



Geliş(Received) :11.12.2020
Kabul(Accepted) :17.01.2021

Araştırma Makalesi
Doi: 10.30708.mantar.839335

***Pleurotus eryngii*' nin Misel Biyokütlesinin ve Farklı Olgunlaşma Seviyesindeki Gövdelerinin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu ve Antidiyabetik Özelliklerinin Belirlenmesi**

Nurcan DOĞAN^{1*}, Cemhan DOĞAN¹

*Corresponding author: nurcan.dogan@bozok.edu.tr

¹Department of Food Technology, Yozgat Boğazlıyan Vocational High School, Yozgat Bozok University 66400, Yozgat, Turkey

Orcid ID: 0000-0001-5414-1819/nurcan.dogan@bozok.edu.tr

Orcid ID: 0000-0002-9043-0949 /cemhan.dogan@bozok.edu.tr

Öz: Yenilebilir mantarlar, tarih öncesi zamanlardan beri küresel olarak tüketilen bir gıda maddesidir. Mantarların bu nama sahip olmalarında duyuşsal özellikleri başta olmak üzere, besleyici değeri ve tıbbi özellikleri etkili olmuştur. Ancak ülkemiz bazında bakıldığında yenilebilir mantarlar üretim, tüketim ve bilimsel çalışmalar açısından yeterli düzeye ulaşamamıştır. Bu çalışmada, *Pleurotus eryngii* mantarının yaşam döngüsünden farklı parçalarının ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu, Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) esas alınarak araştırılmıştır. Optimize edilmiş ekstraktların toplam fenolik madde miktarı (TPC), antioksidan ve antidiyabetik etkileri incelenmiştir. Ekstraksiyon parametreleri olan; sıcaklık, sıvı / katı oranı ve solvent konsantrasyonu, örneklerin TPC ve antioksidan kapasitelerini önemli ölçüde etkilemiştir. Mantarların genç meyve gövdesi miselyum biyokütlesine göre daha yüksek antioksidan ve antidiyabetik aktivite göstermiştir. Ancak meyve gövdesi yaşlandıkça bu etkiler kısmen azalmıştır. Sonuç olarak mantarların hem meyve gövdesi hem de miselyum biyokütlesi birçok biyo-fonksiyonel özelliğe sahiptir. Miselyum biyokütlesinin üretim süresinin kısa oluşu ancak aktivitesinin meyve gövdesine göre azlığı değerlendirilmesi gereken konulardan biri olup, hasat zamanının gecikmesi ile de bu özellikleri önemli ölçüde azalması yadsınamaz bir gerçektir. Bu çalışma ile *P.eryngii* mantarının doğal antioksidan ve anti-diyabetik gıda olma potansiyeli ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: *Pleurotus eryngii*, Miselyum biyokütle, Antioksidan, antidiyabetik, YYY

Optimization of Extraction of Mycelial Biomass and Parts at Different Maturation Levels of *Pleurotus eryngii* and, Determination of Its Antidiabetic Properties

Abstract: Edible mushrooms have been consumed as a global food since prehistoric times. Its sensory properties, its nutritional value, and medicinal properties have been affected in having this famous. However, edible mushrooms could not reach a sufficient level in production, consumption, and scientific studies in our country. In this study, optimization of extraction conditions of parts of the life-cycle of *Pleurotus eryngii* mushroom was investigated based on Response Surface Method (RSM). Total phenolic content (TPC), antioxidant and antidiabetic effects of optimized extracts were investigated. Extract parameters; temperature, liquid/solid ratio, and solvent concentration significantly affected the TPC and antioxidant capacities of the samples. The young fruit body of mushrooms showed higher antioxidant and antidiabetic activity than mycelium biomass. However, these effects partially decreased as the fruit body ages. As a result, both the fruit body and mycelium biomass have many bio-functional properties. The short production time of mycelium biomass, but the low bioactivity than the fruit body, is one of the issues that needs to be evaluated. This research has shown that *P.eryngii* mushrooms have potential as natural antioxidants and anti-diabetic food.

Key words: *Pleurotus eryngii*, Mycelium biomass, Antioxidant, anti-diabetic, RSM



Giriş

Makromantarlar, insanoğlu tarafından yüzyıllar boyunca çeşitli amaçlarla kullanılmagelmiştir. Yenilebilir mantarlar, uygun ekolojik şartlarda, ormanlarda, organik madde yönünden zengin topraklarda, çürümekte olan dal ve kökler üzerinde saprofit olarak kendiliğinden yetişmektedir.

Tarih öncesi zamanlardan beri doğadan toplanan mantarlar kutsal görülmüş, Romalılar tarafından "Tanrıların yiyeceği" olarak anılmış, Yunanlılar tarafından da savaşlarda savaşçılara güç verdiğine inanılmıştır (Arora, 2008). Firavunlar mantarları lezzetli gıdalar olarak addetmişlerdir (Daba ve ark., 2008). Yüzyıllardır yenilebilir mantarlar, halk ilacı olarak, uzun ömürlülüğü arttırmak hatta halüsinojen (magic mushroom) olarak tüketilmiştir (Manzi ve ark., 1999).

Ancak, doğadan toplanan mantarlar hala önemli bir besin ve geçim kaynağı olmakla birlikte, miktarının az olması, mevsime bağımlı olması ve zehirli olanlarının kolay ayırt edilememesi gibi sebeplerden ötürü kültüre alınması çalışmaları başlamıştır (Arora ve Shepard, 2008).

Tarihsel kayıtlarda ilk kültüre alınıp yetiştirilen mantar MS 600 yıllarda yetiştirilen *Auricularia auricula* (wood ear, judae, jelly ear, kulak mantarı) olup, onu sırasıyla MS 800-900 yıllarında kültüre alınan *Flammulina velutipes* (Enokitake, Enoki, kış mantarı) ve MS 1000-1100 yıllarında *Lentinula edodes* (shiitake, meşe mantarı) takip etmiştir. Dünyada en fazla üretim ve tüketimi olan *Agaricus bisporus* (beyaz şapkallı mantar)'un yetiştirilmesi ise MS 1600'lü yıllara, *Pleurotus* cinsi mantarların üretimi ise 1900'lü yıllara dayanır.

Tarihsel süreçte her ne kadar ilk kültüre alınan mantarlar farklı olsa da günümüzde ticari üretim kapasitesine bakıldığında; *Agaricus bisporus* (beyaz şapkallı mantar) dünyada üretimi yapılan mantar türleri arasında birinci sırada, *Pleurotus* cinsi mantarlar ise ikinci sırada yer almaktadır (Öztürk ve Çopur, 2009). Dünya üzerinde binden fazla *Pleurotus* türü tanımlanmıştır. Ancak bununla birlikte *Pleurotus* cinsinde sadece 50 kadar tür kabul edilmektedir (Miles ve Chang, 2004). *Pleurotus* cinsi mantarlar arasında da lezzeti ve gastronomik üstünlüklerinden dolayı *P. eryngii* (King oyster mushroom, kral mantarı, çarşır, çakşır)'ye olan talebin gün geçtikçe arttığı bilinmektedir (Ohga ve Royse, 2004).

Mantarların sahip olduğu besin bileşikleri, miktarı, cins, tür, alttür, hasat zamanı, depolama ve kompost üretiminde kullanılan substratlara göre değişebilmekle birlikte (Sturion ve Oetterer, 1995) yüksek protein ve vitamin içeriğinin yanı sıra; diyet lifi, mineraller ve β -glukan içeriği bakımından zengin, düşük yağ oranına sahip olup, kalorisi son derece düşük olan değerli bir gıdadır (Jablonsky ve ark., 2005; Sanmee ve ark., 2003; Vetter, 2003).

Mantarlar yüksek besin değerinin yanı sıra tıbbi özellikleri ile de son derece dikkat çekicidir. Mantarlar çeşitli ülkelerde farklı hastalıklarda tedavi amaçlı olarak kullanılmakta olup, genel olarak, antiviral, antibakteriyel,

antikolesterol, antikarsinojenik, antihipertansif ve antioksidan özellikleri ile dikkat çekmektedir (Cohen ve ark., 2002; Daba ve Ezeronye, 2003; Gunde-Cimerman, 1999; Sarangi ve ark., 2006; Singh ve Mishra, 2008; Kris-Etherton ve ark., 2002). Ayrıca antidiyabetik aktivitesi ile Tip 2 diyabetin tedavisinde ince barsaklarda bulunan ve disakkaritlerle kompleks karbonhidratları absorbe olabilir forma dönüştüren özellikle α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerini inhibe ederek monosakkaritlerin oluşumunu ve emilimini kısıtlaması Su ve ark. (2013) gibi tıbbi özellikleri de son dönemin çalışma konuları arasındadır. Hastalıkların birçoğunun çevresel faktörlerle ve özellikle tüketilen gıdalarla ilişkilendirilmesi, tüketicilerin satın aldıkları gıdaları sorgulamaya başlamalarına sebep olmuştur. Bu nedenle, gıdaların insan sağlığı üzerine etkileri her geçen gün daha da önem kazanmaktadır. Bilinçli tüketiciler artık, gıdalardan beslenmenin yanı sıra ilave faydalar getirmesini beklemektedirler. Böylelikle günümüz insanı bir nevi "öze dönüş" içerisinde. Tıbbın babası olarak nitelenen Hipokrat (MÖ 400) "Gıdalarınızın ilaç, ilaçlarınızın da gıda olmasını sağlayın" (Let food be thy medicine and medicine be thy food) derken gıdaların sağlık için önemini vurgularken özünde gıda-ilaç ayırımı net olarak yapamamaktadır (Totelin, 2015).

Sahip oldukları besin ve tıbbi özelliklerinden dolayı mantarlar hem direkt olarak tüketilerek hem de bünyelerinde bulunan etken maddelerin ekstrakte edilmesiyle, birçok hastalığın tedavisinde veya önlenmesinde destekleyici gıda ajanı olarak kullanılması, ayrıca yeterli ve dengeli beslenmede de etkin olarak kullanıldığı ve gelecekte de artan oranda kullanılacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla doğadan toplanan yenilebilir mantarlar ile bu miktarlara ulaşılamayacağından kültür mantarı üretimi önem kazanacaktır.

Ülkemizde kültür mantar üretimi, yeni bir alan olmakla birlikte hızlı bir değişim ve gelişme içerisinde. 1983 yılında yıllık mantar üretimi 1400 ton civarındayken, 2018 yılında 65000 tona ulaşmıştır (Erkan ve Pekşen, 2019). Günümüzde, dünyanın birçok ülkesinde kültür mantarı yetiştiriciliği bir endüstri halindeyken, ülkemizde yetiştiriciliği istenen düzeyde yapılamamaktadır. Bu sebeple mantar çeşitliliğini arttırmak ve pazarı çeşitlendirmek için, ülkemizde farklı cins ve türde mantar üretimlerine de ivme kazandırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, ülkemizde üretim ve tüketim potansiyeli yüksek olan egzotik mantarlardan, *Pleurotus eryngii* mantarının yaşam döngüsünden farklı parçalarının ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu, YYY esas alınarak araştırılmıştır. Optimize edilmiş ekstraktların toplam fenolik madde miktarı, antioksidan ve antidiyabetik etkileri incelenmiştir.



Materyal ve metod

Materyal

Sıvı kültür üretiminde kullanılan; açık renkli malt özütü, kavak talaşı, maya, misel taşıyıcısı olarak kullanılan; yulaf, K_2PO_4 , $MgSO_4$ ve kompost yapımında kullanılmış olan kepek, kavak talaşı Yozgat ilindeki lokal tedarikçilerden temin edilmiştir. Polietilen microsac ambalajlar Type 14A, Unicorn Bags, TX, USA'den, diğer tüm kimyasallar aksi belirtilmedikçe Merck KGaA'dan temin edilmiştir.

Mantarlar

Çalışma kapsamında kullanılmış *Pleurotus eryngii* stok kültürden elde edilen hiflerin uygun substrat karışımına inoküle edilip uygun şartlarda inkübasyona tabi tutulması ile elde edilmiştir. Farklı işlem ve gelişim evrelerine göre 3 farklı kısım incelenmiştir. Birincisi Miselyum biyokütle (MB) ikincisi genç meyve (GM) ve üçüncüsü de genç meyvenin 5 gün sonra toplanmasıyla elde edilen olgun meyve (OM) olarak adlandırılmıştır. Genç meyve hasat zamanı, sap ve şapka dahil olmak üzere fruit body (meyve gövdesi) 9 cm olarak belirlenmiştir.

Metot

Sıvı kültür üretimi

Sıvı kültür üretimi Stamets (2011) metodu modifiye edilerek uygulanmıştır. Öncelikle 1. aşamada 100 ml distile su 121 °C de 2 saat sterilize edilmiş ve 25 °C'ye soğutulmuştur. Ardından 9 mm cork borer ile 2 parça kesit alınarak waring blender içine konulmuş, 2 sefer olarak 3 sn çalıştırılır ve 5 s beklenilerek homojenize edilmiştir. 2. aşamada da 90 ml broth için; 20 g/L açık renkli malt özütü, 5 g/L maya, 1 g/L K_2PO_4 and 0.5 g/L $MgSO_4$ karışımı 250 ml'lik erlenmayerde hazırlanarak, 121 °C'de 2 saat sterilize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından 10 ml miselyum bakımından zenginleştirilmiş sıvı sterilize edilmiş broth içine aktarılmıştır. Hazırlanan karışım Lee ve ark. (2009) metodu modifiye edilerek, mantar hiflerinin oksijen ihtiyacını karşılamak için çalkalamalı su banyosunda 25 °C de 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. 10-14 gün içerisinde transparan görüntüsü kaybolup bulanık bir görüntü oluştuğunda süreç tamamlanmıştır.

Miselyum biyokütle üretimi

Elde edilen sıvı kültür 4000 rpm de 5 dak santrifüj (Nüve, Turkey) edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan çökelti MB olarak tanımlanmıştır.

Tohumluk misel üretimi

%1 $CaSO_4$ ve %0,5 $CaCO_3$ ile harmanlanmış yulaf, 0,5 μ delik çapına sahip filtreli microsac torbalarda (Type 14A, Unicorn Bags, TX, USA) 121 °C' de 2 saat sterilize edilmiştir. İnkübe edilen sıvı kültürden steril şırınga ile 10

ml alınmış ve %55 nem içeriğine sahip steril yulaf tanesi üzerine inoküle edilmiştir. İnkübasyonu tamamlanan microsac torbalarda görsel olarak tam bir kolonizasyon oluşana kadar (10-15 gün) 25 °C 'de inkübe edilmiştir (Stamets, 2011).

Mantarların üretimi

Üretilen tohumluk misel %65 nem içeriğine sahip steril besi ortamına %5 oranında inoküle edilmiştir. Besi ortamında bazal substrat olarak kullanılan ince kıyılmış kavak talaşına, katkı mateyali olarak ¼ oranında buğday kepeği ilave edilmiştir. Ayrıca ortamın asitliğini ayarlamak için komposta, %1 $CaCO_3$ ilave edilmiştir. Hazırlanan kompost 0,5 μ delik çapına sahip filtreli polietilen microsac ambalajlara 1 kg olarak doldurularak (Type 14A, Unicorn Bags, TX, USA), 121 °C de 4 saat sterilize edilmiştir. Yaklaşık 3 haftalık 25 °C ve %85 nem ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Sürecin akabinde torbaya çapraz şekilli 3 cm uzunluğunda kesikler atılarak sıcaklık 17 °C ye düşürülmüş, nem %95 çıkarılmış, ortamdaki CO_2 miktarının 800 ppm altında olması sağlanmış ve günde 12 saat ışık verilmiştir. Mantarların çalışmaya uygun toplama zamanları dikkate alınarak flaşlar (hasat) yapılmıştır.

Örneklerin kurutulması

Toplanan tüm örnekler flaş zamanlarını müteakip 0,5 cm kalınlığında kesilmiş ve etüvde 40 °C de 12 saat boyunca kurutulmuştur.

Örneklerin ekstraksiyonu

Kurutulmuş örnekler daha sonra bir bıçaklı değirmen (Bosch MKM6000, Almanya) kullanılarak toz haline getirilmiştir. Ön denemelerde en iyi solvent olarak metanol ve su seçildiği için çalışmada solvent olarak metanol ve su kullanılmıştır. Toz örnekler (1 g), vidalı kapaklı tüplerde çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan sulu metanol karışımına ilave edilmiştir. Ekstraksiyon, deney tasarımında belirtilen sıcaklık, solvent/ katı oranı ve % metanol konsantrasyonunda 60 dakika süreyle çalkalamalı bir su banyosunda (Wisd, Kore) ekstrakte edilmiştir.

Deneme dizaynı ve istatistiksel analiz

Maksimize edilmiş Toplam fenolik madde miktarı (TPC) ve antioksidan kapasitesine göre optimum ekstraksiyon koşullarını belirlemek amacıyla (sıcaklık, solvent/ katı oranı ve % metanol konsantrasyonu) Yanıt Yüzey Yönteminin (YYY) Box-Behnken Tasarımı (BBD) kullanılmıştır. Örneklerin TPC ve antioksidan (DPPH) kapasitesi yanıt olarak seçilmiş, bu yanıtlar üzerine sıcaklık, solvent/ katı oranı ve metanol konsantrasyonu gibi ekstraksiyon koşulları ise bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir (Tablo 1).



Tablo 1. Bağımsız değişkenlerin seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	Birim	Sembol	Kodlanmış değerler		
			-1	0	1
Sıcaklık	°C	X ₁	30	45	60
Sıvı/katı oranı	mL g ⁻¹	X ₂	10	20	30
Metanol konsantrasyonu	%	X ₃	30	55	80

Tablo 2 de verilen deneme dizaynında da gösterildiği üzere 15 deneme noktasında çalışılmıştır.

Tablo 2. Box Behnken deneme dizaynına göre deneysel ve tahminlenen veriler

Den. nok.	Kodlanmış değişkenler			Miselyum Biyokütle (MB)				Genç Meyve (GM)				Olgun Meyve (OM)			
	X ₁	X ₂	X ₃	TPC		DPPH		TPC		DPPH		TPC		DPPH	
	(°C)	(%)	(mL g ⁻¹)	Den.	Tah.	Den.	Tah.	Den.	Tah.	Den.	Tah.	Den.	Tah.	Den.	Tah.
1	-1	-1	0	2.33	2.36	18.97	18.86	3.69	3.77	24.04	24.52	2.99	2.96	21.31	21.62
2	1	-1	0	2.67	2.71	17.66	17.76	3.99	4.13	25.52	25.64	3.50	3.55	25.56	25.25
3	-1	1	0	2.02	1.98	17.05	16.95	3.00	2.86	20.36	20.24	2.87	2.82	20.78	20.07
4	1	1	0	2.14	2.11	16.49	16.60	3.54	3.46	24.23	23.75	3.12	3.15	22.99	23.70
5	-1	0	-1	1.21	1.19	17.05	16.99	3.10	3.15	22.87	22.79	2.87	2.93	20.14	21.38
6	1	0	-1	1.59	1.56	16.64	16.37	3.32	3.31	23.14	23.41	3.55	3.53	25.41	25.01
7	-1	0	1	2.10	2.14	18.13	18.40	3.22	3.24	22.90	22.63	3.05	3.07	22.23	21.38
8	1	0	1	2.23	2.25	17.52	17.58	4.08	4.04	26.55	26.64	3.47	3.41	25.00	25.01
9	0	-1	-1	1.91	1.91	18.12	18.29	3.87	3.75	25.77	25.38	3.33	3.30	24.10	24.06
10	0	1	-1	1.35	1.41	17.36	17.52	3.07	3.16	22.14	22.34	3.14	3.13	23.34	22.51
11	0	-1	1	2.78	2.72	20.51	20.35	4.45	4.36	27.16	26.96	3.40	3.41	24.01	24.06
12	0	1	1	2.24	2.24	18.23	18.06	3.25	3.37	23.44	23.83	3.00	3.03	21.68	22.51
13	0	0	0	2.89	2.91	21.60	21.33	4.85	4.99	27.55	27.87	4.10	3.89	26.98	26.59
14	0	0	0	2.91	2.91	21.40	21.33	5.12	4.99	27.99	27.87	3.75	3.89	26.22	26.59
15	0	0	0	2.94	2.91	21.00	21.33	5.00	4.99	28.07	27.87	3.81	3.89	26.57	26.59

Den. nok.; Deneme noktası, Den. Deneysel değer, Tah. Tahmini değer

Yanıtlar ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişki, ikinci dereceden polinom regresyon eşitliği kullanılarak ifade edilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Y: öngörülen yanıt, β_0 : kesişme, β_1 , β_2 , β_3 : doğrusal katsayılar, β_{11} , β_{22} , β_{33} : etkileşim katsayıları, β_{12} , β_{13} , β_{23} : ikinci dereceden katsayılar, X₁, X₂, X₃: bağımsız değişkenler RSM, Design Expert 11.0.0 yazılımı (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN) kullanılarak gerçekleştirildi. Bağımsız değişkenlerin yanıt üzerindeki etkisini gösteren 3D yüzey grafikleri, Mathematica yazılımında (sürüm 7; Wolfram Research, Champaign, IL) Design Expert 11.0.0 yazılımının çıktılarının işlenmesiyle oluşturulmuştur. İki bağımsız değişken ve bir yanıtta oluşan 3 boyutlu yüzey grafiklerinde diğer bağımsız değişkenin değeri orta noktada sabitlenmiştir. Veriler arasındaki farkların önemini belirlemek için SPSS 22.0 istatistik paket programı (SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmış olup, duncan çoklu karşılaştırma testi ile grup ortalamaları karşılaştırılmıştır.

Toplam fenolik madde miktarı (TPC)

Ekstraktların TPC'si Singleton ve ark. (1999)'nın yöntemine göre belirlenmiştir. 0.4 ml seyreltilmiş özüt, 2 ml 10 kat seyreltilmiş Folin & Ciocalteu fenol reaktifi ve 1.6 mL % 7.5 Na₂CO₃ bir test tüpünde karıştırılmıştır. Karanlık bir yerde 60 dakika inkübasyondan sonra, karışımın absorbansı 765 nm'de okunmuştur (Shimadzu UV-1700 spektrofotometre, Shimadzu Corp, Kyoto, Japonya). TPC değeri, standart bir gallik asit eğrisi (20-100 mg /L) ile kalibre edilerek hesaplanmış ve gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir.

Antioksidan kapasite

Antioksidan kapasite tayini 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and ferric reducing ability of plasma (FRAP) yöntemi ile belirlenmiştir. Analizin sonuçları Trolox eşdeğeri (μ M TE/g örnek) olarak ifade edilmiştir. DPPH analizi için 0,1 mL numune 3.9 mL 25 mg / L konsantrasyonda metanolik DPPH solüsyonu içeren test tüpüne yerleştirdikten sonra karanlık bir yerde oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra, 515 nm de okunmuştur (Brand-Williams ve ark., 1995). ABTS analizinde, 30 mg ABTS ve



7,8 mL 2,46 mM potasyum peroxodisülfattan oluşan ABTS çözeltisi 16 saat inkübe edilmiştir. Bu çözelti daha sonra fosfat tamponlu salin (PBS) ile seyreltilerek 0.70 ± 0.05 'lik bir absorbansa ayarlanmıştır. Bundan sonra 1950 μ L seyreltilmiş ABTS solüsyonu ve 50 μ L örnek 30 saniye vortekslenip 6 dakika inkübe edildikten sonra 734 nm'de okunmuştur (Çam ve ark., 2009). FRAP analizi Benzie ve Strain (1996)'ya göre yapıldı. 10 μ L örnek ve 20 mM ferric chloride, 30 mM sodium acetate ve 10 mM TPTZ'den oluşan FRAP reaktif bir test tüpünde karıştırıldı. 30 dakika inkübasyondan sonra, absorbans 593 nm'de okundu.

Antidiyabetik aktivite

Örneklerin antidiyabetik aktiviteleri, α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyon aktiviteleri kullanılarak belirlenmiştir. Ekstraktlar uygun konsantrasyon aralığına seyreltilmiştir. Hazırlanan bu ekstraktların α -glukozidaz ve α -amilaz enziminin çalışmasını inhibe edici özellikleri enzimatik-spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla denemeler fizyolojik ortamları temsil etmesi açısından 37 °C de gerçekleştirilmiştir. α -glukozidaz inhibisyon aktivitesini belirlemek için, 50 μ L örnek, 1250 μ L 67 mM monopotasyum fosfat ve 50 μ L α -glukozidaz bir test tüpünde karıştırılıp 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Enzimatik reaksiyonu başlatmak için tüpe 125 μ L 10 mM 4-nitrophenyl-D-glucopyranoside solüsyonu eklenmiştir. 20 dakika sonra, reaksiyonu durdurmak için tüpe 2 mL 0.1 M sodyum karbonat ilave edildikten sonra 400 nm'de okunmuştur. α -amilaz inhibisyon aktivitesini belirlemek için, 1 mL örnek, 1 mL patates nişastası solüsyonu ve 1 mL 20 mM monosodyum fosfat bir test tüpünde karıştırılarak 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Enzimatik reaksiyonu başlatmak için tüpe 1 mL α -amilaz solüsyonu ilave edildikten 30 dakika sonra, 0.5 mL 5.31M sodyum potasyum tartarat (2 M sodyum hidroksit ile hazırlanmış) ve 0.5 mL 96 mM 3,5-dinitrosalisilik asit solüsyonu tüpe eklenmiştir. Reaksiyonu durdurmak için karışım 5 dakika kaynar suda tutulduktan sonra absorbans 540 nm'de okunmuştur (Cam ve ark., 2020; McDougall ve ark., 2005). Yukarıda açıklanan her iki yöntem için antidiyabetik aktivite, aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Antidiyabetik aktivite}(\%) = \frac{ABS_{\text{kontrol}} - ABS_{\text{örnek}}}{ABS_{\text{örnek}}} \times 100$$

ABS_{kontrol} kontrolün absorbansını ve $ABS_{\text{örnek}}$ ise numunenin absorbansını ifade eder. α -amilaz ve α -glukozidazın % 50'sini inhibe eden konsantrasyon IC_{50} olarak ifade edilmiştir.

Enzimin çalışmasını %50 oranında inhibe eden konsantrasyon (IC_{50}) ise örnek miktarına karşılık

inhibisyon yüzdesinin bulunduğu grafikten elde edilmiştir. Pozitif kontrol olarak akarboz standartı kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Solvent seçimi için ön çalışmalar

Solvent seçimi ön çalışmalar neticesinde belirlenmiştir. Genç meyve etanol, methanol, aseton ve su (hidrosol) ile ekstrakte edilmiş ve Antioksidan (DPPH) ve TPC miktarı belirlenmiştir. Bu amaçla 1 gram kuru örnek, % 80 konsantrasyona sahip 20 mL çözücü ile karıştırılarak 45 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Süpernatant, çökeltiden ayrıldıktan sonra analiz edilmiştir ve sonuçlar TPC 4.79 ± 0.48 mg GAE/g ve antioksidan kapasitesi 26.32 ± 1.76 μ mol TE/g ile diğer çözücü ekstraktlarına kıyasla en yüksek metanolik ekstrata ait olduğunu göstermiştir. Çözücü ve bileşenin polaritesine ek olarak, bileşenlerin suda çözünürlüğü, biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda kritik bir rol oynar (Barwick, 1997). Etanol, metanol, aseton ve damıtılmış suyun çözücü polarite indeksleri sırasıyla 5.2, 6.6, 5.4 ve 9'dur (Snyder, 1974). Mantar örnekleri için damıtılmış suyun yüksek polarite indeksine rağmen düşük ekstraksiyon performansının nedeni, bu mantarlardaki bazı biyoaktif bileşenlerinin suda çözünmemesiyle açıklanabilir. Öte yandan metanol, en iyi iyonizasyon potansiyeline sahip alkoldür. Bu durum mantar anyonlarının, kolaylaştırılmış elektron transferi yoluyla diğer çözücülere göre metanolde daha fazla çözünmesine neden olmuş olabilir (Litwinienko ve Ingold, 2003).

Model Doğrulama

Modelden üretilen 2. dereceden polinom denklemleri ve regresyon (p-değeri), belirleme katsayısı (R^2), ayarlanmış R^2 (R^2_{adj}), tahmini R^2 (R^2_{pred}) ve uyumsuzluk gibi istatistiksel parametreler Tablo 3. de verilmiştir. Tüm yanıtların varyans analizinin (ANOVA) p değerinin 0,05'ten küçük olduğu görülmüştür, bu da seçilen modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. 15 deney noktasında verilen yanıtların deneysel ve öngörülen değerlerinin birbirine yakın olması güvenilir bir modelin göstergesidir (Tablo 4). Genel olarak, modelin uygunluğunu değerlendirmek için, uyum değeri eksikliğine "Lack of fit" (model uyumsuzluğu) hipotezi ile F testi uygulanır. Örneklerin TPC ve DPPH için belirlenen uyum eksikliği önemsiz bulunmuştur. Yanıtların R^2 değerleri, ikinci dereceden modelin yeni değerleri (tahmini değer) tahmin etme yeteneği için mantarın 3 farklı kısmı (MB, GM, OM) için sırasıyla 0.922-0.990 değişmiştir (Table 3). Dahası, R^2_{pred} ile R^2_{adj} arasındaki fark 0.2'den küçüktür. Adj- R^2 ile pre- R^2 değerleri arasındaki farkın 0.2 değerinden küçük olması seçilen modelin uygunluğunu göstermektedir (Myers ve ark., 1995). Tüm istatistiksel



değerlendirmeler, yazılımdan elde edilen 2. dereceden kuadratik modellerin, yanıtlar üzerindeki etkisini belirlemek ve süreç optimizasyonunda kullanılabileceğini göstermektedir. Modelin belirlenmesinde, önemsiz olan faktörler ($p>0.05$) 2. derece polinomial denklemden

çıkarılarak modifiye edilmiştir. Önemsiz faktörlerin elemine edilmesi, genel tahminin doğruluğunu artırmak ve daha az önemlileri denklemden çıkartarak faktörleri yorumlarken daha efektif değerlendirilmesi ile açıklanabilir (Friedman ve ark., 2001).

Tablo 3. Polinomial denklemler ve model uyumluluğunu belirlemek için istatistiksel parametreler

Örnek	Yanıtlar	2.derece polinomial denklemler	Regression (p-value)	R ²	R ² _{adj}	R ² _{pred}	Model uyumsuzluğu
MB	TPC	$2.91+0.121X_1-0.243X_2+0.411X_3-0.455X_1^2-0.168X_2^2-0.675X_3^2$	<0.0001	0.990	0.982	0.959	0.083
	DPPH	$21.33-0.361X_1-0.766X_2+0.653X_3-2.21X_1^2-1.29X_2^2-1.49X_3^2$	<0.0001	0.972	0.951	0.896	0.393
GM	TPC	$4.99+0.240X_1-0.393X_2+0.205X_3-0.833X_1^2-0.603X_2^2-0.728X_3^2$	<0.0001	0.960	0.930	0.850	0.328
	DPPH	$27.87+1.16X_1-1.54X_2+0.766X_3+0.845X_1X_3-2.55X_1^2-1.79X_2^2-1.46X_3^2$	0.0001	0.967	0.933	0.844	0.143
OM	TPC	$3.89+0.233X_1-0.136X_2+0.004X_3-0.375X_1^2-0.392X_2^2-0.277X_3^2$	0.0003	0.930	0.877	0.783	0.892
	DPPH	$26.59+1.81X_1-0.774X_2-2.01X_1^2-1.92X_2^2-1.39X_3^2$	<0.0001	0.922	0.878	0.775	0.179

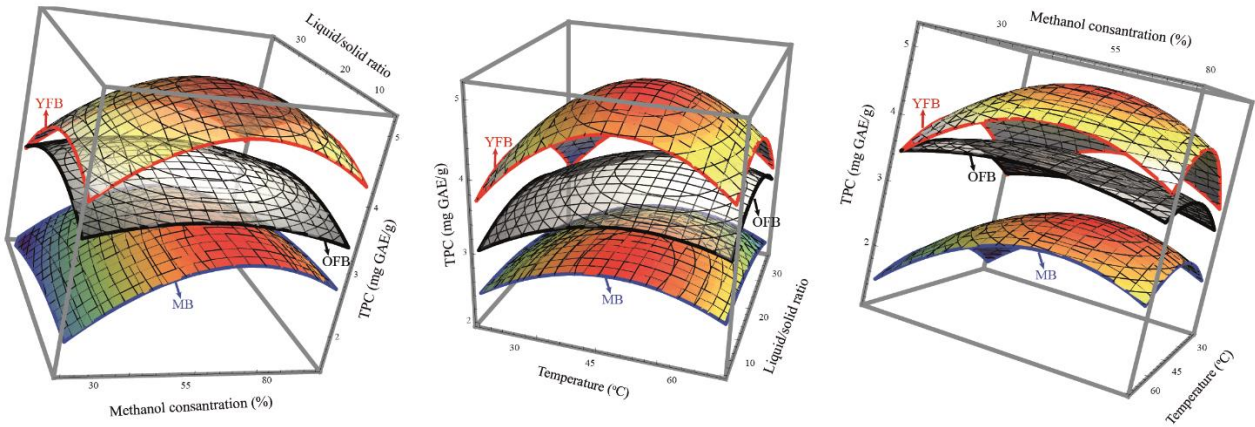
Ekstraksiyon şartlarının TPC üzerine etkisi

MB, GM ve OM kısımlarında, ekstraksiyon işlem koşullarının TPC değeri üzerindeki etkisi Şekil 1.'de verilmiştir.

Bağımsız değişkenlerden sıcaklık ve sıvı/katı oranı önemli ölçüde etkilerken ($p<0.05$), metanol konsantrasyonu bazı kısımlarında önemsiz çıkmıştır ($p>0.05$). Genel olarak, sıvı/katı oranı 10'dan 20'ye çıktıkça TPC, kütle transferi prensibine uygun olarak önemli ölçüde artmıştır. Ancak daha sonra azalmıştır. Bu, sıvı/katı oranı belli bir seviyede maksimum miktarda fenolik ekstrakte edilerek ve bu seviyeden sonra artan sıvı/katı oranının fenolik konsantrasyonunun azaltılmasıyla açıklanabilir.

Metanol konsantrasyonunun değişimi, OM kısmı hariç diğer kısımlarında hem TPC hem de antioksidan kapasitesi üzerine etkili olmuştur. Fenolikler gibi biyoaktif bileşenlerin biyokütleden çözücüye transferi büyük ölçüde çözücü ile çözünen madde arasındaki polarite

farkına bağlıdır. Bu nedenle, alkol ve su kombinasyonundan oluşan çözücüler, yalnızca bir tür alkol kullanan çözücülerden daha verimli özütleme performansı sağlayabilir (Markom ve ark., 2007). Ekstraksiyon işlemi sırasında fenoliklerin geri kazanılmasına sıcaklığın etkisi ile ilgili iki farklı durumdan bahsedilebilir. Birincisi, sıcaklığın dokuları yumuşatması, fenoliklerin çözünürlüğünü artırması ve buna bağlı olarak fenolik madde miktarının difüzyon kabiliyetini belirli bir seviyeye çıkarmasıdır. Ayrıca yüksek sıcaklık, solvent viskozitesini ve yüzey gerilimini düşürerek fenolik transferin verimini artırır. İkincisi, aşırı sıcaklığın kimyasal ve termal bozunma sonucu ekstrakte edilen fenolik miktarının azalmasına neden olmasıdır (Dent ve ark., 2013). Bu nedenle sıcaklık, ekstraksiyon prosesleri için en önemli parametrelerden biridir. Burada sadece sıcaklık göz önüne alındığında MB için 44.95 °C , GM için 47.71 °C ve OM için ise 50.31 °C TPC için kırılma noktası olarak göze çarpmaktadır.



Şekil 1. MB, GM ve OM kısımlarında ekstraksiyon koşullarının TPC üzerindeki etkisi üzerine üst üste bindirilmiş 3-D yüzey grafikleri

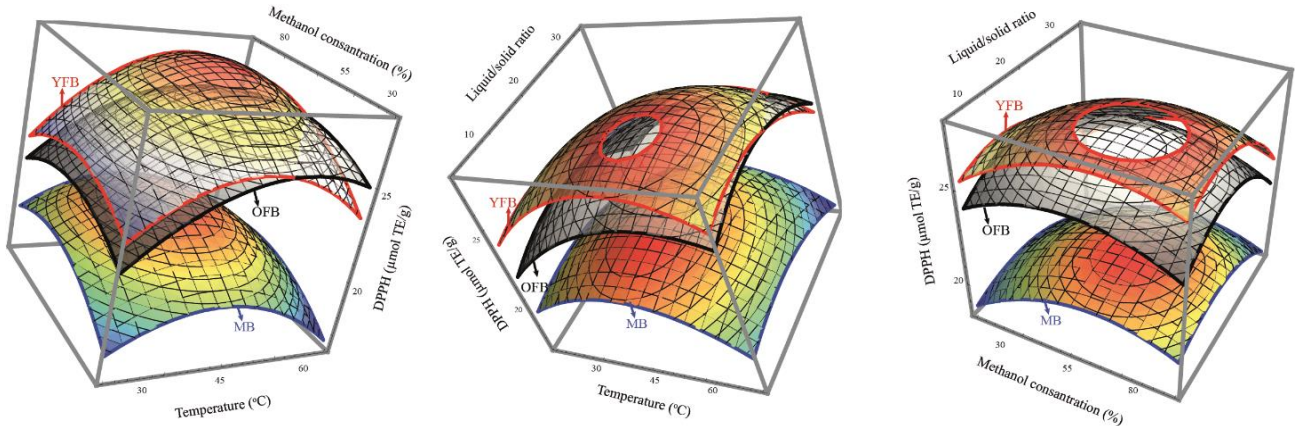
Ekstraksiyon şartlarının DPPH üzerine etkisi

İkinci dereceden denklemlerin DPPH üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemli olarak tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Sıcaklık ve sıvı/katı oranı orta düzeyde sabit tutulduğunda, metanol konsantrasyonunun antioksidan kapasitesi üzerine etkisi TPC'de olduğu gibi quadratic eğri etkisi göstermiştir (Şekil 2). Bu tür bir etki, bazı fenolik bileşenlerin antioksidan etkiye sahip olması nedeniyle TPC ile antioksidan kapasite arasında pozitif bir korelasyon olduğunun da bir işaretidir. Çalışmamıza uygun olarak Liyana-Pathirana (2005), su-alkol kompozit (%50) çözücülerin antioksidan bileşenlerin ekstraksiyonunda en yüksek performansı gösterdiğini belirtmişlerdir.

Sıcaklık, antioksidan kapasiteyi etkileyen bir başka önemli faktördür ve MB için $44.95\text{ }^{\circ}\text{C}$, GM için $47.71\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve OM için ise $50.31\text{ }^{\circ}\text{C}$ antioksidan kapasitesi için tıpkı TPC de olduğu gibi kırılma noktası olarak göze çarpmaktadır. Genel olarak, mantar türlerinin MB ve GM kısımlarının maksimum antioksidan ve TPC miktarlarına

daha düşük sıcaklıklarda ulaşılırken, OM kısımlarında daha yüksek sıcaklık derecelerinde ulaşılmıştır. Mantarlar, kitin, glukan ve glikoproteinlerin çapraz bağlanmasıyla oluşan hücre duvarlarına sahiptir (Bowman ve Free, 2006).

OM'nin maksimum antioksidan kapasitesi ve TPC miktarına diğer kısımlardan daha yüksek sıcaklıklarda ulaşılmasının nedeni, OM'nin kalınlaşmış hücre duvarının TPC ve antioksidan bileşiklerini serbest bırakmak için daha yüksek sıcaklığa ihtiyaç duyması ve ayrıca hücre duvarının aşırı sıcaklık nedeniyle bozulan bileşiklere bir miktar koruma sağlaması olabilir. Sıvı/katı oranının antioksidan kapasitesi üzerinde TPC'ye benzer şekilde $\sim 20\text{ mL g}^{-1}$ pik ile eğri etkisi belirlenmiştir. Bu durum, sıvı/katı oranı 20 mL g^{-1} 'ye çıktıkça çözücü ile temas edebilen antioksidan bileşenlerin artmasıyla açıklanabilir. Bununla birlikte, bu çözücü miktarı daha da arttıkça, çözeltideki bileşenler seyrelceğinden, ölçülen antioksidan kapasitesi azalmaktadır.



Şekil 2. MB, GM ve OM kısımlarında ekstraksiyon koşullarının DPPH üzerindeki etkisi üzerine üst üste bindirilmiş 3-D yüzey grafikleri



Optimizasyon ve optimum noktadaki deneysel verilerin doğrulanması

Mantar örneklerinin farklı parçalarının için en iyi ekstraksiyon koşullarını belirlemek için sayısal optimizasyon ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. İstenen yanıtlar için kriterler TPC ve DPPH için maksimum olarak belirlenmiş olup, en yüksek istenirlik değerine sahip faktör kombinasyonları optimum nokta olarak seçilmiştir. Arzu edilirlilik yaklaşımı, bir dizi yanıtta "puan" atayan ve bu puanı maksimize eden faktör ayarlarını seçen bir

yöntemdir (Natrella, 2010). Optimal bağımsız değişken seviyeleri ve numuneler için arzu edilirlilik değerleri Tablo 4'de gösterilmiştir.

Modelin doğruluğunu ölçmek için, modelin öngördüğü tahmin değerler ile deneysel değerler karşılaştırılmıştır. Deneysel veriler ile tahmin edilen veriler arasında %5'ten daha az fark bulunduğundan modelin uyumlu olduğu söylenebilir (Tablo 4). Dolayısıyla ikinci derece modelin öngördüğü değerlerin güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4. Ekstraksiyon koşulları ve optimum noktadaki deneysel ve tahmin edilen değerler

Örnekler	Optimum şartlar				Yanıtlar	Tahmini değerler	Deneysel değerler	Fark (%)
	Sıcaklık (°C)	Sıvı/katı oranı(mL g ⁻¹)	Metanol konsantrasyonu (%)	Arzu edilirlilik				
MB	43.7	16.6	61.6	0.99	TPC	3.02	3.10±1.03	2.6
					DPPH	21.57	21.74±0.11	0.78
GM	47.2	16.7	59.5	0.99	TPC	5.09	5.15±0.25	1.16
					DPPH	28.39	28.10±1.09	1.02
OM	49.9	18.0	54.7	0.93	TPC	3.94	3.88±0.32	1.52
					DPPH	27.05	27.18±0.55	0.48

Optimum ekstraksiyon koşullarındaki TPC, antioksidan ve antidiyabetik aktivite

Optimum noktalarda alınan ekstraktların TPC, antioksidan ve antidiyabetik etkileri Tablo 5. de verilmiştir. Antioksidan ve antidiyabetik etkileri arasındaki hiyerarşi şu şekildedir: GM> OM> MB. Oksijen radikalleri, hücre içinde DNA, RNA ve protein hasarına neden olabilen kanserle ilgili moleküllerdir. Antioksidanlar, bu radikalleri engelledikleri için kansere karşı koruyucu olabilirler (Lambert ve Elias, 2010). Bu çalışmada antioksidan kapasiteyi değerlendirmek için DPPH, FRAP ve ABTS

yöntemleri kullanılmıştır çünkü antioksidanların radikalleri inhibe etme mekanizmaları birbirinden farklıdır.

GM'nin DPPH, FRAP ve ABTS değerleri sırasıyla MB'den % 29.25, % 44.28 ve % 40.10 daha yüksek bulunmuştur. Ancak meyve gövdesi yaşlandığında (OM) antioksidan etkisini sırasıyla % 3.38, % 24.69 ve % 22.27 oranında kaybetmiştir. Muhtemelen yaşlanma süreci oksidatif reaksiyonları artırarak antioksidan bileşenlerin parçalanmasını hızlandırdığı düşünülmektedir. Sonuçlar, FRAP değerinin 1,76 ila 4,92 µmol TE / g arasında değiştiği önceki çalışmadan daha yüksektir (Atila ve ark., 2018).

Tablo 5. Optimum ekstraksiyon koşullarında TPC, antioksidan ve antidiyabetik aktiviteleri

Örnek	Antioksidan Kapasitesi				Antidiyabetik aktivite		
	TPC (mg GAE g ⁻¹)	DPPH (µmol TE g ⁻¹)	FRAP (µmol TE g ⁻¹)	ABTS (µmol TE g ⁻¹)	α-glucosidase IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	α-amylase IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	UD
MB	3.10±1.03 ^c	21.74±0.11 ^b	31.01±0.10 ^c	40.99±1.05 ^c	227.42±0.58 ^a	285.50±1.66 ^a	3x161.34 g
GM	5.15±0.25 ^a	28.10±1.09 ^a	44.74±1.55 ^a	57.43±0.33 ^a	164.51±0.70 ^c	210.72±0.13 ^c	3x116.71 g
OM	3.88±0.32 ^b	27.18±0.55 ^a	35.88±0.46 ^b	46.97±1.47 ^b	203.11±1.24 ^b	232.51±0.57 ^b	3x144.09 g
Akarboz	-	-	-	-	35.24±1.73 ^d	72.96±3.18 ^d	3x25 mg

UD: Uygulama Dozu; günlük olarak diyabetik bir hastaya verilen ve α-glukozidaz inhibisyonu temelinde hesaplanan 3 x 25 mg tabletlerle akarboza eşdeğer mg *P. eryngii* tozunu ifade eder. Aynı sütunda farklı harfler örneklerin istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir (p <0.05)

Tip 2 diyabet için birincil tedavi yaklaşımlarından biri, karbonhidratları parçalayan α-glukozidaz ve α-amilaz gibi enzimlerin inhibisyonuna dayanır. Bu çalışmada, *P. eryngii*'nin farklı parçalarının optimize edilmiş özütlerinin bu enzimleri engellemedeki etkinliği test edilmiştir. β-

Glukan, polisakkaritler, D-treitol, D-arabinitol, palmitik asit ve α-D-glukan, terpenoidler ve streoridler vb. bileşikler mantarlarda antidiyabetik etkiler gösteren önemli bileşenlerdir (De Silva ve ark., 2012). GM'nin antidiyabetik etkisi MB'den ve OM'den daha düşük olduğu



tespit edilmiştir. Muhtemelen antidiyabetik etkinin MB da daha düşük çıkması meyveye dönüştükçe antidiyabetik etki gösteren bileşiklerin artmasından kaynaklanmaktadır. OM de antidiyabetik etkinin düşük çıkmasının sebebinin ise mantarın sahip olduğu antidiyabetik bileşikler meyvenin yaşlanması ile bozduğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Mantar çeşitlerinin antidiyabetik etkisi araştırıldığı önceki çalışmalarda, genel olarak, GM kısmı dikkate alındığında daha düşük α -amilaz inhibisyonu gösterirken, daha yüksek alfa α -glukozidaz inhibisyonu etkisi göstermiştir (Stojkovic ve ark., 2019). Diyabetli kişiler, antidiyabetik bir ilaç olan akarbozu günlük 3x25 mg'lık bir başlangıç dozunda kullanması önerilmektedir (Lebovitz, 1995). Çalışmamızda, α -glukozidazın akarboz tarafından inhibisyonuna göre yapılan hesaplamayla tüm mantar çeşitleri arasında GM kısmında en etkili olan mantar tozunun 3x116.71 g/gün dozunda kullanılması gerekmektedir (Tablo 5).

Literatür çalışmalarına bakıldığında mantarların antioksidan ve antidiyabetik özelliklerinin ortaya konulduğu birçok çalışma mevcuttur (Suleria ve ark., 2019). Ancak *P. eryngii*'nin yaşamsal döngülerindeki farklı parçaların ekstraksiyonunun optimizasyonu ve antidiyabetik potansiyelinin belirlendiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Söz konusu çalışmanın literature katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak; son yıllarda hastalıkların çoğalması ve bu hastalıkların yediklerimiz ile ilişkilendirilmesi, insanların

sağlık konusunda gıdalarına daha fazla önem vermelerini sağlamıştır. Bilinçli tüketiciler hastalıktan önce, sağlık önlemlerinin alınmasında kimyasal içerikli takviyeler yerine, doğal ürünlere rağbet göstermektedir. Yenilebilir mantarlar besinsel ihtiyaçları karşılama yanında sağlık üzerinede de ilave faydalar sağlama ile son derece popüler konumda olup, içeriğindeki farklı bileşenlerin tespiti ve farklı yenilebilir mantarların literatüre kazandırılması ile de popülaritesi gün geçtikçe artmaktadır. Ülkemiz kültür mantarı üretim ve tüketim konusunda geride kalmış görünse de istatistiksel veriler bu durumun pozitif yönde iyileştiğini göstermektedir. YYY, bu çalışmada antioksidan kapasitesini ve fenolik içeriği en üst düzeye çıkaran ekstraksiyon koşullarının optimizasyonunda başarıyla uygulanmıştır. Sonuçlar, optimize edilmiş özütlerin yüksek düzeyde TPC, antioksidan ve antidiyabetik etkilerinin sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmadan da anlaşıldığı üzere hasat zamanının biyoaktif bileşenler üzerinde etkili olduğu önem kazanmıştır. Ancak biyoaktivitesi miktarca az olmasına rağmen MB'nin kısa üretim periyodu ve nispeten kolay üretilebilir oluşunun değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışmaya 6602b/BMYO/17-125 numaralı Bilimsel Araştırma Projeleri ile destek sağlayan Yozgat Bozok Üniversitesi Proje Koordinasyon Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Kaynaklar

- Arora, D. (2008). Notes on economic mushrooms. *Econ. Bot*, 62, 540-544.
- Arora, D. ve Shepard, G. H. (2008). Mushrooms and economic botany. *Economic Botany*, 62(3), 207-212.
- Atila, F., Tuzel, Y., Fernández, J. A., Cano, A. F. and Sen, F. (2018). The effect of some agro-industrial wastes on yield, nutritional characteristics and antioxidant activities of *Hericium erinaceus* isolates. *Scientia Horticulturae*, 238, 246-254.
- Barwick, V. J. (1997). Strategies for solvent selection—a literature review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 16(6), 293-309.
- Benzie, I. and Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power". *Anal Biochem*. 1996: the FRAP assay, 15(239), 1.
- Bowman, S. and Free, S. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioassays*, 28: 799–808.
- Brand-Williams, B., Cuvelier, M. and Berset, C. (1995). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int*, 28, 25-30.
- Cam, M., Basyigit, B., Alasalvar, H., Yilmaztekin, M., Ahhmed, A., Sagdic, O., . . . and Telci, I. (2020). Bioactive properties of powdered peppermint and spearmint extracts: Inhibition of key enzymes linked to hypertension and type 2 diabetes. *Food Bioscience*, 100577.
- Çam, M., Hışıl, Y. and Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food chemistry*, 112(3), 721-726.
- Cohen, R., Persky, L. and Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(5), 582-594.
- Daba, A. S., Kabeil, S., Botros, W. A. and El-Saadani, M. (2008). Production of mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Egypt as a source of nutritional and medicinal food. *World J. Agric. Sci*, 4(5), 630-634.



- Daba, A. and Ezeronye, O. (2003). Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 672-678.
- De Silva, D. D., Rapior, S., Hyde, K. D. and Bahkali, A. H. (2012). Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *Fungal Diversity*, 56(1), 1-29.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Bosiljkov, T. and Levaj, B. (2013). The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food technology and biotechnology*, 51(1), 84-91.
- Erkan, E., ve Pekşen, A. (2019). Türkiye'de Kültür Mantarı Üretimi ve Teknolojik Gelişmeler. *Mantar Dergisi*, 10(3), 225-233.
- Friedman, J., Hastie, T. and Tibshirani, R. (2001). *The elements of statistical learning* (Vol. 1): Springer series in statistics New York.
- Gunde-Cimerman, N. (1999). Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst.(agaricales sl, Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1(1).
- Jablonsky, I., Copikova, J., Blafkova, P., Mickova, K., Synytsya, A., Cerna, J. and Erban, V. (2005). Isolation and Characterisation of β -Glucans from Fruit Bodies of *Pleurotus* Strains. [http](http://).
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., . . . ve Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 113(9), 71-88.
- Lambert, J. D. and Elias, R. J. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Archives of biochemistry and biophysics*, 501(1), 65-72.
- Lebovitz, H. E. (1995). A new oral therapy for diabetes management: alpha-glucosidase inhibition with acarbose. *Clinical diabetes*, 13(6), 99-104.
- Lee, J. S., Cho, J. Y. and Hong, E. K. (2009). Study on macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the liquid culture broth of *Hericium erinaceus*. *Carbohydrate polymers*, 78(1), 162-168.
- Litwinienko, G. and Ingold, K. (2003). Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph•) in alcohols. *The Journal of organic chemistry*, 68(9), 3433-3438.
- Liyana-Pathirana, C. (2005). Optimization of extraction of phenolics compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chem.*, 93, 45-46.
- Manzi, P., Aguzzi, A., Vivanti, V., Paci, M. and Pizzoferrato, L. (1999). Mushrooms as a source of functional ingredients, *Euro Food Chemistry*, 10. Paper presented at the European Conference on: Functional foods, a new challenge for the food chemist, Budapest.
- Markom, M., Hasan, M., Daud, W. R. W., Singh, H. and Jahim, J. M. (2007). Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. *Separation and purification technology*, 52(3), 487-496.
- McDougall, G. J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A. and Stewart, D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(7), 2760-2766.
- Miles, P. G. and Chang, S.-T. (2004). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. CRC press.
- Myers. R. H, Montgomery, D.C. and Anderson-Cook C.M. (1995). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, John Wiley & Sons. Inc., NY: 134-74.
- Natrella, M. (2010). NIST/SEMATECH e-handbook of statistical methods. *Nist/Sematech*, 49.
- Ohga, S. and Royse, D. J. (2004). Cultivation of *Pleurotus eryngii* on umbrella plant (*Cyperus alternifolius*) substrate. *Journal of Wood Science*, 50(5), 466-469.
- Öztürk, A., ve Çopur, Ö. U. (2009). Mantar bileşenlerinin teröpatik etkileri. *Bahçe*, 38(1), 19-24.
- Sanmee, R., Dell, B., Lumyong, P., Izumori, K. and Lumyong, S. (2003). Nutritive value of popular wild edible mushrooms from northern Thailand. *Food chemistry*, 82(4), 527-532.
- Sarangi, I., Ghosh, D., Bhutia, S. K., Mallick, S. K. and Maiti, T. K. (2006). Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International immunopharmacology*, 6(8), 1287-1297.
- Singh, R. and Mishra, K. (2008). Mushroom cultivation. Mushroom Research and Training Centre, G.B. Pant University of Agriculture and Technology, Pantnagar-263 145 (Uttarakhand).
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Snyder, L. (1974). Classification of the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatography A*, 92(2), 223-230.
- Stamets, P. (2011). *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Ten speed press.



- Stojkovic, D., Smiljkovic, M., Ciric, A., Glamoclija, J., Van Griensven, L., Ferreira, I. C. and Sokovic, M. (2019). An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type-2 diabetes. *South African Journal of Botany*, 120, 100-103.
- Sturion, G. and Oetterer, M. (1995). Utilization of banana leaves as substrate on edible mushroom cultivation (*Pleurotus* spp.). *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 15(2), 194-200.
- Su, C.-H., Lai, M.-N. and Ng, L.-T. (2013). Inhibitory effects of medicinal mushrooms on α -amylase and α -glucosidase–enzymes related to hyperglycemia. *Food & function*, 4(4), 644-649.
- Suleria, H. A. R., Goyal, M. R. and Butt, M. S. (Eds.). (2019). *Phytochemicals from Medicinal Plants: Scope, Applications, and Potential Health Claims*. CRC Press.
- Totelin, L. (2015). When foods become remedies in ancient Greece: The curious case of garlic and other substances. *Journal of ethnopharmacology*, 167, 30-37.
- Vetter, J. (2003). Chemical composition of fresh and conserved *Agaricus bisporus* mushroom. *European Food Research and Technology*, 217(1), 10-12.