J.; Kumar, N.; Kaushik, R.; Ahmed, N.; Yadav, A.N.; Kumar, H. Edible Mushrooms: A Comprehensive Review on Bioactive Compounds with Health Benefits and Processing Aspects. *Foods* **2021**, *10*, 1–22, doi:10.3390/foods10122996.
 18. de Román, M. Boa, E. Woodward, S. Wild-Gathered Fungi for Health and Rural Livelihoods. *Proc. Nutr. Soc.* **2006**, *65*, 190–197, doi:10.1079/pns2006491.
 19. Yeh, M.Y.; Ko, W.C.; Lin, L.Y. Hypolipidemic and Antioxidant Activity of Enoki Mushrooms (*Flammulina Velutipes*). *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/352385.
 20. Sadler, M. Nutritional Properties of Edible Fungi. *Nutr. Bull.* **2003**, *28*, 305–308, doi:10.1046/j.1467-3010.2003.00354.x.
 21. Turło, J. Biotechnologia Grzybów. Zastosowanie W Farmacji I Suplementacji. *Prospect. Pharm. Sci.* **2013**, *11*, 18–26, doi:10.56782/pps.94.
 22. Kakon, A.; Choudhury, M.B.K.; Saha, S. Mushroom Is an Ideal Food Supplement. *J. Dhaka Natl. Med. Coll. Hosp.* **2012**, *18*, 58–62, doi:10.3329/jdnmch.v18i1.12243.
 23. Muszyńska, B.; Sułkowska-Ziaja, K.; Ekiert, H. Główne Grupy Związków i Pierwiastki z Aktywnością Biologiczną w Wybranych Gatunkach Grzybów z Taksonu Basidiomycota. *Farm. Pol.* **2010**, *66*, 804–814.
 24. Siwulski, M.; Sobieralski, K.; Sas-Golak, I. Wartość Odżywcza i Prozdrowotna Grzybów. *Zywn. Nauk. Technol. Jakość/Food. Sci. Technol. Qual.* **2014**, *21*, 16–28,

- doi:10.15193/zntj/2014/92/016-028.
25. Alam, N.; Khan, A.; Shahdat Hossain, M.; Ruhul Amin, S.; Khan, L.A. Nutritional Analysis of Dietary Mushroom-Pleurotus Florida Eger and *Pleurotus Sajor-Caju* (Fr.) Singer. *Bangladesh J. Mushroom* **2007**, *1*, 1–7.
 26. El-Mekkawy, S.; Meselhy, M.R.; Nakamura, N.; Tezuka, Y.; Hattori, M.; Kakiuchi, N.; Shimotohno, K.; Kawahata, T.; Otake, T. Anti-HIV-1 and Anti-HIV-1-Protease Substances from *Ganoderma Lucidum*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1651–1657, doi:10.1016/S0031-9422(98)00254-4.
 27. Erbiai, E.H.; Pinto da Silva, L.; Saidi, R.; Lamrani, Z.; Esteves da Silva, J.C.G.; Maouni, A. Chemical Composition, Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Two Wild Edible Mushrooms *Armillaria Mellea* and *Macrolepiota Procera* from Two Countries (Morocco and Portugal). *Biomolecules* **2021**, *11*, 1–11, doi:10.3390/biom11040575.
 28. Liu, J.; Shimizu, K.; Konishi, F.; Noda, K.; Kumamoto, S.; Kurashiki, K.; Kondo, R. Anti-Androgenic Activities of the Triterpenoids Fraction of *Ganoderma Lucidum*. *Food Chem.* **2007**, *100*, 1691–1696, doi:10.1016/j.foodchem.2006.01.003.
 29. Kim, M.Y.; Seguin, P.; Ahn, J.K.; Kim, J.J.; Chun, S.C.; Kim, E.H.; Seo, S.H.; Kang, E.Y.; Kim, S.L.; Park, Y.J.; et al. Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7265–7270, doi:10.1021/jf8008553.
 30. Palacios, I.; Lozano, M.; Moro, C.; D'Arrigo, M.; Rostagno, M.A.; Martínez, J.A.; García-Lafuente, A.; Guillamón, E.; Villares, A. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds Occurring in Edible Mushrooms. *Food Chem.* **2011**, *128*, 674–678, doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.085.
 31. Elmastas, M.; Isildak, O.; Turkekul, I.; Temur, N. Determination of Antioxidant Activity and Antioxidant Compounds in Wild Edible Mushrooms. *J. Food Compos. Anal.* **2007**, *20*, 337–345, doi:10.1016/j.jfca.2006.07.003.
 32. Oloke, J.K., A.E.. Effectiveness of Immunotherapies from Oyster Mushroom (*Pleurotus Species*) in the Management of Immunocompromised Patients. *Int. J. Immunol.* **2015**, *3*, 8, doi:10.11648/j.iji.s.2015030201.12.
 33. Rathee, S.; Rathee, D.; Rathee, D.; Kumar, V.; Rathee, P. Mushrooms as Therapeutic Agents. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2012**, *22*, 459–474, doi:10.1590/S0102-695X2011005000195.

34. Islam, T.; Yu, X.; Xu, B. Phenolic Profiles, Antioxidant Capacities and Metal Chelating Ability of Edible Mushrooms Commonly Consumed in China. *Lwt* **2016**, *72*, 423–431, doi:10.1016/j.lwt.2016.05.005.
35. Naeem, M.Y.; Ugur, S.; Rani, S. Emerging Role of Edible Mushrooms in Food Industry and Its Nutritional and Medicinal Consequences. *Eurasian J. Food Sci. Technol.* **2020**, *4*, 6–23.
36. Cheung, P.C.K. The Nutritional and Health Benefits of Mushrooms. *Nutr. Bull.* **2010**, *35*, 292–299, doi:10.1111/j.1467-3010.2010.01859.x.
37. Siwulski, M.; Sobieralski, K.; Golak-Siwulska, I.; Sokół, S.; Sękara, A. *Ganoderma Lucidum* (Curt.: Fr.) Karst. – Health-Promoting Properties. A Review. *Herba Pol.* **2015**, *61*, 105–118, doi:10.1515/hepo-2015-0026.
38. Okafor, J.N.C.; Okafor, G.I.; Ozumba, A.U.; Elemo, G.N. Quality Characteristics of Bread Made from Wheat and Nigerian Oyster Mushroom (*Pleurotus Plumonarius*) Powder. *Pakistan J. Nutr.* **2012**, *11*, 5–10, doi:10.3923/pjn.2012.5.10.
39. Zhao, H.; Wang, L.; Brennan, M.; Brennan, C. How Does the Addition of Mushrooms and Their Dietary Fibre Affect Starchy Foods. *J. Futur. Foods* **2022**, *2*, 18–24, doi:10.1016/j.jfutfo.2022.03.013.
40. Bashir, K. Physio-Chemical and Sensory Characteristics of Pasta Fortified With Chickpea Flour and Defatted Soy Flour. *IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.* **2012**, *1*, 34–39, doi:10.9790/2402-0153439.
41. Lisiecka, K.; Wójtowicz, A.; Dziki, D.; Gawlik-Dziki, U. The Influence of *Cistus Incanus* L. Leaves on Wheat Pasta Quality. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 4311–4322, doi:10.1007/s13197-019-03900-9.
42. Sęczyk, L.; Świeca, M.; Gawlik-Dziki, U.; Luty, M.; Czyz, J. Effect of Fortification with Parsley (*Petroselinum Crispum* Mill.) Leaves on the Nutraceutical and Nutritional Quality of Wheat Pasta. *Food Chem.* **2016**, *190*, 419–428, doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.110.
43. Gallegos-Infante, J.A.; Rocha-Guzman, N.E.; Gonzalez-Laredo, R.F.; Ochoa-Martínez, L.A.; Corzo, N.; Bello-Perez, L.A.; Medina-Torres, L.; Peralta-Alvarez, L.E. Quality of Spaghetti Pasta Containing Mexican Common Bean Flour (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Food Chem.* **2010**, *119*, 1544–1549, doi:10.1016/j.foodchem.2009.09.040.
44. Michalak-Majewska, M.; Teterycz, D.; Muszyński, S.; Radzki, W.; Sykut-Domańska, E. Influence of Onion Skin Powder on Nutritional and Quality Attributes of Wheat

- Pasta. *PLoS One* **2020**, *15*, doi:10.1371/journal.pone.0227942.
45. Shreenithee, C.R.; Prabhasankar, P. Effect of Different Shapes on the Quality, Microstructure, Sensory and Nutritional Characteristics of Yellow Pea Flour Incorporated Pasta. *J. Food Meas. Charact.* **2013**, *7*, doi:10.1007/s11694-013-9152-5.
 46. Cedola, A.; Cardinali, A.; D'Antuono, I.; Conte, A.; Del Nobile, M.A. Cereal Foods Fortified with By-Products from the Olive Oil Industry. *Food Biosci.* **2020**, *33*, 100490, doi:10.1016/j.fbio.2019.100490.
 47. Lu, X.; Brennan, M.A.; Serventi, L.; Liu, J.; Guan, W.; Brennan, C.S. Addition of Mushroom Powder to Pasta Enhances the Antioxidant Content and Modulates the Predictive Glycaemic Response of Pasta. *Food Chem.* **2018**, *264*, 199–209, doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.130.
 48. Muresan, C.C.; Farcas, A.; Man, S.; Suharoschi, R.; Vlaic, R.A. Obtaining a Functional Product Through the Exploitation of Mushroom Flour in Pasta. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca. Food Sci. Technol.* **2017**, *74*, 17, doi:10.15835/buasvmcn-fst:12641.
 49. Wang, L.; Zhao, H.; Brennan, M.; Guan, W.; Liu, J.; Wang, M.; Wen, X.; He, J.; Brennan, C. In Vitro Gastric Digestion Antioxidant and Cellular Radical Scavenging Activities of Wheat-Shiitake Noodles. *Food Chem.* **2020**, *330*, 127214, doi:10.1016/j.foodchem.2020.127214.
 50. Parvin, R.; Farzana, T.; Mohajan, S.; Rahman, H.; Rahman, S.S. Quality Improvement of Noodles with Mushroom Fortified and Its Comparison with Local Branded Noodles. *NFS J.* **2020**, *20*, 37–42, doi:10.1016/j.nfs.2020.07.002.
 51. Rangel-Vargas, E.; Rodriguez, J.A.; Domínguez, R.; Lorenzo, J.M.; Sosa, M.E.; Andrés, S.C.; Rosmini, M.; Pérez-Alvarez, J.A.; Teixeira, A.; Santos, E.M. Edible Mushrooms as a Natural Source of Food Ingredient/Additive Replacer. *Foods* **2021**, *10*, 1–19, doi:10.3390/foods10112687.
 52. Seguchi, M.; Morimoto, N.; Abe, M.; Yoshino, Y. Effect of Maitake (*Grifola Frondosa*) Mushroom Powder on Bread Properties. *J. Food Sci.* **2001**, *66*, 261–264, doi:10.1111/j.1365-2621.2001.tb11328.x.
 53. Lu, X.; Brennan, M.A.; Serventi, L.; Brennan, C.S. Incorporation of Mushroom Powder into Bread Dough—Effects on Dough Rheology and Bread Properties. *Cereal Chem.* **2018**, *95*, 418–427, doi:10.1002/cche.10043.
 54. Ng, S.H.; Wan Amir Nizam, W.A.; Wan Rosli, W.I. Incorporation of Pleurotus Sajor-

- Caju Powder in Cinnamon Biscuit: Study on Nutritional, Physical, Colour and Sensorial Properties. *Int. Food Res. J.* **2017**, *24*, 2442–2450.
55. Rathore, H.; Sehwaq, S.; Prasad, S.; Sharma, S. Technological, Nutritional, Functional and Sensorial Attributes of the Cookies Fortified with Calocybe Indica Mushroom. *J. Food Meas. Charact.* **2019**, *13*, 976–987, doi:10.1007/s11694-018-0012-1.
 56. Salehi, F. Characterization of Different Mushrooms Powder and Its Application in Bakery Products: A Review. *Int. J. Food Prop.* **2019**, *22*, 1375–1385, doi:10.1080/10942912.2019.1650765.
 57. The Polish Committee for Standardization. PKN Polish Standard Cereals and Cereal Products. Determination of Moisture Content Reference Method (ISO 712:2009), **2009**. Cereals, Pulses and by-Products. Determination of Ash Yield by Incineration (ISO 2171:2007) **2007**.
 58. The Polish Committee for Standardization. PKN Polish Standard Cereals, Cereals-Based Products and Animal Feeding Stuffs - Determination of Crude Fat and Total Fat Content by the Randall Extraction Method (ISO 11085:2015), **2015**.
 59. Williams, P.C. The Use of Titanium Dioxide as a Catalyst for Large-scale Kjeldahl Determination of the Total Nitrogen Content of Cereal Grains. *J. Sci. Food Agric.* **1973**, *24*, 343–348, doi:10.1002/jsfa.2740240311.
 60. Cecchini, C.; Antonucci, F.; Costa, C.; Marti, A.; Menesatti, P. Application of Near-Infrared Handheld Spectrometers to Predict Semolina Quality. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 151–157, doi:10.1002/jsfa.10625.
 61. The Polish Committee for Standardization. PKN Polish Standard PN-A-79011-15:1998 Dry Food Mixes. Test Methods. Determination of Dietary Fiber Contents. **1998**.
 62. Giannone, V.; Giarnetti, M.; Spina, A.; Todaro, A.; Pecorino, B.; Summo, C.; Caponio, F.; Paradiso, V.M.; Pasqualone, A. Physico-Chemical Properties and Sensory Profile of Durum Wheat Dittaino PDO (Protected Designation of Origin) Bread and Quality of Re-Milled Semolina Used for Its Production. *Food Chem.* **2018**, *241*, 242–249, doi:10.1016/j.foodchem.2017.08.096.
 63. Mis.A Some Methodological Aspects of Determining Wet Gluten Quality by the Glutomatic Method. *In. Agrophisycs* **2000**, *14*, 263–267.
 64. Vinci, P.; Fois, S.; Parente, E.; Roggio, T.; Catzeddu, P. A Study on Relationships between Durum Wheat Semolina Properties, Technological Mixing Parameters and the Properties of Dough after Mixing. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2013**, *48*, 2541–2550,

- doi:10.1111/ijfs.12247.
65. Wang, K.; Fu, B.X. Inter-Relationships between Test Weight, Thousand Kernel Weight, Kernel Size Distribution and Their Effects on Durum Wheat Milling, Semolina Composition and Pasta Processing Quality. *Foods* **2020**, *9*, doi:10.3390/foods9091308.
 66. Dubois, M., Dubait, A.; Launay, B. *The Alveoconsistograph Handbook*, 2008;
 67. Lisiecka, K.; Wójtowicz, A. Effect of Fresh Beetroot Application and Processing Conditions on Some Quality Features of New Type of Potato-Based Snacks. *Lwt* **2021**, *141*, doi:10.1016/j.lwt.2021.110919.
 68. Dib, A.; Wójtowicz, A.; Benatallah, L.; Zidoune, M.N.; Mitrus, M.; Sujak, A. Optimization of Rice-Field Bean Gluten-Free Pasta Improved by the Addition of Hydrothermally Treated Rice Flour. *Ital. J. Food Sci.* **2018**, *30*, 226–248, doi:10.14674/IJFS-923.
 69. Bobryk-Mamczarz, A.; Kiełtyka-Dadasiewicz, A.; Rachoń, L. Usefulness of Hulled Wheats Grown in Polish Environment for Wholegrain Pasta-Making. *Foods* **2021**, *10*, 1–13, doi:10.3390/foods10020458.
 70. Dib, A.; Wójtowicz, A.; Benatallah, L.; Bouasla, A.; Zidoune, M.N. Effect of Hydrothermal Treated Corn Flour Addition on the Quality of Corn-Field Bean Gluten-Free Pasta. *BIO Web Conf.* **2018**, *10*, 02003, doi:10.1051/bioconf/20181002003.
 71. Biernacka, B.; Dziki, D.; Gawlik-Dziki, U.; Różyło, R.; Siastała, M. Physical, Sensorial, and Antioxidant Properties of Common Wheat Pasta Enriched with Carob Fiber. *LWT - Food Sci. Technol.* **2017**, *77*, 186–192, doi:10.1016/j.lwt.2016.11.042.
 72. Wójtowicz, A.; Mościcki, L. Influence of Legume Type and Addition Level on Quality Characteristics, Texture and Microstructure of Enriched Precooked Pasta. *LWT - Food Sci. Technol.* **2014**, *59*, 1175–1185, doi:10.1016/j.lwt.2014.06.010.
 73. Akineden, Ö.; Murata, K.J.; Ohann, A.; Gross, M.; Usleber, E. Microbiological Quality of Raw Dried Pasta from the German Market, with Special Emphasis on Cronobacter Species. *J. Food Sci.* **2015**, *80*, M2860–M2867, doi:10.1111/1750-3841.13117.
 74. The Polish Committee for Standardization. PKN Polish Standard Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Horizontal Method for the Detection of Salmonella Spp (ISO 6579:2002) **2003**.
 75. Martins, C.A.; Cerveira, C. Metal Determination in Tea, Wheat, and Wheat Flour Using Diluted Nitric Acid, High-Efficiency Nebulizer, and Axially Viewed ICP OES.

- 2014, doi:10.1007/s12161-014-0044-z.
76. Yoshimoto, K.; Anh, H.T. Van; Yamamoto, A.; Koriyama, C. Simple Analysis of Total Mercury and Methylmercury in Seafood Using Heating Vaporization Atomic Absorption Spectrometry. *2016*, *41*, 489–500.
 77. Cessak Grzegorz Polish Pharmacopoeia, 12th Ed.; *Polish Pharmaceutical Society*: Warsaw, Poland. 2020.
 78. Lamaison J.L., C.A. Teneurs En Principaux Flavonoids Des Fleurs de Crataegus Monogyna Jacq et de Crataegus Laevigata (Poiret D. C) En Fonction de La Vegetation. *Plantes Med. Phyther.* **1990**, *25*, 315–320.
 79. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
 80. Żuchowski, J.; Kapusta, I.; Szajwaj, B.; Jończyk, K.; Oleszek, W. Phenolic Acid Content of Organic and Conventionally Grown Winter Wheat. *Cereal Res. Commun.* **2009**, *37*, 189–197, doi:10.1556/CRC.37.2009.2.5.
 81. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–13237.
 82. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30, doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
 83. Oyaizu, M. Studies on Products of Browning Reaction. Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *Japanese J. Nutr. Diet.* **1986**, *44*, 307–315, doi:10.5264/eiyogakuzashi.44.307.
 84. Guo, L.; Harnedy, P.A.; Li, B.; Hou, H.; Zhang, Z.; Zhao, X.; FitzGerald, R.J. Food Protein-Derived Chelating Peptides: Biofunctional Ingredients for Dietary Mineral Bioavailability Enhancement. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *37*, 92–105, doi:10.1016/j.tifs.2014.02.007.
 85. Szymanowska, U.; Karaś, M.; Złotek, U.; Jakubczyk, A. Effect of Fortification with Raspberry Juice on the Antioxidant and Potentially Anti-Inflammatory Activity of Wafers Subjected to *in Vitro* Digestion. *Foods* **2021**, *10*, doi:10.3390/foods10040791.
 86. Sissons, M. GlutoPeak: A Breeding Tool for Screening Dough Properties of Durum Wheat Semolina. *Cereal Chem.* **2016**, *93*, 550–556, doi:10.1094/CCHEM-03-16-0063-R.

87. Chauhan, N.; Vaidya, D.; Gupta, A.; Pandit, A. Fortification of Pasta with White Button Mushroom: Functional and Rheological Properties. *Int. J. Food Ferment. Technol.* **2017**, *7*, 87, doi:10.5958/2277-9396.2017.00008.3.
88. Nie, Y.; Zhang, P.; Deng, C.; Xu, L.; Yu, M.; Yang, W.; Zhao, R.; Li, B. Effects of *Pleurotus Eryngii* (Mushroom) Powder and Soluble Polysaccharide Addition on the Rheological and Microstructural Properties of Dough. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 2113–2122, doi:10.1002/fsn3.1054.
89. Lu, X.; Brennan, M.A.; Serventi, L.; Mason, S.; Brennan, C.S. How the Inclusion of Mushroom Powder Can Affect the Physicochemical Characteristics of Pasta. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2016**, *51*, 2433–2439, doi:10.1111/ijfs.13246.
90. Sissons Mike Role of Durum Wheat Composition on the Quality of Pasta and Bread. *Food* **2008**, *2*, 75–90, doi:10.1111/j.1095-8339.1986.tb01427.x.
91. De Noni, I.; Pagani, M.A. Cooking Properties and Heat Damage of Dried Pasta as Influenced by Raw Material Characteristics and Processing Conditions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 465–472, doi:10.1080/10408390802437154.
92. Oikonomou, N.A.; Bakalis, S.; Rahman, M.S.; Krokida, M.K. Gluten Index for Wheat Products: Main Variables in Affecting the Value and Nonlinear Regression Model. *Int. J. Food Prop.* **2015**, *18*, 1–11, doi:10.1080/10942912.2013.772198.
93. Jødal, A.S.S.; Larsen, K.L. Investigation of the Relationships between the Alveograph Parameters. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–10, doi:10.1038/s41598-021-84959-3.
94. Bordes, J.; Branlard, G.; Oury, F.X.; Charmet, G.; Balfourier, F. Agronomic Characteristics, Grain Quality and Flour Rheology of 372 Bread Wheats in a Worldwide Core Collection. *J. Cereal Sci.* **2008**, *48*, 569–579, doi:10.1016/j.jcs.2008.05.005.
95. Dapcevic, T.; Pojic, M.; Hadnaev, M.; Torbic, A. The Role of Empirical Rheology in Flour Quality Control. *Wide Spectra Qual. Control* **2011**, doi:10.5772/24148.
96. Baiano, A.; Lamacchia, C.; Terracone, C. Effects of the Addition of a Meal Deriving from Toasted Durum Wheat Kernels on Dough Properties and Spaghetti Cooking Behavior. *J. Food* **2011**, *9*, 200–209, doi:10.1080/19476337.2010.512395.
97. Fratianni, A.; Irano, M.; Panfili, G.; Acquistucci, R. Estimation of Color of Durum Wheat. Comparison of WSB, HPLC, and Reflectance Colorimeter Measurements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2373–2378, doi:10.1021/jf040351n.
98. Zarzycki, P.; Sykut-Domańska, E.; Sobota, A.; Teterycz, D.; Krawęcka, A.; Blicharz-

- Kania, A.; Andrejko, D.; Zdybel, B. Flaxseed Enriched Pasta—Chemical Composition and Cooking Quality. *Foods* **2020**, *9*, 1–10, doi:10.3390/foods9040404.
99. Komisja Europejska Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1881/2006 z Dnia 19 Grudnia 2006 r. Ustalające Najwyższe Dopuszczalne Poziomy Niektórych Zanieczyszczeń w Środkach Spożywczych. *Dz. Urzędowy Unii Eur. L 364*, 20 grudzień 2006 **2006**.
100. Komisja Europejska Rozporządzenie Komisji (UE) 2023/915 z Dnia 25 Kwietnia 2023 r. w Sprawie Najwyższych Dopuszczalnych Poziomów Niektórych Zanieczyszczeń w Żywności Oraz Uchylające Rozporządzenie (WE) Nr 1881/2006. *Dz. Urzędowy Unii Eur. L 119*, 5 maja 2023 **2023**.
101. Romankiewicz, D.; Cacak-Pietrzak, G.; Gonda, M. Ocena Jakości Makaronów Handlowych Typu Świderek. *Acta Agrophysica* **2014**, *21*, 327–335.
102. Martini, S.; Bonechi, C.; Foletti, A.; Rossi, C. Water-Protein Interactions: The Secret of Protein Dynamics. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, doi:10.1155/2013/138916.
103. Nordiana, A.B.; Wan Rosli, W.I.; Wan Amir Nizam, W.A. The Effect of Oyster Mushroom (*Pleurotus Sajor-Caju*) Flour Incorporation on the Physicochemical Quality and Sensorial Acceptability of Pasta. *Int. Food Res. J.* **2019**, *26*, 1249–1257.
104. Krawęcka, A.; Sobota, A.; Pankiewicz, U.; Zielińska, E.; Zarzycki, P. Stinging Nettle (*Urtica Dioica L.*) as a Functional Component in Durum Wheat Pasta Production: Impact on Chemical Composition, in Vitro Glycemic Index, and Quality Properties. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26226909.
105. Foschia, M.; Peressini, D.; Sensidoni, A.; Brennan, M.A.; Brennan, C.S. How Combinations of Dietary Fibres Can Affect Physicochemical Characteristics of Pasta. *Starch/Staerke* **2015**, *66*, 41–46, doi:10.1016/j.lwt.2014.11.010.
106. Dziki, D.; Laskowski, J. Wpływ Wybranych Czynn timerów Na Cechy Kulinarne Makaronu. *Zywn. Nauk. Technol. Jakośc/Food. Sci. Technol. Qual.* **2003**, *2*, 125–134.
107. Marti, A.; Caramanico, R.; Bottega, G.; Pagani, M.A. Cooking Behavior of Rice Pasta: Effect of Thermal Treatments and Extrusion Conditions. *LWT - Food Sci. Technol.* **2013**, *54*, 229–235, doi:10.1016/j.lwt.2013.05.008.
108. Wójtowicz, A.; Oniszczyk, A.; Kasprzak, K.; Olech, M.; Mitrus, M.; Oniszczyk, T. Chemical Composition and Selected Quality Characteristics of New Types of Precooked Wheat and Spelt Pasta Products. *Food Chem.* **2020**, *309*, 125673, doi:10.1016/j.foodchem.2019.125673.
109. Hong, G.-H.; Kim, Y.-S.; Song, G.-S. Effect of Oyster Mushroom (*Pleurotus*

- Ostreatus*) Powder on Bread Quality. *Prev. Nutr. Food Sci.* **2005**, *10*, 214–218.
110. Kaur, G.; Sharma, S.; Nagi, H.P.S.; Ranote, P.S. Enrichment of Pasta with Different Plant Proteins. *J. Food Sci. Technol.* **2013**, *50*, doi:10.1007/s13197-011-0404-2.
 111. Landi, A. Durum Wheat, Semolina and Pasta Quality Characteristics for an Italian Food Company. *Durum wheat Qual. Mediterr. Reg.* **1995**, *42*, 33–42.
 112. Çarşamba, E.; Duerrschmid, K.; Schleining, G. Assessment of Acoustic-Mechanical Measurements for Crispness of Wafer Products. *J. Food Eng.* **2018**, *229*, 93–101, doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.11.006.
 113. You, S.W.; Hoskin, R.T.; Komarnytsky, S.; Moncada, M. Mushrooms as Functional and Nutritious Food Ingredients for Multiple Applications. *ACS Food Sci. Technol.* **2022**, *2*, 1184–1195, doi:10.1021/acsfoodscitech.2c00107.
 114. Kolniak-Ostek, J.; Oszmiański, J.; Szyjka, A.; Moreira, H.; Barg, E. Anticancer and Antioxidant Activities in *Ganoderma Lucidum* Wild Mushrooms in Poland, as Well as Their Phenolic and Triterpenoid Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms23169359.
 115. Obodai, M.; Mensah, D.L.N.; Fernandes, Â.; Kortei, N.K.; Dzomeku, M.; Teegarden, M.; Schwartz, S.J.; Barros, L.; Prempeh, J.; Takli, R.K.; et al. Chemical Characterization and Antioxidant Potential of Wild *Ganoderma* Species from Ghana. *Molecules* **2017**, *22*, 1–18, doi:10.3390/molecules22020196.
 116. Banerjee, D.K.; Das, A.K.; Banerjee, R.; Pateiro, M.; Nanda, P.K.; Gadekar, Y.P.; Biswas, S.; McClements, D.J.; Lorenzo, J.M. Application of Enoki Mushroom (*Flammulina Velutipes*) Stem Wastes as Functional Ingredients in Goat Meat Nuggets. *Foods* **2020**, *9*, 1–15, doi:10.3390/foods9040432.
 117. Sheikha, A.F. El Nutritional Profile and Health Benefits of *Ganoderma Lucidum* “Lingzhi, Reishi, or Mannentake” as Functional Foods: Current Scenario and Future Perspectives. *Foods* **2022**, *11*, 1–29, doi:https://doi.org/10.3390/foods11071030.
 118. Veljović, S.; Veljović, M.; Nikićević, N.; Despotović, S.; Radulović, S.; Nikšić, M.; Filipović, L. Chemical Composition, Antiproliferative and Antioxidant Activity of Differently Processed *Ganoderma Lucidum* Ethanol Extracts. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 1312–1320, doi:10.1007/s13197-017-2559-y.
 119. Gąsecka, M.; Mleczek, M.; Siwulski, M.; Niedzielski, P.; Kozak, L. Phenolic and Flavonoid Content in *Hericium Erinaceus*, *Ganoderma Lucidum*, and *Agrocybe Aegerita* under Selenium Addition. *Acta Aliment.* **2016**, *45*, 300–308,

doi:10.1556/066.2016.45.2.18.

120. Heleno, S.A.; Barros, L.; Martins, A.; Queiroz, M.J.R.P.; Morales, P.; Fernández-Ruiz, V.; Ferreira, I.C.F.R. Chemical Composition, Antioxidant Activity and Bioaccessibility Studies in Phenolic Extracts of Two *Hericium* Wild Edible Species. *Lwt* **2015**, *63*, 475–481, doi:10.1016/j.lwt.2015.03.040.
121. Asim, S.; Bacha, S.; Ali, S.; Li, Y.; Rehman, H.; Farooq, S. Lion ' s Mane Mushroom ; New Addition to Food and Natural Bounty for Human Wellness : A Review. **2018**, *6655*, 396–402, doi:10.12692/ijb/13.4.396-402.
122. Taofiq, O.; Heleno, S.A.; Calhella, R.C.; Alves, M.J.; Barros, L.; González-Paramás, A.M.; Barreiro, M.F.; Ferreira, I.C.F.R. The Potential of *Ganoderma Lucidum* Extracts as Bioactive Ingredients in Topical Formulations, beyond Its Nutritional Benefits. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *108*, 139–147, doi:10.1016/j.fct.2017.07.051.
123. Gąsecka, M.; Siwulski, M.; Magdziak, Z.; Budzyńska, S.; Stuper-Szablewska, K.; Niedzielski, P.; Mleczek, M. The Effect of Drying Temperature on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of *Leccinum Scabrum* (Bull.) Gray and *Hericium Erinaceus* (Bull.) Pers. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 513–525, doi:10.1007/s13197-019-04081-1.
124. Lu, X.; Brennan, M.A.; Serventi, L.; Liu, J.; Guan, W.; Brennan, C.S. Addition of Mushroom Powder to Pasta Enhances the Antioxidant Content and Modulates the Predictive Glycaemic Response of Pasta. *Food Chem.* **2018**, *264*, doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.130.
125. Melini, V.; Melini, F.; Acquistucci, R. Phenolic Compounds and Bioaccessibility Thereof in Functional Pasta. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1–30, doi:10.3390/antiox9040343.
126. Zhang, Z.; Jin, Q.; Lv, G.; Fan, L.; Pan, H.; Fan, L. Comparative Study on Antioxidant Activity of Four Varieties of *Flammulina Velutipes* with Different Colour. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2013**, *48*, 1057–1064, doi:10.1111/ijfs.12062.
127. Krsmanovi, N.; Rašeta, M.; Miškovi, J.; Bekvalac, K.; Bogavac, M.; Karaman, M.; Isikhuemhen, O.S. Effects of UV Stress in Promoting Antioxidant Activities in Fungal Species *Trametes Versicolor* (L.) Lloyd and *Flammulina Velutipes* (Curtis) Singer. *Antioxidants* **2023**, *12*, 302, doi:doi.org/10.3390/antiox12020302.
128. Bach, F.; Zielinski, A.A.F.; Helm, C.V.; Maciel, G.M.; Pedro, A.C.; Stafussa, A.P.; Ávila, S.; Haminiuk, C.W.I. Bio Compounds of Edible Mushrooms: *In Vitro* Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Lwt* **2019**, *107*, 214–220,

doi:10.1016/j.lwt.2019.03.017.

129. Kim, J.H.; Lim, S.R.; Jung, D.H.; Kim, E.J.; Sung, J.; Kim, S.C.; Choi, C.H.; Kang, J.W.; Lee, S.J. *Grifola Frondosa* Extract Containing Bioactive Components Blocks Skin Fibroblastic Inflammation and Cytotoxicity Caused by Endocrine Disrupting Chemical, Bisphenol A. *Nutrients* **2022**, *14*, doi:10.3390/nu14183812.
130. Lee, J.S.; Park, S.Y.; Thapa, D.; Choi, M.K.; Chung, I.M.; Park, Y.J.; Yong, C.S.; Choi, H.G.; Kim, J.A. *Grifola Frondosa* Water Extract Alleviates Intestinal Inflammation by Suppressing TNF- α Production and Its Signaling. *Exp. Mol. Med.* **2010**, *42*, 143–154, doi:10.3858/emm.2010.42.2.016.
131. Shin, Y.J.; Lee, S.C. Antioxidant Activity and β -Glucan Contents of Hydrothermal Extracts from Maitake (*Grifola Frondosa*). *Food Sci. Biotechnol.* **2014**, *23*, 277–282, doi:10.1007/s10068-014-0038-z.
132. McCleary, B. V.; Draga, A. Measurement of β -Glucan in Mushrooms and Mycelial Products. *J. AOAC Int.* **2016**, *99*, 364–373, doi:10.5740/jaoacint.15-0289.
133. Mongkontanawat, N.; Wongekalak, L. Effect of Blanching on β -Glucan Content of Native Mushrooms in Thailand. *J. Agric. Technol.* **2015**, *11*, 2227–2237.
134. Lu, X.; Brennan, M.A.; Guan, W.; Zhang, J.; Yuan, L.; Brennan, C.S. Enhancing the Nutritional Properties of Bread by Incorporating Mushroom Bioactive Compounds: The Manipulation of the Pre-Dictive Glycaemic Response and the Phenolic Properties. *Foods* **2021**, *10*, doi:10.3390/foods10040731.
135. Wang, L.; Brennan, M.A.; Guan, W.; Liu, J.; Zhao, H.; Brennan, C.S. Edible Mushrooms Dietary Fibre and Antioxidants: Effects on Glycaemic Load Manipulation and Their Correlations Pre-and Post-Simulated *in Vitro* Digestion. *Food Chem.* **2021**, *351*, 129320, doi:10.1016/j.foodchem.2021.129320.
136. Ibrahim, R.M.; Ali, M.I.K.; Abdel-Salam, F.F. Nutritional and Quality Characteristics of Some Foods Fortified with Dried Mushroom Powder as a Source of Vitamin D. *Int. J. Food Sci.* **2022**, *2022*, doi:10.1155/2022/2792084.
137. Dong, Q.; He, D.; Ni, X.; Zhou, H.; Yang, H. Comparative Study on Phenolic Compounds, Triterpenoids, and Antioxidant Activity of *Ganoderma Lucidum* Affected by Different Drying Methods. *J. Food Meas. Charact.* **2019**, *13*, 3198–3205, doi:10.1007/s11694-019-00242-0.
138. Saltarelli, R.; Ceccaroli, P.; Buffalini, M.; Vallorani, L.; Casadei, L.; Zambonelli, A.; Iotti, M.; Badalyan, S.; Stocchi, V. Biochemical Characterization and Antioxidant and

- Antiproliferative Activities of Different *Ganoderma* Collections. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *25*, 16–25, doi:10.1159/000369212.
139. Taofiq, O.; Calhelha, R.C.; Heleno, S.; Barros, L.; Martins, A.; Santos-Buelga, C.; Queiroz, M.J.R.P.; Ferreira, I.C.F.R. The Contribution of Phenolic Acids to the Anti-Inflammatory Activity of Mushrooms: Screening in Phenolic Extracts, Individual Parent Molecules and Synthesized Glucuronated and Methylated Derivatives. *Food Res. Int.* **2015**, *76*, 821–827, doi:10.1016/j.foodres.2015.07.044.
140. Rosa, S.I.G.; Rios-Santos, F.; Balogun, S.O.; Martins, D.T.D.O. Vitexin Reduces Neutrophil Migration to Inflammatory Focus by Down-Regulating pro-Inflammatory Mediators via Inhibition of P38, ERK1/2 and JNK Pathway. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 9–17, doi:10.1016/j.phymed.2015.11.003.
141. Sęczyk, Ł.; Świeca, M.; Gawlik-Dziki, U. Effect of Carob (*Ceratonia Siliqua L.*) Flour on the Antioxidant Potential, Nutritional Quality, and Sensory Characteristics of Fortified Durum Wheat Pasta. *Food Chem.* **2016**, *194*, 637–642, doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.086.
142. Złotek, U. Antioxidative, Potentially Anti-Inflammatory, and Antidiabetic Properties, as Well as Oxidative Stability and Acceptability, of Cakes Supplemented with Elicited Basil. *Food Chem.* **2018**, *243*, 168–174, doi:10.1016/j.foodchem.2017.09.129.
143. Dissanayake, A.A.; Zhang, C.R.; Mills, G.L.; Nair, M.G. Cultivated Maitake Mushroom Demonstrated Functional Food Quality as Determined by *in Vitro* Bioassays. *J. Funct. Foods* **2018**, *44*, 79–85, doi:10.1016/j.jff.2018.02.031.
144. Gunawardena, D.; Bennett, L.; Shanmugam, K.; King, K.; Williams, R.; Zabarar, D.; Head, R.; Ooi, L.; Gyengesi, E.; Münch, G. Anti-Inflammatory Effects of Five Commercially Available Mushroom Species Determined in Lipopolysaccharide and Interferon- γ Activated Murine Macrophages. *Food Chem.* **2014**, *148*, 92–96, doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.015.
145. Habza-Kowalska, E.; Kaczor, A.A.; Bartuzi, D.; Piłat, J.; Gawlik-Dziki, U. Some Dietary Phenolic Compounds Can Activate Thyroid Peroxidase and Inhibit Lipoygenase-Preliminary Study in the Model Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22105108.
146. Habza-Kowalska, E.; Gawlik-Dziki, U.; Dziki, D. Mechanism of Action and Interactions between Thyroid Peroxidase and Lipoygenase Inhibitors Derived from Plant Sources. *Biomolecules* **2019**, *9*, doi:10.3390/biom9110663.

147. Jakubczyk, A.; Świeca, M.; Gawlik-Dziki, U.; Dziki, D. Nutritional Potential and Inhibitory Activity of Bread Fortified with Green Coffee Beans against Enzymes Involved in Metabolic Syndrome Pathogenesis. *Lwt* **2018**, *95*, 78–84, doi:10.1016/j.lwt.2018.04.071.
148. Świeca, M.; Sęczyk, L.; Gawlik-Dziki, U.; Dziki, D. Bread Enriched with Quinoa Leaves - The Influence of Protein-Phenolics Interactions on the Nutritional and Antioxidant Quality. *Food Chem.* **2014**, *162*, 54–62, doi:10.1016/j.foodchem.2014.04.044.
149. Harhaji Trajkovic, L.M.; Mijatovic, S.A.; Maksimovic-Ivanic, D.D.; Stojanovic, I.D.; Momcilovic, M.B.; Tufegdžic, S.J.; Maksimovic, V.M.; Marjanovi, Z.S.; Stosic-Grujicic, S.D. Anticancer Properties of *Ganoderma Lucidum* Methanol Extracts in Vitro and in Vivo. *Nutr. Cancer* **2009**, *61*, 696–707, doi:10.1080/01635580902898743.
150. Reis, F.S.; Lima, R.T.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R.; Vasconcelos, M.H. Methanolic Extract of *Ganoderma Lucidum* Induces Autophagy of AGS Human Gastric Tumor Cells. *Molecules* **2015**, *20*, 17872–17882, doi:10.3390/molecules201017872.
151. Oliveira, M.; Reis, F.S.; Sousa, D.; Tavares, C.; Lima, R.T.; Ferreira, I.C.F.R.; Dos Santos, T.; Vasconcelos, M.H. A Methanolic Extract of *Ganoderma Lucidum* Fruiting Body Inhibits the Growth of a Gastric Cancer Cell Line and Affects Cellular Autophagy and Cell Cycle. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1389–1394, doi:10.1039/c4fo00258j.
152. Li, W.; Zhou, W.; Kim, E.J.; Shim, S.H.; Kang, H.K.; Kim, Y.H. Isolation and Identification of Aromatic Compounds in Lion's Mane Mushroom and Their Anticancer Activities. *Food Chem.* **2015**, *170*, 336–342, doi:10.1016/j.foodchem.2014.08.078.
153. Hetland, G.; Tangen, J.; Mahmood, F.; Mirlashari, M.R.; Tjønnfjord, G.E.; Johnson, E. Related Medicinal Basidiomycetes Mushrooms, Preclinical and Clinical Studies. *Nutrients* **2020**, *12*, 1–19, doi:10.3390/nu12051339
154. Ukaegbu, C.I.; Shah, S.R.; Hazrulrizawati, A.H.; Alara, O.R. Acetone Extract of *Flammulina Velutipes* Caps: A Promising Source of Antioxidant and Anticancer Agents. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2018**, *7*, 675–682, doi:10.1016/j.bjbas.2018.07.012.
155. Tang, C.; Hoo, P.C.X.; Tan, L.T.H.; Pusparajah, P.; Khan, T.M.; Lee, L.H.; Goh, B.H.; Chan, K.G. Golden Needle Mushroom: A Culinary Medicine with Evidenced-Based Biological Activities and Health Promoting Properties. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*,

doi:10.3389/fphar.2016.00474.

9. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW (Załącznik 1)

Lublin, data 14.07.2023

Magdalena Szydłowska-Tutaj
Ul. Tymiankowa 6/2, 21-003 Elizówka
Tel. 696402595
magdalena.szydłowska@up.lublin.pl

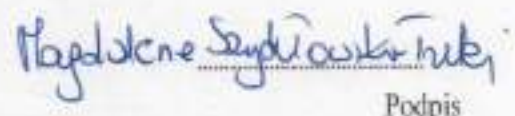
**Rada Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

1. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Złotek, Maciej Combrzyński, 2021, Influence of addition of mushroom powder to semolina on proximate composition, physicochemical properties and some safety parameters of material for pasta production. *LWT-Food Science and Technology*, 151, 112235.
2. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Złotek, Agnieszka Wójtowicz, Maciej Combrzyński, 2022, The Effect of the Addition of Various Species of Mushrooms on the Physicochemical and Sensory Properties of Semolina Pasta. *Food & Function*, 13, 8425-8435.
3. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Szymanowska, Krzysztof Tutaj, Dorota Domagała, Urszula Złotek, 2023, The Addition of Reishi and Lion's Mane Mushroom Powder to Pasta Influences the Content of Bioactive Compounds and the Antioxidant, Potential Anti-Inflammatory, and Anticancer Properties of Pasta, *Antioxidants*, Tom 12, 738.
4. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Szymanowska, Krzysztof Tutaj, Dorota Domagała, Urszula Złotek, 2023, Influence of dried Maitake and Enoki mushroom addition on antioxidant, potentially anti-inflammatory, and anti-cancer properties of enriched pasta, *Applied Science*, Tom 13, 8183.

Mój udział polegał na opracowaniu koncepcji pracy, udział w opracowaniu założeń metodycznych, wykonanie analiz laboratoryjnych, analiza i opracowanie wyników badań, redagowanie manuskryptu, udział w korekcie po recenzjach. Wkład w artykuł (1) wynosi 70% a w artykuły (2)-(4) wynosi po: 60%.



Podpis

Lublin, data 20.07.2023

dr hab. Urszula Złotek, prof. uczelni
Katedra Biochemii i Chemii Żywności Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Skromna 8, 20-704 Lublin
Tel. 81 462 33 28
urszula.zlotek@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

1. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Złotek, Maciej Combrzyński, 2021, Influence of addition of mushroom powder to semolina on proximate composition, physicochemical properties and some safety parameters of material for pasta production. *LWT-Food Science and Technology*, 151, 112235.
2. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Złotek, Agnieszka Wójtowicz, Maciej Combrzyński, 2022, The Effect of the Addition of Various Species of Mushrooms on the Physicochemical and Sensory Properties of Semolina Pasta. *Food & Function*, 13, 8425-8435.
3. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Szymanowska, Krzysztof Tutaj, Dorota Domagała, Urszula Złotek, 2023, The Addition of Reishi and Lion's Mane Mushroom Powder to Pasta Influences the Content of Bioactive Compounds and the Antioxidant, Potential Anti-Inflammatory, and Anticancer Properties of Pasta, *Antioxidants*, Tom 12, 738.
4. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Szymanowska, Krzysztof Tutaj, Dorota Domagała, Urszula Złotek, 2023, Influence of dried Maitake and Enoki mushroom addition on antioxidant, potentially anti-inflammatory, and anti-cancer properties of enriched pasta, *Applied Science*, Tom 13, 8183.

Mój udział polegał na pomocy w opracowaniu wstępnych hipotez badawczych, pomocy naukowej i merytorycznej podczas prowadzenia doświadczenia, opracowanie metodyki, wkładzie intelektualnym w końcową analizę wyników i współredagowanie manuskryptu. Wkład w artykuły (1)-(2) wynosi po: 20%, w artykuły (3)-(4) wynosi po: 15%,



Podpis

Lublin, data 14.07.2023

dr Maciej Combrzyński
Wydział Inżynierii Produkcji Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Głęboka 31, 20-612 Lublin
81 4456118
maciej.combrzynski@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

1. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Złotek, Maciej Combrzyński, 2021, Influence of addition of mushroom powder to semolina on proximate composition, physicochemical properties and some safety parameters of material for pasta production. LWT-Food Science and Technology, 151, 112235.
1. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Złotek, Agnieszka Wójtowicz, Maciej Combrzyński, 2022, The Effect of the Addition of Various Species of Mushrooms on the Physicochemical and Sensory Properties of Semolina Pasta. Food & Function, 13, 8425-8435.

Mój udział polegał na pomocy w opracowaniu metodyki oraz pomocy naukowej i merytorycznej podczas prowadzenia doświadczenia analizy tekstury. Wkład w artykuły (1)-(2) wynosi: po 10%.



Podpis

Lublin, data 14.07.2023

prof. dr hab. inż Agnieszka Wójtowicz
Wydział Inżynierii Produkcji Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Głęboka 31, 20-612 Lublin
81 44456127
agnieszka.wojtowicz@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracy:

1. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Złotek, Agnieszka Wójtowicz, Maciej Combrzyński, 2022, The Effect of the Addition of Various Species of Mushrooms on the Physicochemical and Sensory Properties of Semolina Pasta. Food & Function, 13, 8425-8435.

Mój udział polegał na opracowaniu metodyki oraz pomocy naukowej i merytorycznej podczas prowadzenia doświadczenia analizy tekstury. Wkład w artykuł wynosi: 10%.



Podpis

Lublin, data 20.07.2023

dr Urszula Szymanowska
Katedra Biochemii i Chemii Żywności Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Ul. Skromna 8, 20-704 Lublin,
Tel. 81 462 33 28
urszula.szymanowska@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Technologia
Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

1. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Szymanowska, Krzysztof Tutaj, Dorota Domagała, Urszula Złotek, 2023, The Addition of Reishi and Lion's Mane Mushroom Powder to Pasta Influences the Content of Bioactive Compounds and the Antioxidant, Potential Anti-Inflammatory, and Anticancer Properties of Pasta, Antioxidants, Tom 12, 738.
2. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Szymanowska, Krzysztof Tutaj, Dorota Domagała, Urszula Złotek, 2023, Influence of dried Maitake and Enoki mushroom addition on antioxidant, potentially anti-inflammatory, and anti-cancer properties of enriched pasta, Applied Science, Tom 13, 8183.

Mój udział polegał na opracowaniu metodyki oraz pomocy naukowej i merytorycznej podczas prowadzenia doświadczenia dotyczącego badania właściwości przeciwnowotworowych. Wkład w artykuły (1)-(2) wynosi po: 10%.


Podpis

Lublin, data 14.07.2023

dr Krzysztof Tutaj
Katedra Biochemii i Toksykologii
ul. Akademicka 13/22, 20-950 Lublin
81 445 65 57
ktutaj@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

1. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Szymanowska, Krzysztof Tutaj, Dorota Domagała, Urszula Złotek, 2023, The Addition of Reishi and Lion's Mane Mushroom Powder to Pasta Influences the Content of Bioactive Compounds and the Antioxidant, Potential Anti-Inflammatory, and Anticancer Properties of Pasta, Antioxidants, Tom 12, 738.
2. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Szymanowska, Krzysztof Tutaj, Dorota Domagała, Urszula Złotek, 2023, Influence of dried Maitake and Enoki mushroom addition on antioxidant, potentially anti-inflammatory, and anti-cancer properties of enriched pasta, Applied Science, Tom 13, 8183.

Mój udział polegał na opracowaniu metodyki oraz pomocy naukowej i merytorycznej podczas prowadzenia doświadczenia oznaczania związków fenolowych z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS. Wkład w artykuły (1)-(2) wynosi po: 10%.


.....
Podpis

Lublin, data 20.07.2023

Dr Dorota Domagała
Katedra Zastosowań Matematyki i Informatyki,
Wydział Inżynierii Produkcji Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Głęboka 28, 20-612 Lublin
815319624
dorota.domagala@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, że w pracach:

1. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Szymanowska, Krzysztof Tutaj, Dorota Domagała, Urszula Złotek, 2023, The Addition of Reishi and Lion's Mane Mushroom Powder to Pasta Influences the Content of Bioactive Compounds and the Antioxidant, Potential Anti-Inflammatory, and Anticancer Properties of Pasta, Antioxidants, Tom 12, 738.
2. Magdalena Szydłowska-Tutaj, Urszula Szymanowska, Krzysztof Tutaj, Dorota Domagała, Urszula Złotek, 2023, Influence of dried Maitake and Enoki mushroom addition on antioxidant, potentially anti-inflammatory, and anti-cancer properties of enriched pasta, Applied Science, Tom 13, 8183.

Mój udział polegał na opracowaniu statystycznym wyników. Wkład w artykuły (1)-(2) wynosi po: 5%.


Podpis

**10. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD PRACY
DOKTORSKIEJ (Załącznik 2)**



Influence of addition of mushroom powder to semolina on proximate composition, physicochemical properties and some safety parameters of material for pasta production

Magdalena Szydłowska-Tutaj^{a,b}, Urszula Złotek^{a,*}, Maciej Combrzyński^c

^a Department of Biochemistry and Food Chemistry, University of Life Sciences in Lublin, Skraszowa Str. 8, 20-704, Lublin, Poland

^b PZŻ Lubelski GMW Sp. z o.o. Spółka, Wroclawska Str. 1, 20-469, Lublin, Poland

^c Department of Thermal Technology and Food Process Engineering, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka Str. 31, 20-612, Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Semolina
Fortification
Mushrooms
Nutritional quality
Physicochemical properties

ABSTRACT

The aim of this work was to compose a mixture of semolina fortified with 2.5–10 % of dried mushroom powder (Lion's Mane (L), Maitake (M), Reishi (R), and Enoki (E)) which will have good potential to be used for making pasta. The supplementation of durum flour with dried mushroom led to an increase in the content of ash, fat, carbohydrate, and in some cases protein in the studied mixtures. However, the increase in the amount of protein in the supplemented semolina was not correlated with an increase in the level of gluten proteins; on the contrary, the addition of the fungus reduced the amount of gluten content, whereas gluten index values were at a satisfactory level in all tested samples as normal gluten strength (GI = 30–80 %). A decrease in L* (brightness) and b* (yellowness) was observed after the semolina supplementation (the greatest decline in R samples). All studied mixtures of semolina with dried mushrooms were safe in terms of their microbiological quality and the absence of heavy metal contamination.

1. Introduction

Nowadays, consumers do not regard food only as a means of satisfying hunger and providing basic nutritional values but look for products that may be useful in prevention and/or treatment of civilization diseases or improvement of mental health and well-being (Minarovicovi et al., 2018).

Recently, there has been increased consumers' interest in food products for consumption as part of the daily diet, which have been enriched with ingredients with documented pro-health properties.

Semolina derived from *Triticum durum* is a type of raw material that is the choice for manufactures of pasta in many countries, as it is regarded as the best raw material for making pasta. The quality of pasta is determined by the market, i.e. consumers who choose pastas with a natural uniform yellow color without gray or red discoloration. After cooking, pasta should be springy, flexible, and not sticky and have a pleasant taste and smell. There are three main factors affecting the quality of pasta available on the market: raw material, pasta production process, and recipe. In order to obtain the above-mentioned characteristics of pasta, certain conditions of high-quality raw materials used in

pasta production must be met, i.e. an optimal technology of grinding durum wheat from which semolina is obtained and a properly conducted technological process of pasta production (Sissoum, 2016).

It should be assumed that the addition of some ingredients to the standard raw material, i.e. semolina, in different proportions can cause changes in dough, which may have various effects on the production of pasta. Many literature data indicate attempts in scientific research to enrich pasta with various additives, e.g. vegetables, fruits, spices, herbs, and mushrooms. The basic raw materials for pasta production, i.e. wheat flour from common wheat (*Triticum aestivum*) or semolina from durum wheat (*Triticum durum*), are replaced with different percentages of selected additives. The current scientific research is focused on investigations of food with high nutritional potential and the higher content of biologically active compounds. The literature data show large differences in the recipe composition of pasta with the addition of bioactive ingredients. The raw materials used to enrich pasta can be divided into several groups: herbs (oregano, parsley, purges, chia) (Szczyrk et al., 2016; Lisiecka et al., 2019), vegetable (carrot pomace, spinach, tomato) (Lisiecka et al., 2019; Bekku et al., 2013), legume chickpeas, white beans (Shreenithee & Prabhakar, 2013; Bashir,

* Corresponding author.

E-mail address: ursula.zlotek@up.lublin.pl (U. Zlotek).

2012; Gallegos-Infante et al., 2010), locust bean gum (Sisrznacka et al., 2017), onion peel (Michalak-Majewska et al., 2020), celery root (Minarovićová et al., 2018), and fungi: shiitake, *Boletus edulis*, or common mushroom (Lu et al., 2016; Muresan et al., 2017).

The pro-health properties of such saprotrophic fungi as *Ganoderma lucidum* (called Reishi), *Flammulina velutipes* (known as Enoki), *Hericiam erinaceus* (known as Lion's Mane), and *Grifola frondosa* (called Maitake), which are popular in Asian countries (mainly China and Japan) but less popular in Europe, arouse the interest of scientists and food producers. The mushrooms used in this research are a source of nutrients, including dietary fiber, minerals, and vitamins, and bioactive compounds exerting a beneficial impact on human health, for example β -glucan. The polysaccharides contained in the fungal cell wall are believed to promote health with their antitumor and immunostimulant properties (Ren et al., 2012).

The present study was carried out to compare and evaluate various mixtures of semolina with dried mushrooms in terms of their physical, chemical, and technological parameters that can be selected for pasta production.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Durum wheat semolina was obtained from milling durum wheat (*Triticum durum*) available in PZZ Lubella, Poland. Semolina comes from the grinding of durum wheat on an industrial mill equipped with Bühler machines, in which modern technical and technological solutions have been applied. After passing through the cleaning plant, the grain is conditioned, i.e. subjected to a water-thermal treatment, and then directed to a roller mill. The result of the mill's operation is the grinding of wheat grain into the form of pasta called semolina, flour and bran. Commercially available dried *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Hericiam erinaceus*, and *Grifola frondosa* mushrooms were purchased in food stores. Each mushroom batch was provided with a quality certificate confirming the appropriate quality, expiry date, and country of origin.

Based on the distributors' information all mushrooms are in 100 % single-ingredient products and their nutritional value are (in g/100 g): Lion's Mane (L) - fat: 2.8, protein: 20.1, carbohydrates: 23.9; Maitake (M) - fat: 2.5, protein: 15.0, carbohydrates: 31.0; Reishi (R) - fat: 0.8, protein: 9.2, carbohydrates: <0.1; Enoki (E) - fat: 0.29, protein: 3.9, carbohydrates: 7.81.

2.2. Sample preparation

Three types of dried mushrooms: Lion's Mane (L), Maitake (M), and Reishi (R) were purchased in the powder form. Dried Enoki (E) mushrooms were bought and then ground to obtain powder using a Retsch GM200 mill. Semolina flour was replaced with mushroom powder at the levels of 2.5 % (w/w), 5.0 % (w/w), 7.5 % (w/w), and 10 % (w/w), respectively. These substitution levels were selected on the basis of the literature (Lu et al., 2018; Muresan et al., 2017) and preliminary research determining the ranges of the addition of dried droughts possible to produce the dough. All components were prepared by mixing the semolina with the mushroom flour to obtain a homogeneous free-flowing raw material.

2.3. Proximate composition

Moisture, ash, and fat content were determined in accordance with standard methods (ISO Standard 712, ISO Standard 2171, ISO Standard 11085, respectively). (International Organization of Standardization (ISO), n.d.) Protein content (Nx5.7) was determined with the standard Kjeldahl method (Williams, 1973).

The carbohydrate content was estimated by the so-called difference,

and the energy content was calculated using Atwater factors.

Starch content was determined using a near-infrared diode array (NIR) instrument for rapid analysis with available manufacturer's proprietary calibrations (Cecchini et al., 2021).

2.4. Chemical and functional characteristics

2.4.1. α -amylase activity

The α -amylase activity was determined using Falling Number apparatus 1305 (Perten Instruments) according to ISO 3093 (Giamone et al., 2018).

2.4.2. Gluten and gluten index content

Determination of the gluten concentration was performed with Glutomatic 2200 (Perten Instruments). The gluten index (GI) is the measure of the proportion of wet gluten that resists passing through a screen during centrifugation (Min, 2000).

2.4.3. Damaged starch content

Determination of damaged starch was performed using a SDmatic analyzer (CHOPIN Technologies, France), which measures iodine absorption from damaged starch in a diluted semolina suspension (Alm) (Vinci et al., 2015).

2.4.4. Physical properties

The color profile of the composition of the raw materials was measured using a Konica Minolta CR-410 colorimeter in the CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) LAB scale. The measurements determined the chromatic values of L*, a*, and b*. The L* value describes brightness in the range from 0 to 100 (black to white). The a* value describes the redness-greenness balance (in-minus for green and in-plus for red color). The b* value describes the yellowness-blueness balance (in-minus for blue and in-plus for yellow color). For the measurements were used illuminant C, the slit diameter is constant and equals \varnothing 50 mm and the measurement angle is 0° (Wang & Fu, 2020).

2.5. Rheological properties of dough

The rheological properties of the semolina blends were determined using Alveograph equipment (CHOPIN Technologies, France) according to standardized analysis (ISO Standard 27971). Dough tenacity (P), extensibility (L), deformation energy (W), and the total area under the curve were determined. Additionally, the P-to-L ratio was calculated to compare tenacity versus extensibility (Dubois, Dubaut, & Launay, 2008).

2.6. Safety parameters

The microbiological purity of the semolina and fungi was determined using the method described in ISO 6579 for the presence of *Salmonella* spp. in 25 g sample. Coagulase-positive staphylococci were detected following method ISO 6888 (Akinedeen et al., 2015).

The ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry) method was used to determine the levels of heavy metals (Martins & Cerveira, 2014) and an Atomic Absorption Spectrometer was used for determination of the content of mercury (Yoshimoto et al., 2016).

2.7. Statistical analyses

All analyses were carried out in triplicate, unless otherwise stated. Statistically significant differences were determined using one-way analysis of variance (ANOVA) at the significance level $p \leq 0.05$. Homogeneous groups were determined with the Tukey test and data were reported as mean \pm standard deviation using Statistica ver. 13.3.

3. Results

3.1. Proximate composition of control semolina and mushroom-enriched semolina

The results of the basic composition of semolina and semolina with the addition of the dried mushrooms are shown in Table 1. The content of minerals (ash) in all raw material mixtures was statistically significantly higher than the ash content in the control sample ($p \leq 0.05$). Additionally, the ash content increased with the increase in the percentage of the dried mushrooms. The highest value of 1.48 % was shown by the E10 sample. A decrease in moisture was observed with an increase in the percentage of the dried fungus addition. The highest value of 14.65 % was demonstrated for the control C. The fat content in the tested samples ranged between 1.00 (sample M2.5) and 1.13 % (sample L10). It should be noted that the addition of 7.5 % and 10 % of each of the tested dried mushrooms resulted in an approx. 10 % increase in the fat content in the mixtures. In the case of the protein content, the lowest level, i.e. 14.56 %, was found for M2.5, and the highest value was detected for R10 (17.59 %). Additionally, it should be noted that the mixtures of semolina with the different percentages of dried Reishi mushroom showed the highest protein content. The lowest protein values were indicated for the mixture of semolina with the dried Lion's Mane mushroom. One common correlation was observed in all the mixtures, i.e. the protein content increased with the increase in the percentage of dried mushrooms. The highest carbohydrate content ranging from 69.06 % to 69.61 % was found in the mixtures of semolina with the Enoki mushrooms. In turn, the lowest content was determined in the mixtures with the dried Reishi mushrooms, and the lowest value for all samples was 66.64 % for the R10 trial. As shown in Table 1, energy was at a similar level in all the samples and ranged from 342.67 kcal/100 g to 349.25 kcal/100 g.

3.2. Physicochemical analysis of control semolina and mushroom-enriched semolina

The physicochemical parameters of the control semolina and the semolina fortified with dried mushrooms are given in Table 2. The data show that the highest content of wet gluten in the control sample C (semolina), reaching the value of 30.77 %. Additionally, in the mixture of semolina with Maitake, Lion's Mane, and Enoki mushrooms, a decrease in the wet gluten content was observed with an increase in the

Table 2

Physicochemical analysis of semolina and mixtures with the addition of dried mushrooms.

Samples	Wet Gluten (%)	Falling Number (s)	Starch (% d.m.)
C	30.77 ± 0.56j	404 ± 4.00cde	56.97 ± 0.21efgh
R2.5	29.27 ± 0.12hi	411 ± 2.52cdef	56.02 ± 0.10e
R5	29.70 ± 0.70ij	387 ± 4.98c	55.31 ± 0.25h
R7.5	27.63 ± 0.15fg	295 ± 12.50d	54.80 ± 0.10f
R10	26.07 ± 0.15de	230 ± 8.54e	53.83 ± 0.35a
M2.5	29.90 ± 0.10j	436 ± 16.74fghi	56.57 ± 0.25def
M5	28.27 ± 0.06gh	414 ± 18.47cdefg	57.23 ± 0.15ghij
M7.5	27.17 ± 0.35efg	409 ± 16.74cde	56.67 ± 0.15cdefg
M10	26.82 ± 0.25ef	423 ± 4.73efghi	56.43 ± 0.21cde
L2.5	28.30 ± 0.10gh	490 ± 4.16gh	57.67 ± 0.25j
L5	24.40 ± 0.10bc	429 ± 1.73efghi	57.17 ± 0.21fghij
L7.5	23.80 ± 0.20 ab	441 ± 5.13hi	56.97 ± 0.15efghi
L10	23.67 ± 0.58 ab	389 ± 2.52cd	56.77 ± 0.06defgh
E2.5	28.80 ± 0.70hi	415 ± 3.00efgh	57.31 ± 0.25hij
E5	26.80 ± 0.36ef	391 ± 4.51cd	56.47 ± 0.35cde
E7.5	25.37 ± 0.32cd	404 ± 6.66cde	57.43 ± 0.21j
E10	23.17 ± 0.31a	442 ± 3.05i	56.30 ± 0.20cd

C - control (semolina); R2.5-10 - semolina flour fortified with 2.5%-10 % of Reishi mushroom powder; M2.5-10 - semolina flour fortified with 2.5%-10 % of Maitake mushroom powder; L2.5-10 - semolina flour fortified with 2.5%-10 % of Lion's Mane mushroom powder; E2.5-10 - semolina flour fortified with 2.5%-10 % of Enoki mushroom powder.

Means with different superscripts within a column are significantly different ($n = 3$; $p < 0.05$).

percentage of the dried mushrooms. The amyolytic activity of the raw materials was determined by the falling number. As shown in Table 2, it reached the highest value, i.e. 442 s, in the E10 sample. The mixtures of semolina with the different percentages of dried Reishi mushrooms were the only blends where the falling number decreased as the dried mushroom addition increased. In turn, this parameter was similar in the mixture of semolina with Maitake, Lion's Mane and Enoki mushrooms, and it was in the range of 391-442 s. The content of starch in the control sample and the mixtures with Maitake, Lion's Mane, and Enoki mushrooms was stable in the range of 56-57 %. In turn, in the case of flours supplemented with Reishi (samples R2.5-R10), statistically significantly lower values of starch content in comparison to control were observed - Table 2. The lowest starch content, i.e. 53.83 %, was determined in the R10 sample.

Table 1

Proximate composition of semolina and mixtures with the addition of dried mushrooms.

Samples	Moisture (g/100 g d.m.)	Ash (g/100 g d.m.)	Protein (g/100 g d.m.)	Fat (g/100 g d.m.)	Carbohydrate (g/100 g d.m.)	Energy ^a (kcal/100 g)
C	14.65 ± 0.03i	0.94 ± 0.01a	15.31 ± 0.05f	1.01 ± 0.01a	68.09 ± 0.06d	342.67 ± 0.17a
R2.5	14.63 ± 0.006h	1.11 ± 0.01c	16.37 ± 0.05h	1.04 ± 0.02 ab	67.45 ± 0.06c	344.62 ± 0.13bc
R5	13.72 ± 0.01 fg	1.26 ± 0.01e	16.61 ± 0.05e	1.04 ± 0.04abc	67.36 ± 0.08c	345.25 ± 0.23cd
R7.5	13.38 ± 0.03e	1.45 ± 0.01g	16.98 ± 0.05a	1.12 ± 0.03bcd	67.07 ± 0.10b	346.25 ± 0.12e
R10	13.84 ± 0.01c	1.60 ± 0.01h	17.59 ± 0.05b	1.12 ± 0.03d	66.64 ± 0.04a	347.11 ± 0.13f
M2.5	14.13 ± 0.01b	1.05 ± 0.02b	14.56 ± 0.05a	1.00 ± 0.001a	69.26 ± 0.05ij	344.26 ± 0.11b
M5	14.86 ± 0.00h	1.17 ± 0.01d	14.89 ± 0.05bc	1.05 ± 0.001abcd	68.83 ± 0.13fg	344.33 ± 0.04b
M7.5	13.85 ± 0.02g	1.26 ± 0.01e	15.21 ± 0.07def	1.12 ± 0.03bcd	68.56 ± 0.10ef	345.12 ± 0.16cd
M10	13.83 ± 0.02g	1.37 ± 0.01f	15.26 ± 0.13ef	1.11 ± 0.04bcd	68.42 ± 0.11e	344.74 ± 0.44bc
L2.5	14.84 ± 0.00h	1.05 ± 0.001b	14.79 ± 0.05b	1.00 ± 0.002a	69.11 ± 0.11ghj	344.63 ± 0.26bc
L5	13.85 ± 0.00g	1.18 ± 0.002d	14.85 ± 0.05bc	1.04 ± 0.06 ab	69.09 ± 0.11ghi	345.08 ± 0.43cd
L7.5	13.68 ± 0.01f	1.29 ± 0.01e	14.98 ± 0.001bcd	1.12 ± 0.03bcd	68.94 ± 0.04gh	345.73 ± 0.13de
L10	13.25 ± 0.07de	1.38 ± 0.001f	15.05 ± 0.05cde	1.13 ± 0.03d	69.18 ± 0.10hi	347.14 ± 0.19f
E2.5	13.21 ± 0.04d	1.05 ± 0.02b	15.20 ± 0.05def	1.00 ± 0.002a	69.53 ± 0.10j	347.92 ± 0.24g
E5	12.82 ± 0.03b	1.18 ± 0.01d	15.33 ± 0.10f	1.05 ± 0.05abcd	69.61 ± 0.03k	349.25 ± 0.09h
E7.5	12.75 ± 0.02 ab	1.36 ± 0.005f	15.67 ± 0.05g	1.11 ± 0.01bcd	69.10 ± 0.06ghi	349.09 ± 0.11h
E10	12.64 ± 0.03a	1.47 ± 0.002g	15.71 ± 0.18g	1.12 ± 0.03cd	69.06 ± 0.18hij	349.18 ± 0.24h

C - control (semolina); R2.5-10 - semolina flour fortified with 2.5%-10 % of Reishi mushroom powder; M2.5-10 - semolina flour fortified with 2.5%-10 % of Maitake mushroom powder; L2.5-10 - semolina flour fortified with 2.5%-10 % of Lion's Mane mushroom powder; E2.5-10 - semolina flour fortified with 2.5%-10 % of Enoki mushroom powder.

Means with different superscripts within a column are significantly different ($n = 3$; $p < 0.05$).

^a Values calculated using Atwater factors.

3.3. Technological parameters of control semolina and mushroom-enriched semolina

The gluten index in the control semolina and the mixtures of semolina and dried mushrooms varied between 43 % for sample R5 and 80 % for sample L7.5. As shown in Table 3, the highest values of the Gluten Index were calculated for the mixture with the Lion's Mane mushrooms. Parameters describing the strength of the dough (*W* alveograph value) are shown in Table 3. They were in the range from 146×10^{-4} J for the control (C) to 206×10^{-4} J for the L5 sample. Similar to the results of the gluten index, the highest values of this parameter were noted for the dough prepared from the semolina fortified with Lion's Mane (Table 3). The alveograph P/L value showed very different gluten tenacities increasing from 0.75 for E2.5 to 5.37 for M10. The highest values of this parameter were recorded for the dough made from flour enriched with Maitake (M7.5 and M10 samples) and Lion's Mane (L7.5 and L10 samples). The degree of damage to starch is increasingly being used as a parameter of the properties of starch. It is related to the mechanical damage of starch grains during the grain milling process. In the present study, starch damage expressed in AI (absorption of iodine) units ranged from 76.59 % for sample M5 to 84.14 % for sample R10 (Table 3). It should also be noted that a high degree of starch damage was observed in samples made from semolina supplemented with the Reishi powder (R2.5-R10 samples) characterized by low gluten index values – Table 3.

The instrumental assessment of the color of the tested dough showed a statistically significant decrease in the L^* parameter in all samples supplemented with the mushrooms (which indicates that the dough prepared from the dried mushroom-fortified semolina was darker). Furthermore, the other color parameters of the dough prepared from the mushroom-supplemented semolina (a^* and b^*) differed statistically significantly compared to the control – a significant increase in parameter a and a decrease in parameter b were observed. The use of the Reishi mushrooms for semolina supplementation resulted in the greatest color changes of the dough – Table 3. Sample R10 had the highest results of all samples. The control sample showed the highest values of parameters L^* (brightness) and b^* (yellowness), which are most frequently expected for semolina.

3.4. Safety parameters of semolina and mushroom-enriched semolina

The content of harmful metals and the microbiological quality of the

analyzed mixtures are summarized in Table 4. The content of Pb, As, Cd, and Hg in the semolina and all semolina and fungi mixtures was below the limit of quantification of the method and all were compliant with the requirements of Commission Regulation (EC) No 1831/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (European Commission, 2006). All raw materials exhibited the same microbiological purity and were free from pathogens: *Salmonella* was absent in 25 g and coagulase-positive *Staphylococci* were below 10 colony-forming units (CFU) in 1 g.

4. Discussion

Analyses of the nutritional value of the starting material for production of flour products should take into account the effect of fortification on the content of the main nutrients. The typical value of protein in semolina from durum wheat is in the range of 11–16 % (Sissons *Milke*, 2000). The mixtures of semolina flour with dried mushrooms analyzed in this study were characterized by a satisfactory protein concentration in the range of 14.56 ± 0.05 g/100g for M2.5 sample to 17.59 ± 0.05 g/100g for R10 sample based on data on the quality of semolina (Table 1), because according to Italian Voluntary Classification semolina class A from durum wheat should have protein ≥ 13.5 % (Pagani *et al.*, 2007). Significantly higher protein values were observed in the case of fortification with Reishi mushroom powder. Based on the distributors' information included in Material and methods section in the Reishi mushroom powder, protein is the dominant macronutrient, while carbohydrates are the dominant macronutrient in the case of other mushrooms. Similarly, Parvin *et al.* (Parvin *et al.*, 2020) observed a higher concentration of protein in pastas after fortification with Oyster mushroom powder. However, in a study conducted by Chauhan *et al.* (Chauhan *et al.*, 2017), addition of white button mushrooms to semolina resulted in a reduction of the protein content in the pasta. A comparison of the content of other nutrients (carbohydrates, fat) presented in Table 1 demonstrates that the nutritional value of the dough made from semolina with the addition of the tested fungi is similar to or even higher than the control. Dough prepared from flour (or flour with some addition) and its characteristics are the basis for production of most wheat-containing products (Jin *et al.*, 2019). A previous study (Lu *et al.*, 2016) indicated that fortification of semolina with some mushroom powders (white button, shiitake, and porcini) exerted an impact on the nutritional value and the rheological and structural properties of dough.

Table 3
Technological parameters of semolina and semolina mixtures with the addition of dried mushrooms.

Samples	Gluten index (%)	Alveograph*		Damaged Starch		Colorimetric parameters	
		$W \times 10^{-4}$ J	P/L	AI %	L^*	a^*	b^*
C	54 ± 2.08bc	146 ± 11.36a	0.86 ± 0.12 ab	78.61 ± 0.44ef	84.74 ± 0.07a	-0.51 ± 0.02a	27.60 ± 0.22m
E2.5	45 ± 2.00a	174 ± 13.53 ab	0.99 ± 0.11 ab	79.19 ± 0.22e	65.84 ± 0.18d	3.29 ± 0.07a	13.83 ± 0.09d
R5	43 ± 1.53a	171 ± 22.67 ab	1.59 ± 0.22abc	81.34 ± 0.11g	59.77 ± 0.34c	4.27 ± 0.06k	11.35 ± 0.21c
E7.5	49 ± 4.04 ab	198 ± 12.50 ab	2.18 ± 0.18abcd	83.08 ± 0.04h	56.10 ± 0.25b	4.72 ± 0.07l	10.24 ± 0.08b
R10	62 ± 0.58ef	189 ± 20.52 ab	2.99 ± 0.11cd	84.14 ± 0.01j	53.10 ± 0.45a	5.07 ± 0.13i	9.51 ± 0.12a
M2.5	55 ± 0.58bcd	180 ± 6.08 ab	1.56 ± 0.05abc	78.53 ± 0.23def	70.23 ± 0.01i	1.96 ± 0.04c	22.59 ± 0.32b
M5	61 ± 0.58def	169 ± 23.80 ab	2.38 ± 0.79bcd	76.59 ± 0.38a	75.14 ± 0.07g	3.08 ± 0.05g	20.55 ± 0.24g
M7.5	45 ± 1.00a	178 ± 34.43 ab	3.37 ± 0.17de	77.24 ± 0.22abc	73.27 ± 0.17f	3.79 ± 0.08f	19.43 ± 0.10f
M10	59 ± 0.00cde	205 ± 24.21b	5.37 ± 1.23f	76.88 ± 0.23 ab	72.16 ± 0.04e	4.02 ± 0.03j	18.96 ± 0.03c
L2.5	67 ± 0.00f	185 ± 4.93 ab	1.35 ± 0.10 ab	77.83 ± 0.09cde	83.26 ± 0.04m	1.36 ± 0.04b	26.66 ± 0.10l
L5	74 ± 0.58g	206 ± 13.32b	1.87 ± 0.40abcd	77.23 ± 0.37abc	82.28 ± 0.03h	2.16 ± 0.03d	26.09 ± 0.10l
L7.5	80 ± 2.00g	204 ± 16.26b	3.23 ± 0.21de	78.04 ± 0.10cde	81.69 ± 0.03kl	2.70 ± 0.03f	25.44 ± 0.16k
L10	79 ± 0.58g	177 ± 10.67 ab	4.54 ± 1.34ef	77.45 ± 0.60abc	81.27 ± 0.05k	3.08 ± 0.01g	24.88 ± 0.03j
E2.5	54 ± 1.15bcd	156 ± 8.14 ab	0.75 ± 0.07a	77.69 ± 0.34bcd	81.92 ± 0.08l	1.30 ± 0.02b	25.82 ± 0.08kl
E5	47 ± 2.08a	148 ± 10.62a	0.81 ± 0.13a	77.69 ± 0.03bcd	79.82 ± 0.04q	2.47 ± 0.05e	24.64 ± 0.13j
E7.5	65 ± 1.15ef	174 ± 23.54 ab	1.26 ± 0.23 ab	76.89 ± 0.16 ab	78.03 ± 0.08	3.42 ± 0.02h	23.78 ± 0.18h
E10	67 ± 6.24f	171 ± 21.82 ab	1.12 ± 0.03 ab	76.79 ± 0.17a	76.89 ± 0.16b	3.73 ± 0.03i	23.00 ± 0.05h

C - control (semolina); R2.5-10 - semolina flour fortified with 2.5%-10% of Reishi mushroom powder; M2.5-10 - semolina flour fortified with 2.5%-10% of Maitake mushroom powder; L2.5-10 - semolina flour fortified with 2.5%-10% of Lion's Mane mushroom powder; E2.5-10 - semolina flour fortified with 2.5%-10% of Enoki mushroom powder.

Means with different superscripts within a column are significantly different ($n = 3$; $p < 0.05$).

* Alveograph indices: W - dough strength ($\times 10^{-4}$), L - extensibility (mm), P - tenacity (mm), P/L - tenacity to - extensibility ratio.

Table 4
Safety parameters of raw materials (semolina and semolina mixtures with the addition of dried mushrooms).

Samples	Microbiological parameters		Heavy metals ^a			
	Subsorella (CFU)	Coagulase positive <i>Staphylococci</i> (CFU)	Pb (mg/kg)	As (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Hg (mg/kg)
C	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
R2.5	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
R5	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
R7.5	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
R10	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
M2.5	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
M5	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
M7.5	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
M10	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
L2.5	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
L5	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
L7.5	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
L10	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
E2.5	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
E5	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
E7.5	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005
E10	Not detected 25g	<19 in 1g	<0.025	<0.021	<0.005	<0.005

C - control (semolina); R2.5–10 - semolina flour fortified with 2.5%–10% of Reishi mushroom powder; M2.5–10 - semolina flour fortified with 2.5%–10% of Maitake mushroom powder, L2.5–10 - semolina flour fortified with 2.5%–10% of Lion's Mane mushroom powder, E2.5–10 - semolina flour fortified with 2.5%–10% of Enoki mushroom powder.

Means with different superscripts within a column are significantly different ($n = 3$; $p \leq 0.05$).

^a QL (limit of quantification) for lead is 0.025 mg/kg; ^b QL (limit of quantification) for cadmium is 0.005 mg/kg; ^c QL (limit of quantification) for arsenic is 0.021 mg/kg; ^d QL (limit of quantification) for mercury is 0.005 mg/kg.

Therefore, certain features e.g. the protein composition or the content and quality of starch are important for the functional properties of dough made of flour (including those determining good quality of the manufactured bread or pasta product) (Sissons *et al.*, 2008). Gluten proteins (gliadins and glutenins) mix with water when semolina dough is made and form gluten, i.e. a viscoelastic substance that binds starch grains and other flour ingredients together (Sissons *et al.*, 2008; De Hoon & Pagani, 2010). Gluten proteins play a significant role in determining the quality of wheat flour by conferring water absorption capacity, cohesivity, viscosity, and elasticity on dough. The gluten index (GI) is a popular indicator of gluten quality determining its strength. The GI value classifies gluten quality as weak (GI < 30%), normal (GI = 30–80%), or strong (GI > 80%) (Olihanonou *et al.*, 2015; Vinci *et al.*, 2013). The increase in the content of proteins in the semolina mixtures fortified with the dried mushrooms observed in the present study was not correlated with an increase in gluten proteins. On the contrary, the addition of the fungus reduced the gluten content (Tables 1 and 2), whereas satisfactory GI values were noted for all tested samples - based on above classification they should be classified as normal GI value - values from 43% for R5 sample to 80% for L7.5 sample (Table 3). The results regarding the content of gluten are consistent with the studies of other researchers (the addition of mushrooms resulted in a lower proportion of gluten) (Lisecka *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2018). On the other hand, the results concerning the value of the gluten index are surprising, as the GI values increased with the increase in the amount of dried mushrooms added. In the studies of other researchers, the addition of other raw materials to wheat flour usually caused a decrease in the strength of gluten (Lisecka *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2018). However, there are also studies where inconsistent correlations between the measures of pasta quality and the content and strength of gluten have been observed (Sissons *et al.*, 2008). The type of protein-starch interaction that can affect the viscoelastic behavior of dough plays a significant role in the rheological properties of dough prepared from durum wheat starch. In bread production, sufficiently damaged starch is required to ensure adequate gassing during fermentation. Conversely, in the production of pasta, starch damage is highly disadvantageous, as it can increase cooking losses and reduce firmness and water absorption in pasta. Therefore, the lowest degree of starch damage predisposes prepared dough for pasta production (Sissons *et al.*, 2008; Vinci *et al.*, 2013). The semolina fortification used in the present study resulted in a statistically

significant increase in this parameter in comparison to the control only when 5% and 10% of dried Reishi mushrooms were added, whereas a decrease in the degree of starch damage was detected in samples M5, M10, and E2.5–10 (Table 3). Starch damage generally is formed at the stage of grinding wheat grain. In our researches we observed that also in dried mushrooms there are starch damage and the highest rate of starch damage in Reishi powder in comparison to other mushrooms (data not published) has been observed - this could be the reason for the increase in the value of this parameter in mixtures with the addition of this mushroom. Another parameter that determines the product-making quality of raw material is the fermentative aptitude expressed by the falling number. This parameter should be high for pasta production - Falling Number, although was usually significant different among samplings, generally were always should be within the range 480–800 s corresponds to a very limited amylase activity, usually more suitable for pasta than for bread-making (Giannone *et al.*, 2018). A decrease in the falling number causes an increase in the activity of amylolytic enzymes, which break down starch; therefore, an insufficient value of the falling number will increase cooking losses and increase pasta stickiness (De Hoon & Pagani, 2010; Giannone *et al.*, 2018). In this study, a statistically significantly lower falling number was found for samples R7.5 and R10 and higher values were noted for samples M2.5, L2.5, L7.5, and E10, compared to the control (Table 2). These observations may indicate that enrichment of semolina with dried Reishi mushroom may deteriorate the usefulness of such flour for the production of pasta; however, determination of additional parameters is necessary. Additional parameters of dough quality in the context of the quality of products are determined by rheological tests (Sissons *et al.*, 2008). Alveograph parameters, i.e. the P/L ratio and W-value, were checked to characterize the rheological properties of the dough (Table 3). As suggested by some researchers, the W parameter (dough strength) and the P/L (tenacity versus elasticity) ratio indicate the levels of gluten strength (Sissons *et al.*, 2008; Abuhammad *et al.*, 2012). W is one of the industrially most applied alveograph parameters, as it is used for prediction of the processing behavior of flour. High P/L indicates resistant and inextensible dough, while low P/L indicates weak and extensible dough. P/L is often used industrially together with W to assess flour quality, as P/L indicates the balance between tenacity and extensibility (Jodal & Larsen, 2021). While the suitable P/L value for bakery products is lower than 0.5 (Bordes *et al.*, 2008), the values of parameters of wheat durum

indicating its suitability for pasta production suggested by (Dapović et al., 2011) are P/L in the range of 1.5–2.5 and the W value in the range of 200–250 ($\times 10^{-4}$ J). It should be mentioned that the alveographic W value indicates the suitable form of pasta production. Durum wheat characterized by a W value below 200 is not very suitable for production of long pasta such as spaghetti, but it does not have to interfere with the production of other forms of pasta (Baiano et al., 2011). As indicated by the data in Table 3, the fortification of the semolina with the mushrooms generally resulted in an increase in the W and P/L parameters, which may suggest improvement in the rheological properties of the analyzed mixtures. The value of these parameters may indicate that the dough obtained from the tested semolina mixtures with dried mushrooms will be suitable for the production of pasta. Nevertheless, with P/L values > 2.5 (as for the F10, M5-10, and L7.5-10 samples), an unbalanced proportion of extensibility and elasticity is observed in the behavior of the dough - the dough has no elasticity, which can cause problems in the production of pasta (Baiano et al., 2011). In a study conducted by (Nie et al., 2019), addition of *Pleurotus eryngii* powder influenced the rheological properties of wheat dough; more specifically, the greater addition of the dried mushroom to the wheat flour yielded more elastic and firmer but less viscous dough.

Color is a very important parameter of the quality of food products from the consumer's point of view. The most suitable parameter for the evaluation of semolina color is measurement of the b^* and L^* values (yellowness and lightness). The yellow color comes from the natural pigments present in the grains of durum wheat (carotenoid and xanthophyll). Their amounts may vary depending on the botanical origin, growing conditions, distribution in grain, and technology processes (Patianni et al., 2006). Some additives used in the manufacture of wheat products may induce color changes (Zarzycki et al., 2020; Lisiecka et al., 2019). In the present study a statistically significant decrease in the L^* parameter in all samples supplemented with the mushrooms has been detected - the highest value of the L^* coordinate was noted in wheat pasta without the addition. The greatest reduction of brightness was observed for the dough with the addition of Reishi mushroom because of the brown-red shade of dried Reishi. Our results are in agreement with others (Zarzycki et al., 2020; Lisiecka et al., 2019) in which pasta supplementation caused a decrease in the L^* parameter. In our study (Table 3), the addition of two mushrooms: Reishi and Maitake caused a significant decrease in the b^* value - most likely the addition of a dark dried mushroom masked the yellow color. Additionally the concentrations of carotenoids and xanthophyll (which is responsible for the yellow color of semolina) in mixtures probably differ from those in semolina without additives. The chromatic coordinate a^* , indicating redness-greenness balance reached in-plus values in case of semolina supplemented with all studied mushrooms whereas for the control sample (semolina) it was -0.51. As indicated also another authors (Chauhan et al., 2017; Lisiecka et al., 2019) it can be caused by the brown-red shade of added material. Additionally, an increase in the redness parameter was accompanied by the increase in the ash content. This may have a significant impact on the consumers' evaluation of the color of products made from such a blend.

An important additional parameter of the quality of cereal products (especially those supplemented with non-flour additives) is the safety of consumption by consumers. It is obvious, therefore, that the microbiological quality and the absence of contamination of the starting raw materials, e.g. with heavy metals, will determine the quality and safety of the final products. As indicated by the data presented in Table 4, all studied mixtures of semolina with dried mushrooms were safe in this respect and may be qualified for the production of food products (European Commission, 2006).

5. Conclusion

In conclusion, the parameters of semolina fortified with dried mushroom powder with documented pro-health properties (*Ganoderma*

lucidum, *Flammulina velutipes*, *Hericiium erinaceus*, and *Grifola frondosa*) indicated that dough made from these mixtures may be used for pasta production. Although some parameters of some of the mixtures (especially Reishi, Lion's Mane supplemented in 10 %) indicate possibly worse rheological parameters, none of the studied mixtures should be excluded from pasta production based on the results of the study. Although, on the basis of the obtained results, mixtures of semolina with dried Enoki will be especially recommended for the production of pasta.

Funding

This work was financially supported by the grant of the Ministry of Science and Higher Education in Poland (grant number "DWD/3/58/2019 - Implementation doctorate I").

CRediT authorship contribution statement

Magdalena Szydłowska-Tutaj: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Urszula Złotek:** Conceptualization, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing, Project administration. **Maciej Combrzyński:** Methodology, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Thanks go to Andrzej Gapiorek —General Director of PZZ Lubella GMW Sp. z o.o. Sp. k. for providing machines and equipment for the research.

References

- Abulnour, W. A., Elise, E. H., Maribay, F. A., Alami, M. S., & Mergem, M. (2012). A comparison of methods for assessing dough and gluten strength of durum wheat and their relationship to pasta cooking quality. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(12), 2561–2573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03135.x>
- Akinofun, O., Mhazta, K., Oham, J., Gross, M., & Edele, E. (2015). Microbiological quality of raw dried pasta from the German market, with special emphasis on cross-contaminated species. *Journal of Food Science*, 80(12), M2860–M2867. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13317>
- Baiano, A., Lamacchia, C., & Terrascone, C. (2011). Effects of the addition of a meal deriving from toasted durum wheat kernels on dough properties and spaghetti cooking behavior. *CYTA - Journal of Food*, 9(3), 200–209. <https://doi.org/10.1080/10475317.2010.512896>
- Balci, K. (2012). Physico-chemical and sensory characteristics of pasta fortified with chickpea flour and defatted soy flour. *OSR Journal of Environmental Science, Technology and Food Technology*, 1(5), 34–39. <https://doi.org/10.0790/2802-0153439>
- Bieracka, B., Dziś, D., Gneńk-Dziś, U., Różyk, B., & Siastals, M. (2017). Physical, sensorial, and antioxidant properties of common wheat pasta enriched with cereb fiber. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie: Food Science and Technology*, 77, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.042>
- Boedes, J., Brandard, G., Oury, F. X., Chomet, G., & Balfourier, F. (2006). Agronomic characteristics, grain quality and flour rheology of 372 bread wheats in a worldwide core collection. *Journal of Cereal Science*, 48(3), 569–579. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.05.005>
- Cecchini, C., Antonucci, F., Costa, C., Marti, A., & Menesatti, P. (2021). Application of near-infrared handheld spectrometers to predict semolina quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(1), 151–157. <https://doi.org/10.1002/jsf.11625>
- Chauhan, N., Vaidya, D., Gupta, A., & Pandit, A. (2017). Fortification of pasta with white button mushrooms: Functional and rheological properties. *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 7(1), 87. <https://doi.org/10.3958/2277-0390.2017.00006.3>
- Dapović, T., Prjic, M., Hadzovic, M., & Torbic, A. (2011). The role of empirical rheology in flour quality control. *Wide spectra of quality control*, July. <https://doi.org/10.3773/24118>
- Do Noni, I., & Pagani, M. A. (2010). Cooking properties and heat damage of dried pasta is influenced by raw material characteristics and processing conditions. *Critical*

- Review in Food Science and Nutrition, 50(5), 465–472. <https://doi.org/10.1080/104020909032477134>
- Dubois, M., Dubois, A., & Lamy, B. (2008). The ultraviolet–visible spectrophotometer. *European Commission (2006). Commission Regulation (EC) No 118/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union*, 20(1), 9–24.
- Fratini, A., Iramo, M., Parfili, G., & Acquascente, R. (2005). Estimation of color of durum wheat. Comparison of WSB, HPLC, and reflectance colorimeter measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2373–2378. <https://doi.org/10.1021/jf040353a>
- Gálvez Infante, J. A., Bocha-Guzmán, R. E., González Laredo, R. F., Ochoa-Martínez, L. A., Corzo, R., Bello Pérez, L. A., Medina-Torres, L., & Pesalta Álvarez, L. E. (2010). Quality of spaghetti pasta containing Mexican common bean flour (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 119(4), 1544–1549. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.040>
- Gianzone, V., Giannotti, M., Spina, A., Todaro, A., Pecorino, B., Summo, C., Caponio, F., Paradiso, V. M., & Pasqualone, A. (2018). Physico-chemical properties and sensory profile of durum wheat Dittaino PDO (Protected Designation of Origin) bread and quality of re-milled semolina used for its production. May 2017 *Food Chemistry*, 241, 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.096>
- International Organization of Standardization (ISO). (a.d.). Cereals and cereal products - determination of moisture content - reference method (ISO 712:2009); Cereals, pulses and by-products - determination of ash yield by incineration (ISO 2171:2007); Cereals, cereal-based products and animal feeding stuffs - De.
- Jodal, A. S. S., & Larsen, K. L. (2021). Investigation of the relationships between the alveograph parameters. *Scientific Reports*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04059-3>
- Lislerka, K., Wójtowicz, A., Dziłki, D., & Gawlik-Dziłki, U. (2019). The influence of *Gstus incanus* L. leaves on wheat pasta quality. *Journal of Food Science & Technology*, 50(9), 4311–4322. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03900-9>
- Lu, X., Brennan, M. A., Serventi, L., Liu, J., Guo, W., & Brennan, C. S. (2018). Addition of mushroom powder to pasta enhances the antioxidant content and modulates the predictive glycemic response of pasta. *Food Chemistry*, 264. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.130>
- Lu, X., Brennan, M. A., Serventi, L., Mason, S., & Brennan, C. S. (2016). How the inclusion of mushroom powder can affect the physicochemical characteristics of pasta. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 2433–2439. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13306>
- Martins, C. A., & Cervantes, C. (2014). Metal determination in rice, wheat, and wheat flour using diluted nitric acid, high efficiency modifier, and axially viewed ICP OES. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-0044-z>, 2012.
- Michalak-Majewska, M., Teterycz, D., Masyński, S., Farbiś, W., & Sykut-Domańska, E. (2020). Influence of onion skin powder on nutritional and quality attributes of wheat pasta. *Food One*, 15(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227942>
- Mike, S. (2008). Role of durum wheat composition on the quality of pasta and bread. *Food*, 2(2), 75–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-8329.1986.tb03427.x>
- Misurovičová, I., Lauková, M., Kojáková, Z., Kurovičová, J., Dolníčková, D., & Kurbíková, V. (2016). Qualitative properties of pasta enriched with edible root and sugar beet by-products. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(1). <https://doi.org/10.17221/242/2017/CJFS>
- Mis, A. (2009). Some methodological aspects of determining wet gluten quality by the glutamic method. *Agrobiologia*, 14, 263–267.
- Muresan, C. C., Farooq, A., Man, S., & Sühanschi, R. (2017). Obtaining a functional product through the exploitation of mushroom flour in pasta. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 74(1), 17. <https://doi.org/10.15835/bst-2017-12641>
- Nie, Y., Zhang, P., Dong, C., Xu, L., Yu, M., Yang, W., Zhao, R., & Li, B. (2019). Effects of *Pleurotus eryngii* (mushroom) powder and soluble polysaccharide addition on the rheological and microstructural properties of dough. *Food Science and Nutrition*, 7(9), 2113–2122. <https://doi.org/10.1002/fsn2.1054>
- Oikarinen, H. A., Bakalis, S., Rahaman, M. S., & Krokida, M. K. (2015). Gluten index for wheat products: Main variables in affecting the value and nonlinear regression model. *International Journal of Food Properties*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.772198>
- Papari, M. A., Lucisano, M., & Mariotti, M. (2007). Traditional Italian products from wheat and other starchy flours. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of food product manufacturing* (pp. 322–388).
- Parvin, R., Farzana, T., Mohajan, S., Rahman, H., & Rahman, S. S. (2020). Quality improvement of noodles with mushroom fortified and its comparison with local branded noodles. *NFS Journal*, 20(May), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.07.002>
- Rekha, M. N., Chanthan, A. S., Prabhakar, P., Ramesh, R. S., & Venkateswara Rao, G. (2013). Influence of vegetable purées on quality attributes of pastamade from bread wheat (*Taestivum*). *CyTA - Journal of Food*, 11(2), 142–149. <https://doi.org/10.1080/19476337.2012.708881>
- Rea, L., Peres, C., & Hemar, Y. (2012). Antitumor activity of mushroom polysaccharides: A review. *Food and Function*, 3(11), 1118–1130. <https://doi.org/10.1039/c2fo19279j>
- Serzyk, L., Świeca, M., Gawlik-Dziłki, U., Luty, M., & Cysk, J. (2016). Effect of fortification with perley (*Pterocarpium crispum* Mill.) leaves on the nutraceutical and nutritional quality of wheat pasta. *Food Chemistry*, 190, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.110>
- Shreenitha, C. R., & Prabhakar, P. (2013). Effect of different shapes on the quality, microstructure, sensory and nutritional characteristics of yellow pea flour incorporated pasta. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 7(4). <https://doi.org/10.1007/s11694-013-9152-5>
- Sissons, M. (2016). GlutoPeak: A breeding tool for screening dough properties of durum wheat semolina. *Cereal Chemistry*, 93(6), 550–556. <https://doi.org/10.1094/CCTHEM-03.16-0063-P>
- Vinci, P., Pola, S., Pavesio, E., Roggio, T., & Cazzolada, P. (2013). A study on relationships between durum wheat semolina properties, technological mixing parameters and the properties of dough after mixing. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(12), 2541–2550. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12247>
- Wang, K., & Fu, K. X. (2020). Inter-relationships between test weight, thousand kernel weight, kernel size distribution and their effects on durum wheat milling, semolina composition and pasta processing quality. *Food*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/food9090308>
- Williams, P. C. (1973). The use of titanium dioxide as a catalyst for large scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24(3), 343–348. <https://doi.org/10.1002/jofa.2746280311>
- Yoshimoto, K., Ash, H. T. Van, Yamamoto, A., & Kuriyama, C. (2016). Simple analysis of total mercury and methylmercury in seafood using heating vaporization atomic absorption spectrometry. *Food*, 4(4), 489–500.
- Zarzycki, P., Sykut-Domańska, E., Sobota, A., Teterycz, D., Krawczyńska, A., Blicharz-Kania, A., Andriejko, D., & Zdybel, B. (2020). Flaxseed enriched pasta—chemical composition and cooking quality. *Food*, 9(4), 1–10. <https://doi.org/10.3390/food9040404>

PAPER

Cite this: *Food Funct.*, 2022, **13**, 8425

The effect of the addition of various species of mushrooms on the physicochemical and sensory properties of semolina pasta

Magdalena Szydtowska-Tutaj,^{a,b} Urszula Złotek,^{a,b} Agnieszka Wójtowicz^c and Maciej Combrzyński^{b,c}

Interest in foods enriched with natural ingredients containing bioactive compounds prompts scientists to undertake research to investigate them. This work aimed to evaluate the chemical composition, physical properties, texture, and sensory properties of semolina pasta enriched with 2.5–10% dried mushroom powder (Lion's Mane (L), Maitake (M), Reishi (R), and Enoki (E)). Supplementation with dried mushrooms increased the nutritional value of all the enriched pasta variants, mainly by increasing the content of ash, protein, and dietary fiber. Fortification with Lion's Mane (10%), Reishi (7.5% and 10%), and Enoki (10%) increased the cooking loss of the pasta. A decrease in *L** (lightness) and *b** (yellowness) was observed in the enriched pasta, with the exception of the cooked E and L samples. Hardness was increased in the Enoki-supplemented cooked pasta. Only the pasta with 7.5% and 10% Lion's Mane and Reishi mushrooms did not have acceptable sensory attributes. Based on the research, the recommended level of supplementation is 5% for Lion's Mane and Reishi, 7.5% for Enoki, and 10% for Maitake mushrooms.

Received 29th March 2022

Accepted 13th July 2022

DOI: 10.1039/d2fo00856d

rsc.li/food-function

Introduction

Food manufacturers are currently producing many varieties of dried pasta. Pasta products of numerous shapes, sizes, and thicknesses are commercially available. Moreover, in recent years pasta has been made from ingredients other than wheat flour, e.g. lentils, corn, peas, or rice.¹ Nevertheless, the main ingredients of pasta, which have not changed over the centuries, are wheat flour, i.e. durum wheat semolina flour, common wheat flour, or their various combinations and proportions, and water. Other, optional ingredients may be added as well.²

Semolina pasta has a pleasant taste and good cooking quality, e.g. a firm texture, low stickiness, and low cooking loss. These properties are linked to the characteristics of gluten proteins, which preferentially bind water and build a network that binds starch grains into a matrix.² These properties are influenced by characteristics such as the amount of gluten and its quality, determined by the gluten index. Owing to the simple composition of pasta, obtained after mixing

semolina and water, pressing the dough, and drying it, it can easily be enriched with various natural ingredients. Replacement of semolina with other ingredients is a challenge for pasta companies. Dilution of the basic raw material, i.e. semolina, with another raw material that does not contain gluten proteins may cause problems in the technological process and adversely affect quality.³ The addition of ingredients without gluten proteins to semolina changes the quality of the protein, because gluten is responsible for dough properties such as water absorption capacity, cohesiveness, viscosity, and elasticity. The addition of other raw materials to wheat flour usually reduces gluten strength. Moreover, the addition of high-fiber material disturbs the continuous gluten matrix. Altered proportions of protein and fiber may affect other interactions between starch, proteins, and fiber, as well as their hydration levels, which in turn can affect the strength of the gluten network.^{2,4,5}

Many publications describe attempts to enrich pasta with various additives, e.g. vegetables, fruit, spices, herbs, mushrooms, or special ingredients such as cereal coffee.^{1,4,6} Due to growing consumer awareness of the composition of food and healthy diets, scientific research is focusing on investigating foods with high nutritional potential as well as increased content of biologically active compounds. The growing interest in the consumption of mushrooms, which have documented health-promoting properties as well as pharmacological and medicinal value, has prompted research on the addition of

^aDepartment of Biochemistry and Food Chemistry, University of Life Sciences in Lublin, Skromna Str. 8, 20-704 Lublin, Poland. E-mail: urszula.zlotek@up.lublin.pl; Fax: +48 81 4623324; Tel: +48 81 4623328

^bPZZ Lubello GMW Sp. z o.o., Lublin, Wroclawska Str. 1, 20-469 Lublin, Poland

^cDepartment of Thermal Technology and Food Process Engineering, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka Str. 31, 20-612 Lublin, Poland

dried mushrooms to various foods, including pasta.⁷ In the present study, dried mushrooms *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Flammulina velutipes* (Enoki), *Hericium erinaceus* (Lion's Mane), and *Grifola frondosa* (Maitake), which are popular in Asian countries, were selected for pasta fortification owing to their health properties. The biological activities of these mushrooms are linked to their large number of bioactive components (mainly polysaccharides, i.e. β -glucans, as well as phenolic compounds and chitosan) exerting anti-cancer, immunomodulatory, hypolipidemic, antioxidant, neuroprotective, anti-microbial, anti-diabetic, and other effects.⁸

The addition of ingredients with documented health-promoting properties will undoubtedly have a positive effect on the nutraceutical potential of pasta, but the addition of mushrooms (which do not contain gluten proteins) to durum wheat flour may negatively affect the physicochemical properties and sensory quality of pasta. Therefore, the first step should be to determine the amount of mushrooms that can be added to semolina pasta without significantly compromising these parameters.

The aim of this work was to evaluate the chemical composition, physical properties, texture, and sensory properties of semolina pasta enriched with various varieties and amounts of dried mushrooms. The ultimate aim of the study was to find a procedure for formulating a new food product (pasta) with improved nutritional and biodynamic value as well as satisfactory culinary and organoleptic properties.

Results

Chemical composition of control pasta and mushroom-enriched pasta

The proximate composition of pasta made from semolina and mushroom-enriched semolina is shown in Table 1. The moisture content was similar to the normal value, in all cases, i.e. 12.5% for dry pasta, except for R10, for which the value was 12.71%.⁹ The content of minerals (ash) in each fortified pasta sample was statistically significantly higher than the control value of 0.96%. In addition, in each of the enriched pasta samples, the ash content increased with the amount of dried mushrooms added, reaching a maximum value of 1.54% in the R10 sample. Protein content also increased with the amount of dried mushrooms, reaching the highest value of 17.60% in the R10 sample. The fat content was similar in all samples, i.e. approximately 1% (Table 1).

The content of carbohydrates in the pasta decreased as the addition of dried mushrooms increased, reaching the lowest value of 67.04% in the R10 sample. The energy value of the pasta before cooking was similar to the control value and ranged from 348.63 kcal per 100 g in R10 to 356.41 kcal per 100 g in the control sample. The total dietary fiber (TDF) content in the 100% semolina pasta sample was 8.56%. The addition of the Reishi and Enoki mushrooms (all amounts) increased the fiber content in the pasta. In the case of the

Table 1. Chemical composition and energy of raw pasta with the addition of dried mushrooms

Samples	Moisture (%)	Ash (% d.m.)	Protein (% d.m.)	Fat (% d.m.)	IDF (% d.m.)	SDF (% d.m.)	TDF (% d.m.)	Carbohydrates (% d.m.)	Energy ^a (kcal per 100 g)
C	11.21 ± 0.02 ^{cd}	0.96 ± 0.01 ^a	14.30 ± 0.05 ^a	1.01 ± 0.01 ^{de}	4.37 ± 0.13 ^{ab}	3.83 ± 0.22 ^{de}	8.56 ± 0.35 ^{de}	72.52 ± 0.07 ^b	356.41 ± 0.10 ^b
R2.5	11.52 ± 0.03 ^f	1.08 ± 0.01 ^a	14.30 ± 0.05 ^a	1.01 ± 0.01 ^{abc}	5.02 ± 0.11 ^b	4.61 ± 0.16 ^{cd}	9.63 ± 0.03 ^{cd}	72.08 ± 0.09 ^f	354.65 ± 0.09 ^f
R5	11.32 ± 0.02 ^e	1.23 ± 0.01 ^b	16.22 ± 0.22 ^b	1.02 ± 0.01 ^{bc}	6.86 ± 0.24 ^{cd}	3.95 ± 0.14 ^{abcd}	10.82 ± 0.39 ^{de}	70.20 ± 0.22 ^e	354.89 ± 0.12 ^f
R7.5	11.07 ± 0.03 ^e	1.43 ± 0.01 ^b	16.98 ± 0.05 ^a	1.06 ± 0.01 ^d	6.93 ± 0.24 ^{cd}	5.73 ± 0.26 ^b	12.66 ± 0.30 ^{de}	69.06 ± 0.04 ^e	353.72 ± 0.16 ^f
R10	12.71 ± 0.01 ^f	1.54 ± 0.01 ^b	17.60 ± 0.23 ^b	1.12 ± 0.01 ^e	7.58 ± 0.24 ^{cd}	4.81 ± 0.28 ^{bc}	12.39 ± 0.04 ^f	67.04 ± 0.28 ^e	348.63 ± 0.02 ^g
M2.5	11.99 ± 0.07 ^b	1.01 ± 0.01 ^b	14.52 ± 0.05 ^{abc}	1.00 ± 0.02 ^{ab}	3.86 ± 0.13 ^c	3.67 ± 0.20 ^{ab}	7.53 ± 0.33 ^a	71.48 ± 0.12 ^{ga}	352.99 ± 0.11 ^{cd}
M5	11.93 ± 0.03 ^b	1.10 ± 0.01 ^b	14.64 ± 0.10 ^{bcde}	1.01 ± 0.01 ^{abc}	6.43 ± 0.21 ^{de}	3.62 ± 0.25 ^{ab}	10.04 ± 0.45 ^{cd}	71.32 ± 0.09 ^g	352.90 ± 0.18 ^{cd}
M7.5	12.12 ± 0.08 ^b	1.23 ± 0.01 ^b	14.77 ± 0.10 ^{cd}	1.01 ± 0.01 ^{abc}	5.53 ± 0.16 ^{bcd}	4.69 ± 0.25 ^{abc}	10.22 ± 0.42 ^{cd}	70.86 ± 0.02 ^{ga}	351.64 ± 0.36 ^b
M10	11.96 ± 0.02 ^b	1.33 ± 0.01 ^b	14.85 ± 0.09 ^{de}	1.12 ± 0.01 ^c	8.05 ± 0.01 ^b	5.99 ± 0.08 ^f	14.04 ± 0.09 ^{gh}	70.74 ± 0.09 ^f	352.44 ± 0.09 ^g
L2.5	11.22 ± 0.02 ^{cd}	1.05 ± 0.01 ^b	14.40 ± 0.10 ^{ab}	1.01 ± 0.01 ^{abc}	4.00 ± 0.16 ^c	4.00 ± 0.19 ^{abcd}	7.99 ± 0.33 ^{ab}	72.32 ± 0.10 ^{ga}	356.01 ± 0.08 ^{gh}
L5	11.20 ± 0.04 ^{cd}	1.18 ± 0.01 ^b	14.47 ± 0.05 ^{abc}	1.03 ± 0.02 ^{cd}	7.44 ± 0.28 ^{cd}	3.31 ± 0.18 ^f	10.75 ± 0.10 ^{de}	72.12 ± 0.06 ^f	355.67 ± 0.22 ^g
L7.5	11.10 ± 0.01 ^{cd}	1.26 ± 0.01 ^b	14.58 ± 0.08 ^{abcd}	1.03 ± 0.02 ^{cd}	6.98 ± 0.28 ^{cd}	4.40 ± 0.18 ^{bcde}	11.38 ± 0.47 ^{de}	72.02 ± 0.11 ^g	355.71 ± 0.02 ^g
L10	11.10 ± 0.01 ^{cd}	1.39 ± 0.01 ^b	14.73 ± 0.05 ^{de}	1.12 ± 0.02 ^c	10.96 ± 0.32 ^d	4.34 ± 0.07 ^{bcde}	15.19 ± 0.32 ^h	71.66 ± 0.07 ^h	355.67 ± 0.06 ^g
E2.5	11.45 ± 0.04 ^f	1.09 ± 0.01 ^b	14.74 ± 0.08 ^{abcd}	0.98 ± 0.01 ^c	7.88 ± 0.34 ^{cd}	4.97 ± 0.30 ^{ef}	12.85 ± 0.64 ^g	71.73 ± 0.06 ^h	354.75 ± 0.17 ^f
E5	11.76 ± 0.03 ^f	1.23 ± 0.01 ^b	14.92 ± 0.05 ^a	1.00 ± 0.01 ^{abc}	6.13 ± 0.34 ^{cd}	4.36 ± 0.26 ^{bcde}	10.49 ± 0.08 ^{de}	71.09 ± 0.08 ^{de}	353.04 ± 0.10 ^{de}
E7.5	11.28 ± 0.01 ^{de}	1.36 ± 0.01 ^b	15.34 ± 0.10 ^f	1.01 ± 0.01 ^{abc}	5.19 ± 0.37 ^{bc}	4.33 ± 0.29 ^{bcde}	9.52 ± 0.68 ^{de}	71.01 ± 0.11 ^{de}	354.47 ± 0.05 ^f
E10	11.06 ± 0.04 ^d	1.50 ± 0.01 ^b	15.41 ± 0.10 ^f	1.01 ± 0.01 ^{abc}	6.37 ± 0.22 ^{de}	5.12 ± 0.27 ^{de}	11.49 ± 0.49 ^{de}	71.01 ± 0.11 ^{de}	354.80 ± 0.16 ^f

IDF – Insoluble dietary fiber, SDF – soluble dietary fiber, TDF – total dietary fiber, C – control (pasta from semolina flour), R2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Reishi mushroom powder, M2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Maitake mushroom powder, L2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Lion's Mane mushroom powder, E2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Enoki mushroom powder. Means with different superscripts within a column are significantly different at $p < 0.05$. ^a Values calculated using Atwaters' factors.

Maitake and Lion's Mane mushrooms, the content of TDF was increased in the variants with at least 5% dried mushrooms.

Cooking properties of control pasta and mushroom-enriched pasta

The cooking quality parameters of the mushroom-enriched pasta are presented in Table 2. The optimum cooking time (OCT) ranged from 4.50–4.54 in the R7.5 sample to 4.6 min in the C pasta, but the differences between samples were not statistically significant.

The cooking loss (CL) parameter, indicating solid substance leaching into the water from cooking, was highest in the mushroom-enriched E10 pasta (6.25% vs. 3.37% in the control). Moreover, cooking loss increased with the amount of dried mushrooms added (all species). CL in the R2.5 pasta was similar to that of the control sample (3.37%). The lowest CL value, 3.05%, was observed for M2.5. The cooking weight index ranged from 2.01 to 2.50, as shown in Table 2. The addition of dried Lion's Mane mushrooms yielded the lowest CWI values among all the mushrooms used in the study, ranging from 2.01 in the L7.5 sample to 2.06 in the L5 sample, which was an 18% decrease in comparison with the control (2.46). The highest CWI values were obtained for the Enoki mushroom-fortified pasta; the value in both the E2.5 and E10 samples was 2.50, which was slightly higher than the CWI in the control C (a 1.6% increase).

Hydration properties of pasta

The values of the hydration parameters of the pasta are presented in Table 2.

WAI was not significantly affected by the addition of any of the mushrooms tested, in comparison with the control sample. The addition of different mushrooms exerted varied

effects. Increasing the addition of Reishi and Maitake mushrooms caused a slight decrease in the WAI value relative to the control pasta. The reverse relationship was observed in the case of increasing supplementation with Lion's Mane and Enoki mushrooms. The WSI ranged from 3.37% in the control to 9.22% in R10, which was a 60% increase in comparison to the control. Moreover, the WSI parameter was shown to increase with the concentration of all the dried mushrooms.

Color determination of control pasta and mushroom-enriched pasta

The results of the color evaluation of dry and cooked pasta fortified with dried mushrooms are shown in Table 3. In the case of dry pasta, the b^* value for the control was 24.43. The most similar value in the mushroom-enriched pasta, i.e. 23.54, was found in sample L2.5. The lowest value was obtained in the pasta sample fortified with 10% dried Reishi mushrooms, where the b^* value was only 3.76. The greatest difference in the L^* parameter, indicating the lightness of the pasta, was also noted in the Reishi-fortified pasta. Compared to the control, the L^* value decreased by 31.59–42.48% in the R2.5–R10 samples. Fig. 1 presents a visualization of the color of the pasta variants. In general, the color of the Enoki and Lion's Mane mushroom-enriched pasta was the most similar to the control, while the addition of Reishi resulted in the greatest changes in the pasta color (Table 3 and Fig. 1). In the cooked pasta, the highest value of the L^* coordinate, 70.76, was noted in the control sample with 100% semolina. As in the raw pasta, the L^* value decreased in all samples supplemented with dried mushrooms. The lowest L^* value was noted in the cooked pasta with 10% dried Reishi. There was also a significant increase in the a^* parameter relative to the control sample, with the lowest value of 0.06. The highest a^* value was

Table 2 Cooking properties of pasta with the addition of dried mushrooms

Samples	WAI g/g	WSI %	CWI (-)	CL (% d.w.)	OCT (min)
C	1.77 ± 0.02 ^{ab}	3.37 ± 0.93 ^a	2.46 ± 0.03 ^{ef}	3.37 ± 0.03 ^{abc}	4.60 ± 0.01 ^c
R2.5	1.75 ± 0.06 ^{ab}	6.86 ± 0.49 ^{cd}	2.35 ± 0.01 ^{def}	3.34 ± 0.23 ^{abc}	4.51 ± 0.01 ^a
R5	1.71 ± 0.01 ^{ab}	7.46 ± 0.34 ^{cd}	2.42 ± 0.04 ^{ef}	3.74 ± 0.06 ^{abcde}	4.51 ± 0.01 ^a
R7.5	1.73 ± 0.06 ^{ab}	8.36 ± 0.22 ^{bc}	2.48 ± 0.05 ^{ef}	3.94 ± 0.01 ^{abdef}	4.54 ± 0.01 ^b
R10	1.68 ± 0.03 ^a	9.22 ± 0.29 ^a	2.19 ± 0.03 ^{abc}	4.33 ± 0.05 ^{efg}	4.51 ± 0.01 ^a
M2.5	1.82 ± 0.09 ^b	6.37 ± 0.21 ^{bc}	2.19 ± 0.01 ^{abc}	3.05 ± 0.17 ^{abcd}	4.51 ± 0.01 ^a
M5	1.78 ± 0.01 ^b	6.85 ± 0.29 ^{cd}	2.31 ± 0.13 ^{abc}	3.49 ± 0.10 ^{abcd}	4.50 ± 0.01 ^a
M7.5	1.77 ± 0.01 ^{ab}	7.95 ± 0.31 ^{abc}	2.22 ± 0.01 ^{bcd}	3.54 ± 0.01 ^{abcd}	4.51 ± 0.01 ^a
M10	1.79 ± 0.01 ^{ab}	8.27 ± 0.24 ^{bc}	2.15 ± 0.05 ^{abc}	3.95 ± 0.06 ^{abdef}	4.51 ± 0.01 ^a
L2.5	1.72 ± 0.01 ^{ab}	6.55 ± 0.50 ^{bc}	2.02 ± 0.01 ^a	3.17 ± 0.15 ^{ab}	4.51 ± 0.01 ^a
L5	1.74 ± 0.02 ^{ab}	7.22 ± 0.09 ^{cd}	2.06 ± 0.04 ^{ab}	3.62 ± 0.01 ^{abcde}	4.51 ± 0.01 ^a
L7.5	1.77 ± 0.02 ^{ab}	7.95 ± 0.37 ^{abc}	2.01 ± 0.02 ^a	3.73 ± 0.04 ^{abcde}	4.51 ± 0.01 ^a
L10	1.76 ± 0.02 ^{ab}	8.32 ± 0.07 ^{bc}	2.05 ± 0.02 ^{ab}	4.13 ± 0.40 ^{defg}	4.50 ± 0.01 ^a
E2.5	1.73 ± 0.04 ^{ab}	5.19 ± 1.32 ^b	2.50 ± 0.01 ^f	3.63 ± 0.08 ^{abcde}	4.51 ± 0.01 ^a
E5	1.78 ± 0.05 ^{ab}	6.80 ± 0.46 ^{cd}	2.43 ± 0.07 ^{ef}	4.48 ± 0.02 ^{fg}	4.51 ± 0.01 ^a
E7.5	1.73 ± 0.06 ^{ab}	7.89 ± 0.72 ^{abc}	2.41 ± 0.02 ^{def}	4.85 ± 0.03 ^g	4.50 ± 0.01 ^a
E10	1.77 ± 0.01 ^{ab}	8.23 ± 0.42 ^{bc}	2.50 ± 0.02 ^{ef}	6.25 ± 0.31 ^h	4.51 ± 0.01 ^a

WAI (water absorption index), WSI (water solubility index), CWI (cooking weight index), CL (cooking loss), OCT (optimal cooking time), C - control (pasta from semolina flour); R2.5–10 - pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Reishi mushroom powder; M2.5–10 - pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Maitake mushroom powder, L2.5–10 - pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Lion's Mane mushroom powder, E2.5–10 - pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Enoki mushroom powder. Means with different superscripts within a column are significantly different at $p \leq 0.05$.

Table 3 Color parameters of pasta with the addition of dried mushrooms

Samples	Dry pasta			Cooked pasta		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
C	79.86 ± 0.12 ^g	0.53 ± 0.01 ^g	24.43 ± 0.29 ^g	70.76 ± 0.01 ^g	0.06 ± 0.01 ^g	17.80 ± 0.05 ^g
R2.5	54.63 ± 0.17 ^{cd}	5.22 ± 0.01 ^{kl}	10.32 ± 0.06 ^{kl}	45.46 ± 0.01 ^d	4.52 ± 0.02 ^l	7.17 ± 0.03 ^{cd}
R5	50.36 ± 0.13 ^c	4.60 ± 0.02 ^j	7.40 ± 0.06 ^e	42.39 ± 0.02 ^c	4.07 ± 0.01 ^j	5.09 ± 0.02 ^c
R7.5	48.42 ± 0.07 ^b	3.98 ± 0.04 ^d	5.89 ± 0.04 ^b	39.93 ± 0.25 ^b	3.19 ± 0.02 ^c	3.57 ± 0.01 ^b
R10	45.93 ± 0.10 ^a	2.97 ± 0.04 ^b	3.76 ± 0.04 ^a	39.02 ± 0.13 ^a	3.00 ± 0.03 ^a	3.17 ± 0.04 ^a
M2.5	67.47 ± 0.45 ⁱ	4.43 ± 0.03 ^f	17.55 ± 0.04 ^h	58.79 ± 0.04 ^b	2.71 ± 0.02 ^c	14.22 ± 0.01 ^b
M5	61.64 ± 0.06 ^g	5.30 ± 0.02 ⁱ	15.01 ± 0.03 ^e	53.48 ± 0.04 ^g	3.51 ± 0.01 ^g	11.28 ± 0.01 ^g
M7.5	59.09 ± 0.17 ^f	5.64 ± 0.03 ^j	13.74 ± 0.04 ^f	49.47 ± 0.02 ^f	3.86 ± 0.02 ^h	10.32 ± 0.01 ^f
M10	57.09 ± 0.22 ^e	5.63 ± 0.02 ^j	12.38 ± 0.07 ^e	46.47 ± 0.02 ^e	3.96 ± 0.01 ⁱ	8.60 ± 0.01 ^e
L2.5	74.50 ± 0.17 ^m	3.57 ± 0.04 ^e	23.54 ± 0.08 ^m	66.47 ± 0.02 ^m	2.67 ± 0.01 ^c	20.27 ± 0.01 ^m
L5	71.79 ± 0.69 ^j	4.94 ± 0.03 ^f	22.84 ± 0.05 ^l	62.57 ± 0.03 ^{kl}	4.28 ± 0.02 ^k	19.82 ± 0.01 ^m
L7.5	68.89 ± 0.10 ^j	6.00 ± 0.05 ^h	22.02 ± 0.02 ^j	59.96 ± 0.06 ^j	5.62 ± 0.02 ^h	19.20 ± 0.01 ^k
L10	66.69 ± 0.10 ^h	6.72 ± 0.02 ⁱ	20.78 ± 0.01 ⁱ	58.80 ± 0.04 ^h	5.56 ± 0.02 ^{gh}	18.41 ± 0.01 ^j
E2.5	74.69 ± 0.03 ^m	3.92 ± 0.02 ^d	23.18 ± 0.02 ^m	65.02 ± 0.04 ^k	2.34 ± 0.01 ^b	19.16 ± 0.02 ^k
E5	72.55 ± 0.21 ⁱ	5.19 ± 0.04 ^h	22.22 ± 0.02 ⁱ	63.77 ± 0.04 ⁱ	3.29 ± 0.02 ^e	19.27 ± 0.01 ^j
E7.5	69.47 ± 0.18 ^k	6.47 ± 0.05 ⁱ	21.64 ± 0.02 ^h	60.28 ± 0.05 ^j	4.86 ± 0.01 ⁱ	20.45 ± 0.03 ^o
E10	67.60 ± 0.08 ⁱ	7.00 ± 0.02 ^{kl}	20.35 ± 0.01 ⁱ	59.80 ± 0.05 ^j	4.89 ± 0.02 ⁱ	19.59 ± 0.01 ⁱ

C – control (pasta from semolina flour); R2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Reishi mushroom powder; M2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Maitake mushroom powder, L2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Lion's Mane mushroom powder, E2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Enoki mushroom powder. Means with different superscripts within a column are significantly different at $p \leq 0.05$.



Fig. 1 Pasta after cooking (photo by M. Szydlowska-Tutaj). C – control (pasta from semolina flour); R2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Reishi mushroom powder; M2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Maitake mushroom powder, L2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Lion's Mane mushroom powder, E2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Enoki mushroom powder.

obtained for the cooked pasta with 7.5% Lion's Mane. Compared to the control sample, the a^* parameter increased in both the raw and cooked pasta samples (Table 3). The b^* value in the cooked pasta was significantly increased by the addition of Lion's Mane and Enoki mushrooms, but decreased by supplementation with Reishi and Maitake, compared to the control pasta (Table 3).

Evaluation of the texture of control pasta and mushroom-enriched pasta

Table 4 shows that the texture of the dry pasta was positively influenced by almost all varieties and amounts of mushrooms.

Higher resistance to breaking and deformation was observed in most of the mushroom-supplemented pasta samples, which indicates greater stiffness, lower brittleness, and greater damage resistance. The highest breaking strength (24.30 MPa), highest maximum breaking force (2.810 N) needed to break the sample, and highest breaking deformation value were obtained in the pasta prepared with 10% Lion's Mane. The hardness of the cooked pasta ranged from 97.10 N in the sample with the 5% addition of Reishi mushrooms to 237 N in the M5 sample, while the hardness of the control sample was 221 N. Generally, fortification with the mushrooms reduced the hardness of the cooked pasta, except for the M5 and E10 samples (Table 4). The highest stickiness result, *i.e.* 4.69 mJ, was recorded for the L5 sample, and the lowest value (0.18 mJ) for the R5 sample. The highest value of the elasticity parameter (0.91) was observed in the L5 sample, and the lowest (0.52) in the R10 sample (a lower value indicates more elastic pasta). It should also be noted that only the elasticity of the L5 sample was lower than that of the control sample (Table 4).

Sensory evaluation of control pasta and mushroom-enriched pasta

Pasta samples for analysis were successfully produced from all mixtures of semolina and mushrooms, which were evaluated in previous research.⁵

In the sensory evaluation of the dry pasta (Fig. 2a), the highest overall score (smell, color, and appearance) was obtained for the control sample. It should be noted that all the raw pasta samples with the addition of various mushrooms were assessed favorably. The organoleptic evaluation of the cooked pasta took into account its taste, smell, consistency, color, and appearance. The highest acceptability was obtained

Table 4 Texture analysis of pasta with the addition of dried mushrooms

Samples	Dry pasta			Cooked pasta		
	Breaking force (N)	Breaking strength (MPa)	Breaking deformation (%)	Hardness (N)	Stickiness (mJ)	Elasticity (–)
C	0.63 ± 0.07 ^a	5.73 ± 0.63 ^{cd}	0.20 ± 0.01 ^a	221.50 ± 0.71 ^j	0.76 ± 0.01 ^{cd}	0.75 ± 0.01 ^f
R2.5	0.61 ± 0.10 ^a	4.86 ± 0.73 ^b	0.22 ± 0.1 ^{ab}	206.50 ± 0.71 ^{gh}	0.88 ± 0.01 ^f	0.71 ± 0.01 ^{de}
R5	0.64 ± 0.11 ^a	7.88 ± 1.29 ^{abc}	0.26 ± 0.1 ^{ab}	97.10 ± 0.71 ^a	0.18 ± 0.01 ^b	0.67 ± 0.02 ^{cd}
R7.5	0.62 ± 0.08 ^a	7.56 ± 0.95 ^{abc}	0.20 ± 0.01 ^a	202.00 ± 1.41 ^{gh}	0.67 ± 0.02 ^{de}	0.56 ± 0.01 ^{ab}
R10	1.55 ± 0.35 ^{cd}	8.57 ± 1.93 ^{abc}	0.94 ± 0.2 ^d	140.50 ± 0.71 ^c	0.76 ± 0.01 ^{cd}	0.52 ± 0.01 ^b
M2.5	1.13 ± 0.34 ^{abc}	9.86 ± 2.92 ^{bc}	0.40 ± 0.2 ^{abc}	122.00 ± 2.83 ^b	0.67 ± 0.03 ^{de}	0.61 ± 0.03 ^{bc}
M5	1.60 ± 0.32 ^{de}	13.90 ± 2.76 ^{cd}	0.47 ± 0.1 ^{bc}	237.00 ± 2.83 ⁱ	0.52 ± 0.01 ^{cd}	0.63 ± 0.01 ^c
M7.5	1.64 ± 0.40 ^{de}	9.98 ± 3.42 ^{bc}	0.50 ± 0.1 ^{cd}	210.00 ± 1.41 ^{hi}	0.37 ± 0.01 ^{abc}	0.61 ± 0.01 ^{bc}
M10	1.33 ± 0.19 ^{bcd}	11.40 ± 2.98 ^{cd}	0.39 ± 0.2 ^{abc}	157.50 ± 0.71 ^d	0.41 ± 0.01 ^{bc}	0.64 ± 0.02 ^c
L2.5	1.85 ± 0.38 ^e	13.30 ± 2.73 ^{cd}	0.62 ± 0.2 ^{bc}	154.00 ± 1.41 ^d	0.40 ± 0.01 ^{bc}	0.64 ± 0.01 ^c
L5	2.71 ± 0.76 ^f	18.60 ± 5.19 ^h	0.90 ± 0.2 ^{bc}	170.00 ± 1.41 ^e	4.69 ± 0.19 ^j	0.91 ± 0.01 ^f
L7.5	2.57 ± 0.39 ^f	17.80 ± 2.67 ^{gh}	0.57 ± 0.1 ^{cd}	210.50 ± 0.71 ^{hi}	0.22 ± 0.01 ^{ab}	0.65 ± 0.02 ^c
L10	2.81 ± 0.39 ^f	24.30 ± 3.35 ⁱ	0.72 ± 0.1 ^{cd}	211.50 ± 0.71 ^{hi}	1.43 ± 0.03 ^e	0.62 ± 0.01 ^{bc}
E2.5	0.79 ± 0.16 ^b	8.58 ± 1.73 ^{abc}	0.22 ± 0.1 ^a	214.00 ± 1.41 ⁱ	1.40 ± 0.01 ^{de}	0.75 ± 0.01 ^f
E5	0.98 ± 0.16 ^{ab}	10.80 ± 1.70 ^{cd}	0.39 ± 0.1 ^{abc}	199.00 ± 1.41 ^f	1.53 ± 0.03 ^e	0.72 ± 0.01 ^{de}
E7.5	0.93 ± 0.22 ^{ab}	6.16 ± 1.44 ^{ab}	0.41 ± 0.1 ^{abcd}	172.50 ± 0.71 ^c	1.92 ± 0.03 ^h	0.72 ± 0.01 ^{de}
E10	0.95 ± 0.05 ^{abc}	16.30 ± 0.89 ^{gh}	0.40 ± 0.01 ^{abcd}	230.00 ± 1.41 ^k	1.47 ± 0.01 ^{de}	0.57 ± 0.02 ^{ab}

C – control (pasta from semolina flour); R2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Reishi mushroom powder; M2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Maitake mushroom powder; L2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Lion's Mane mushroom powder; E2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Enoki mushroom powder. Means with different superscripts within a column are significantly different at $p \leq 0.05$.

for the pasta without the addition of mushrooms (control sample). Among the enriched pastas, the M10 sample had the highest scores for appearance, color, and taste. The results of the assessment of flavor after cooking, presented in Fig. 2b, show a significant deterioration of this parameter for pasta enriched with 7.5% and 10% Reishi and Lion's Mane. On a 5-point scale, the R7.5 and R10 samples (Reishi) scored 2.9 and 1.4, respectively, while the L7.5 and L10 samples (Lion's Mane) scored 2.7 and 1.2. These scores were due to the intense bitter taste indicated by the panel. The lowest scores for all sensory attributes were obtained for the cooked pasta with 10% Lion's Mane.

Discussion

Durum wheat flour is considered a valuable source of nutrients (mainly protein and carbohydrates) in the human diet, but researchers are still searching for ingredients that can be added to flour to enrich its nutritional value or even its culinary or health-promoting properties.

The addition of various raw materials to durum wheat pasta has been reported to change its cooking quality, nutritional value, and sensory attributes. Some materials may affect the health-promoting quality of pasta.⁴ Therefore, in this study, the addition of dried mushrooms with documented health-promoting properties was assessed with respect to the culinary, nutritional, and consumer quality of durum wheat pasta. Our previous research⁵ indicated that dough made from semolina fortified with 2.5–10% dried mushroom powder (Lion's Mane (L), Maitake (M), Reishi (R), and Enoki (E)) has great potential for use in making pasta.

The results of the nutritional composition analyses of the control and fortified pasta, summarized in Table 1, indicated that supplementation with dried mushrooms increased its ash, protein, and dietary fiber content. It should also be emphasized that increasing the amounts of added mushrooms generally caused an increase in the content of some nutritional compounds in pasta, e.g. protein, carbohydrates, and especially dietary fiber. This is probably linked to the composition of the added mushrooms, which are a rich source of protein and carbohydrates.⁵ Similar results were obtained by Parvin *et al.* (2020),¹⁰ Lu *et al.* (2016),²⁸ and Nordiana *et al.* (2019),³⁶ who studied mushroom supplementation of pasta. However, as shown in our previous research,⁵ an increase in the protein content resulting from the addition of mushrooms may adversely affect parameters of the culinary quality of pasta, due to the addition of non-gluten proteins. The studies conducted in the above-mentioned publications indicated that the process recovery, water absorption, and cooking loss of the noodles increased with the amount of mushroom powder added to wheat flour pasta. The authors suggest that these results were linked to the fact that the fiber-rich fractions added to the pasta negatively affected the integrity and tenacity of the protein–starch network, and hence pasta quality.

Pasta moisture is one of the most important parameters influencing the storage suitability of pasta. Water content in pasta above 12.5% may contribute to the growth of mold and to deterioration of the quality of the pasta, while insufficient moisture content, below 6%, may increase its brittleness.⁹ The moisture results obtained in the present study were within the required values for all pasta variants, except for R10, in which the moisture level was too high (Table 1). Our previous research⁵ indicated that mixtures of semolina with Reishi

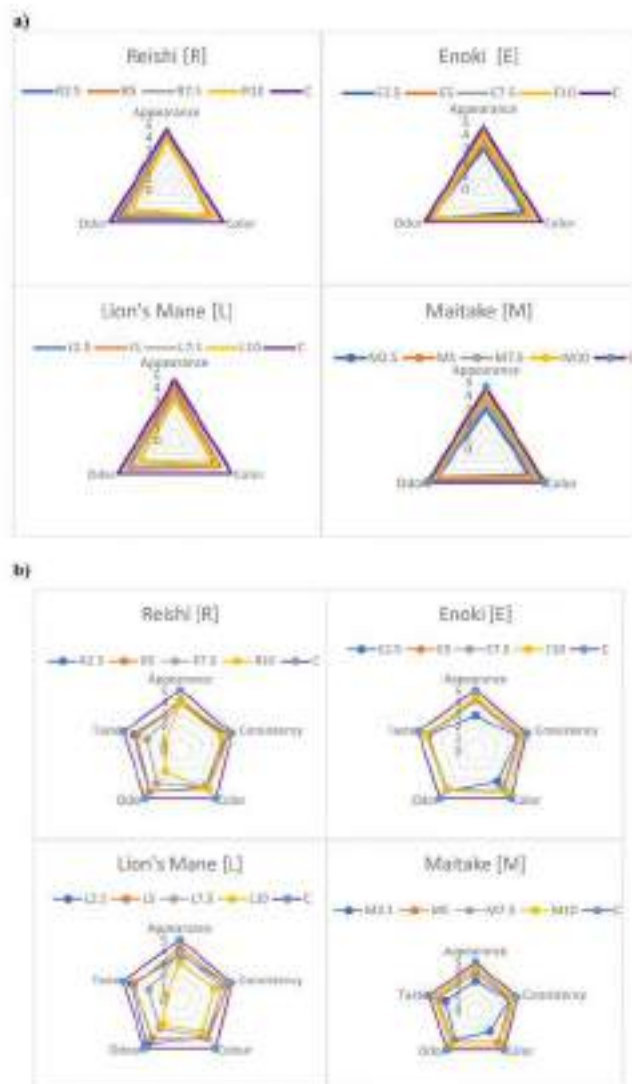


Fig. 2 Sensory evaluation of pasta: (a) dry pasta, (b) cooked pasta. C – control (pasta from semolina flour); R2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Reishi mushroom powder; M2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Maitake mushroom powder; L2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Lion's Mane mushroom powder; E2.5–10 – pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% Enoki mushroom powder.

mushrooms had reduced moisture in comparison to the control sample (semolina). Therefore, the result for R10 is difficult to explain. It is most likely explained by the fact that this pasta had the highest content of protein, which caused an increase in the moisture content due to protein–water interactions, described in the literature.¹²

Testing the resistance of pasta products to water is important for optimizing their production, transport, storage, and preparation for consumption. Absorption of water by pasta can be considered a positive feature, reducing cooking time and the time needed to achieve an appropriate consistency for consumption. This property can also be a disadvantage, especially when there is a need to protect the product against the action

of water or when the packaging material protecting the pasta against external humidity becomes unsealed.¹²

The content and quality of some components of pasta, *e.g.* protein or starch, may affect its cooking quality parameters, as the type of protein–starch interaction can influence the formation of the starch–protein matrix. Some studies indicate that the addition of fiber and non-gluten protein-rich components to flour may exert a significant negative effect on the integrity and tenacity of the protein–starch network, resulting in changes in the cooking quality of pasta.^{10,14} The addition of dried mushrooms had little influence on the optimum cooking time, shortening it only slightly in all cases (Table 2). Similarly, as demonstrated by Biernacka *et al.* (2017),¹⁵ and Parvin *et al.* (2020),¹⁰ the addition of carob fiber and mushroom powders to flour, respectively, reduced the optimal pasta cooking time. The opposite tendency was noted in a study by Krawęcka *et al.* (2021),¹⁴ in which noodles were fortified with high-fiber stinging nettle. In the present study, the CL of the pasta increased with the amount of added mushrooms. However, no increase in this parameter was observed in the samples with 2.5% Reishi, Maitake, or Lion's Mane, compared to the control. On the other hand, the highest CL was recorded in the Enoki-fortified pasta (3.63–6.25% d.w. in the E2.5–E10 samples; Table 2). The increase in CL was probably due to the interference of some components of the mushrooms (fiber) with the starch–gluten network, allowing greater amounts of gelatinized starch to leach from the pasta during cooking, which has suggested by other researchers as well.¹² It should also be noted that the CL of all samples was below 8% d.w., the level above which pasta quality is considered unacceptable.¹⁶

The WAI and WSI values obtained in the present study are similar to the results reported by other authors¹⁷ and even lower than for pasta cooked by the extrusion method^{18,19} or for other extruded products.²⁰

WAI was not significantly influenced by the addition of any of the mushrooms, compared to the control sample. The slight changes in this parameter depending on the amount of a given mushroom added to the flour were not statistically significant (Table 2). Similarly, in a study conducted by Lu *et al.* (2016),²¹ the WAI of pasta supplemented with white button mushroom and shiitake mushroom was not significantly different from the control, although there was a trend towards lower WAI in the mushroom-enriched samples compared with the control. The differences in WAI values between the various kinds of mushroom powders added to the pasta may be due to structural differences or to different particle sizes in the fibers.

The addition of each of the mushroom species caused a significant increase in WSI compared to the control sample. The WSI increased with the increase in the addition of each mushroom. The highest value (9.22%) was obtained in the pasta supplemented with 10% Reishi mushrooms, and the lowest in the control sample (3.37%). The values obtained in the fortified pasta are higher than those reported by other researchers analyzing extruded pasta.^{17–19} In the examples cited above, all the ingredients were better bound to the starch–protein

matrix, in which the starch was gelatinized by the extrusion method at a temperature above the starch gelatinization temperature. In the present study, the mushroom-supplemented pasta was processed at room temperature and dried at about 55°C, which ultimately led to its stable structure. The formation of a stable matrix based on hydrated gluten protein was disturbed by the introduction of the mushroom additives, whose higher content of fiber and non-gluten protein reduced the amount of gluten protein and carbohydrates, which are needed to form the structure of pasta. This can be seen in the WSI results in comparison with the semolina-only control pasta. Similar results were obtained in research using pasta fortified with white button mushrooms (Chauhan *et al.*, 2017).²²

For the consumer, the color of pasta is a very important feature, often determining the purchase of the product. Producers need to meet the criteria and expectations of Italians, who are the leading pasta consumers in Europe. According to these criteria, pasta should be amber-yellow without shades of gray or red.²³ The results presented in Table 3 show the impact of the addition of dried mushrooms on the color of pasta. In general, the value of the a^* parameter (redness) was significantly higher in all samples (dry and cooked pasta) supplemented with mushrooms than in the control sample, reaching a maximum a^* value in dry pasta E10 ($a^* = 7.00$) and cooked pasta L7.5 ($a^* = 5.62$). This was probably associated with the color of the added mushrooms. The highest lightness value was observed in the control sample ($L^* = 79.86$ and 70.76 for dry and cooked pasta, respectively). These results are in agreement with studies on pasta supplemented with oyster mushroom flour²⁴ and *Gistis incarnus* L. leaves.² Additionally, in our study, the dry pasta fortified with mushrooms was less yellow (b^*) than the control sample. A significant decrease in yellowness was observed in all raw fortified pasta samples, with the greatest decline noted in the R10 dry pasta ($b^* = 3.76$). The intensity of the yellow color of the cooked pasta was reduced by the addition of all concentrations of Reishi and Maitake mushrooms, with the highest decline noted in the R10 cooked pasta ($b^* = 3.17$). This may have been caused by the brownish-red hue of the added material, as the addition of the dark dried mushrooms probably masked the yellow color. Similarly, in a study conducted by Nordiana *et al.* (2019),²⁴ the addition of oyster mushrooms and white button mushrooms caused a decrease in the b^* parameter of pasta. In contrast, the Enoki- and Lion's Mane-fortified cooked pasta exhibited an increase in yellowness in comparison to the control (Table 3). This may be linked to the differences in the types of mushrooms used and may have an important positive impact on the consumer quality of pasta fortified with these mushrooms.

Determination of the texture of dry pasta should take into account its stiffness and thus its resistance to destruction and breakage. These features are important for both optimization of the production process (drying conditions and the method of packaging of the finished product) and the logistics of product transport from the manufacturer to the end customer.

Excessive brittleness of pasta may hinder the packaging process and result in a loss of sales and consumer value (the product is unstable during storage and too fragile for transport, with inferior functional properties, including altered appearance and shape).²⁵ It should also be noted that the flexural strength of the vast majority of the studied pasta variants increased with the amount of mushrooms included in the mixture (Table 4). These results were significantly lower than those reported for other food products, e.g. waffles²⁵ and extruded cereal snacks.²⁰

The higher breaking strength and lower brittleness of the analyzed samples probably resulted from the properties of the fungal additives, which have high content of dietary fiber, e.g. insoluble fibers, which directly strengthen/stiffen the texture of the finished product, compared to the control pasta based on semolina alone.

The texture characteristics of cooked pasta are very important due to their impact on consumer acceptance. As reported by Lu *et al.* (2016),²¹ the textural parameters of cooked pasta enriched with mushrooms are affected by the composition of the mushroom powder (type and amount). In the present study, the addition of mushrooms decreased the hardness of the cooked pasta (except the M5 and E10 samples) and increased its elasticity (except L5) – Table 4. As suggested by other researchers, these textural parameters of cooked pasta are affected by the composition of mushroom powder added to semolina as well as the types of fiber, proteins, lipids, or gums in the mushrooms and even their molecular weight. High fiber content in pasta may result in greater hardness after cooking. This may be due to competition for water molecules between starch, proteins, and fiber and the hydration levels of the constituents, which in turn can affect the strength of the gluten network.^{23,22} In a study by Chauhan *et al.* (2017),²² supplementation of semolina with white button mushrooms resulted in a decrease in hardness. Similarly, in studies by Chauhan *et al.* (2017)²² and Nordiana *et al.* (2019),²⁴ pasta fortification with 5%, 10%, and 15% oyster mushrooms resulted in a 4–11% decrease in pasta hardness and a 50–76% increase in pasta elasticity. In their study, substitution with mushrooms also reduced the stickiness of pasta by 12–30%. The value of this parameter in our study was dependent on the kind of mushrooms added: it decreased in the E2.5–E10, L5, and R2.5 samples and increased in the other mushroom-supplemented samples (Table 4).

The sensory evaluation indicated that the 2.5–10% addition of dried mushrooms did not cause a significant deterioration in the appearance, color, or smell of the pasta before cooking (Fig. 2a) or in the appearance, color, smell, consistency, or taste of cooked pasta fortified with Enoki and Maitake (Fig. 2b). However, in the case of the other two species of mushrooms added to the pasta (Reishi and Lion's Mane), the taste of the cooked pasta with 7.5% and 10% supplementation deteriorated significantly in comparison to the control sample (Fig. 2b). These samples of cooked pasta were assessed as unpleasant and bitter, and thus unacceptable. The sensory evaluation (Fig. 2) indicated that the highest acceptability

score was achieved by the control pasta (dry and cooked). Increasing the amount of all dried mushrooms resulted in lower scores both before and after cooking. The same observation was reported by Lisiecka *et al.* (2019);² sensory evaluation results for dry pasta declined as the addition of *C. incanus* increased. Similar conclusions regarding sensory quality were formulated by Hong *et al.* (2005),²⁵ in a study in which oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) were added to bread in the amount of 1–4%. In terms of the overall acceptability of the bread, when the addition of mushrooms exceeded 1%, scores for sensory quality decreased significantly. In contrast, the addition of 6% and 8% dried button mushrooms to pasta increased the overall acceptability score of cooked pasta compared to the control sample without the additives. The best scores were obtained for pasta supplemented with 8% mushroom powder,²⁷ while the addition of 12% and 15% button mushrooms resulted in a lower score than that obtained for the control sample. In a study by Muresan *et al.* (2017),⁷ where 10% and 20% *Boletus edulis* mushrooms were added to pasta, the highest sensory evaluation results (including for taste) were achieved by the sample with the 10% addition.

The results of the present study indicate that pasta supplementation with the mushrooms tested resulted in pasta with good sensory quality, especially in the case of assessment before cooking. The cooked pasta (except for the samples fortified with 7.5% and 10% Lion's Mane and Reishi mushrooms) were found to be acceptable to consumers, as the mean scores for all evaluated characteristics were above 3 (Fig. 2a and b).

Experimental

Materials

Durum wheat semolina was obtained by milling durum wheat (*Triticum durum*) available from PZZ Lubella (Poland). Dried *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Flammulina velutipes* (Enoki), *Hericium erinaceus* (Lion's Mane), and *Grifola frondosa* (Maitake) mushrooms were purchased in food stores (NANGA Przemysław Figura). Each mushroom had a quality certificate confirming its quality, expiry date, and country of origin. Lion's Mane, Maitake and Reishi mushrooms were purchased as dried powder with a particle size of 80–100 mesh; next, it was sieved in our lab through a sieve with 500 µm mesh. Enoki was purchased as whole dried mushrooms, milled in a Retsch GM200 mill grinder to obtain a particle size of 80–100 mesh, and additionally sieved in the lab through a sieve with 500 µm mesh. The raw materials for the production of pasta (mushrooms and semolina) were stored in the laboratory in controlled temperature (max. 25 °C) and relative humidity (max. 65%).

Preparation of pasta

The tagliatelle pasta was prepared in repeatable laboratory conditions from semolina fortified with four types of dried mushrooms: Lion's Mane (L), Maitake (M), Reishi (R), and Enoki (E)

(2.5% (w/w); 5.0% (w/w); 7.5% (w/w), and 10% (w/w). All components were prepared by mixing the semolina with mushroom flour to obtain a homogeneous free-flowing raw material. For each formulation, the semolina, mushrooms, and water were mixed in a domestic blender (Kitchen Aid 5KSM45, USA) for 10 min at 150 rpm to obtain homogenous dough. The dough was formed into sheets up to 140 mm wide and 1.5 mm thick using a pasta rolling device. Thin strands of pasta (2 mm thick) were made and cut using a KitchenAid Fettuccine pasta roller and cutter set. The tagliatelle pasta was dried in a laboratory dryer (Selecta) at 55 °C for 2 h.^{6,28}

After drying and cooling, the pasta was packed in foil bags, sealed, and stored in the laboratory in controlled temperature (max. 25 °C) and relative humidity (max. 65%).

Analysis of chemical composition

The following methods were used to evaluate the chemical composition of the semolina pasta and the dried mushroom-enriched pasta: the total protein content and total ash content were determined as in Bobtyk-Mamczarz *et al.*,²⁹ and moisture according to PN-EN ISO 712.³⁰ The measurements were performed in triplicate.

The fat content was determined using a near-infrared diode array (NIR) instrument for rapid analysis with the manufacturer's proprietary calibrations.³¹

The carbohydrate content was estimated "by difference", and the energy content was calculated using Atwater factors (4 kcal g⁻¹ for carbohydrates; 9 kcal g⁻¹ for fat; and 4 kcal g⁻¹ for protein).

Dietary fiber was determined by the weight method using thermostable α-amylase, pepsin and pancreatin enzymes in accordance with standard methods PN-A-79011-15.³²

Cooking properties of pasta

For evaluation of cooking properties, 10 g of each sample of pasta was cooked in 300 ml of boiling distilled water. The optimal cooking time (OCT) (min) for each sample was measured. The tagliatelle was considered cooked when its white core disappeared after being pressed between two transparent plastic plates, which was regarded as the optimum cooking time.³³

Cooking loss (CL) was measured by fully evaporating the cooking and rinsing water in an Erlenmeyer glass beaker to dryness in an air oven (SLW 53 STD POL-EKO APARATURA, Poland) at 105 °C. The residue was weighed and the result was expressed as a percentage of the dry sample weight before cooking.³³

The cooking weight index (CWI) of the pasta was calculated by dividing its weight after being cooked for the optimum cooking time by the weight of the uncooked pasta.¹⁵

$$\text{CWI} = \text{weight of cooked pasta} / \text{weight of uncooked pasta}$$

Hydration properties of pasta

The hydration properties of the pasta samples were determined at ambient temperature by calculating the water absorp-

tion index (WAI) and the water solubility index (WSI). Ground pasta samples (0.7 g) were mixed in centrifugal tubes with 7 ml of distilled water. After a 5 min interval, the samples were irrigated for 10 min and mixed every minute to obtain a uniform suspension, which was then centrifuged (15 000 rpm, 10 min, 21 °C) in a Ortoalresa Digicen 21 centrifuge. The supernatant was dried to constant weight at 110 °C. The tests were performed in triplicate. The values of WAI and WSI were calculated using eqn (a) and (b) according to Wójtowicz and Mościcki (2014).¹⁹

$$\text{WAI (g/g)} = m_z/m_s \quad (\text{a})$$

where: m_z – wet sedimentation weight (g), m_s – dry sample weight (g).

$$\text{WSI (\%)} = m_c/m_s \times 100\% \quad (\text{b})$$

where: m_c – dry supernatant weight (g), m_s – dry sample weight (g).

Pasta color

The color profile of the pastas was measured using a CR-410 Chroma Meter (Konica Minolta, Tokyo, Japan) colorimeter in the CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) LAB scale. The chromatic values of L^* , a^* , and b^* were measured. The L^* value describes brightness in a range from 0 to 100 (black to white). The a^* value describes the redness–greenness balance (in-minus for green and in-plus for red). The b^* value describes the yellowness–blueness balance (in-minus for blue and in-plus for yellow). Illuminant C, a constant slit diameter of \varnothing 50 mm, and the measurement angle of 0^{20} were used for the measurements.

Textural properties

The texture was assessed by a three-point breaking test performed using a Zwick/Roell BDO-FB0.5TH testing machine (Zwick GmbH & Co., Ulm, Germany). The maximum breaking force of a single pasta sample was determined at a constant test speed of 100 mm min⁻¹. The distance between the supports was 50 mm. The following pasta strength parameters were determined: the destructive force recorded at the moment of breaking the pasta sample, the breaking strength at the moment of the highest deformation immediately before failure of the test, and the deformation at failure as a percentage of deflection/deformation up to the point of failure of the sample. The measurements were made in at least 5 replicates according to the methodology available in the literature,²⁰ with our own modifications. The results were recorded and presented as means of the calculations made in TestXpert® 10.11 software, which is recommended by the manufacturer of the testing machine.

The texture characteristics of cooked pasta were assessed using the Zwick/Roell BDO-FB0.5 TH universal testing machine (Zwick GmbH & Co., Ulm, Germany). The OTMS Ottawa cell was used to evaluate the hardness, stickiness, and elasticity of cooked pasta samples from each run of the experi-

mental design. A double-compression test was used to determine the hardness (N), stickiness (mJ), and elasticity of the cooked pasta products. 50 g of cooked and drained pasta was placed in the OTMS chamber and compressed with a test speed of 3.3 mm s⁻¹. TestXpert® 10.11 software was used to record data in three independent replications.²⁴

Sensory evaluation of pasta

The sensory characteristics of the dry and cooked pasta were determined as in Bobryk-Mameczarz *et al.* (2021).²⁹ Each feature was rated on a scale of 1 to 5, from very good quality (5) to bad quality (1). The arithmetic mean of ten evaluations provided the result for the pasta from each variant. The assessment panel evaluating the sensory attributes consisted of ten trained and certified professional sensory experts. The dry and cooked pasta was served on white plates. The dry pasta evaluation included assessment of its appearance, color, and smell. The cooked pasta evaluation included assessment of its appearance, color, taste, smell, and consistency.

Statistical analyses

All analyses were carried out in triplicate, unless otherwise stated. Statistical significance was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) at the significance level $p \leq 0.05$. Homogeneous groups were determined by the Tukey test, and data were reported as mean \pm standard deviation using Statistica ver. 13.3.

Conclusions

Previous studies of the raw material⁵ and the present work have shown that it is possible to produce pasta fortified with dried powdered mushrooms with documented health-promoting properties (*Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Hericium erinaceus*, and *Grifola frondosa*), which has not previously been explored. The addition of these mushrooms resulted in an increase in the content of nutrients, mainly protein and dietary fiber. In general, increasing the addition of mushrooms increased the content of these nutrients in the pasta. The textural properties of dry pasta were also improved by supplementation with the mushrooms, especially resistance to breaking and deformation. The assessment of culinary and sensory quality parameters was used to select the optimal level of addition of each type of mushroom. In the case of Lion's Mane and Reishi, pasta with a 7.5% or 10% addition of these mushrooms should not be used in further research due to the negative sensory assessment, particularly the intensely bitter taste, which was distinctly different from the taste of the control samples. The increase in cooking loss also indicated that these mushrooms should be added in smaller amounts. Thus, in the case of Lion's Mane and Reishi, 5% supplementation can be recommended, given their high nutritional value and acceptable sensory features. Cooking loss was also higher in the 10% Enoki sample in comparison to the control. Moreover, cooked pasta with 10% Enoki was characterized by

increased hardness; therefore, the recommended level of Enoki is 7.5%. The highest level of pasta supplementation (10%) can be recommended only in the case of Maitake mushrooms, as the M10 sample had high nutritional value and satisfactory culinary and organoleptic properties.

Further work is required to test the influence of the addition of mushrooms with documented health-promoting properties on the bioactive activity of fortified pasta.

Author contributions

Conceptualization, U. Z.; methodology, U. Z., A. W., M. S.-T., M. C. formal analysis, U. Z.; investigation, A. W., M. S.-T., M. C.; writing—original draft preparation, M. S.-T., M. C. writing—review and editing, U. Z., M. S.-T., M. C.; project administration, U. Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors would like to thank Andrzej Gąsiorek, the General Director of PZZ Lubella GMW Sp. z o.o., for providing machines and equipment for the research and Piotr Lewko and Anna Grabiec for their invaluable help.

This work was financially supported by a grant from the Ministry of Science and Higher Education in Poland (grant no. DWD/3/58/2019 "Implementation doctorate I").

Notes and references

- 1 A. Ainsa, A. Vega, A. Honrado, P. Marquina, P. Roncales, J. A. B. Gracia and J. B. C. Morales, Gluten-free pasta enriched with fish by-product for special dietary uses: Technological quality and sensory properties, *Foods*, 2021, **10**, 3049, DOI: [10.3390/foods10123049](https://doi.org/10.3390/foods10123049).
- 2 K. Lisiecka, A. Wójtowicz, D. Dżiki and U. Gawlik-Dżiki, J. The influence of *Cistus incanus* L. leaves on wheat pasta quality, *Food Sci. Technol.*, 2019, **56**, 4311–4322.
- 3 F. Fanari, E. Desogus, E. A. Scano, G. Carboni and M. Grosso, The rheological properties of semolina doughs: Influence of the relative amount of ingredients, *Chem. Eng. Trans.*, 2019, **76**, 703–708.
- 4 D. Dżiki, Current trends in enrichment of wheat pasta: Quality, nutritional value and antioxidant properties, *Processes*, 2021, **9**, 1280.
- 5 M. Szydłowska-Tutaj, U. Złotek and M. Combrzyński, Influence of addition of mushroom powder to semolina on proximate composition, physicochemical properties and some safety parameters of material for pasta production, *LWT – Food Sci. Technol.*, 2021, **151**, 112235, DOI: [10.1016/j.lwt.2021.112235](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112235).
- 6 B. Biernacka, D. Dżiki, U. Gawlik-Dżiki and R. Różyło, Common wheat pasta enriched with cereal coffee: Quality and physical and functional properties, *LWT – Food Sci. Technol.*, 2021, **139**, 1–6.
- 7 C. C. Muresan, A. Farcas, S. Man, R. Suharoschi and R. A. Vlaie, Obtaining a Functional Product Through the Exploitation of Mushroom Flour in Pasta, *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca, Food Sci. Technol.*, 2017, **74**, 17.
- 8 K. Kumar, R. Mehra, R. P. F. Guiné, M. J. Lima, N. Kumar, R. Kaushik, N. Ahmed, A. N. Yadav and H. Kumar, Edible Mushrooms: A Comprehensive Review on Bioactive Compounds with Health Benefits and Processing Aspects, *Foods*, 2021, **10**, 2996.
- 9 D. Romankiewicz, G. Cacale-Pietrzak and M. Gonda, Assessment of the quality of fusilli-form pastas available on the Warsaw market, *Acta Agroph.*, 2014, **21**, 327–335.
- 10 R. Parvin, T. Farzana, S. Mohajan, H. Rahman and S. S. Rahman, Quality improvement of noodles with mushroom fortified and its comparison with local branded noodles, *NFS J.*, 2020, **20**, 37–42.
- 11 D. B. M. Ficco, V. De Simone, A. M. De Leonardi, V. Giovanniello, M. A. Del Nobile, L. Padalino, L. Lecce, G. M. Borrelli and P. De Vita, Use of purple durum wheat to produce naturally functional fresh and dry pasta, *Food Chem.*, 2016, **203**, 187–195.
- 12 S. Martini, C. Bonechi, A. Foletti and C. Rossi, Water-protein interactions: The secret of protein dynamics, *Sci. World J.*, 2013, 138916, DOI: [10.1155/2013/138916](https://doi.org/10.1155/2013/138916).
- 13 D. Dżiki and J. Laskowski, Influence of selected factors on pasta cooking quality, *Food Sci. Technol. Qual.*, 2003, **2**, 125–134.
- 14 A. Krawęcka, A. Sobota, U. Pankiewicz, E. Zielińska and P. Zarzycki, Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a functional component in durum wheat pasta production: Impact on chemical composition, in vitro glycaemic index, and quality properties, *Molecules*, 2021, **26**, 6909, DOI: [10.3390/molecules26226909](https://doi.org/10.3390/molecules26226909).
- 15 B. Biernacka, D. Dżiki, U. Gawlik-Dżiki, R. Różyło and M. Siastala, Physical, sensorial, and antioxidant properties of common wheat pasta enriched with carob fiber, *LWT – Food Sci. Technol.*, 2017, **77**, 186–192.
- 16 M. Foschia, D. Peressini, A. Sensidoni, M. A. Brennan and C. S. Brennan, How combinations of dietary fibres can affect physicochemical characteristics of pasta, *Starch/Stärke*, 2015, **66**, 41–46.
- 17 A. Marti, R. Caramanico, G. Bottega and M. A. Pagani, Cooking behavior of rice pasta: Effect of thermal treatments and extrusion conditions, *LWT – Food Sci. Technol.*, 2013, **54**, 229–235.
- 18 A. Wójtowicz, A. Oniszczuk, K. Kasprzak, M. Olech, M. Mitrus and T. Oniszczuk, Chemical composition and selected quality characteristics of new types of precooked wheat and spelt pasta products, *Food Chem.*, 2020, **309**, 125673.

- 19 A. Wójtowicz and L. Mościcki, Influence of legume type and addition level on quality characteristics, texture and microstructure of enriched precooked pasta, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2014, **59**, 1175–1185.
- 20 K. Lisiecka and A. Wójtowicz, Effect of fresh beetroot application and processing conditions on some quality features of new type of potato-based snacks, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2021, **141**, 110919, DOI: [10.1016/j.lwt.2021.110919](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110919).
- 21 X. Lu, M. A. Brennan, L. Serventi, S. Mason and C. S. Brennan, How the inclusion of mushroom powder can affect the physicochemical characteristics of pasta, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2016, **51**, 2433–2439.
- 22 N. Chauhan, D. Vaidya, A. Gupta and A. Pandit, Fortification of Pasta with White Button Mushroom: Functional and Rheological Properties, *Int. J. Food Ferment. Technol.*, 2017, **7**, 87.
- 23 A. Landi, Durum wheat, semolina and pasta quality characteristics for an Italian food company, *Durum wheat Qual. Mediterr. Reg., Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens*, n. 22, CIHEAM, Zaragoza, 1995, pp. 33–42.
- 24 A. B. Nordiana, W. I. Wan Rosli and W. A. Wan Amir Nizam, The effect of oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) flour incorporation on the physicochemical quality and sensorial acceptability of pasta, *Int. Food Res. J.*, 2019, **26**, 1249–1257.
- 25 E. Çarşamba, K. Duerschmid and G. Schleining, Assessment of acoustic-mechanical measurements for crispness of wafer products, *J. Food Eng.*, 2018, **229**, 93–101.
- 26 G.-H. Hong, Y.-S. Kim and G.-S. Song, Effect of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Powder on Bread Quality, *Prev. Nutr. Food Sci.*, 2005, **10**, 214–218.
- 27 G. Kaur, S. Sharma, H. P. S. Nagi and P. S. Ranote, Enrichment of pasta with different plant proteins, *J. Food Sci. Technol.*, 2013, **50**, 1000–1005, DOI: [10.1007/s13197-011-0404-2](https://doi.org/10.1007/s13197-011-0404-2).
- 28 I. SĘcczyk, M. Świeca, U. Gawlik-Dziki, M. Luty and J. Czaj, Effect of fortification with parsley (*Petroselinum crispum* Mill.) leaves on the nutraceutical and nutritional quality of wheat pasta, *Food Chem.*, 2016, **190**, 419–428.
- 29 A. Bobryk-Mameczarz, A. Kiełtyka-Dadasiewicz and L. Rachon, Usefulness of hulled wheats grown in polish environment for wholegrain pasta-making, *Foods*, 2021, **10**, 1–13.
- 30 The Polish Committee for Standardization. PKN Polish Standard, PN-EN ISO 712:2012 Cereals and cereal products. Determination of moisture content. Reference method, 2012.
- 31 C. Cecchini, F. Antonucci, C. Costa, A. Marti and P. Menesatti, Application of near-infrared handheld spectrometers to predict semolina quality, *J. Sci. Food Agric.*, 2021, **101**, 151–157.
- 32 The Polish Committee for Standardization, PKN Polish Standard, PN-A-79011-15:1998 Dry food mixes. Test methods. Determination of dietary fiber contents, 1998.
- 33 A. Dib, A. Wójtowicz, L. Benatallah, A. Bouasla and M. N. Zidoune, Effect of hydrothermal treated corn flour addition on the quality of corn-field bean gluten-free pasta, *BIO Web Conf.*, 2018, **10**, 02003.
- 34 A. Dib, A. Wójtowicz, L. Benatallah, M. N. Zidoune, M. Mitrus and A. Sujak, Optimization of rice-field bean gluten-free pasta improved by the addition of hydrothermally treated rice flour, *Ital. J. Food Sci.*, 2018, **30**, 226–248.



Article

The Addition of Reishi and Lion's Mane Mushroom Powder to Pasta Influences the Content of Bioactive Compounds and the Antioxidant, Potential Anti-Inflammatory, and Anticancer Properties of Pasta

Magdalena Szydłowska-Tutaj ^{1,2}, Urszula Szymanowska ¹, Krzysztof Tutaj ³, Dorota Domagała ⁴ and Urszula Złotek ^{1,*}

¹ Department of Biochemistry and Food Chemistry, University of Life Sciences, Skromna Str. 8, 20-704 Lublin, Poland

² PZZ Lubella GMW Sp. z o.o., Wrotkowska Str. 1, 20-469 Lublin, Poland

³ Department of Biochemistry and Toxicology, University of Life Sciences, Akademicka Str. 13, 20-950 Lublin, Poland

⁴ Department of Applied Mathematics and Computer Science, Faculty of Production Engineering, University of Life Sciences, Ciepłoka Str. 28, 20-612 Lublin, Poland

* Correspondence: urszula.zlotek@up.lublin.pl; Tel: +48-81-4623328; Fax: +48-81-4623324

Abstract: The influence of a 2.5% and 5% addition of dried Reishi and Lion's Mane mushrooms on the content of bioactive compounds and some pro-health properties of pasta was studied. In samples subjected to gastrointestinal digestion, the content of phenolic compounds and the antioxidant, potential anti-inflammatory, and antiproliferative properties were significantly higher. The qualitative-quantitative analysis of phenolic compounds performed using the LC-MS/MS technique indicated that the Reishi-enriched pasta was characterized by a higher content of syringic (R2.5 sample), while pasta supplemented with Lion's Mane had a higher content of vanillin in relation to the control pasta. In the case of ethanolic extracts, samples supplemented with the Reishi mushrooms (R5 sample) were characterized by higher ABTS antiradical properties and a reducing power while the sample supplemented with Lion's Mane (L5 sample) had a higher ability to inhibit lipoxygenase in relation to the control sample. In conclusion, the results suggest that Reishi and Lion's Mane mushroom powder can be used for the fortification of semolina pasta, conferring slightly healthier characteristics of the product.

Keywords: mushrooms; pasta fortification; antioxidant activities; anti-inflammatory properties; anticancer properties



Citation: Szydłowska-Tutaj, M.; Szymanowska, U.; Tutaj, K.; Domagała, D.; Złotek, U. The Addition of Reishi and Lion's Mane Mushroom Powder to Pasta Influences the Content of Bioactive Compounds and the Antioxidant, Potential Anti-Inflammatory, and Anticancer Properties of Pasta. *Antioxidants* **2023**, *12*, 738. <https://doi.org/10.3390/antiox12030738>

Academic Editors: David Arrese-Rodríguez and Alessandra Napolitano

Received: 26 January 2023

Revised: 6 March 2023

Accepted: 15 March 2023

Published: 17 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Fungi are among the most common organisms on Earth. They perform critical roles in the soil ecosystem by forming vast microscopic filamentous networks in symbiosis with the roots of most plants. The role of fungi in the ecosystem is connected with enhancing rock weathering and providing the nutrient supply to plants [1].

In addition to the numerous functions of fungi in the ecosystem, scientists from many research centers around the world conduct investigations of cultivated fungi as well as wild species given their documented biological activity with anticancer, antiviral, hepatoprotective, and immunomodulatory properties. Therefore, mushrooms can be used as a source of biotherapeutics and for the development of new drugs [2].

With their bioactive properties, mushrooms can also be used as ingredients of functional foods. They can serve as natural matrices of functional products and can be used as ingredients for the fortification of some food products [3].

Reishi (*Ganoderma lucidum*) and Lion's Mane (*Hericium erinaceus*), among others, have been used as dried powders in research related to the fortification of pasta [4]. *Ganoderma lucidum*, known as Reishi, represents the group of polypores, i.e., mushrooms producing large fruiting bodies with pores or tubes on the underside. The Reishi mushroom is mainly used medicinally; so far, it has not been used in food due to its hard texture and bitter taste. It has been used to inhibit cancer growth and is well known in China, Japan, the USA, and other parts of the world as a source of drug components [2,5]. The main bioactive molecules that are present in Reishi mushrooms are peptidoglycans (Ganoderan A and B), glucans, triterpenes, heteropolysaccharides, and some phenolic compounds, mainly from the group of phenolic acids, i.e., protocatechuic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, and cinnamic acid [2,5]. This mushroom has documented healthy properties such as hypoglycemic, antioxidant, anticancer, antiviral (HIV-1), anti-allergic, anti-inflammatory, anti-hepatotoxic, cholesterol biosynthesis inhibitory, and antioxidant activities [2]. Currently, many products based on the Reishi mushroom are available in stores, for instance, powders, tea, dietary supplements, and cosmetics [5].

The other mushroom with both culinary and medicinal properties is *Hericium erinaceus*, commonly called Lion's Mane [6]. It is widely consumed in Asian countries for its nutritional and health benefits and it has a long history of use in traditional Chinese medicine. This species can contribute to the mitigation, prevention, or even treatment of various serious diseases such as cancer, depression, diabetes, and neurodegenerative diseases [6]. The main active ingredients of Lion's Mane are polysaccharides, terpenoids (especially hericenones and erinacines, which are specific for this species), steroids, alkaloids, lactones, and some phenolic compounds. These compounds are responsible for the anticancer, immunomodulating, and neuroprotective effects, they support the functioning of the nervous system at many levels (e.g., support of learning and memory processes and the stimulation of neurogenesis), and they support the circulatory system [7,8]. Additionally, products containing *Hericium erinaceus* are used in the treatment of Alzheimer's disease.

The Lion's Mane mushroom, apart from its health-promoting properties, is also valued for its taste, mainly in Asian countries [9].

So far, there are limited studies using Lion's Mane for food fortification. Given the pro-health properties of this mushroom feature, we decided to make an attempt to use dried Lion's Mane mushroom for pasta fortification.

In our previous work, we investigated the effect of the addition of Reishi and Lion's Mane (in the amount of 2.5, 5, 7.5, and 10.0%) on the physicochemical, culinary, and organoleptic properties of semolina wheat pasta. Our results indicated that pasta with a 7.5% or 10% addition of these mushrooms had no satisfactory quality due to the negative sensory assessment, particularly the intensely bitter taste. In contrast, pasta enriched with Reishi and Lion's Mane at the level of 2.5 and 5% were characterized by a high nutritional value and satisfactory culinary and organoleptic properties. [4].

The aim of this study was to evaluate the influence of a 2.5% and 5% addition of dried Reishi and Lion's Mane mushrooms on some pro-health properties of pasta, especially reflected in the antioxidant, potentially anti-inflammatory, and anticancer activities.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Pasta

The materials for pasta production were durum wheat semolina (obtained by milling durum wheat (*Triticum durum*) that was available from PZZ Lubella (Mill PZZ Lubella GMW Sp. z o.o. in Lublin, Poland), dried *Ganoderma lucidum* (Reishi), and *Hericium erinaceus* (Lion's Mane). Mushrooms were purchased in food stores (NANGA Przemysław Figura, Złotów, Poland). Each mushroom had a quality certificate confirming its quality, expiry date, and country of origin. The centesimal compositions (g/100 g) of raw materials (semolina and added mushrooms) have been published in our previous study and they were as follows: Semolina: fat: 1.01, protein: 15.31, and carbohydrates: 68.09; Lion's Mane (L):

fat: 2.8, protein: 20.1, and carbohydrates: 23.9; Maitake (M): fat: 2.5 and protein: 15.0, carbohydrates [10].

Lion's Mane and Reishi mushrooms were purchased as dried powder with a particle size of 80–100 mesh; next, the dried powder was sieved in our lab through with a 500 μm mesh sieve. The raw materials for the production of pasta (mushrooms and semolina) were stored in the laboratory in controlled temperature (max. 25 °C) with a relative humidity (max. 65%).

The tagliatelle pasta was prepared in reproducible laboratory conditions from semolina fortified with two types of dried mushrooms: Reishi (R) and Lion's Mane (L) (2.5% (*w/w*); 5.0% (*w/w*)), as described previously [4]. The pasta was cooked at the optimal cooking time determined in our previous study [4]. Next, pasta was frozen, freeze-dried (LABCONCO, Kansas City, MO, USA), ground (MRC GRINDING MACHINE, SM-450, Holon, Israel), and used for further research.

2.2. Content of Some Bioactive Compounds

2.2.1. Determination of Phenolic Compounds

Determination of Phenolic Acid Content (PAC)

The total content of phenolic acids was determined according to the Arnov method [11] and expressed as caffeic acid equivalent (CAE) in μg per g of dry weight (DW).

Determination of Total Flavonoid Content (TFC)

The total flavonoid content was determined according to the method described by Lamaison and Carnet (1990) [12]. It was calculated as quercetin equivalent (QE) in mg per g of dry weight (DW).

Determination of Total Phenolic Content (TPC)

The amount of total phenolics was determined using Folin-Ciocalteu reagent used for the determination all polyphenol fractions contained in the extract [13]. The amount of total phenolics was calculated as gallic acid equivalent (GAE) in mg per g DW.

Determination of phenolic compounds using spectrophotometric methods (PAC, TFC, and TPC) was made in ethanolic, PBS extracts, and in samples after *in vitro* digestion.

Qualitative–Quantitative Analysis of Phenolic Compounds Using the LC-MS/MS Technique

Briefly, phenolic compounds were released from the esterified form and from the cell wall by means of alkaline hydrolysis and then were extracted with ethyl acetate in acidic pH, as described by Żuchowski et al., with modifications [14]. The extraction was performed in triplicates. A total of 25 mg of the material was incubated with 500 μL of 0.2 M NaOH containing 1% of ascorbic acid as an antioxidant at 50 °C for 1 h. Prior to the hydrolysis, 25 μL of the internal standard (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *trans*-cinnamic-*d*7 acid, Merck) was added. Acidification to pH 2 was carried out using 2 M HCl, and extraction was performed with 1 mL of ethyl acetate for 15 min at room temperature. Then, the extracts were centrifuged at 14,000 $\times g$ for 10 min, and the organic layer was evaporated at 40 °C under a stream of nitrogen. The residue was reconstituted in 50 μL of water with methanol (9:1) and centrifuged at 14,000 $\times g$. The supernatant was transferred to a glass vial with insert for LC-MS/MS analysis.

The concentration of phenolic compounds was determined using a high performance liquid chromatograph (ExionLC AD, AB Sciex, Framingham, MA, USA) coupled with a mass spectrometer (QTRAP 6500+, AB Sciex, Framingham, MA, USA). Chromatographic separation was carried out on a Kinetex Biphenyl (100 mm \times 3 mm, 2.6 μm) column (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

Mobile phase: A—water with formic acid 0.1% (at the beginning 5%); B—acetonitrile with formic acid 0.1% (95%) and 0.4 mL/min flow. Gradient program: 0.0–1.0 min 5% B, 1.0–2.0 min 5–22% B, 2.0–5.0 min 28% B, 5.0–6.0 min hold 28% B, 6.0–10.0 min 28–70% B, 10.0–11.0 min 70–95% B, 11.0–12.0 min 95% B, 12.0–12.1 min 95–5% B, and 12.1–14.0 min

5% B. The injection volume was 5 μ L. For detection, electrospray ionization (ESI) in the negative ion mode was used. Tandem mass spectrometry MS/MS was used for quantitative studies. The parameters of all molecules monitored with the MRM method (e.g., precursor (Q1), productions (Q2), collision energy (CE), and retention times) are listed in the Supplementary Materials (Supplementary File Table S1). The LC-MS/MS system was controlled using Analyst 1.7.2 software (AB Sciex, Framingham, MA, USA). SCIEX OS Version 2.1.6.59781 (AB Sciex, Framingham, MA, USA) was used for data processing.

In the case of ethanolic extracts, PBS, and digested samples, direct injections of extracts were analyzed with separation conditions identical to those in alkaline hydrolysis.

2.2.2. Determination of Glucans

The contents of total alpha- and beta-glucans were determined using the K-YBGL β -glucan Assay Kit (Yeast and Mushrooms) (Megazyme, Bray, Ireland) according to the manufacturer's instructions. The dried and milled pasta samples (100 mg) were used for the extraction procedure. The results were calculated according to the manufacturer's instructions and expressed as g/100 g DW.

2.3. Preparation of Extracts

2.3.1. Ethanolic Extracts

Ethanolic extracts were prepared using sonication (1g DW in 10 mL of 50% ethanol, sonication at 30 °C for 1 h, and then centrifugation at 9000 \times g for 30 min).

2.3.2. PBS Extracts

For preparation of buffer extracts (PBS), a freeze-dried and grounded sample (1 g) was homogenized, extracted for 60 min with 10 mL of PBS buffer (phosphate-buffered saline, pH 7.4), and centrifuged at 9000 \times g for 20 min.

2.3.3. In Vitro Digestion

In vitro digestion was performed according to the procedure described by Minekus et al. [15], with slight modifications, proposed by Seczyk et al. [16].

Before the first step of digestion, samples (1 g) were homogenized with 1 mL of distilled water. After all phases of digestion (gastrointestinal digested samples—GID), the samples were centrifuged (15 min, 6900 \times g), and the supernatants were used for analysis. The gastric phase (gastro digested samples—GD) was collected for determination of potential anticancer properties.

2.4. Antioxidant Activities

Determination of antioxidant activities was made in ethanolic, PBS extracts, and in samples after in vitro digestion.

2.4.1. Free Radical Scavenging Assays

Free radical scavenging activity was measured using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) according to Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) [17] and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS⁺•)), according to Re et al. (1999) [18], as a source of free radicals. The antioxidant activity was related to Trolox (an analogue of vitamin E) and expressed as mg of Trolox per gram of dry weight (DW).

2.4.2. Ferric-Reducing Antioxidant Power

Ferric-reducing antioxidant power (RP) was determined according to the methods described by Oyaizu [19]. Reducing power was expressed as a Trolox equivalent (TE) in mg of Trolox per gram of dry weight (DW).

2.4.3. Chelating Power

Chelating power (CHP) was determined using the method developed by Guo et al. [20]. The chelating power was expressed as an EDTA equivalent in μg EDTA per g of dry weight (DW).

2.5. Determination of Potential Anti-Inflammatory Properties

Determination of potential anti-inflammatory properties was made in ethanolic, PBS extracts, and in samples after *in vitro* digestion.

2.5.1. LOX Inhibitory Activity

The impact of extracts from the control sample and pastas supplemented with dried mushrooms on the lipoxygenase (LOX) activity was measured spectrophotometrically according to the method described by Szymanowska et al. [21], and adapted to the BioTek Microplate Reader (Winooski, VT, USA). One unit of LOX activity was defined as an increase in absorbance of 0.001 per minute at 234 nm. The corresponding control contained the same concentration of the enzyme in the absence of the inhibitor. An extract concentration (mgDW/mL) providing 50% inhibition (EC₅₀) was obtained by plotting the inhibition percentage against sample concentrations.

2.5.2. COX2 Inhibitory Activity

The impact of the analyzed extracts on cyclooxygenase-2 activity was determined spectrophotometrically at 590 nm by measuring the activity of the COX peroxidase subunit using NNN'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPDA) as an electron donor, with the use of the COX Activity Assay kit from Cayman Chemical (Cayman Chemical, MI, USA). COX activity was determined according to the instructions provided with the kit. An extract concentration (mg DW/mL) providing 50% inhibition (EC₅₀) was obtained by plotting the inhibition percentage against sample concentrations.

2.6. Determination of Potential Anticancer Properties

The potential anticancer properties of the studied pastas were tested using two cancer cell lines: AGS: Human Caucasian gastric adenocarcinoma (ECACC No. 89090402) and HT 29: Human Caucasian colon adenocarcinoma (ATCC HTB-38). The cells (0.5×10^6 cells/mL) were seeded in 96-well plates and incubated in an air atmosphere humidified with 5% of CO₂ at 37 °C for 24 h. The growth medium consisted of DMEM F12 (for AGS) or RPMI 1640 medium (for HT29), 10% FBS (heat-inactivated fetal bovine serum), 2 mM L-glutamine, and a 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma-Aldrich, Poznań, Poland). One day after cell seeding, the medium was replaced by samples subjected to gastric (GD samples) or gastrointestinal digestion (GID samples). After 24 h incubation at 37 °C, the cell lines were exposed to various amounts of gastric (GD) or gastrointestinal (GID) samples in DMEM F12 and RPMI, respectively, and were further incubated for 24 h. The final concentration of gastric and gastrointestinal fluids did not affect cell viability. Then, the WST-1 assay kit (BioVision, Inc., San Francisco, CA, USA) was used for cytotoxicity evaluation according to the manufacturer's procedure.

The cytotoxicity was determined as a percentage of living cells in comparison to the control. The results were evaluated by determination of the EC₅₀ (effective concentration of 50% cell viability) values, which were expressed as mg DW/mL. Each experiment was repeated three times.

2.7. Statistical Analysis

All determinations were performed in triplicates unless otherwise stated. Statistical analysis was performed using Statistica ver. 13.3 software. The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to examine whether there were any statistically significant differences between groups at the significance level $p \leq 0.05$. Homogenous groups were determined by the Dunn test, and data were reported as mean \pm standard deviation.

3. Results

3.1. Content of Bioactive Compounds

The contents of total phenolic compounds, total flavonoids, and phenolic acids in the pasta with the 2.5% and 5% addition of dried Reishi and Lion's Mane mushrooms after ethanol and PBS extraction and after simulated digestion (gastrointestinal digested samples—GID) are presented in Table 1. The total phenolic content (TPC) in Reishi-fortified samples achieved the highest value of 5.44 mg/gDW in the R5 sample after gastrointestinal digestion (Table 1).

Table 1. Phenolic compound content in pasta supplemented with dried Reishi and Lion's Mane mushrooms.

Samples	PAC (µg/g DW)			TFC (mg/g DW)			TPC (mg/g DW)		
	EtOH	PBS	GID	EtOH	PBS	GID	EtOH	PBS	GID
C	0.17 ± 0.01 *	1.33 ± 0.02 *	3.11 ± 0.33 *	0.17 ± 0.12 *	0.04 ± 0.04 *	4.45 ± 0.08 *	0.60 ± 0.06 *	0.55 ± 0.10 *	5.27 ± 0.20 *
R2.5	0.20 ± 0.03 *	1.36 ± 0.07 *	3.07 ± 0.30 *	0.48 ± 0.13 *	0.38 ± 0.08 *	4.79 ± 0.28 *	0.77 ± 0.21 *	0.81 ± 0.05 *	5.35 ± 0.70 *
R5	0.20 ± 0.01 *	1.41 ± 0.07 *	3.21 ± 0.08 *	0.82 ± 0.35 *	0.64 ± 0.13 *	5.08 ± 0.38 *	1.01 ± 0.18 *	1.08 ± 0.11 *	5.45 ± 0.83 *
L2.5	0.17 ± 0.01 *	1.29 ± 0.08 *	3.13 ± 0.06 *	0.73 ± 0.62 *	0.04 ± 0.02 *	4.84 ± 0.44 *	0.67 ± 0.21 *	0.66 ± 0.07 *	5.37 ± 0.47 *
L5	0.18 ± 0.01 *	1.28 ± 0.07 *	3.00 ± 0.02 *	0.80 ± 0.47 *	0.10 ± 0.07 *	4.44 ± 0.56 *	0.64 ± 0.09 *	0.70 ± 0.12 *	5.20 ± 0.42 *
p-value	0.0828	0.4769	0.1329	0.1361	0.0708	0.0994	0.1870	0.0617	0.9339

C—control (pasta from semolina); R2.5–5—pasta from semolina flour fortified with 2.5–5% of Reishi mushroom powder; L2.5–5—pasta from semolina flour fortified with 2.5–5% of Lion's Mane mushroom powder; PAC—phenolic acid content; TFC—total flavonoid content; TPC—total phenolic content. Means with different superscripts within a column are significantly different at $p < 0.05$.

A similar trend was observed in the total flavonoid content (TFC), i.e., an increase in the dried Reishi mushroom dose was accompanied by an increase in the TFC in all extracts. A similar trend was observed in samples with the addition of dried Lion's Mane mushroom, except for the sample subjected to digestion, where a higher value was observed for the L2.5 sample. The contents of phenolic acid (PAC) in all the extracts were similar (no statistically significant differences between the tested samples were found; $p = 0.08$, 0.1319, and 0.296 for ethanolic, PBS, and GID extracts, respectively), regardless of the concentration of the dried mushrooms used; they also oscillated around the value noted in the control sample.

Using the LC-MS/MS technique, 15 compounds were identified in the tested samples, but the content of some of these compounds was below the limit of determination of the lowest calibration point (Table 2). Ferulic acid was the dominant phenolic acid in all the samples (content between 140.91 and 154.13 µg/g DW). It should be noted that, in some cases, the fortification with the studied mushrooms had an influence on the phenolic compound content. The fortification with Reishi resulted in higher amounts of syringic acid (Table 2). In turn, the addition of the Lion's Mane dried powder resulted in a higher content of vanillin in relation to the control pasta (Table 2).

The identification of phenolic compounds in ethanolic, PBS, and GID extracts confirmed the presence of compounds in the raw materials that were also in the extracts used for the study (Table S2). In the ethanolic extracts of pasta enriched with Reishi, a significantly higher content of the following compounds was noted compared to the control: 3,4-dihydroxybenzoic acid (R5 sample) and caffeic acid (R2.5 and R5 samples). In the case of PBS extracts, a statistically significant difference ($p = 0.0097$) was noted only for the content of syringic acid—extracts from pasta enriched with Reishi (R5) showed the highest content of this phenolic acid. In the samples after simulated digestion, statistically significant differences were noted only in the contents of 3,4-dihydroxybenzoic acid (which was detected only in R2.5 and R5 samples) syringic acid, and sinapic acids ($p = 0.0112$ and 0.0122, respectively)—a higher content compared to the control was observed for the R5 and R2.5 samples, respectively.

Table 2. Qualitative–quantitative analysis of phenolic compounds using the LC-MS/MS technique.

Name of Polyphenolic Compound	Polyphenolic Compound (µg DM)														
	Salicylic Acid	Gallic Acid	Trimesic Acid	Ducosic	Resor	Diapic Acid	p-Coumaric Acid	Salicylic Acid	Vanillic	Trimesic Acid	Trimesic Acid	Resorcinol	p-Coumaric Acid	Gallic Acid	Vanillic
C	<0.5	<0.5	<0.5	n.d.	<0.5	n.d.	1.17 ± 0.01 ^{ab}	<0.5	0.5 ± 0.01 ^a	156.12 ± 10.21 ^a	27.70 ± 1.24 ^{ab}	<0.5	<0.5	n.d.	n.d.
R2 5–5	<0.5	<0.5	0.17 ± 0.01 ^a	<0.5	<0.5	<0.5	1.04 ± 0.11 ^{ab}	<0.5	0.70 ± 0.01 ^{ab}	142.98 ± 2.85 ^a	29.11 ± 0.69 ^{ab}	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
R2	<0.5	<0.5	1.13 ± 0.07 ^a	<0.5	<0.5	<0.5	1.08 ± 0.23 ^{ab}	<0.5	0.74 ± 0.15 ^{ab}	141.16 ± 7.10 ^a	21.62 ± 0.11 ^{ab}	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
R23	<0.5	<0.5	<0.5	n.d.	<0.5	<0.5	2.4 ± 0.07 ^{ab}	<0.5	0.17 ± 0.04 ^{ab}	145.79 ± 7.71 ^a	25.65 ± 0.99 ^a	<0.5	<0.5	n.d.	n.d.
R3	<0.5	<0.5	<0.5	n.d.	<0.5	<0.5	2.19 ± 0.15 ^{ab}	<0.5	0.30 ± 0.01 ^a	130.29 ± 9.75 ^a	25.15 ± 1.49 ^a	<0.5	<0.5	n.d.	n.d.
paste	-	-	0.002	-	-	-	0.104	-	0.043	0.024	0.073	-	-	-	-

C—control (paste from semolina); R2 5–5—paste from semolina flour fortified with 2.5–5% of Reishi mushroom powder; R2 5—paste from semolina flour fortified with 2.5–5% of Lion's Mane mushroom powder; <0.5 below the limit of determination of the lowest calibration point; n.d.—not detected. Means with different superscripts (a,b) within a column are significantly different at $p \leq 0.05$.

Table 3 summarizes the content of glucans in the studied pasta. In all the samples, the content of the beta-glucan fraction was higher than that of the alpha-glucans; surprisingly, the addition of the mushrooms did not cause statistically significant differences in the content of these components (Table 3).

Table 3. Glucan content in pasta supplemented with dried Reishi and Lion’s Mane mushrooms.

Sample	Total Glucan (g/100 g)	α -Glucan (g/100 g)	β -Glucan (g/100 g)
C	0.28 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^{ab}	0.18 ± 0.01 ^a
R2.5	0.29 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^{ab}	0.19 ± 0.01 ^a
R5	0.28 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^{ab}	0.18 ± 0.01 ^a
L2.5	0.28 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.18 ± 0.01 ^a
L5	0.28 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.01 ^b	0.18 ± 0.01 ^a
<i>p</i> -value	0.4846	0.0248	0.8148

C—control (pasta from semolina); R2.5-5—pasta from semolina flour fortified with 2.5–5% of Reishi mushroom powder; L2.5-5—pasta from semolina flour fortified with 2.5–5% of Lion’s Mane mushroom powder. Means with different superscripts within a column are significantly different at $p \leq 0.05$.

3.2. Antioxidant Activity

The antioxidant activities measured by DPPH and ABTS radical scavenging activity, chelating power, and reducing power of the pasta with the 2.5% and 5% addition of dried Reishi and Lion’s Mane mushrooms after ethanol and PBS extraction and after gastrointestinal digestion are presented in Table 4.

Table 4. Antioxidant properties of pasta supplemented with dried Reishi and Lion’s Mane mushrooms.

Samples	ABTS (mg TE/gDW)			DPPH (mg TE/gDW)			CHP (mg EDTA/gDW)			RP (mg TE/gDW)		
	ETOH	PBS	GID	ETOH	PBS	GID	ETOH	PBS	GID	ETOH	PBS	GID
C	0.68 ± 0.04 ^b	1.05 ± 0.11 ^{ab}	12.47 ± 1.34 ^a	n.a.	0.25 ± 0.04 ^a	4.05 ± 0.06 ^a	0.26 ± 0.16 ^{ab}	n.a.	217.94 ± 70.82 ^a	0.20 ± 0.02 ^b	0.20 ± 0.06 ^a	1.13 ± 0.06 ^a
R2.5	0.66 ± 0.04 ^{ab}	1.35 ± 0.12 ^a	12.15 ± 1.37 ^a	0.06 ± 0.05 ^b	0.19 ± 0.10 ^a	3.71 ± 0.25 ^b	0.36 ± 0.11 ^a	n.a.	92.53 ± 1.65 ^{ab}	0.45 ± 0.02 ^{ab}	0.36 ± 0.07 ^{ab}	1.12 ± 0.14 ^a
R5	1.04 ± 0.08 ^a	0.91 ± 0.09 ^b	12.16 ± 1.23 ^a	0.06 ± 0.04 ^b	0.25 ± 0.11 ^a	3.81 ± 0.34 ^a	n.a.	n.a.	77.43 ± 86.90 ^b	0.66 ± 0.02 ^b	0.75 ± 0.16 ^b	1.52 ± 0.24 ^a
L2.5	0.68 ± 0.10 ^b	0.95 ± 0.08 ^b	12.81 ± 1.20 ^a	n.a.	0.16 ± 0.04 ^a	3.44 ± 0.71 ^a	0.16 ± 0.02 ^b	n.a.	103.90 ± 26.44 ^{ab}	0.25 ± 0.04 ^a	0.21 ± 0.07 ^a	1.06 ± 0.39 ^a
L5	0.71 ± 0.09 ^{ab}	1.02 ± 0.04 ^{ab}	12.49 ± 1.41 ^a	n.a.	0.27 ± 0.17 ^a	3.28 ± 0.80 ^a	n.a.	n.a.	125.47 ± 17.51 ^{ab}	0.30 ± 0.06 ^{ab}	0.21 ± 0.06 ^{ab}	1.17 ± 0.09 ^a
<i>p</i> -value	0.002	0.004	0.4003	0.470	0.162	0.183	0.036	–	0.040	0.004	0.007	0.002

C—control (pasta from semolina); R2.5-5—pasta from semolina flour fortified with 2.5–5% of Reishi mushroom powder; L2.5-5—pasta from semolina flour fortified with 2.5–5% of Lion’s Mane mushroom powder; ABTS—radical scavenging ability against ABTS; DPPH—radical scavenging ability against DPPH; CHP—chelating power; RP—reducing power; n.a.—no activity. Means with different superscripts within a column are significantly different at $p \leq 0.05$.

The ABTS scavenging ability of the ETOH and PBS extracts was significantly lower (from 0.68 mg TE/gDW in sample C extracted with ETOH to 1.35 mg TE/gDW for sample R2.5 extracted with PBS) than in the in vitro digested samples (12.14–12.49 mg TE/gDW). It should be noted that the ethanolic extract samples supplemented with Reishi mushrooms (R5 sample) were characterized by statistically significantly higher antiradical activity (against ABTS) than the control sample. In the GID samples, in both cases (Reishi and Lion’s Mane addition), the increase in the amount of the dried mushrooms was accompanied by an increase in the value of antiradical activity against ABTS. In the case of the antiradical activity against DPPH, the highest activity was also observed for GID samples with values ranging from 3.28 to 4.04 mg TE/gDW. However, there were no significant differences between the study groups. The lowest activity or no activity was observed for the ETOH samples. It should be noted that only the ethanolic extract from the R2.5 and R5 samples exhibited antiradical activity against DPPH.

In the case of the chelating power, the PBS extracts of all samples (control and with mushrooms addition) as well as the R5 and L5 samples after ethanolic extraction showed no activity. The highest CHP activity, i.e., 217.94 mg EDTA/gDW, was found in the control sample after simulated digestion.

The values of the reducing power of the analyzed samples ranged from 0.19 mg TE/gDW for the control ethanolic sample to 1.52 mg TE/gDW for the GID R5 sample. The highest

values were found in the samples subjected to digestion. In the case of the ETOH and PBS samples, the lowest RP was detected in the control sample. A significant increase in the value of RP was found in the samples supplemented with 5% of Reishi ($p = 0.0016$ and 0.0079 , for ETOH and PBS extract, respectively).

3.3. Potential Anti-Inflammatory Properties

The ability of the studied samples to inhibit enzymes involved in inflammation, i.e., lipoyxygenase and cyclooxygenase 2, is presented in Table 5. The ethanolic extracts from pasta fortified with Lion's Mane mushrooms (L5 sample) showed a statistically significantly higher ability to inhibit LOX (the EC50 values were 0.15 mg/mL) than the control (EC50 = 0.52 mg/mL)— $p = 0.0349$. It should also be noted that the PBS extract from the control sample showed no ability to inhibit lipoyxygenase activity, while the PBS extracts from pasta fortified with the studied mushrooms were characterized by the ability to inhibit LOX at the EC50 level ranging from 0.42 mg/mL to 0.34 mg/mL (Table 5). The GID extracts were characterized by a significantly higher LOX inhibition capacity compared to the ETOH and PBS extracts, but the activity of the GID samples supplemented with the mushrooms was not statistically significantly different from the control sample.

Table 5. Lipoyxygenase and cyclooxygenase-2 inhibitory activity of extracts from pasta supplemented with dried Reishi and Lion's Mane mushrooms.

Samples	LOXI (EC50 mg/mL)			COX2I (EC50 mg/mL)		
	ETOH	PBS	GID	ETOH	PBS	GID
C	0.52 ± 0.13 ^a	n.a.	0.10 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.05 ^a	n.a.	0.22 ± 0.03 ^a
R2.5	0.19 ± 0.04 ^{ab}	0.35 ± 0.08 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.52 ± 0.20 ^a	n.a.	0.21 ± 0.05 ^a
R5	0.18 ± 0.04 ^{ab}	0.37 ± 0.04 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.24 ± 0.03 ^a	n.a.	0.19 ± 0.01 ^a
L2.5	0.18 ± 0.03 ^{ab}	0.37 ± 0.08 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.36 ± 0.06 ^a	n.a.	0.18 ± 0.01 ^a
L5	0.16 ± 0.02 ^b	0.42 ± 0.05 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.41 ± 0.11 ^a	n.a.	0.20 ± 0.01 ^a
<i>p-value</i>	0.0349	0.5160	0.2610	0.0587	-	0.1377

C—control (pasta from semolina); R2.5—pasta from semolina flour fortified with 2.5–5% of Reishi mushroom powder; L2.5—pasta from semolina flour fortified with 2.5–5% of Lion's Mane mushroom powder; LOXI—lipoyxygenase inhibition; COX2I—cyclooxygenase-2 inhibition; n.a.—no activity. Means with different superscripts within a column are significantly different at $p \leq 0.05$.

The PBS extracts from all the studied pasta (control and fortified with Reishi and Lion's Mane) did not show COX-2 inhibitory activity (Table 5). However, the ethanolic extracts and the in vitro digested samples showed a significant ability to inhibit COX-2; similarly to LOX inhibition, the GID samples showed greater activity compared to the ethanol extracts. However, the fortification with the studied mushrooms did not result in a statistically significant increase in this activity.

3.4. Potential Anticancer Properties

The samples from the studied pastas subjected to gastric (GD) and gastrointestinal digestion (GID) showed dose-dependent cytotoxic activity against the AGS and HT 29 cancer cell lines, respectively (Table 6). The GID samples showed higher antiproliferative activity (against the HT 29 cancer line; EC50 = 0.07–0.08 mg/mL) than the GD samples (against the AGS cancer line; EC50 = 0.15–0.28 mg/mL). However, there were no significant differences between the study groups.

Table 6. Anticancer properties of pasta supplemented with dried Reishi and Lion’s Mane mushrooms.

Samples	Anticancer Properties EC50 (mg/mL)	
	GD	GID
C	0.18 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.01 ^{ab}
R2.5	0.15 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^a
R5	0.28 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^b
L2.5	0.16 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^{ab}
L5	0.20 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.01 ^{ab}
<i>p-value</i>	0.0811	0.0255

C—control (pasta from semolina); R2.5-5—pasta from semolina flour fortified with 2.5–5% of Reishi mushroom powder; L2.5-5—pasta from semolina flour fortified with 2.5–5% of Lion’s Mane mushroom powder; GD—gastric digested samples; GID—gastrointestinal digested samples; ACS—Human Caucasian gastric adenocarcinoma; HT 29—Human Caucasian colon adenocarcinoma. Means with different superscripts within a column are significantly different at $p \leq 0.05$.

4. Discussion

Mushrooms can be defined as large fungi that are capable of forming hard fungal tissue or large fleshy masses [22].

Mushrooms are consumed because they not only contain nutrients, e.g., protein, carbohydrates, dietary fiber, vitamins, and minerals, but they also possess documented pharmacological properties, such as immunomodulatory, anticancer, and even dementia-preventing activities. The biological properties are associated with many bioactive compounds that are abundant in mushrooms, e.g., phenolics, terpenoids, polysaccharides, glucans, and lectins [23].

Therefore, with their nutritional value, pro-health properties, and sensory and textural traits, mushrooms can be used in the food industry as possible substitutes for some ingredients or as food additives [24].

In the food industry, mushrooms can be used in a direct way (as an ingredient or additive to food products) or in an indirect way (as a source of fermentation) in food products [25].

There are some reports on the use of edible mushrooms as food ingredients or additives [24,26]. Among others, there are attempts to add mushrooms to flour-based products, such as bread, muffins, or pasta [24,27].

However, the addition of ingredients without gluten proteins or high-fiber ingredients (for example, mushroom powder) as replacements for commonly used flour may change some dough properties. Therefore, in our previous study, we selected recipes for the addition of such ingredients to flour products in terms of satisfactory physicochemical and sensory properties before assessment of their pro-health activities [4].

Our previous study on the culinary and sensory properties of durum wheat pasta enriched with dried mushrooms indicates that the optimal level of supplementation with dried Reishi and Lion’s Mane mushrooms as a semolina flour replacer is 2.5 and 5% [4].

The use of the Lion’s Mane as well as Reishi mushrooms in the production of food products has so far been limited [27,28].

The addition of mushroom powder to flour-based products such as breads, cakes, biscuits, or pasta has been studied recently, but mainly in the context of nutrition and consumer quality of obtained products [4,29]. There are many studies confirming its health-promoting properties, which are attributed to the bioactive compounds contained in this mushroom, i.e., triterpenoids, polyphenols, and biologically active polysaccharides [5,30].

The beneficial biological activity of Reishi and Lion’s Mane has aroused research interest in using these mushrooms as food additives. However, so far, there are scarce data on the effect of the addition of mushrooms to flour-based products on health-promoting properties.

Hence, the influence of a 2.5% and 5% addition of dried Reishi and Lion’s Mane mushrooms on the content of bioactive compounds and some pro-health properties of pasta was analyzed in the present study.

In Veljovic et al. [31] study, the glucans content in Reishi mushrooms was determined using the same protocol as in the present study. This research indicated that the content of total glucans and β -glucans in Reishi was 9.44–18.55 g/100 g and 8.90–15.64 g/100 g, respectively, depending on the extraction time and particle size.

Whereas, based on the literature data, glucan content in Lion's Mane varies slightly depending on the procedure used; the procedure used in the present study regarding the content of total glucans and β -glucans, determined by McCleary and Draga, was 37.1 g/100 g and 33.9 g/100 g, respectively [32].

Surprisingly, the fortification with the dried Reishi and Lion's Mane mushrooms did not cause statistically significant differences in the content of glucans in the studied pasta (Table 3). These results are difficult to explain; perhaps the addition of dried mushrooms used in this study turned out to be too small.

Polyphenols are bioactive compounds with well-documented pro-health properties. Based on the literature data, the content of phenolic compounds in mushrooms depends on the kind of extraction; for the TPC content in Reishi, it varies from 86 to 139 mg/g and for the ethanolic extract, it varies from 33 to 47 mg/g for water extract [31], while in Lion's Mane, according to Gasecka et al. [33], the TPC content was 17.10 mg/g. Phenolic acids are the main fraction of this group of compounds present in the mushrooms used in the present study [5,34].

Gallic, *p*-coumaric, and *p*-hydroxybenzoic acids are the most often described phenolic acids in Lion's Mane extracts [34,35], while protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic, *p*-coumaric, syringic, and cinnamic acids are most commonly identified in Reishi extracts [5,36]. There are also reports of detection of protocatechuic, 4-hydroxybenzoic, chlorogenic, vanillic, caffeic, syringic, *p*-coumaric, ferulic, sinapic, salicylic, gallic, and trans-cinnamic acids as well as rutin, quercetin, and kaempferol in Lion's Mane [33,37]. In a study conducted by Gasecka et al. [33], phenolic compounds were also identified in an extract from *Ganoderma lucidum*, namely 4-hydroxybenzoic, chlorogenic, vanillic, caffeic, sinapic, and trans-cinnamic acids, rutin, quercetin, and kaempferol.

Based on their research, Lu et al. [38] suggested that pasta could be a good medium to add antioxidant and bioactive compounds to in order to enhance human nutrition. There are some reports on the use of phenolics-rich powder or extracts from plants or mushrooms as a strategy in the production of functional pasta [39]. Mushrooms can also be a valuable source of polyphenols in the diet. In a study conducted by Lu et al. [40], the contribution of mushroom powder supplementation to the phenolic content in pasta was studied. In this study, powder from white button, shiitake, and porcini mushrooms was added to pasta in three amounts: 5, 10, and 15%. All the mushroom powder-fortified pastas were characterized by a significantly higher content of TPC than that in the control sample, except for the 5% and 10% shiitake mushroom pasta variants. A similar effect was obtained in the present study. The qualitative–quantitative analysis of phenolic compounds indicated that the ethanolic extracts of the Reishi-enriched pasta were characterized by a higher content of 3,4-dihydroxybenzoic acid and caffeic acid in comparison to the control pasta (Table S2).

The fortification of food with bioactive compound-rich ingredients should result in the increased pro-health potential of the obtained products. Lu et al. [40] studied the effect of the addition of 5, 10, and 15% of white button, shiitake, and porcini mushrooms on the antioxidant properties (DPPH and ORAC methods) of pasta. An increase in the DPPH scavenging activity was exhibited by pasta supplemented with 10% and 15% of white button mushrooms. This effect was achieved in the shiitake and porcini supplementation variants only in the case of the 15% addition. In turn, the antioxidant activity determined with the ORAC method was higher in all pasta variants that were enriched with the tested mushrooms in comparison to the control pasta [40]. Additionally, in a study performed by Ibrahim et al. [41], the total phenolic content, total flavonoid content, DPPH scavenging activity, and FRAP values of waffles, breadsticks, and salad cream supplemented with *Oyster* mushroom powder were higher than in the control sample.

In our study, the fortification of pasta with Reishi caused an increase in antioxidant activity, mainly in the ethanolic extracts (Table 4). Most importantly, samples subjected to gastrointestinal digestion were characterized by a significantly higher content of polyphenolic compounds as well as antioxidant and potentially anti-inflammatory potential than the other ones (Tables 1, 4, and 5). Similar results were obtained by Sęczyk et al. [16] in their study on pasta fortified with parsley leaves.

Dong et al. [42] showed strong correlations between the DPPH and FRAP antioxidant activities and polyphenolic content in Reishi mushrooms. Similarly, Saltarelli et al. [43] found a positive correlation between the content of phenolic compounds in Reishi extracts and antioxidant properties, i.e., DPPH and chelating power, as well as lipoxygenase inhibition.

Phenolic compounds as well as other bioactive compounds, e.g., β -glucans, glycoproteins, or triterpenes, contained in mushrooms may also have anti-inflammatory effects. As evidenced by Taofiq et al. [44], the anti-inflammatory properties are mainly ascribed to phenolic acids (especially *p*-hydroxybenzoic, *p*-coumaric, and cinnamic acids) and their derivatives contained in mushrooms.

Among the anti-inflammatory mechanisms of action such as the inhibition of transcription factors linked to inflammation and pro-inflammatory cytokines, the inhibition of pro-inflammatory enzymes (lipoxygenase, cyclooxygenase-2, and inducible nitric oxide synthase) should be highlighted [44,45]. The ability of the extracts from the studied pastas to inhibit LOX and COX-2 was determined in the present work (Table 5). The ethanol extracts and the *in vitro* digested samples from all the pasta variants showed a significant ability to inhibit the activity of these pro-inflammatory enzymes. What is noteworthy is that the samples subjected to simulated digestion exhibited significantly higher potential anti-inflammatory activity than the PBS and ethanol extracts. These differences are most likely related to the differences in the content of phenolic compounds in the extracts—after *in vitro* digestion, more phenolic compounds are found in the sample because they are released as a result of the action of digestive enzymes and simulated conditions of the digestive tract (mainly pH) [14]. Similar results have been seen in other studies using simulated digestion [46,47]. Additionally, in the case of the ethanolic extracts, samples from pasta fortified with Lion's Mane mushrooms (L5 sample) showed a statistically significantly higher ability to inhibit LOX in comparison to the control sample (Table 5).

Among the health-promoting properties of Reishi and Lion's Mane mushrooms, their documented anticancer properties deserve special attention. The antitumor activity exhibited by *Ganoderma lucidum* is achieved via the induction of programmed cell death, as reported by many studies [48–50]. A methanolic extract of *Ganoderma lucidum* fruiting bodies prevented the growth of a human gastric tumor cell line, as reported by Reis et al. and Oliveira et al. [49,50]. Additionally, research conducted by Kolniak-Ostek et al. [30] confirmed the potential anticancer activity of *Ganoderma lucidum* bioactive compounds against breast and colorectal cancer.

Some reports have also indicated the anticancer properties of extracts from *Hericium erinaceus* via the reduction of cell proliferation, induction of apoptosis in cancer cells [51], and inhibition of the migration and invasion of cancer cells by reduction of the expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in cancer cells [52].

In their publication, Kolniak-Ostek et al. [30] suggested that a significant part of the antiproliferative activity of *Ganoderma lucidum* extract toward cancer cells might be attributed to the high content of phenolic compounds (especially resveratrol and apigenin). Additionally, Sęczyk et al. [16] indicated that the anticancer activity (against breast carcinoma cells) of pasta fortified with parsley leaves was correlated with the phenolic content, but a relatively high concentration of the extract caused a cytostatic effect in their research. In the present study, not very high concentrations of the samples of the digested pasta (especially in the case of gastrointestinal digestion) were necessary to obtain a cytostatic effect on carcinoma cells (Table 6).

5. Conclusions

In conclusion, the results obtained in the present study suggest that Reishi and Lion's Mane mushroom powder can be used for the fortification of semolina pasta, conferring slightly healthier characteristics connected with the phenolic compound content, mainly in terms of the antioxidant and potentially anti-inflammatory properties of the product (determined mainly in ethanolic and PBS extracts). However, further research is needed because the potentially bioavailable fraction of bioactive compounds contained in the fortified pasta samples after simulated digestion did not show (with some exceptions) significant differences regarding the tested biological properties.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox12030738/s1>, Table S1: Parameters of all the molecules monitored with the MRM method; Table S2: Qualitative–quantitative analysis of phenolic compounds using the LC-MS/MS technique in ethanolic (A), PBS (B), and GID (C) extracts.

Author Contributions: Conceptualization, U.Z. and M.S.-T.; methodology, U.Z., M.S.-T., U.S., D.D. and K.T.; formal analysis, U.Z. and M.S.-T.; investigation, U.Z., M.S.-T., U.S., D.D. and K.T.; data curation, U.Z., M.S.-T., U.S. and K.T.; writing—original draft preparation, M.S.-T. and U.Z.; writing—review and editing, M.S.-T. and U.Z.; supervision, U.Z.; project administration, U.Z. and M.S.-T.; funding acquisition, U.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financially supported by a grant from the Ministry of Science and Higher Education in Poland (grant number “DWD/3/58/2019 “Implementation doctorate I”).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All relevant data are included in the article.

Acknowledgments: Special thanks to Małgorzata Krytosz, the director of quality and product safety in the Maspex Group, for her support and understanding during this research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Bonneville, S.; Delpomdor, F.; Preat, A.; Chevalier, C.; Araki, T.; Kazemian, M.; Steele, A.; Schreiber, A.; Wirth, R.; Benning, L.G. Molecular identification of fungi microfossils in a Neoproterozoic shale rock. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaa7599. [CrossRef] [PubMed]
- Prasad, S.; Rathore, H.; Sharma, S.; Yadav, A.S. Medicinal Mushrooms as a Source of Novel Functional Food. *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet.* **2015**, *04*, 221–225. [CrossRef]
- Reis, E.S.; Martins, A.; Vasconcelos, M.H.; Morales, E.; Ferreira, L.C.F.R. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *66*, 48–62. [CrossRef]
- Szydłowska-Tutaj, M.; Złotek, U.; Węjtowicz, A.; Combrzyński, M. The effect of the addition of various species of mushrooms on the physicochemical and sensory properties of semolina pasta. *Food Funct.* **2022**, *13*, 8425–8435. [CrossRef]
- Obodai, M.; Mensah, D.L.N.; Fernandes, Á.; Kortei, N.K.; Dzomeku, M.; Teegarden, M.; Schwartz, S.J.; Barros, L.; Prempeh, J.; Takli, R.K.; et al. Chemical characterization and antioxidant potential of wild ganoderma species from Ghana. *Molecules* **2017**, *22*, 196. [CrossRef] [PubMed]
- Friedman, M. Chemistry, Nutrition, and Health-Promoting Properties of *Herichium erinaceus* (Lion's Mane) Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia and Their Bioactive Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7108–7123. [CrossRef] [PubMed]
- Ma, B.J.; Shen, J.W.; Yu, H.Y.; Ruan, Y.; Wu, T.T.; Zhao, X. Hericenones and erinacines: Stimulators of nerve growth factor (NGF) biosynthesis in *Herichium erinaceus*. *Mycology* **2010**, *1*, 92–98. [CrossRef]
- Tachabajarong, N.; Rungsardthong, V.; Ruktanonch, U.; Poodchakarn, S.; Thumthananaruk, B.; Vatanyoopaisarn, S.; Suttisintong, K.; Iempridee, T.; Uttapap, D. Bioactive compounds and antioxidant activity of Lion's Mane mushroom (*Herichium erinaceus*) from different growth periods. *E3S Web Conf.* **2022**, *355*, 02016. [CrossRef]
- Khan, M.A.; Tania, M.; Liu, R.; Rahman, M.M. *Herichium erinaceus*: An edible mushroom with medicinal values. *J. Complement. Integr. Med.* **2013**, *10*, 253–258. [CrossRef]
- Szydłowska-Tutaj, M.; Złotek, U.; Combrzyński, M. Influence of addition of mushroom powder to semolina on proximate composition, physicochemical properties and some safety parameters of material for pasta production. *LWT* **2021**, *151*, 112235. [CrossRef]
- Cessak, G. *Polish Pharmacopoeia*, 12th ed.; Polish Pharmaceutical Society: Warsaw, Poland, 2020.

12. Lamaison, J.L.; Camart, A. Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la végétation. *Plantes Med. Phytother.* **1990**, *25*, 315–320.
13. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
14. Zuchowski, J.; Kapusta, I.; Szajwaj, B.; Jorczyk, K.; Oleszek, W. Phenolic acid content of organic and conventionally grown winter wheat. *Cereal Res. Commun.* **2009**, *37*, 189–197. [\[CrossRef\]](#)
15. Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—An international consensus. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1113–1124. [\[CrossRef\]](#)
16. Szczyk, L.; Świąca, M.; Gawlik-Dziki, U.; Luty, M.; Czyz, J. Effect of fortification with parsley (*Petroselinum crispum* Mill.) leaves on the nutraceutical and nutritional quality of wheat pasta. *Food Chem.* **2016**, *190*, 419–428. [\[CrossRef\]](#)
17. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [\[CrossRef\]](#)
18. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–13237. [\[CrossRef\]](#)
19. Oyaizu, M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr. Diet.* **1986**, *44*, 307–315. [\[CrossRef\]](#)
20. Guo, L.; Hamedy, P.A.; Li, B.; Hou, H.; Zhang, Z.; Zhao, X.; FitzGerald, R.J. Food protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *37*, 92–105. [\[CrossRef\]](#)
21. Szymanowska, U.; Karas, M.; Zlotek, U.; Jakubczyk, A. Effect of fortification with raspberry juice on the antioxidant and potentially anti-inflammatory activity of wafers subjected to in vitro digestion. *Foods* **2021**, *10*, 791. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Liu, S.; Liu, H.; Li, J.; Wang, Y. Research Progress on Elements of Wild Edible Mushrooms. *J. Fungi* **2022**, *8*, 964. [\[CrossRef\]](#)
23. Kumar, K.; Mehra, R.; Guiné, R.P.F.; Lima, M.J.; Kumar, N.; Kaushik, R.; Ahmed, N.; Yadav, A.N.; Kumar, H. Edible mushrooms: A comprehensive review on bioactive compounds with health benefits and processing aspects. *Foods* **2021**, *10*, 2996. [\[CrossRef\]](#)
24. Rangel-Vargas, E.; Rodriguez, J.A.; Dominguez, R.; Lorenzo, J.M.; Sosa, M.E.; Andrés, S.C.; Rosmini, M.; Pérez-Alvarez, J.A.; Teixeira, A.; Santos, E.M. Edible mushrooms as a natural source of food ingredient/additive replacer. *Foods* **2021**, *10*, 2687. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Naeem, M.Y.; Ugur, S.; Rani, S. Emerging Role of Edible Mushrooms in Food Industry and Its Nutritional and Medicinal Consequences. *Eurasian J. Food Sci. Technol.* **2020**, *4*, 6–23.
26. Das, A.K.; Nanda, P.K.; Dandapat, P.; Bandyopadhyay, S.; Gullón, P.; Sivaraman, G.K.; McClements, D.J.; Gullón, B.; Lorenzo, J.M. Edible mushrooms as functional ingredients for development of healthier and more sustainable muscle foods: A flexitarian approach. *Molecules* **2021**, *26*, 2463. [\[CrossRef\]](#)
27. You, S.W.; Hoskin, R.T.; Komamytsky, S.; Moncada, M. Mushrooms as Functional and Nutritious Food Ingredients for Multiple Applications. *ACS Food Sci. Technol.* **2022**, *2*, 1184–1195. [\[CrossRef\]](#)
28. Sheikh, A.F. El Nutritional Profile and Health Benefits of *Ganoderma lucidum* “Lingzhi, Reishi, or Mannentake” as Functional Foods: Current Scenario and Future Perspectives. *Foods* **2022**, *11*, 1030. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Salehi, F. Characterization of different mushrooms powder and its application in bakery products: A review. *Int. J. Food Prop.* **2019**, *22*, 1375–1385. [\[CrossRef\]](#)
30. Kolniak-Ostek, J.; Oszmiański, J.; Szyjka, A.; Moreira, H.; Barg, E. Anticancer and Antioxidant Activities in *Ganoderma lucidum* Wild Mushrooms in Poland, as Well as Their Phenolic and Triterpenoid Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9359. [\[CrossRef\]](#)
31. Veľjović, S.; Veľjović, M.; Nikićević, N.; Despotović, S.; Radulović, S.; Nikšić, M.; Filipović, L. Chemical composition, antiproliferative and antioxidant activity of differently processed *Ganoderma lucidum* ethanol extracts. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 1312–1320. [\[CrossRef\]](#)
32. McCleary, B.V.; Draga, A. Measurement of β -Glucan in mushrooms and mycelial products. *J. AOAC Int.* **2016**, *99*, 364–373. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Gąsecka, M.; Młeczek, M.; Siwulski, M.; Niedzielski, P.; Kozak, L. Phenolic and flavonoid content in *hericium erinaceus*, *ganoderma lucidum*, and *agrocybe aegerita* under selenium addition. *Acta Aliment.* **2016**, *45*, 300–308. [\[CrossRef\]](#)
34. Heleno, S.A.; Barros, L.; Martins, A.; Queiroz, M.J.R.P.; Morales, P.; Fernández-Ruiz, V.; Ferreira, I.C.F.R. Chemical composition, antioxidant activity and bioaccessibility studies in phenolic extracts of two *Herichium* wild edible species. *LWT* **2015**, *63*, 475–481. [\[CrossRef\]](#)
35. Asim, S.; Bacha, S.; Ali, S.; Li, Y.; Rehman, H.; Farooq, S. Lion’s mane mushroom; new addition to food and natural bounty for human wellness: A review. *Int. J. Biosci.* **2018**, *13*, 396–402. [\[CrossRef\]](#)
36. Taoufik, O.; Heleno, S.A.; Calhelia, R.C.; Alves, M.J.; Barros, L.; González-Paramás, A.M.; Barreiro, M.E.; Ferreira, I.C.F.R. The potential of *Ganoderma lucidum* extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *108*, 139–147. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Gąsecka, M.; Siwulski, M.; Magdziak, Z.; Budzyńska, S.; Stuper-Szablewska, K.; Niedzielski, P.; Młeczek, M. The effect of drying temperature on bioactive compounds and antioxidant activity of *Lecanum scabrum* (Bull.) Gray and *Herichium erinaceus* (Hull.) Pers. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 513–525. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

38. Lu, X.; Brennan, M.A.; Serventi, L.; Liu, J.; Guan, W.; Brennan, C.S. Addition of mushroom powder to pasta enhances the antioxidant content and modulates the predictive glycaemic response of pasta. *Food Chem.* **2018**, *264*, 199–209. [[CrossRef](#)]
39. Melini, V.; Melini, F.; Acquistucci, R. Phenolic compounds and bioaccessibility thereof in functional pasta. *Antioxidants* **2020**, *9*, 343. [[CrossRef](#)]
40. Lu, X.; Brennan, M.A.; Serventi, L.; Brennan, C.S. Incorporation of mushroom powder into bread dough—Effects on dough rheology and bread properties. *Cereal Chem.* **2018**, *95*, 418–427. [[CrossRef](#)]
41. Ibrahim, R.M.; Ali, M.I.K.; Abdel-Salam, F.F. Nutritional and Quality Characteristics of Some Foods Fortified with Dried Mushroom Powder as a Source of Vitamin D. *Int. J. Food Sci.* **2022**, *2022*, 2792084. [[CrossRef](#)]
42. Dong, Q.; He, D.; Ni, X.; Zhou, H.; Yang, H. Comparative study on phenolic compounds, triterpenoids, and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* affected by different drying methods. *J. Food Mass. Charact.* **2019**, *13*, 3198–3205. [[CrossRef](#)]
43. Saltarelli, R.; Ceccaroli, P.; Buffalini, M.; Vallorani, L.; Casadei, L.; Zambonelli, A.; Iotti, M.; Badalyan, S.; Stocchi, V. Biochemical characterization and antioxidant and antiproliferative activities of different *ganoderma* collections. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *25*, 16–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Taofiq, O.; Calhella, R.C.; Heleno, S.; Barros, L.; Martins, A.; Santos-Buelga, C.; Queiroz, M.J.R.P.; Ferreira, I.C.F.R. The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food Res. Int.* **2015**, *76*, 821–827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Rosa, S.I.G.; Rios-Santos, F.; Balogun, S.O.; Martins, D.T.D.O. Vitexin reduces neutrophil migration to inflammatory focus by down-regulating pro-inflammatory mediators via inhibition of p38, ERK1/2 and JNK pathway. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 9–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sęczyk, L.; Świeca, M.; Gawlik-Dziki, U. Effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) flour on the antioxidant potential, nutritional quality, and sensory characteristics of fortified durum wheat pasta. *Food Chem.* **2016**, *194*, 637–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Zlotek, U. Antioxidative, potentially anti-inflammatory, and antidiabetic properties, as well as oxidative stability and acceptability, of cakes supplemented with elicited basil. *Food Chem.* **2018**, *243*, 168–174. [[CrossRef](#)]
48. Harhaji Trajkovic, L.M.; Mijatovic, S.A.; Maksimovic-Ivanic, D.D.; Stojanovic, I.D.; Memicilovic, M.B.; Tufegdžić, S.; Maksimovic, V.M.; Marjanovi, Z.S.; Stosic-Grujicic, S.D. Anticancer properties of *ganoderma lucidum* methanol extracts in vitro and in vivo. *Nutr. Cancer* **2009**, *61*, 696–707. [[CrossRef](#)]
49. Reis, F.S.; Lima, R.T.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R.; Vasconcelos, M.H. Methanolic extract of *ganoderma lucidum* induces autophagy of AGS human gastric tumor cells. *Molecules* **2015**, *20*, 17872–17882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Oliveira, M.; Reis, F.S.; Sousa, D.; Tavares, C.; Lima, R.T.; Ferreira, I.C.F.R.; Dos Santos, T.; Vasconcelos, M.H. A methanolic extract of *Ganoderma lucidum* fruiting body inhibits the growth of a gastric cancer cell line and affects cellular autophagy and cell cycle. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1389–1394. [[CrossRef](#)]
51. Li, W.; Zhou, W.; Kim, E.J.; Shim, S.H.; Kang, H.K.; Kim, Y.H. Isolation and identification of aromatic compounds in Lion's Mane Mushroom and their anticancer activities. *Food Chem.* **2015**, *170*, 336–342. [[CrossRef](#)]
52. Hetland, G.; Tangen, J.; Mahmood, F.; Mirlashari, M.R.; Tjønnfjord, G.E.; Johnson, E. Related Medicinal Basidiomycetes Mushrooms, Preclinical and Clinical Studies. *Nutrients* **2020**, *12*, 1339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. Parameters of all the molecules monitored with the MRM method

Compound	Precursor ion Q1 (m/z)	Product ion Q2 (m/z)	CE (V)	Retention time (min)
Gallic acid 1	169	124.9	-20	1.89
Gallic acid 2	169	78.9	-30	1.89
3,4-Dihydroxybenzoic acid 1	153	108.9	-20	3
3,4-Dihydroxybenzoic acid 2	153	65	-26	3
Chlorogenic acid 1	352.9	190.8	-26	3.45
Chlorogenic acid 2	352.9	84.9	-26	3.45
Caffeic acid 1	179	135	-22	3.75
Caffeic acid 2	179	107	-32	3.75
Syringic acid 1	197	181.9	-18	3.8
Syringic acid 2	197	122.9	-30	3.8
Daidzin 1	415.1	251.9	-38	3.96
Daidzin 2	415.1	222.8	-38	3.96
Rutin 1	609	300.3	-46	4.01
Rutin 2	609	270.9	-46	4.01
Ellagic acid 1	301	284	-40	4.27
Ellagic acid 2	301	229	-38	4.27
p-Coumaric acid 1	163	119	-20	4.33
p-Coumaric acid 2	163	92.9	-42	4.33
Salicylic acid 1	137	93	-16	4.46
Salicylic acid 2	137	75	-40	4.46
Vanillin 1	150.9	136.1	-18	4.65
Vanillin 2	150.9	91.9	-26	4.65
Cynarin 1	515	353	-28	4.68
Cynarin 2	515	191	-42	4.68

m-Coumaric acid 1	163	119	-20	4.72
m-Coumaric acid 2	163	92.9	-42	4.72
Ferulic acid 2	193	177.9	-18	4.74
Ferulic acid 1	193	134	-22	4.74
Sinapic acid 1	223.1	164	-22	4.78
Sinapic acid 2	223.1	148.9	-28	4.78
Rosmarinic acid 1	358.9	160.9	-22	4.8
Rosmarinic acid 2	358.9	132.6	-40	4.8
Naringin	579	271	-32	5.03
Quercetin 1	301	121	-34	7.08
Quercetin 2	301.1	150.9	-30	7.08
trans-cinnamic-d7 acid	153.9	110	-16	7.4
trans-cinnamic acid 1	146.9	77	-28	7.53
trans-cinnamic acid 2	146.9	103	-14	7.53
Apigenin 1	269.9	116.9	-42	8.33
Apigenin 2	269.9	150.9	-34	8.33
Genistein 1	269	133	-30	8.42
Genistein 2	269	159	-40	8.42
Naringenin 1	271	150.9	-24	8.51
Naringenin 2	271	118.9	-34	8.51

Table S2. Qualitative-quantitative analysis of phenolic compounds using the LC-MS/MS technique in ethanolic (A), PBS (B) and GID (C) extracts

Name of polyphenolic compound	A (Ethanolic extracts)															
	3,4-Dihydroxybenzoic acid	Caffeic acid	Syringic acid	Quercetin	Rutin	Ellagic acid	p-Coumaric acid	Salicylic acid	Vanillin	Ferulic acid	Sinapic acid	Rosmarinic acid	trans-Cinnamic acid	Genistein	Naringenin	
C	13.73±0.12 ^a	<1	153.03±2.37 ^{ab}	nd	<1	nd	314.90±6.06 ^{ab}	<1	112.17±13.05 ^a	1387.57±85.27 ^a	177.77±4.56 ^a	nd	nd	nd	nd	

R2.5	186.60±7.2 ^{ab}	19.33±0.9 ^{2a}	862.10±27.3 ^{7a}	<1	<1	n.d.	287.67±10.5 ^a	<1	105.73±7.5 ^a	1314.03±78.1 ^{7a}	336.67±18.13 ^a	<1	n.d.	n.d.	<1
R5	316.60±0.69 ^b	35.17±16.22 ^a	1242.43±77.31 ^a	<1	<1	n.d.	197.33±5.48 ^a	<1	96.83±6.29 ^a	918.23±20.50 ^a	256.47±4.27 ^a	<1	n.d.	n.d.	<1
L2.5	22.83±0.92 ^{a*}	<1	106.13±6.12 ^{ab}	n.d.	<1	n.d.	341.83±15.9 ^{ab}	<1	101.57±2.0 ^{2a}	1436.23±78.3 ^{5a}	130.50±2.9 ^{1a*}	<1	n.d.	n.d.	n.d.
L5	26.37±0.64 ^{a*}	<1	95.87±2.83 ^b	n.d.	<1	n.d.	381.83±8.08 ^c	<1	84.70±5.89 ^a	1457.43±2.66 ^{ab}	115.57±1.6 ^{2b}	<1	n.d.	n.d.	n.d.
<i>P</i> -value	0.0086	0.0007	0.0036	-	-	-	0.0086	-	0.0651	0.0149	0.0086	-	-	-	-

B (PBS extracts)

Name of polyphenolic compound	[µg/g DW]															
	3,4-Dihydroxybenzoic acid	Caffeic acid	Syringic acid	Daidzin	Rutin	Ellagic acid	<i>p</i> -Coumaric acid	Salicylic acid	Vanillin	Ferulic acid	Sinapic acid	Rosmarinic acid	<i>p</i> -Cinnamic acid	Genistein	Naringenin	
C	26.33±5.05 ^a	n.d.	140.13±16.86 ^{ab}	n.d.	<1	n.d.	209.10±16.45 ^a	<1	69.90±11.78 ^{ab}	1247.77±150.46 ^a	48.57±10.33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
R2.5	15.70±3.64 ^a	n.d.	727.67±21.31 ^{ab}	<1	n.d.	n.d.	157.70±10.04 ^a	<1	70.73±16.24 ^a	809.20±31.00 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	<1	<1	
R5	10.27±5.54 ^a	n.d.	2400.87±900.30 ^a	<1	n.d.	n.d.	261.80±103.75 ^a	<1	134.83±27.57 ^a	1406.67±495.71 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	<1	<1	
L2.5	n.d.	n.d.	101.50±6.06 ^{ab}	n.d.	n.d.	n.d.	251.80±24.2 ^a	<1	65.83±5.31 ^a	1004.83±133 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
L5	n.d.	n.d.	97.90±0.17 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	277.73±25.4 ^a	<1	57.33±5.77 ^a	1159.57±15.13 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
<i>P</i> -value	0.5660	--	0.0007	-	-	-	0.1058	-	0.0149	0.1416	-	-	-	-	-	

C (GID samples)

Name of polyphenolic compound	[µg/g DW]															
	3,4-Dihydroxybenzoic acid	Caffeic acid	Syringic acid	Daidzin	Rutin	Ellagic acid	<i>p</i> -Coumaric acid	Salicylic acid	Vanillin	Ferulic acid	Sinapic acid	Rosmarinic acid	<i>p</i> -Cinnamic acid	Genistein	Naringenin	
C	n.d.	n.d.	124.85±0.52 ^b	n.d.	<1	n.d.	143.08±2.19 ^a	<1	179.85±7.09 ^a	936.87±43.13 ^a	68.28±0.99 ^a	<1	n.d.	<1	n.d.	
R2.5	32.27±0.79 ^a	n.d.	502.22±19.95 ^{ab}	n.d.	<1	n.d.	159.70±12.07 ^a	<1	202.83±16.88 ^a	906.57±73.13 ^a	136.01±8.49 ^a	n.d.	n.d.	<1	<1	

R5	26.62±0.85 ^a	n.d.	799.85±32.05 ^a	n.d.	<1	n.d.	131.31±2.45 ^a	<1	188.94±0.32 ^a	760.00±30.70 ^a	135.71±3.50 ^{ab}	n.d.	n.d.	<1	<1
L2.5	n.d.	n.d.	109.15±16.62 ^{ab}	n.d.	n.d.	n.d.	153.89±20.56 ^a	<1	223.23±43.65 ^a	863.94±121.77 ^a	23.23±5.16 ^b	n.d.	n.d.	<1	n.d.
L5	n.d.	n.d.	100.30±0.52 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	159.75±9.62 ^a	<1	207.47±36.39 ^a	845.40±42.60 ^a	31.16±4.29 ^b	n.d.	n.d.	<1	n.d.
<i>P</i> -value	0.0309	*	0.0112	*	*	*	0.0740	*	0.5227	0.1509	0.0122	*	*	*	*

Article

Influence of Addition of Dried Maitake and Enoki Mushrooms on Antioxidant, Potentially Anti-Inflammatory, and Anti-Cancer Properties of Enriched Pasta

Magdalena Szydłowska-Tutaj ¹, Urszula Szymanowska ¹, Krzysztof Tutaj ², Dorota Domagała ³ and Urszula Złotek ^{1,*}

¹ Department of Biochemistry and Food Chemistry, University of Life Sciences in Lublin, Skromna Str. 8, 20-704 Lublin, Poland

² Department of Biochemistry and Toxicology, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka Str. 13, 20-950 Lublin, Poland

³ Department of Applied Mathematics and Computer Science, Faculty of Production Engineering, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka Str. 28, 20-612 Lublin, Poland

* Correspondence: urszula.zlotek@up.lublin.pl; Tel: +48-81-4623328; Fax: +48-81-4623324

Abstract: The influence of the addition of 2.5, 5, 7.5, and 10.0% of dried Enoki and Maitake mushrooms on the content of bioactive compounds and some nutraceutical properties of pasta was determined in the study. The LC-MS/MS analysis of phenolic compounds revealed the highest amount of phenolic compounds in the Maitake-supplemented pasta. However, all the samples of the Enoki-enriched pasta exhibited a statistically significantly higher content of α -glucans than the control. Samples subjected to gastrointestinal digestion had significantly higher antioxidant and potential anti-inflammatory activities than ethanolic and buffer extracts (PBS). The ethanolic extracts from the Enoki- and Maitake-supplemented pasta had higher antioxidant activity (in some antiradical and reducing power assays) and higher lipoxygenase (E2.5 and E5 samples) inhibitory potential compared to the control sample. Additionally, some in vitro digested samples of pasta enriched with dried Enoki and Maitake mushrooms showed higher chelating power (E10, M7.5, and M10), reducing power (E5, E7.5, and M10), and lipoxygenase inhibition ability (E7.5, E10, and M10) than the control. In conclusion, the fortification of pasta with 7.5% and 10% of Enoki mushrooms and with 10% of Maitake mushrooms can be recommended.

Keywords: mushrooms; pasta fortification; antioxidant activities; anti-inflammatory properties; anticancer properties



Citation: Szydłowska-Tutaj, M.; Szymanowska, U.; Tutaj, K.; Domagała, D.; Złotek, U. Influence of Addition of Dried Maitake and Enoki Mushrooms on Antioxidant, Potentially Anti-Inflammatory, and Anti-Cancer Properties of Enriched Pasta. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 8183. <https://doi.org/10.3390/app13148183>

Academic Editor: Alessandra Biancolillo

Received: 9 June 2023
Revised: 9 July 2023
Accepted: 12 July 2023
Published: 14 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In addition to their nutritional properties, mushrooms are characterized by the presence of many ingredients with health-promoting properties. The impact of mushrooms on human health has been better documented in Asian countries than in Europe. This is related to the Asian culture and tradition, in which the cultivation of mushrooms has several centuries-old roots, especially in China. Edible mushrooms have recently been investigated and evaluated in various research centers around the world. The interest in fungi as a raw material that can be used in medicine and in the production of natural pharmaceuticals is associated with their pro-health properties [1]. Edible mushrooms with medicinal properties are an abundant source of biologically active compounds, e.g., polyphenols, polysaccharides, terpenoids, steroids, cerebrosides, and proteins [2]. Given their pro-health properties, mushrooms are well-known elements of traditional diets and medicine in Asian countries. Many of the compounds present in edible fungi are increasingly being used for the development of new functional foods and nutraceuticals in order to take advantage of their very broad properties, e.g., antitumor, antimicrobial, antiviral, immunomodulating, hypocholesterolemic, hypoglycemic, and many other effects [3–5].

Maitake (*Grifola frondosa*) and Enoki (*Flammulina velutipes*) are edible mushrooms with a high nutrient and bioactive compound content [6–9].

The growing demand for healthy food expressed by increasing numbers of health-conscious consumers over the last decade has resulted in growing interest in recipes for products with increased nutritional and/or health-promoting value. Although fortification with functional ingredients may increase the cost of such food products in some cases, many consumers are ready to purchase foods with proven health-enhancing properties. This also results in the growing demand for scientific research on functional products [6].

The interest in the use of natural products with a high content of some bioactive compounds as elements of popular functional food is growing. Given their multiple pro-health properties, medicinal mushrooms may be valuable functional additives to some food products. In some studies, powdered mushrooms or various extracts (aqueous or hydroalcoholic) from mushrooms have been used to fortify many types of foods, e.g., biscuits, cookies, crackers, cakes, and processed meat [7,8].

In Western countries, the use of mushrooms as additives to functional food is much less popular than in Asian countries. However, since the knowledge of the impact of food on health is widely available, the issue of health-enhancing food products has gained interest among consumers and food producers in Western countries [7]. In general, the supplementation of flour products with dried mushroom flour may impoverish pasting properties, yield darker products, and enhance firmness. The addition of mushroom fibers may also weaken the gluten network in fortified products. Therefore, the amount of mushroom addition is very important, as it may determine the physicochemical and sensory traits of flour products in addition to the impact of this additive on the health-promoting properties of this type of food [9].

The addition of some mushroom powders to wheat flour has been analyzed in some studies. Namely, β -glucans (in amounts of 1–3%) from *Lentinus edodes* were added to bakery foods, extruded snacks were supplemented with 5–15% of chestnut mushroom (*Agrocybe aegerita*), 5–15% of flour used for production of biscuits was replaced by *Pleurotus sajor-cajupowder*, and *Pleurotus ostreatus* was used as a replacer of wheat flour in noodles [9].

Another important aspect is that additives with a high content of bioactive compounds should be used in products that are willingly and frequently consumed [10].

Pasta, which is an excellent source of carbohydrates, is popular worldwide due to its good storage stability (dried pasta), low production cost, simple preparation, and relatively low glycemic index. One of the strategies used to produce functional pasta consists of a partial replacement of semolina with various ingredients characterized by a high content of bioactive compounds, e.g., medicinal mushrooms [6].

Another advantage besides the health-promoting and nutritional properties of *Grifola frondosa* (Maitake) and *Flammulina velutipes* (Enoki) is the possibility of farm cultivation of these species in controlled ecological conditions; hence, they can potentially be used for food production [9].

In our previous study, it was observed that the supplementation of pasta with dried Maitake and Enoki mushrooms (in the amount of 2.5, 5, 7.5, and 10.0%) contributed to the high nutritional value and acceptable culinary and organoleptic traits of the product [11].

The aim of this study was to determine the effect of dried Maitake and Enoki mushrooms on the bioactive activity (especially antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer properties) of fortified pasta.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Pasta

The tagliatelle pasta was made from semolina mixed with dried Maitake (M) and Enoki (E) mushrooms—Figure 1 (doses: 2.5% (*w/w*), 5.0% (*w/w*), 7.5% (*w/w*), and 10.0% (*w/w*)) as described previously [11]. Non-fortified semolina pasta was the control sample, as in our previous publication [12].



Figure 1. Dried Enoki and Maitake mushrooms.

2.2. Preparation of Extracts

2.2.1. Ethanolic Extracts

Ethanolic extracts were made as described in our previous study [12].

2.2.2. PBS Extracts

PBS samples (buffer extracts) were prepared as described in our previous study.

2.2.3. In Vitro Digestion

In vitro digestion was carried out according to the procedure proposed by Minekus et al. [13] and slightly modified by Sęczyk et al. [14].

Three-step digestion, i.e., an oral, gastric, and intestinal process, was performed. In the oral phase (2 min at 37 °C), pre-hydrated samples (1 g samples plus 1 mL of water) were mixed with 1.4 mL of simulated salivary fluid electrolyte stock solution (SSFESS) and incubated in the dark. Next, an oral bolus was mixed with 3 mL of simulated gastric fluid electrolyte stock solution (SGFESS) for gastric digestion (120 min at 37 °C in the dark). In the simulated intestinal digestion, gastric chyme was mixed with 4.4 mL of simulated intestinal fluid electrolyte stock solution (SIFESS), and the samples were incubated in the dark with continuous shaking for 120 min at 37 °C. After all the phases, the samples were centrifuged (15 min, 6900 × g), and the supernatants were used for analysis.

Electrolyte stock solutions (SSFESS, SGFESS, SIFESS) were prepared as described elsewhere [13]. At each digestion step, pH was checked and adjusted with 1 M NaOH or 1 M HCl to pH 7 for the oral and intestinal phases and pH 3 for the gastric phase when required. Samples subjected to all the digestion steps (gastrointestinal digested samples—GID) were used for the analysis of pro-health properties. Additionally, the gastric phase (gastro-digested samples—GD) was collected for the determination of potential anticancer properties.

The exact in vitro digestion procedure was identical to that previously described [12].

2.3. Content of Bioactive Compounds

2.3.1. Determination of Phenolic Compounds

Determination of Phenolic Acid Content (PAC)

The content of phenolic acids was determined according to the Arnov method [15] and expressed as caffeic acid equivalents (CAE)— $\mu\text{g Eq CAE/g DW}$.

Determination of Total Flavonoid Content (TFC)

The total flavonoid content was analyzed as in Lamaison and Carnet [16]. The results were presented as quercetin equivalents (QE)— mg Eq QE/g DW .

Determination of Total Phenolic Content (TPC)

The content of total phenolic compounds was determined based on the method proposed by Singleton et al. [17]. The results were presented as gallic acid equivalents (GAE)— mg Eq GAE/g DW .

Phenolic compounds were detected in ethanolic extracts, PBS extracts, and in vitro digested samples with spectrophotometric methods using a BioTek Microplate Reader (Winooski, VT, USA) (PAC, TFC and TPC).

LC-MS/MS-Based Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolic Compounds

The qualitative–quantitative analyses of phenolic compounds in the dried mushrooms, pasta, ethanolic extracts, PBS, and digested samples were performed according to the procedure described by Żuchowski et al. [18] with modifications used in our previous publication [12]. The analyses were carried out on a Sciex ExionLC AD chromatograph coupled with a Sciex QTRAP 6500+ mass spectrometer. The Phenomenex 2.6 μm Biphenyl column 4.6 \times 100 mm was used.

2.3.2. Determination of Glucans

The content of total, α -glucans, and β -glucans was determined with the use of the K-YBGL β -glucan Assay Kit (Yeast and Mushrooms) (Megazyme, Bray, Ireland) following the manufacturer's instructions (www.megazyme.com (accessed on 17 January 2023)). For the determination of the total (α - and β -) glucan content, lyophilized pasta samples (90 mg) were hydrolyzed using cold 12 M sulfuric acid in an ice-water bath for 2 h. Next, the samples were placed in boiling water for 2 h. After neutralization with 8 M NaOH, an aliquot was digested with exo-1,3- β -glucanase (20 U/mL) plus β -glucosidase (4 U/mL) in 200 mM sodium acetate buffer (pH 4.5). The hydrolyzates were incubated with a mixture of glucose oxidase, peroxidase, and 4-aminoantipyrine at 40 °C for 20 min. The absorbance of the solution was measured at 510 nm. For the determination of the α -glucan content, samples of lyophilized pasta (100 mg) were dissolved in 1.7 M NaOH, hydrolyzed (20 min in an ice-water bath), and treated with 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8). Amyloglucosidase (1.630 U/mL) and invertase (500 U/mL) were added to the solution, and the mixture was incubated at 40 °C for 30 min. The aliquot was incubated with a mixture of glucose oxidase, peroxidase, and 4-aminoantipyrine at 40 °C for 20 min. The absorbance of the solution was measured at 510 nm. The concentration of β -glucan was determined by subtracting α -glucan from the total glucan content. The results were calculated as specified in the manufacturer's instructions (www.megazyme.com (accessed on 17 January 2023)) and expressed as g/100 g DW.

2.4. Antioxidant Activities

The ethanolic extracts, PBS extracts, and in vitro digested samples were analyzed to determine antioxidant activities.

2.4.1. Free Radical Scavenging Assays

The DPPH method described in Brand-Williams et al. [19] and the ABTS^{•+} assay proposed by Re et al. [20] were used. The antiradical activity was expressed as mg of Trolox per gram of dry weight (DW).

2.4.2. Ferric Reducing Antioxidant Power

Reducing power (RP) was determined with the methods proposed by Oyaizu [21], and the results were expressed in mgTE/gDW.

2.4.3. Chelating Power

The method proposed by Guo et al. [22] was used for estimation of chelating power (CHP). The results were expressed in mg EDTA/gDW (EDTA equivalent).

2.5. Determination of Anti-Inflammatory Properties

The ethanolic extracts, PBS extracts, and in vitro digested samples were assessed for their potential anti-inflammatory properties.

2.5.1. Lipoxygenase (LOX) Inhibitory Activity

LOX inhibitory activity was determined with the method described by Szymanowska et al. [23]. Quercetin served as a positive control. The LOX inhibitory activity was expressed as EC₅₀ for the extracts or IC₅₀ for quercetin.

2.5.2. COX2 Inhibitory Activity

The influence of the samples on cyclooxygenase-2 (COX-2) activity was determined using the COX Activity Assay kit from Cayman Chemical. Quercetin served as a positive control. The COX2 inhibitory activity was expressed as EC₅₀ for the extracts or IC₅₀ for quercetin.

2.6. Determination of Anti-Cancer Properties

The anti-cancer properties of the samples were tested on two cancer cell lines: AGS—Human Caucasian gastric adenocarcinoma (ECACC No. 89090402)—samples after gastric digestion (GD) and HT29—Human Caucasian colon adenocarcinoma (ATCC HTB-38)—samples after gastrointestinal digestion (GID).

The results were expressed as EC₅₀ values in mg DW/mL.

The exact procedure was identical to that described previously [12].

An appropriate solvent or digestive fluid was used as a reference sample in all the biological activity assays so as to eliminate its influence on the tested activity. To compare the results reliably, the volume of the solvent added to the mixture was always kept at a constant minimum level that did not affect the analyzed activity.

2.7. Statistical Analysis

All the determinations were carried out in triplicate unless otherwise stated. Statistical analysis was carried out using the Statistica ver. 13.3 software package (StatSoft, Krakow, Poland). One-way analysis of variance (ANOVA) or Student's *t*-test was used to detect any statistically significant differences between the samples. Whenever the assumptions of the homogeneity of variance were not met, the Kruskal–Wallis non-parametric test was used. Homogenous groups were determined with Tukey's test (when using ANOVA) or Dunn's test (when using the Kruskal–Wallis test). The data were reported as mean ± standard deviation.

3. Results

3.1. Content of Bioactive Compounds

Table 1 summarizes the results of the content of TPC, TFC, and PAC in pasta supplemented with 2.5%, 5%, 7.5%, and 10% of dried Enoki and Maitake mushrooms after extraction with ethanol and PBS and after simulated digestion (gastrointestinally digested samples—GID).

After the simulated digestion process, samples from pasta supplemented with the mushrooms exhibited a higher content of PAC (except for E10 and M2.5) compared to the control sample. The greatest increase, i.e., by 12.9% and 11.3%, in the PAC content was observed in the *in vitro* digested samples of pasta fortified with 7.5 and 10% of Maitake, respectively, in comparison to the control.

The TFC value in the PBS extracts was higher in the mushroom-fortified pasta samples than in the semolina-only pasta. The E10 sample contained significantly higher levels of TFC than the M2.5 variant and the control. However, as shown by the analysis of the potentially bioavailable fraction of flavonoids (GID samples), greater amounts of flavonoids versus the control were recorded only in the M2.5, M5, and M7.5 samples, with the highest flavonoid content in the M5 sample—see Table 1.

The PBS extracts of pasta enriched with dried Enoki and Maitake mushrooms had a higher TPC content than the control sample. The highest TPC content was determined in the E10 sample (0.91 ± 0.09 mg Eq GAE/g DW), which constituted a 65% increase in comparison to the control.

Table 1. Content of phenolic compounds in pasta fortified with dried Enoki and Maitake mushrooms.

Samples	PAC ($\mu\text{g Eq CAE/g DW}$)			TFC (mg Eq CE/g DW)			TPC (mg Eq GAE/g DW)		
	EtOH	PBS	GJD	EtOH	PBS	GJD	EtOH	PBS	GJD
C	0.17 ± 0.01 ^{AA}	1.33 ± 0.02 ^{bcAB}	3.11 ± 0.32 ^{abB}	0.17 ± 0.12 ^{nAB}	0.04 ± 0.04 ^{nA}	4.45 ± 0.04 ^{abcE}	0.60 ± 0.06 ^{nAB}	0.55 ± 0.10 ^{nA}	5.27 ± 0.30 ^{ab}
E2.5	0.18 ± 0.01 ^{AA}	1.28 ± 0.02 ^{bcAB}	3.21 ± 0.06 ^{abB}	0.45 ± 0.32 ^{nAB}	0.16 ± 0.10 ^{abA}	4.08 ± 0.27 ^{abE}	0.58 ± 0.07 ^{nA}	0.60 ± 0.02 ^{bcAB}	4.91 ± 0.43 ^{ab}
E5	0.18 ± 0.01 ^{AA}	1.31 ± 0.04 ^{bcAB}	3.26 ± 0.07 ^{abB}	0.32 ± 0.23 ^{nAB}	0.12 ± 0.07 ^{abA}	4.38 ± 0.34 ^{abcE}	0.57 ± 0.04 ^{nA}	0.65 ± 0.03 ^{bcAB}	5.39 ± 0.22 ^{ab}
E7.5	0.18 ± 0.02 ^{AA}	1.34 ± 0.04 ^{bcAB}	2.86 ± 0.15 ^{ab}	0.33 ± 0.06 ^{nAB}	0.32 ± 0.23 ^{nAB}	3.85 ± 0.33 ^{abE}	1.10 ± 0.23 ^{bcAB}	0.78 ± 0.08 ^{bcA}	4.74 ± 0.39 ^{ab}
E10	0.17 ± 0.01 ^{AA}	1.31 ± 0.02 ^{bcAB}	3.05 ± 0.12 ^{abB}	0.34 ± 0.09 ⁿ	0.32 ± 0.02 ⁿ	4.39 ± 0.31 ^{abc}	1.15 ± 0.16 ^{bcAB}	0.91 ± 0.09 ^{nA}	4.74 ± 0.36 ^{ab}
M2.5	0.17 ± 0.01 ^{AA}	1.25 ± 0.02 ^{nAB}	3.09 ± 0.19 ^{abB}	0.23 ± 0.14 ^{nAB}	0.06 ± 0.06 ^{nA}	4.87 ± 0.37 ^{bcE}	1.66 ± 0.08 ^{bcB}	0.64 ± 0.03 ^{bcA}	4.73 ± 0.44 ^{ab}
M5	0.17 ± 0.01 ^{AA}	1.27 ± 0.03 ^{bcAB}	3.17 ± 0.08 ^{abB}	0.22 ± 0.15 ^{nAB}	0.12 ± 0.09 ^{abA}	5.09 ± 0.71 ^{bcE}	1.47 ± 0.61 ^{bcAB}	0.62 ± 0.02 ^{bcA}	4.64 ± 0.55 ^{ab}
M7.5	0.18 ± 0.01 ^{AA}	1.27 ± 0.03 ^{bcAB}	3.51 ± 0.11 ^{ab}	0.37 ± 0.09 ^{nAB}	0.19 ± 0.04 ^{abA}	4.52 ± 0.31 ^{abcE}	0.84 ± 0.31 ^{abA}	0.83 ± 0.10 ^{bcAB}	4.90 ± 0.37 ^{ab}
M10	0.18 ± 0.01 ^{AA}	1.31 ± 0.03 ^{bcAB}	3.46 ± 0.09 ^{ab}	0.32 ± 0.05 ^{nAB}	0.18 ± 0.10 ^{abA}	4.13 ± 0.50 ^{abE}	0.82 ± 0.24 ^{bcAB}	0.74 ± 0.06 ^{bcA}	4.53 ± 0.34 ^{ab}
<i>p</i> -value	0.1954	0.0005	0.0028	0.4779	0.0042	0.0036	0.0009	0.0000014	0.059

C—control (pasta from semolina); E2.5–10—pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% of Enoki mushroom powder; M2.5–10—pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% of Maitake mushroom powder; PAC—phenolic acid content; TFC—total flavonoid content; TPC—total phenolic content. Different lowercase letters in the same column or capital letters in the same row indicate significantly different groups at $p \leq 0.05$.

Similarly, a higher TPC content was noted in the majority of the EtOH extracts of pasta supplemented with the studied mushrooms compared to the control sample. The highest TPC content was noted in the M2.5 sample.

Surprisingly, the samples of pasta fortified with the mushrooms and subjected to simulated digestion exhibited no increase in the TPC content relative to the control.

It is noteworthy that the highest content of phenolic acids, flavonoids, and total phenolic compounds was recorded in the in vitro-digested samples and, with some exceptions, this trend was statistically significant—see Table 1.

Table S2 shows phenolic compounds identified by LC-MS/MS in the dried Enoki and Maitake mushrooms. Twelve phenolic compounds in Maitake and thirteen in Enoki mushrooms were identified, but ten of these compounds identified in Enoki and three in Maitake were below the limit of determination of the lowest calibration point ($<0.5 \mu\text{g/g DW}$). The Maitake mushrooms exhibited a higher content of all the identified phenolic compounds than Enoki (Table S2). Fifteen phenolic compound standards were used in the LC-MS/MS analysis (Table S2). Detailed results are shown in Table 2. In the case of the crude pasta material (Table 2A), four polyphenols were detected in the control sample. Such polyphenols as rutin, salicylic acid, rosmarinic acid, and *t*-cinnamic acid were detected at $<0.5 \mu\text{g/g}$ in all the pasta samples.

The largest amounts of phenolic compounds were detected in the dried Maitake-supplemented pasta (M2.5, M5, M7.5, and M10), and they were represented by as many as eight compounds. Compared to all the mushroom-supplemented samples and the control, the following compounds with the highest concentrations were detected in the M10 sample: caffeic acid $0.83 \pm 0.14 \times 10^3 \text{ ng/g DW}$, syringic acid $1.70 \pm 0.24 \times 10^3 \text{ ng/g DW}$ (p value 0.0241), ellagic acid $1.22 \pm 0.09 \times 10^3 \text{ ng/g DW}$, and vanillin $0.67 \pm 0.09 \times 10^3 \text{ ng/g DW}$ —Table 2A.

3,4-dihydroxybenzoic acid was identified in all the Enoki- and Maitake-supplemented samples, with the highest value of $2.13 \pm 0.52 \times 10^3 \text{ ng/g DW}$ determined for the E10 sample. In turn, the content of this compound in the control was $<0.5 \mu\text{g/g DW}$. In addition, *p*-coumaric acid, ferulic acid, and sinapic acid were detected in all the dried Enoki-fortified pasta samples—see Table 2A. Most of the phenolic compounds identified in the raw materials were also detected in the EtOH, PBS, and GID extracts. The chromatographic analysis showed a wide variety of phenolic compounds present in the pasta samples supplemented with the dried Enoki and Maitake mushrooms. It is noteworthy that the highest content of phenolic compounds was determined in all the extracts (ethanolic, PBS, and GID) from the M10 sample. The largest number of compounds, i.e., as many as eleven, was determined in the ethanol extracts from the M10 sample, while six phenolic compounds were detected in the ethanolic extract from the control sample.

The smallest number of phenolic compounds, i.e., only four compounds, was found in the PBS extracts in all the Enoki-enriched pasta samples. Additionally, in the ethanolic extracts, the content of 3,4-dihydroxybenzoic acid in the pasta samples supplemented with Enoki and Maitake mushrooms was higher than in the control sample ($13.73 \pm 0.12 \text{ ng/g DW}$), reaching the highest value in the M10 sample ($148.37 \pm 3.67 \text{ ng/g DW}$). This value was statistically higher than in the control sample ($p = 0.0014$). The amount of syringic acid in the ethanolic extracts from the dried Maitake-fortified pasta increased with the increase in the dose of the mushroom, reaching the highest level in the M10 sample, which was 178% higher than that in the control. Noteworthy, additional phenolic compounds that were not present in the control sample were detected in the samples of pasta fortified with the tested mushrooms. These were ellagic acid, which was identified only in the Maitake-enriched pasta samples (raw material and ethanolic extracts), and naringenin (determined in the Maitake-enriched pasta samples)—see Table 2.

The glucan content in the pasta samples is shown in Table 3. The fortification with the studied mushrooms did not yield statistically significant differences in the total glucan content ($p = 0.0516$). All the Enoki-enriched pasta samples (E2.5, E5, E7.5, and E10) exhibited statistically significantly higher content of α -glucans than the control ($p = 0.000025$).

Table 2. LC-MS/MS-based qualitative–quantitative analysis of phenolic compounds in crude pasta samples (A) and in ethanolic (B), PBS (C), and GFD (D) extracts.

		A									
Name of polyphenolic compound		C	E2.5	E5	E7.5	E10	M2.5	M5	M7.5	M10	p-value
Polyphenolic compound µg (10 ³ mg/g DW)	3,4-Dihydroxybenzoic acid	<0.5	1.71 ± 0.24 ^{AB}	1.99 ± 0.43 ^{AB}	1.37 ± 0.13 ^{AB}	2.13 ± 0.51 ^{AB}	1.65 ± 0.29 ^{AB}	1.87 ± 0.25 ^{AB}	1.43 ± 0.15 ^{AB}	1.57 ± 0.35 ^{AB}	0.973
	Caffeic acid	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	0.51 ± 0.17 ^A	0.61 ± 0.09 ^{AB}	0.50 ± 0.38 ^{AB}	0.87 ± 0.14 ^{AB}	0.957
	Syringic acid	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	0.93 ± 0.11 ^{AB}	1.24 ± 0.11 ^{AB}	1.46 ± 0.13 ^{AB}	1.70 ± 0.24 ^{AB}	0.327
	Gallic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
	Roosin	<0.9	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	-
	Ellagic acid	n.d.	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1.93 ± 0.41 ^A	0.94 ± 0.09 ^A	1.22 ± 0.04 ^{AB}	0.185
	p-Coumaric acid	1.67 ± 0.03 ^{AB}	3.31 ± 0.30 ^{AB}	3.23 ± 0.46 ^{AB}	3.13 ± 0.41 ^{AB}	3.21 ± 0.44 ^{AB}	2.95 ± 0.26 ^{AB}	3.08 ± 0.19 ^{AB}	2.96 ± 0.19 ^{AB}	2.96 ± 0.52 ^{AB}	0.1307
	Salicylic acid	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	-
	Vanillin	0.56 ± 0.11 ^A	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	0.54 ± 0.04 ^{AB}	0.58 ± 0.12 ^{AB}	0.67 ± 0.04 ^{AB}	0.1365
	Ferulic acid	154.85 ± 15.21 ^{AB}	204.49 ± 34.75 ^{AB}	204.14 ± 34.11 ^{AB}	205.91 ± 26.54 ^{AB}	213.54 ± 26.67 ^{AB}	142.70 ± 21.67 ^{AB}	194.49 ± 17.45 ^{AB}	197.58 ± 15.76 ^{AB}	192.34 ± 30.57 ^{AB}	0.109
	Sinapic acid	27.50 ± 1.24 ^{AB}	31.80 ± 5.73 ^{AB}	32.38 ± 4.16 ^{AB}	34.98 ± 5.14 ^{AB}	33.23 ± 3.66 ^{AB}	24.55 ± 3.55 ^{AB}	29.00 ± 2.15 ^{AB}	29.46 ± 1.54 ^{AB}	26.50 ± 3.50 ^{AB}	0.1644
	Resorcinic acid	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	-
	o-Cinnamic acid	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	-
	Genistein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	-
	Naringenin	n.d.	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	-
		B (Ethanolic extract)									
Name of polyphenolic compound		Cx	E2.5	E5	E7.5	E10	M2.5	M5	M7.5	M10	p-value
Polyphenolic compound µg/g DW	3,4-Dihydroxybenzoic acid	15.73 ± 0.12 ^{AB}	15.77 ± 1.46 ^{AB}	20.33 ± 2.22 ^{AB}	21.17 ± 2.71 ^{AB}	41.13 ± 3.01 ^{AB}	34.83 ± 1.65 ^{AB}	63.67 ± 4.01 ^{AB}	64.60 ± 17.43 ^{AB}	148.37 ± 3.67 ^{AB}	0.0014
	Caffeic acid	<1	<1	<1	<1	17.60 ± 1.51 ^A	<1	22.87 ± 0.78 ^{AB}	21.13 ± 4.10 ^{AB}	40.27 ± 3.47 ^{AB}	0.368
	Syringic acid	155.05 ± 2.12 ^{AB}	84.00 ± 4.36 ^{AB}	71.30 ± 0.66 ^{AB}	67.63 ± 3.76 ^{AB}	63.90 ± 3.62 ^{AB}	146.07 ± 6.01 ^{AB}	305.43 ± 13.15 ^{AB}	297.00 ± 66.54 ^{AB}	426.10 ± 6.71 ^{AB}	0.0013
	Gallic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
	Roosin	<1	17.67 ± 3.76 ^A	9.07 ± 1.14 ^A	12.50 ± 2.34 ^A	65.20 ± 9.84 ^{AB}	23.10 ± 1.73 ^A	42.20 ± 2.50 ^{AB}	41.80 ± 12.87 ^{AB}	74.10 ± 1.20 ^{AB}	0.0024
	Ellagic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	70.87 ± 6.06 ^A	121.50 ± 9.03 ^{AB}	0.0022
	p-Coumaric acid	314.90 ± 6.06 ^{AB}	317.20 ± 4.17 ^{AB}	271.50 ± 4.12 ^{AB}	205.47 ± 8.15 ^{AB}	220.17 ± 10.45 ^{AB}	351.37 ± 7.66 ^{AB}	335.87 ± 11.54 ^{AB}	233.90 ± 41.31 ^{AB}	239.80 ± 10.21 ^{AB}	0.0020
	Salicylic acid	<1	<1	<1	<1	<1	12.13 ± 2.01 ^A	12.37 ± 2.85 ^A	13.02 ± 3.48 ^A	14.63 ± 1.56 ^A	0.1225
	Vanillin	112.17 ± 17.03 ^{AB}	121.27 ± 7.45 ^{AB}	100.72 ± 5.15 ^{AB}	98.50 ± 7.77 ^{AB}	126.70 ± 10.41 ^{AB}	140.57 ± 1.62 ^{AB}	161.33 ± 12.29 ^{AB}	145.23 ± 9.61 ^{AB}	166.42 ± 6.67 ^{AB}	0.0030
	Ferulic acid	1687.52 ± 85.25 ^{AB}	1778.40 ± 90.51 ^{AB}	1479.43 ± 12.91 ^{AB}	1311.22 ± 36.67 ^{AB}	1141.66 ± 36.07 ^{AB}	1673.33 ± 74.07 ^{AB}	1564.42 ± 11.12 ^{AB}	1014.70 ± 194.25 ^{AB}	1054.60 ± 15.38 ^{AB}	0.001
	Sinapic acid	177.77 ± 4.56 ^{AB}	293.23 ± 5.94 ^{AB}	279.07 ± 5.52 ^{AB}	279.27 ± 10.49 ^{AB}	134.27 ± 29.11 ^{AB}	130.30 ± 12.47 ^{AB}	303.47 ± 16.51 ^{AB}	211.73 ± 34.09 ^{AB}	170.97 ± 16.13 ^{AB}	0.002
	Resorcinic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17.63 ± 0.61	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
	o-Cinnamic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
	Genistein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
	Naringenin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	97.47 ± 2.14 ^{AB}	200.17 ± 0.53 ^{AB}	242.47 ± 47.13 ^{AB}	250.60 ± 9.24 ^{AB}

Table 2. Cont.

		C (PBS extracts)										
	Name of polyphenolic compound	C	E2.5	E5	E7.5	E10	M2.5	M5	M7.5	M10	p-value	
Polyphenolic compound (µg/g DW)	3,4-Dihydroxybenzoic acid	26.33 ± 5.08 ^{AB}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12.54 ± 0.62 ^{AB}	85.49 ± 6.87 ^{AB}	124.70 ± 3.12 ^{AB}	181.56 ± 17.24 ^{AB}	0.009	
	Citric acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	
	Springer acid	140.13 ± 16.36 ^{AB}	93.30 ± 28.95 ^{AB}	64.17 ± 16.60 ^{AB}	69.65 ± 0.40 ^{AB}	100.40 ± 25.31 ^{AB}	244.50 ± 22.50 ^{AB}	348.17 ± 4.74 ^{AB}	428.17 ± 14.17 ^{AB}	535.13 ± 42.14 ^{AB}	0.002	
	Docosan	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	
	Rutin	<1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<1	14.00 ± 2.86 ^{AB}	24.03 ± 3.04 ^B	0.083	
	Ellagic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	
	p-Coumaric acid	209.10 ± 16.45 ^{AB}	441.07 ± 86.44 ^{AB}	492.27 ± 64.14 ^{AB}	901.53 ± 25.52 ^{AB}	147.34 ± 47.43 ^{AB}	330.91 ± 24.92 ^{AB}	238.10 ± 3.58 ^{AB}	224.23 ± 3.75 ^{AB}	248.27 ± 15.34 ^{AB}	0.0613	
	Salicylic acid	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	-	
	Vanillin	69.90 ± 11.78 ^{AB}	256.20 ± 40.81 ^{AB}	306.13 ± 46.33 ^{AB}	255.80 ± 16.97 ^{AB}	164.13 ± 32.31 ^{AB}	107.50 ± 9.81 ^{AB}	113.67 ± 9.17 ^{AB}	126.61 ± 18.14 ^{AB}	162.17 ± 39.23 ^{AB}	0.0024	
	Ferulic acid	1247.23 ± 150.46 ^{AB}	1273.23 ± 24.71 ^{AB}	1211.20 ± 76.04 ^{AB}	754.10 ± 64.10 ^{AB}	1474.67 ± 366.68 ^{AB}	1141.80 ± 42.40 ^{AB}	1129.40 ± 40.74 ^{AB}	654.61 ± 24.44 ^{AB}	716.39 ± 51.69 ^{AB}	0.0045	
	Sinapic acid	48.57 ± 10.33 ^{AB}	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	27.37 ± 3.76 ^{AB}	n.d.	26.83 ± 0.35 ^{AB}	0.065
	Boscharinic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
	m-Cinnamic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
	Coumaric	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
Naringenin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	92.94 ± 4.92 ^{AB}	132.70 ± 3.00 ^{AB}	237.30 ± 9.68 ^{AB}	312.40 ± 27.29 ^{AB}	0.0156	
		D (GID samples)										
	Name of polyphenolic compound	C	E2.5	E5	E7.5	E10	M2.5	M5	M7.5	M10	p-value	
Polyphenolic compound (µg/g DW)	3,4-Dihydroxybenzoic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16.23 ± 7.88 ^A	-	
	Caffeic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	
	Springer acid	124.85 ± 6.52 ^{AB}	75.36 ± 5.23 ^{AB}	94.29 ± 76.91 ^{AB}	81.72 ± 7.17 ^{AB}	73.23 ± 3.11 ^{AB}	157.58 ± 6.57 ^{AB}	210.75 ± 7.76 ^{AB}	176.31 ± 66.15 ^{AB}	213.06 ± 101.60 ^{AB}	0.0613	
	Sulzlin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	
	Rutin	<1	n.d.	n.d.	<1	<1	<1	<1	<1	<1	-	
	Ellagic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	
	p-Coumaric acid	143.68 ± 2.14 ^{AB}	130.61 ± 5.00 ^{AB}	150.32 ± 9.08 ^{AB}	136.77 ± 7.46 ^{AB}	104.90 ± 5.31 ^{AB}	203.24 ± 7.15 ^{AB}	162.78 ± 5.92 ^{AB}	113.23 ± 43.78 ^{AB}	150.40 ± 58.90 ^{AB}	0.0172	
	Salicylic acid	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	-	
	Vanillin	124.85 ± 7.14 ^{AB}	203.84 ± 49.72 ^{AB}	231.31 ± 42.13 ^{AB}	218.70 ± 17.14 ^{AB}	104.04 ± 21.46 ^{AB}	220.15 ± 11.27 ^{AB}	230.56 ± 1.30 ^{AB}	133.36 ± 344.44 ^{AB}	261.36 ± 47.57 ^{AB}	0.0184	
	Ferulic acid	936.87 ± 4.13 ^{AB}	1005.18 ± 6.36 ^{AB}	1263.64 ± 10.28 ^{AB}	1095.45 ± 36.04 ^{AB}	1366.02 ± 39.24 ^{AB}	1362.98 ± 15.02 ^{AB}	1087.47 ± 40.70 ^{AB}	993.89 ± 26.42 ^{AB}	445.05 ± 47.74 ^{AB}	0.0019	
	Sinapic acid	68.26 ± 0.69 ^{AB}	78.03 ± 5.10 ^{AB}	125.38 ± 10.67 ^{AB}	79.29 ± 3.91 ^{AB}	116.31 ± 3.55 ^{AB}	80.71 ± 4.67 ^{AB}	80.31 ± 7.12 ^{AB}	51.46 ± 21.41 ^{AB}	75.15 ± 25.80 ^{AB}	0.0068	
	Boscharinic acid	<1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
	m-Cinnamic acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
	Coumaric	<1	151.75 ± 4.52 ^A	210.78 ± 112.61 ^A	193.13 ± 1.52 ^A	171.31 ± 4.77 ^A	181.79 ± 10.55 ^A	150.51 ± 7.59 ^A	151.55 ± 76.11 ^A	151.31 ± 51.12 ^A	122.91 ± 31.63 ^{AB}	0.2213
Naringenin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36.23 ± 1.64 ^{AB}	42.68 ± 0.40 ^{AB}	81.01 ± 27.36 ^{AB}	127.90 ± 31.63 ^{AB}	0.0772	

C—control (pasta from semolina), E2.5–10—pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% of Enoki mushroom powder, M2.5–10—pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% of Maitake mushroom powder. <0.5 (µg/g DW) below the limit of determination of the lowest calibration point, n.d.—not detected. Samples with different superscripts within a row (a, b, etc.) are significantly different at $p \leq 0.05$. Different capital letters in the same sample but different types of extract indicate significantly different groups at $p \leq 0.05$.

Table 3. Content of glucans in pasta fortified with dried Enoki and Maitake mushrooms.

Sample	Total Glucan (g/100 g)	α -Glucan (g/100 g)	β -Glucan (g/100 g)
C	0.26 \pm 0.02 ^a	0.05 \pm 0.01 ^a	0.21 \pm 0.02 ^{ac}
E2.5	0.28 \pm 0.01 ^a	0.09 \pm 0.01 ^a	0.18 \pm 0.01 ^{ab}
E5	0.25 \pm 0.01 ^a	0.07 \pm 0.01 ^d	0.18 \pm 0.01 ^{ab}
E7.5	0.24 \pm 0.01 ^a	0.07 \pm 0.01 ^{cd}	0.16 \pm 0.02 ^b
E10	0.25 \pm 0.01 ^a	0.06 \pm 0.01 ^{bcd}	0.19 \pm 0.01 ^{abc}
M2.5	0.25 \pm 0.01 ^a	0.06 \pm 0.01 ^{abc}	0.19 \pm 0.01 ^{abc}
M5	0.26 \pm 0.02 ^a	0.06 \pm 0.01 ^{abc}	0.20 \pm 0.02 ^{abc}
M7.5	0.28 \pm 0.01 ^a	0.06 \pm 0.01 ^{ab}	0.22 \pm 0.01 ^c
M10	0.26 \pm 0.02 ^a	0.05 \pm 0.01 ^{ab}	0.21 \pm 0.02 ^{ac}
p-value	0.0516	0.000025	0.000312

C—control (pasta from semolina); E2.5–10—pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% of Enoki mushroom powder, M2.5–10—pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% of Maitake mushroom powder. Samples with different superscripts within a column are significantly different at $p \leq 0.05$.

3.2. Antioxidant Activity

The antioxidant activities of the ethanolic, PBS, and GID extract samples from the studied pasta are shown in Table 4.

All the EtOH extracts from the mushroom-enriched pasta had higher ABTS^{•+} inhibition activity than the C sample. The highest ABTS^{•+} inhibition activity was exhibited by the M7.5 sample (0.90 \pm 0.14 mg TE/gDW), but these differences were not statistically significant.

The PBS extracts from the studied pasta had the highest antiradical activity against ABTS in the control sample (1.15 \pm 0.11 mg TE/gDW).

The GID samples from the dried Maitake- and Enoki-fortified pasta showed slightly higher ABTS^{•+} inhibition activity than the C sample (12.47 \pm 1.34 mg TE/gDW) except for the E2.5 and M2.5 samples. The highest value was found for the M7.5 sample (14.15 \pm 1.54 mg TE/gDW).

Additionally, the GID samples (with the exception of the E10 samples) exhibited statistically significant higher ABTS^{•+} inhibition activity than the ethanolic extracts—see Table 4.

Only a few ethanolic extracts showed low DPPH inhibition activity. As revealed by the analysis of the PBS extracts, the enrichment with the tested mushrooms had only a slight effect on the DPPH scavenging activity. It should be noted that the PBS extracts from the M7.5 and M10 samples had the highest DPPH inhibition activity (0.34 \pm 0.27 mg TE/gDW and 0.33 \pm 0.09 mg TE/gDW, respectively). The GID samples exhibited the highest antiradical activity against DPPH. The pasta supplemented with 10% of dried Maitake mushrooms showed slightly higher activity than the control (4.06 \pm 0.57 mg TE/gDW).

The ethanolic extracts from the dried Enoki and Maitake-fortified pasta had higher chelating activity than the control sample. The activity of the control sample (0.26 \pm 0.16 mg EDTA/gDW) was statistically significantly lower than that of the E10 sample, which reached the highest value (3.54 \pm 0.94 mg EDTA/gDW).

The highest CHP activity was exhibited by samples subjected to simulated digestion. All the dried Maitake-enriched samples and the sample fortified with 10% of dried Enoki mushrooms showed a higher ability to chelate transition metal ions than the control sample. It is noteworthy that this activity of the E10, M7.5, and M10 samples was statistically significant higher than that of the control. It should also be noted that all the GID extracts from the studied samples were characterized by statistically significant higher chelating power than the ethanolic extracts—see Table 4.

Table 4. Antioxidant properties of pasta fortified with dried Enoki and Maitake mushrooms.

Samples	ABTS (mg TE/g DW)			DPPH (mg TE/g DW)			CIP (mg EYTH/g DW)			RP (mg TE/g DW)		
	ETOH	PBS	GID	ETOH	PBS	GID	ETOH	PBS	GID	ETOH	PBS	GID
C	0.68 ± 0.04 ^{AB}	1.15 ± 0.11 ^{AB}	12.47 ± 1.34 ^{AB}	n.a.	0.25 ± 0.01 ^{AB}	4.05 ± 0.38 ^{AB}	0.26 ± 0.16 ^{AB}	n.a.	217.42 ± 8.46 ^{AB}	0.20 ± 0.02 ^{AB}	0.20 ± 0.08 ^{AB}	1.13 ± 0.06 ^{AB}
E2.5	0.86 ± 0.18 ^{AB}	0.68 ± 0.57 ^{AB}	12.10 ± 0.82 ^{AB}	0.64 ± 0.05 ^{AB}	0.29 ± 0.01 ^{AB}	3.49 ± 0.25 ^{AB}	0.34 ± 0.10 ^{AB}	n.a.	177.22 ± 15.46 ^{AB}	0.22 ± 0.04 ^{AB}	0.19 ± 0.08 ^{AB}	1.15 ± 0.05 ^{AB}
E5	0.84 ± 0.15 ^{AB}	1.04 ± 0.05 ^{AB}	13.14 ± 0.80 ^{AB}	n.a.	0.26 ± 0.19 ^A	2.65 ± 1.79 ^A	1.15 ± 0.20 ^{AB}	n.a.	184.82 ± 4.23 ^{AB}	0.26 ± 0.05 ^{AB}	0.20 ± 0.13 ^{AB}	1.18 ± 0.21 ^{AB}
E7.5	0.87 ± 0.03 ^{AB}	0.85 ± 0.82 ^{AB}	13.04 ± 0.18 ^{AB}	0.05 ± 0.01 ^{AB}	0.22 ± 0.01 ^{AB}	3.67 ± 0.30 ^{AB}	2.05 ± 1.01 ^{AB}	n.a.	178.17 ± 3.41 ^{AB}	0.41 ± 0.06 ^{AB}	0.27 ± 0.05 ^{AB}	1.24 ± 0.06 ^{AB}
E10	0.88 ± 0.26 ^{AB}	0.81 ± 0.05 ^{AB}	12.66 ± 0.27 ^{AB}	0.08 ± 0.01 ^{AB}	0.14 ± 0.08 ^{AB}	3.81 ± 0.47 ^{AB}	3.54 ± 0.94 ^{AB}	n.a.	268.61 ± 14.69 ^{AB}	0.49 ± 0.04 ^{AB}	0.43 ± 0.23 ^{AB}	1.29 ± 0.02 ^{AB}
M2.5	0.70 ± 0.05 ^{AB}	0.84 ± 0.02 ^{AB}	11.36 ± 1.63 ^{AB}	n.a.	0.22 ± 0.05 ^{AB}	3.66 ± 0.34 ^{AB}	0.88 ± 0.74 ^{AB}	n.a.	245.25 ± 6.19 ^{AB}	0.22 ± 0.05 ^{AB}	0.21 ± 0.10 ^{AB}	0.98 ± 0.03 ^{AB}
M5	0.82 ± 0.06 ^{AB}	0.96 ± 0.01 ^{AB}	12.67 ± 0.16 ^{AB}	n.a.	0.17 ± 0.06 ^{AB}	3.86 ± 0.39 ^{AB}	1.23 ± 0.85 ^{AB}	n.a.	225.60 ± 12.39 ^{AB}	0.26 ± 0.03 ^{AB}	0.16 ± 0.04 ^{AB}	1.13 ± 0.06 ^{AB}
M7.5	0.90 ± 0.14 ^{AB}	0.96 ± 0.12 ^{AB}	14.15 ± 1.54 ^{AB}	0.47 ± 0.15 ^A	0.34 ± 0.27 ^A	3.74 ± 0.39 ^{AB}	0.70 ± 0.59 ^{AB}	n.a.	302.30 ± 11.82 ^{AB}	0.25 ± 0.02 ^{AB}	0.19 ± 0.08 ^{AB}	1.14 ± 0.04 ^{AB}
M10	0.68 ± 0.06 ^{AB}	0.98 ± 0.12 ^{AB}	12.95 ± 0.63 ^{AB}	0.31 ± 0.23 ^{AB}	0.33 ± 0.10 ^{AB}	4.06 ± 0.57 ^{AB}	0.65 ± 0.75 ^{AB}	n.a.	282.99 ± 10.73 ^{AB}	0.53 ± 0.06 ^{AB}	0.50 ± 0.22 ^{AB}	1.38 ± 0.07 ^{AB}
p-value	0.2899	0.0342	0.1372	0.0944	0.2074	0.1679	0.3052	-	0.0001	0.0000002	0.0397	0.00000001

C—control (pasta from semolina), E2.5–10—pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% of Enoki mushroom powder, M2.5–10—pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% of Maitake mushroom powder, ABTS—radical scavenging ability against ABTS, DPPH—radical scavenging ability against DPPH, CIP—chelating power, RP—reducing power, n.a.—no activity. Different lowercase letters in the same column or capital letters in the same row indicate significantly different groups at $p \leq 0.05$.

All the ethanolic extracts from the Enoki- and Maitake-enriched pasta were characterized by a higher RP value, compared to the control sample (Table 4). The M10 sample exhibited the highest RP value (0.53 ± 0.08 mg TE/gDW), which was 165% higher than that in the control. The reducing power of some PBS extracts from the fortified pasta was increased, but the results were not statistically significantly different.

Some in vitro digested samples from the mushroom-fortified pasta showed higher reducing power than the control sample. The RP value in the E5, E7.5, and M10 samples was statistically significantly higher than the RP value in the control sample. The highest RP was exhibited by the M10 and E7.5 samples (1.38 ± 0.07 mg TE/gDW and 1.34 ± 0.06 mg TE/gDW, respectively). The RP value increased by 22.1% and 18.5%, respectively, compared to the control.

It should also be noted that all the GID extracts from the studied samples had a statistically significantly higher RP value than the PBS extracts (Table 4).

The potential of the samples to inhibit lipoxygenase and cyclooxygenase 2 enzymes (proinflammatory enzymes) was evaluated in the present study as well (Table 5). The ethanolic extract from pasta fortified with 2.5 and 5% of dried Enoki mushrooms had higher LOX inhibition activity ($EC_{50} = 0.17 \pm 0.03$ mg/mL) than the control ($EC_{50} = 0.52 \pm 0.13$ mg/mL). The control PBS extract sample was characterized by no LOX inhibition, while the fortified pasta extracts had this activity (EC_{50} from 0.83 ± 0.27 mg/mL for E7.5 to 0.33 ± 0.08 mg/mL for M10).

Table 5. Lipoxygenase and cyclooxygenase-2 inhibitory activity of extracts from pasta fortified with dried Enoki and Maitake mushrooms.

Samples	LOXI (EC_{50} mg/mL)			COX2I (EC_{50} mg/mL)		
	ETOH	PBS	GID	ETOH	PBS	GID
C	0.523 ± 0.127^a	n.a.	0.104 ± 0.003^a	0.245 ± 0.055^a	n.a.	0.221 ± 0.027^{ab}
E2.5	0.169 ± 0.026^{bAB}	0.424 ± 0.108^{nA}	0.103 ± 0.006^{abB}	0.279 ± 0.058^a	n.a.	0.180 ± 0.015^a
E5	0.166 ± 0.027^{bAB}	0.583 ± 0.380^{nA}	0.099 ± 0.003^{abcB}	0.221 ± 0.020^a	n.a.	0.201 ± 0.009^{ab}
E7.5	0.238 ± 0.023^{abAB}	0.830 ± 0.273^{nA}	0.095 ± 0.001^{bcB}	0.192 ± 0.009^a	n.a.	0.246 ± 0.010^b
E10	0.244 ± 0.039^{ab}	0.371 ± 0.154^a	0.093 ± 0.001^c	0.210 ± 0.010^a	n.a.	0.209 ± 0.023^{ab}
M2.5	0.235 ± 0.025^{abAB}	0.507 ± 0.065^{nA}	0.095 ± 0.002^{bcB}	0.255 ± 0.027^a	n.a.	0.215 ± 0.021^{ab}
M5	0.236 ± 0.015^{abAB}	0.498 ± 0.211^{nA}	0.096 ± 0.003^{abcB}	0.276 ± 0.066^a	n.a.	0.204 ± 0.017^{ab}
M7.5	0.212 ± 0.019^{abAB}	0.491 ± 0.011^{nA}	0.096 ± 0.003^{abcB}	0.339 ± 0.174^a	n.a.	0.232 ± 0.022^b
M10	0.236 ± 0.011^{abAB}	0.329 ± 0.083^{nA}	0.095 ± 0.001^{bcB}	0.201 ± 0.031^a	n.a.	0.225 ± 0.007^{ab}
p-value	0.0016	0.1392	0.0035	0.0919	-	0.0147

C—control (pasta from semolina); E2.5–10—pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% of Enoki mushroom powder, M2.5–10—pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% of Maitake mushroom powder, LOXI—lipoxygenase inhibition; COX2I—cyclooxygenase-2 inhibition; n.a.—no activity. Different lowercase letters in the same column or capital letters in the same row indicate significantly different groups at $p \leq 0.05$. Positive control (Quercetin): LOXI IC_{50} mg/mL = 0.1 ± 0.002 ; COXI IC_{50} mg/mL = 0.0026 ± 0.0001 .

In turn, the GID extracts showed higher LOX inhibition activity than the ethanol and PBS extracts. Additionally, the pasta fortified with Enoki (E7.5 and E10) and Maitake (M2.5 and M10) subjected to simulated digestion exhibited a statistically significantly higher LOX inhibitory ability than the control ($p = 0.0035$)—Table 5. Additionally, with the exception of the C and E10 samples, the difference in the LOX inhibitory ability between the PBS and GID extracts was statistically significant—see Table 5.

The PBS extracts of the control and dried Enoki- and Maitake-fortified pasta samples exhibited no ability to inhibit COX-2 (Table 5), while the ethanol extracts did not differ statistically significantly in this parameter.

Unfortunately, no GID-fortified pasta sample had statistically significantly higher COX-2 inhibition activity compared to the control.

Additionally, no statistically different ability to inhibit COX-2 was found between the ethanol extracts and the samples subjected to simulated digestion (Table 5).

3.3. Anti-Cancer Properties

After the gastric digestion (GD) and gastrointestinal digestion (GID) processes, the cytotoxic activity against the AGS and HT29 cancer cell lines was assessed in the pasta samples (control and fortified). The results are shown in Table 6. No significant differences in the activity against the HT29 cancer line were found between the tested GID groups, although the antiproliferative activity of these samples was higher than the activity of the GD samples.

Table 6. Anti-cancer properties of the pasta fortified with dried Enoki and Maitake mushrooms.

Samples	Anti-Cancer Properties EC50 mg/mL	
	GD (Against AGS)	GID (Against HT29)
C	0.18 ± 0.01 ^{ab}	0.07 ± 0.01 ^a
E2.5	0.24 ± 0.04 ^c	0.07 ± 0.01 ^a
E5	0.19 ± 0.02 ^{abc}	0.07 ± 0.01 ^a
E7.5	0.20 ± 0.01 ^{abc}	0.08 ± 0.01 ^a
E10	0.21 ± 0.01 ^{bc}	0.08 ± 0.01 ^a
M2.5	0.16 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.01 ^a
M5	0.20 ± 0.01 ^{abc}	0.07 ± 0.01 ^a
M7.5	0.18 ± 0.01 ^{ab}	0.07 ± 0.01 ^a
M10	0.19 ± 0.02 ^{ab}	0.07 ± 0.01 ^a
p-value	0.0031	0.6849

C—control (pasta from semolina); E2.5–10—pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% of Enoki mushroom powder, M2.5–10—pasta from semolina flour fortified with 2.5–10% of Maitake mushroom powder, GD—gastrically digested samples, GID—gastrointestinally digested samples, AGS—Human Caucasian gastric adenocarcinoma, HT 29—Human Caucasian colon adenocarcinoma. Samples with different superscripts within a column are significantly different at $p \leq 0.05$.

4. Discussion

In the literature, there are some examples of the pro-health potential of Enoki and Maitake mushrooms indicating that this raw material is a good source of biologically active compounds and can potentially be used in the production of some functional food [8].

In our previous study, we demonstrated that durum wheat pasta supplemented with dried Maitake and Enoki mushrooms (in the amount of 2.5, 5, 7.5, and 10.0%) had high nutritional value and acceptable culinary and organoleptic properties [11]. Hence, the objective of this study was to assess the effect of the addition of dried Maitake and Enoki mushrooms on the content of bioactive compounds and some health-enhancing properties of pasta.

Given the literature data on bioactive compounds and the biological properties of extracts from Maitake and Enoki mushrooms, the hypothesis that the enrichment of pasta with powder from these mushrooms may have an impact on the biological activity of this food product seems justified.

Glucans are bioactive compounds present in edible mushrooms. As reported by McClear and Draga [24], the content of total, α -glucans, and β -glucans in Maitake was 32.4–18.55 g/100 g, 1.3 g/100 g, and 32.1–35.1 g/100 g, respectively. However, in a study carried out by Shin and Lee [25], the content of glucans in Maitake mushrooms was in the range of 8.25–9.94 g/100 g (total glucans), 4.57–5.28 g/100 g (α -glucans), and 3.58–5.00 g/100 g (β -glucans), depending on the extraction temperature. In turn, the literature data showed that the content of glucans in Enoki mushrooms was 19.9–26.29%, 0.55–0.7%, and 20–25.71% (total glucans, α -glucans, and β -glucans, respectively) [24,26]. As demonstrated by Nordiana et al. 2019 [27], the addition of Oyster mushrooms to pasta resulted in an increase in the β -glucan content. In the present study, the addition of the dried Enoki and Maitake mushrooms did not increase the content of total and β -glucans in the pasta, while all the Enoki-enriched samples (E2.5, E5, E7.5 and E10) ex-

hibited statistically significant higher amounts of α -glucans in comparison to the control—see Table 3.

Probably, the relationships obtained in this study result from interactions of glucans with other biomolecules present in food matrices, e.g., proteins or lipids, as reported by other researchers [28,29].

Phenolic compounds are an important group of bioactive ingredients of mushrooms determining many health-promoting properties, which are mainly related to their antioxidant activity. Based on literature data, phenolic acids are the major phenolic compounds contained in extracts from Enoki mushrooms. Namely, four phenolic acids (gallic, protocatechuic, chlorogenic, and caffeic acids) and quercetin were detected in Enoki samples using the HPLC method [30]. In turn, as reported by Kršmanović et al. [31], LC-MS/MS detected the presence of *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, *p*-coumaric, and quinic acids as well as daidzein and genistein in *Flammulina velutipes* extracts. However, the LC-MS/MS analysis performed in this study showed the presence of thirteen compounds in Enoki, with the largest amounts of 3,4-dihydroxybenzoic, caffeic, and ferulic acids—see Table S2.

The profile of phenolic compounds in the pasta fortified with Enoki in the present study partially confirmed the above data, as larger amounts of 3,4-dihydroxybenzoic acid (crude pasta and ethanolic extracts), *p*-coumaric acid (crude pasta), ferulic acid (crude pasta, GID samples), sinapic acid (crude pasta, ethanolic extracts, and GID samples), and genistein (GID samples) were identified in the pasta fortified with this mushroom than in the control—see Table 2. Maitake extracts have also been shown to be a good source of antioxidant phenolic compounds. An analysis of phenolic compounds with the UHPLC-DAD technique showed the presence of protocatechuic acid, catechol, and vanillin in Maitake mushroom extracts [32]. In a study reported by Kim et al. [33], the UPLC system identified the following phenolic compounds in Maitake: caffeic acid, chlorogenic acid, and *p*-coumaric acid as well as kaempferol, naringin, and hesperidin. In turn, in a study conducted with HPLC methods, Lee et al. [34] identified high amounts of phenolic compounds in Maitake, i.e., protocatechuic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, hesperidin, benzoic acid, *o*-coumaric acid, myricetin, *t*-cinnamic acid, naringenin, formononetin, biochanin A, *b*-resorcylic acid, naringin, kaempferol, veratric acid, and very small amounts of vanillin and rutin. The LC-MS/MS analysis performed in the present study confirmed the content of twelve phenolic compounds in Maitake: 3,4-dihydroxybenzoic, caffeic, syringic, ellagic, *p*-coumaric, salicylic, ferulic, sinapic acids and rutin, vanillin, genistein, and naringenin (Table S2).

In this study, the supplementation of the pasta with Maitake contributed to an increase in the content of a large number of phenolic compounds (3,4-dihydroxybenzoic acid, caffeic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid); in addition, compounds that were not detected in the control were found in the Maitake-supplemented pasta (ellagic acid and naringenin)—see Table 2. Although the content of these compounds in the fortified pasta samples increased, compared to the control sample, there were no statistically significant differences between the samples enriched with the different doses of the mushrooms, which is a puzzling finding. A clearly dose-dependent relationship was noted only in the case of the naringenin content, and the M2.5 sample was statistically different from the M10 sample—see Table 2.

There are few literature data on the pro-health properties (mainly antioxidant activity associated with changes in the content of phenolic compounds) of flour products enriched with mushroom powder. As reported by Lu et al. [35], the enrichment of bread with powder from three mushrooms (white button, shiitake, and porcini) in the amount of 5%, 10%, and 15% contributed to an increase in antioxidant activity (DPPH and ORAC) and phenolic content in the analyzed product. Similarly, in their study, Lu et al. [36] added white button, shiitake, and porcini mushrooms to pasta in the amount of 5%, 10%, and 15%. There was no increase in TPC in the case of pasta enriched with 5% and 10% of shiitake, whereas the content of phenolic compounds in all the other variants of pasta enriched with the mushrooms was higher than in the control [36]. All the variants of mushroom powder addition to the pasta produced an increase in the antioxidant activity (ORAC), but

the DPPH method showed an increase in antioxidant activity only in pasta with the 10% and 15% addition of white button mushrooms and the 15% supplementation with shiitake and porcini mushrooms [36]. However, the effect of *in vitro* digestion on these properties was not considered in these studies. Although analyses of samples subjected to simulated digestion are the most valuable tools for examining the effect on the human organism, tests of other extracts, i.e., ethanolic, also give some knowledge, as other compounds can also be extracted from the food product analyzed in this way. PBS extracts, in turn, are regarded as “before digestion” trials showing the effect of the simulated digestion on pro-health activities. Similarly, in the present study, the ethanolic and PBS extracts from the enriched pasta had higher TPC content (with some exceptions) than the control sample—see Table 1. The ethanolic extracts from the Maitake- and Enoki-supplemented pasta also showed higher antioxidant activity (especially chelation power and reducing power) than the control—see Table 4.

In the present study, the pasta was subjected to simulated *in vitro* digestion. Most importantly, it was indicated that the gastrointestinally digested samples exhibited significantly higher content of polyphenolic compounds and antioxidant activities in comparison to the ethanolic and PBS extracts—see Tables 1 and 4. In turn, the *in vitro* digestion process enhanced the potential anti-inflammatory activity (LOX and COX2 inhibition) significantly in comparison to the PBS extracts—see Table 5. In fact, PBS samples are regarded as “before digestion”, because ethanolic extracts are “chemical extracts”.

Simulated *in vitro* digestion was used by Wang et al. [37], who investigated the properties of pasta enriched with shiitake mushrooms. As in our research, the simulated digestion process caused an increase in the content of phenolic compounds and antioxidant properties (except for ABTS in samples enriched with 5% and 10%) both in the control pasta and in the mushroom-enriched samples [37]. The same trend was observed by Wang et al. [38] in the case of pasta fortified with white button and oyster mushrooms. The authors explain this effect by the simulated digestion-induced release of bioactive compounds (especially phenolic compounds) associated with the cell wall or conjugated with macronutrients in the food matrix. Probably, a similar effect connected with some antioxidant and potentially anti-inflammatory activities was observed in the present study—see Tables 4 and 5.

The addition of shiitake mushrooms, white button mushrooms, and oyster mushrooms in the above-mentioned research also increased the TPC content and antioxidant activity (ABTS and FRAP) in samples subjected to simulated digestion relative to control pasta samples [37,38].

The analysis of samples subjected to simulated digestion in this study demonstrated that the addition of the mushrooms caused an increase in TPC only in the E5 sample. In the case of PAC, most of the enriched pasta samples (except E7.5, E10, and M2.5) contained greater amounts of phenolic acids than the control (the highest PAC content was recorded in M7.5)—see Table 1. The potentially bioavailable fraction of phenols (GID samples) from the Maitake- and Enoki-enriched pasta also showed statistically significantly higher antioxidant activities, i.e., chelating power (E10, M7.5 and M10 samples) and reducing power (E5, E7.5, and M10 samples), in comparison to the control—see Table 4.

Dissanayake et al. [39] demonstrated that Maitake mushrooms exhibited anti-inflammatory properties through the inhibition of COX activity as well as antioxidant activity (LPO). Similarly, some studies showed anti-inflammatory properties of Enoki via the inhibition of NO as well as TNF- α production [40].

The current study confirmed the potential anti-inflammatory abilities of the enriched pasta measured as LOX and COX-2 inhibition (Table 5). The EtOH extracts from pasta supplemented with 2.5 and 5% of dried Enoki mushrooms showed a higher level of LOX inhibition than the C sample. Importantly, the control sample of the PBS extract was characterized by no LOX inhibition, while the fortified pasta extracts had this activity. Most importantly, the samples of pasta fortified with Enoki (E7.5 and E10) and Maitake (M10)

and exposed to simulated digestion showed statistically significantly higher LOX inhibition activity than the control—see Table 5.

Some studies have indicated that single molecules and mixtures of bioactive compounds may differ in terms of biological activity, and the activity of extracts cannot be considered as the sum of the activities of individual components. Therefore, the inference of the bioactivity of extracts considering only their composition may lead to wrong conclusions, as an important role in the prediction of biological activity may be played by changes occurring during digestion and/or interactions with various food matrix components. Although further research on the mechanisms of action of biologically active compounds (including phenolic compounds) is needed, the attempts made so far to explain these phenomena indicate mutual interactions (synergistic, additive, or antagonistic) between compounds determining the biological activity of extracts [41,42].

Since we additionally assume the possibility of interactions with the matrix (semolina), the biological activity of mushroom-enriched pasta extracts can be modified by such interactions between various bioactive compounds, and this is probably the cause of the lack of a direct relationship between the amount of the fungus addition and the analyzed biological activities (including antioxidant or anti-inflammatory activity reflected in LOX and COX2 inhibition). Similarly, the lack of a direct relationship of biological activity with the dose of an ingredient rich in bioactive compounds, i.e., phenolic compounds, was also noted by other researchers. For example, in a study carried out by Jakubczyk et al. [43], the addition of 1–5 g/100 g of coffee to bread had a positive effect on the inhibition of enzymes involved in the pathogenesis of metabolic syndrome, but no dose-dependent effect was demonstrated. The highest ACE inhibition was achieved after the addition of 4% of coffee, while the greatest lipase inhibition was shown in the 2% coffee supplementation variant. Similarly, in studies on bread fortified with quinoa leaves, analyses performed after *in vitro* digestion revealed an unexpected effect on several antioxidant activities (i.e., larger doses did not increase the activity) [44].

The changes between predicted and experimental results were explained as the possibility that the bread matrix interacted with proteins and starch, which was confirmed by the chromatographic analyses carried out by the authors. Since pasta is a protein- and carbohydrate-rich flour product, the mechanism described by Świeca et al. [44] may be responsible for the relationships observed in the present study as well.

There are some studies reporting the anti-cancer properties of Maitake [45]. As shown by Ukaegbu et al. [46], acetone extracts from Enoki showed potent activity against breast cancer cell lines. Some studies have indicated that some anti-cancer properties of Enoki may be connected with the content of phenolic compounds, e.g., protocatechuic, *p*-coumaric, and ellagic acids [47]. The phenolic content in extracts from pasta enriched with parsley leaves was also correlated with anti-cancer activity (against breast carcinoma cells) by Sęczyk et al. [48], who additionally reported a cytostatic effect of a relatively high concentration of the extracts. However, in the present study, the fortification of the pasta with Enoki and Maitake mushrooms did not result in enhanced anti-cancer properties, although some fortified pasta (especially the Maitake-enriched samples) contained higher amounts of some phenolic compounds (Tables 2 and 6).

5. Conclusions

In conclusion, both mushrooms (Enoki and Maitake) analyzed in this study can be used for the fortification of semolina pasta to achieve a healthier product. Particularly important for the pro-health properties is the activity of the potentially bioavailable fraction of bioactive compounds. Therefore, when choosing the dose of these fungi to be added to pasta, the biological activity of this fraction is mainly important. It is noteworthy that the *in vitro* digested E10, M7.5, and M10 samples had statistically significantly higher antioxidant activities (chelating power), and the E5, E7.5, and M10 samples exhibited higher reducing power than the control. Additionally, the E7.5, E10, and M10 samples had statistically significantly higher LOX inhibition activity than the control. Despite

the lack of a direct relationship between the mushroom supplementation dose and the biological activities in some cases, the present results indicate the greatest potential in terms of the pro-health effect of pasta samples fortified with the largest amount of the analyzed mushrooms. Although further studies (especially *in vivo*) are needed, the fortification of pasta with 7.5%, and 10% of Enoki mushrooms and with 10% of Maitake mushrooms can be recommended.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/app13148183/s1>, Table S1. Parameters of all the molecules monitored with the MRM method. Table S2. Phenolic compounds profile in dried mushrooms (Enoki and Maitake) identified using the LC-MS/MS technique.

Author Contributions: Conceptualization, U.Z. and M.S.-T.; methodology, U.Z., M.S.-T., U.S., D.D. and K.T.; formal analysis, U.Z. and M.S.-T.; investigation, U.Z., M.S.-T., U.S., D.D. and K.T.; data curation, U.Z., M.S.-T., U.S. and K.T.; writing—original draft preparation, M.S.-T. and U.Z.; writing—review and editing, M.S.-T. and U.Z.; supervision, U.Z.; project administration, U.Z. and M.S.-T.; funding acquisition, U.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financially supported by the grant of the Ministry of Science and Higher Education in Poland (grant number “DWD/3/58/2019 “Implementation doctorate I”).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All relevant data are included in the article.

Acknowledgments: Special thanks to Marta Czajka, Monika Stepień-Kaszak and Edyta Urbanek for their support and understanding during this research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Rajewska, J.; Balaśńska, B. Związki Biologicznie Aktywne Zawarte w Grzybach Jadalnych i Ich Korzystny Wpływ Na Zdrowie Biologically Active Compounds of Edible Mushrooms and Their Beneficial Impact on Health. *Post. Hig. Med. Dosw.* **2004**, *58*, 352–357.
- Blagodatski, A.; Yatsunskaya, M.; Mikhailova, V.; Tiasto, V.; Kagansky, A.; Katanaev, V.L. Medicinal Mushrooms as an Attractive New Source of Natural Compounds for Future Cancer Therapy. *Oncotarget* **2018**, *9*, 29259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Glavasis, I. Bioactive Fungal Polysaccharides as Potential Functional Ingredients in Food and Nutraceuticals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *26*, 162–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ren, L.; Perera, C.; Hemar, Y. Antitumor Activity of Mushroom Polysaccharides: A Review. *Food Funct.* **2012**, *3*, 1118–1130. [[CrossRef](#)]
- Patel, S.; Goyal, A. Recent Developments in Mushrooms as Anti-Cancer Therapeutics: A Review. *J. Biotech.* **2012**, *2*, 1–15. [[CrossRef](#)]
- Sissons, M. Development of Novel Pasta Products with Evidence Based Impacts on Health—A Review. *Foods* **2022**, *11*, 123. [[CrossRef](#)]
- Reis, F.S.; Martins, A.; Vasconcelos, M.H.; Morales, P.; Ferreira, I.C.F.R. Functional Foods Based on Extracts or Compounds Derived from Mushrooms. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *66*, 48–62. [[CrossRef](#)]
- Banerjee, D.K.; Das, A.K.; Banerjee, R.; Pateiro, M.; Nanda, P.K.; Gadekar, Y.P.; Biswas, S.; McClements, D.J.; Lorenzo, J.M. Application of Enoki Mushroom (*Flammulina Velutipes*) Stem Wastes as Functional Ingredients in Goat Meat Nuggets. *Foods* **2020**, *9*, 432. [[CrossRef](#)]
- Rangel-Vargas, E.; Rodriguez, J.A.; Domínguez, R.; Lorenzo, J.M.; Sosa, M.E.; Andrés, S.C.; Rosmini, M.; Pérez-Alvarez, J.A.; Teixeira, A.; Santos, E.M. Edible Mushrooms as a Natural Source of Food Ingredient/Additive Replacer. *Foods* **2021**, *10*, 2687. [[CrossRef](#)]
- Stawirńska, A.; Solowij, B.G.; Radzki, W.; Fornal, E. Wheat Bread Supplemented with *Agaricus Bisporus* Powder: Effect on Bioactive Substances Content and Technological Quality. *Foods* **2022**, *11*, 3786. [[CrossRef](#)]
- Szydłowska-Tutaj, M.; Złotek, U.; Wójtowicz, A.; Combrzyński, M. The Effect of the Addition of Various Species of Mushrooms on the Physicochemical and Sensory Properties of Semolina Pasta. *Food Funct.* **2022**, *13*, 8425–8435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Szydłowska-Tutaj, M.; Szymanowska, U.; Tutaj, K.; Domagała, D.; Złotek, U. The Addition of Reishi and Lion’s Mane Mushroom Powder to Pasta Influences the Content of Bioactive Compounds and the Antioxidant, Potential Anti-Inflammatory, and Anticancer Properties of Pasta. *Antioxidants* **2023**, *12*, 738. [[CrossRef](#)]

13. Minekus, M.; Almiringer, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; et al. A Standardised Static In Vitro Digestion Method Suitable for Food—an International Consensus. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1113–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sęczyk, E.; Sugię, D.; Świeca, M.; Gawlik-Dziki, U. The Effect of In Vitro Digestion, Food Matrix, and Hydrothermal Treatment on the Potential Bioaccessibility of Selected Phenolic Compounds. *Food Chem.* **2021**, *344*, 128581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Cessa, G. *Polish Pharmacopoeia*, 12th ed.; Polish Pharmaceutical Society: Warsaw, Poland, 2020.
16. Lamaison, J.L.; Carnet, A. Teneurs En Principaux Flavonoïdes Des Fleurs de *Crataegus Monogyna* Jacq et de *Crataegus Laevigata* (Poiret D. C) En Fonction de La Végétation. *Plantes Med. Phyther.* **1990**, *25*, 315–320.
17. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158. [[CrossRef](#)]
18. Zuchowski, J.; Kapusta, I.; Szajwaj, B.; Jończyk, K.; Oleszek, W. Phenolic Acid Content of Organic and Conventionally Grown Winter Wheat. *Cereal Res. Commun.* **2009**, *37*, 189–197. [[CrossRef](#)]
19. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [[CrossRef](#)]
20. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
21. Oyaizu, M. Studies on Products of Browning Reaction. Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *Jpn. J. Nutr. Diet.* **1986**, *44*, 307–315. [[CrossRef](#)]
22. Guo, L.; Hamedy, P.A.; Li, B.; Hou, H.; Zhang, Z.; Zhao, X.; FitzGerald, R.J. Food Protein-Derived Chelating Peptides: Biofunctional Ingredients for Dietary Mineral Bioavailability Enhancement. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, *37*, 92–105. [[CrossRef](#)]
23. Szymancowska, U.; Karas, M.; Zlotek, U.; Jakubczyk, A. Effect of Fortification with Raspberry Juice on the Antioxidant and Potentially Anti-Inflammatory Activity of Wafers Subjected to In Vitro Digestion. *Foods* **2021**, *10*, 791. [[CrossRef](#)]
24. McCleary, B.V.; Draga, A. Measurement of β -Glucan in Mushrooms and Mycelial Products. *J. AOAC Int.* **2016**, *99*, 364–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shin, Y.; Lee, S.C. Antioxidant Activity and β -Glucan Contents of Hydrothermal Extracts from Maitake (*Grifola frondosa*). *Food Sci. Biotechnol.* **2014**, *23*, 277–282. [[CrossRef](#)]
26. Mengkontanawat, N.; Wongekalak, L. Effect of Blanching on β -Glucan Content of Native Mushrooms in Thailand. *J. Agric. Technol.* **2015**, *11*, 2227–2237.
27. Nordiana, A.B.; Wan Rosli, W.I.; Wan Amir Nizam, W.A. The Effect of Oyster Mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) Flour Incorporation on the Physicochemical Quality and Sensorial Acceptability of Pasta. *Int. Food Res. J.* **2019**, *26*, 1249–1257.
28. Wu, X.; Boulos, S.; Syryamina, V.; Nyström, L.; Yulikov, M. Interaction of Barley β -Glucan with Food Dye Molecules—An Insight from Pulse Dipolar EPR Spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* **2023**, *309*, 120698. [[CrossRef](#)]
29. Beachie, R.T.; Commandeur, M.M.B.; Abioye, R.O.; Capuano, E.; Oliviero, T.; Fogliano, V.; Udenigwe, C.C. β -Glucan Interaction with Lentil (*Lens culinaris*) and Yellow Pea (*Pisum sativum*) Proteins Suppresses Their In Vitro Digestibility. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 10630–10637. [[CrossRef](#)]
30. Zhang, Z.; Jin, Q.; Lv, G.; Fan, L.; Pan, H.; Fan, L. Comparative Study on Antioxidant Activity of Four Varieties of *Flammulina Velutipes* with Different Colour. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2013**, *48*, 1057–1064. [[CrossRef](#)]
31. Krsmanović, N.; Rašeta, M.; Mišković, J.; Bekvalac, K.; Bogovac, M.; Karaman, M.; Isikhuemhen, O.S. Effects of UV Stress in Promoting Antioxidant Activities in Fungal Species *Trametes versicolor* (L.) Lloyd and *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer. *Antioxidants* **2023**, *12*, 302. [[CrossRef](#)]
32. Bach, F.; Zielinski, A.A.F.; Helm, C.V.; Maciel, G.M.; Pedro, A.C.; Stafussa, A.P.; Ávila, S.; Haminiuk, C.W.I. Bio Compounds of Edible Mushrooms: In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Lat* **2019**, *107*, 214–220. [[CrossRef](#)]
33. Kim, J.H.; Lim, S.R.; Jung, D.H.; Kim, E.J.; Sung, J.; Kim, S.C.; Choi, C.H.; Kang, J.W.; Lee, S.J. *Grifola frondosa* Extract Containing Bioactive Components Blocks Skin Fibroblastic Inflammation and Cytotoxicity Caused by Endocrine Disrupting Chemical, Bisphenol A. *Nutrients* **2022**, *14*, 3812. [[CrossRef](#)]
34. Lee, J.S.; Park, S.Y.; Thapa, D.; Choi, M.K.; Chung, I.M.; Park, Y.J.; Yong, C.S.; Choi, H.G.; Kim, J.A. *Grifola frondosa* Water Extract Alleviates Intestinal Inflammation by Suppressing TNF- α Production and Its Signaling. *Exp. Mol. Med.* **2010**, *42*, 143–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lu, X.; Brennan, M.A.; Guan, W.; Zhang, J.; Yuan, L.; Brennan, C.S. Enhancing the Nutritional Properties of Bread by Incorporating Mushroom Bioactive Compounds: The Manipulation of the Pre-Dictive Glycaemic Response and the Phenolic Properties. *Foods* **2021**, *10*, 731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lu, X.; Brennan, M.A.; Serventi, L.; Liu, J.; Guan, W.; Brennan, C.S. Addition of Mushroom Powder to Pasta Enhances the Antioxidant Content and Modulates the Predictive Glycaemic Response of Pasta. *Food Chem.* **2018**, *264*, 199–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Wang, L.; Zhao, H.; Brennan, M.; Guan, W.; Liu, J.; Wang, M.; Wen, X.; He, J.; Brennan, C. In Vitro Gastric Digestion Antioxidant and Cellular Radical Scavenging Activities of Wheat-Shiitake Noodles. *Food Chem.* **2020**, *330*, 127214. [[CrossRef](#)]
38. Wang, L.; Brennan, M.A.; Guan, W.; Liu, J.; Zhao, H.; Brennan, C.S. Edible Mushrooms Dietary Fibre and Antioxidants: Effects on Glycaemic Load Manipulation and Their Correlations Pre- and Post-Simulated In Vitro Digestion. *Food Chem.* **2021**, *351*, 129320. [[CrossRef](#)]

39. Dissanayake, A.A.; Zhang, C.R.; Mills, G.L.; Nair, M.G. Cultivated Maitake Mushroom Demonstrated Functional Food Quality as Determined by In Vitro Bioassays. *J. Funct. Foods* **2018**, *44*, 79–85. [[CrossRef](#)]
40. Gunawardena, D.; Bennett, L.; Shanmugam, K.; King, K.; Williams, R.; Zabar, D.; Head, R.; Ooi, L.; Gyengesi, E.; Münch, G. Anti-Inflammatory Effects of Five Commercially Available Mushroom Species Determined in Lipopolysaccharide and Interferon- γ Activated Murine Macrophages. *Food Chem.* **2014**, *148*, 92–96. [[CrossRef](#)]
41. Habza-Kowalska, E.; Gawlik-Dziki, U.; Dziki, D. Mechanism of Action and Interactions between Thyroid Peroxidase and Lipoxigenase Inhibitors Derived from Plant Sources. *Biomolecules* **2019**, *9*, 663. [[CrossRef](#)]
42. Habza-Kowalska, E.; Kaczor, A.A.; Bártuzi, D.; Pilat, J.; Gawlik-Dziki, U. Some Dietary Phenolic Compounds Can Activate Thyroid Peroxidase and Inhibit Lipoxigenase—Preliminary Study in the Model Systems. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Jakubczyk, A.; Świeca, M.; Gawlik-Dziki, U.; Dziki, D. Nutritional Potential and Inhibitory Activity of Bread Fortified with Green Coffee Beans against Enzymes Involved in Metabolic Syndrome Pathogenesis. *Lwt* **2018**, *95*, 78–84. [[CrossRef](#)]
44. Świeca, M.; Sęczyk, I.; Gawlik-Dziki, U.; Dziki, D. Bread Enriched with Quinoa Leaves—The Influence of Protein-Phenolics Interactions on the Nutritional and Antioxidant Quality. *Food Chem.* **2014**, *162*, 54–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wu, J.Y.; Siu, K.C.; Geng, P. Bioactive Ingredients and Medicinal Values of *Grifola Frondosa* (Maitake). *Foods* **2021**, *10*, 95. [[CrossRef](#)]
46. Ukaegbu, C.I.; Shah, S.R.; Hazrulrizawati, A.H.; Alara, O.R. Acetone Extract of *Flammulina Velutipes* Caps: A Promising Source of Antioxidant and Anticancer Agents. *Beni.-Suef. Univ. J. Basic Appl. Sci.* **2018**, *7*, 675–682. [[CrossRef](#)]
47. Tang, C.; Hoo, P.C.X.; Tan, L.T.H.; Pusparajah, P.; Khan, T.M.; Lee, L.H.; Goh, B.H.; Chan, K.G. Golden Needle Mushroom: A Culinary Medicine with Evidenced-Based Biological Activities and Health Promoting Properties. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 474. [[CrossRef](#)]
48. Sęczyk, I.; Świeca, M.; Gawlik-Dziki, U.; Luty, M.; Czyz, J. Effect of Fortification with Parsley (*Petroselinum crispum* Mill.) Leaves on the Nutraceutical and Nutritional Quality of Wheat Pasta. *Food Chem.* **2016**, *190*, 419–428. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1 Parameters of all the molecules monitored with the MRM method

Compound	Precursor ion Q1 (m/z)	Product ion Q2 (m/z)	CE (V)	Retention time (min)
Gallic acid 1	169	124.9	-20	1.89
Gallic acid 2	169	78.9	-30	1.89
3,4-Dihydroxybenzoic acid 1	153	108.9	-20	3
3,4-Dihydroxybenzoic acid 2	153	65	-26	3
Chlorogenic acid 1	352.9	190.8	-26	3.45
Chlorogenic acid 2	352.9	84.9	-26	3.45
Caffeic acid 1	179	135	-22	3.75
Caffeic acid 2	179	107	-32	3.75
Syringic acid 1	197	181.9	-18	3.8
Syringic acid 2	197	122.9	-30	3.8
Daidzin 1	415.1	251.9	-38	3.96
Daidzin 2	415.1	222.8	-38	3.96
Rutin 1	609	300.3	-46	4.01
Rutin 2	609	270.9	-46	4.01
Ellagic acid 1	301	284	-40	4.27
Ellagic acid 2	301	229	-38	4.27
p-Coumaric acid 1	163	119	-20	4.33
p-Coumaric acid 2	163	92.9	-42	4.33
Salicylic acid 1	137	93	-16	4.46
Salicylic acid 2	137	75	-40	4.46
Vanillin 1	150.9	136.1	-18	4.65
Vanillin 2	150.9	91.9	-26	4.65
Cynarin 1	515	353	-26	4.68

Cynarin 2	515	191	-42	4.68
m-Coumaric acid 1	163	119	-20	4.72
m-Coumaric acid 2	163	92.9	-42	4.72
Ferulic acid 2	193	177.9	-18	4.74
Ferulic acid 1	193	134	-22	4.74
Sinapic acid 1	223.1	164	-22	4.78
Sinapic acid 2	223.1	148.9	-28	4.78
Rosmarinic acid 1	358.9	160.9	-22	4.8
Rosmarinic acid 2	358.9	132.6	-40	4.8
Naringin	579	271	-32	5.03
Quercetin 1	301	121	-34	7.08
Quercetin 2	301.1	150.9	-30	7.08
trans-cinnamic-d7 acid	153.9	110	-16	7.4
trans-cinnamic acid 1	146.9	77	-28	7.53
trans-cinnamic acid 2	146.9	103	-14	7.53
Apigenin 1	269.9	116.9	-42	8.33
Apigenin 2	269.9	150.9	-34	8.33
Genistein 1	269	133	-30	8.42
Genistein 2	269	159	-40	8.42
Naringenin 1	271	150.9	-24	8.51
Naringenin 2	271	118.9	-34	8.51

Table S2. Phenolic compounds profile in dried mushrooms (Enoki and Maitake) identified using the LC-MS/MS technique

Polyphenolic Compound	Enoki	Maitake
	[ng *10 ² /g DW]	
3,4-Dihydroxybenzoic acid	1.66 ± 0.12 ^a	10.15 ± 0.39 ^b
Caffeic acid	<0.5	10.74 ± 0.81
Syringic acid	<0.5	12.19 ± 0.45
Daidzin	n.d	n.d
Rutin	<0.5	<0.5
Ellagic acid	<0.5	3.57 ± 0.52
<i>p</i> -Coumaric acid	0.64 ± 0.06 ^a	15.67 ± 0.64 ^b
Salicylic acid	<0.5	<0.5
Vanillin	<0.5	6.97 ± 0.74
Ferulic acid	0.75 ± 0.20 ^b	36.58 ± 3.79 ^b
Sinapic acid	<0.5	0.52 ± 0.08
Rosmarinic acid	n.d	n.d
<i>t</i> -Cinnamic acid	<0.5	n.d
Genistein	<0.5	<0.5
Naringenin	<0.5	0.57 ± 0.06

<0.5 [µg/g DW] below the limit of determination of the lowest calibration point; n.d.—not detected. Samples with different superscripts within a row are significantly different at $p \leq 0.05$.