

INSTYTUT AGROFIZYKI
IM. BOHDANA DOBRZAŃSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Katarzyna Złotko

**Sorpcja metali ciężkich na
alfa-glukanach i chitynie**

Sorption of heavy metals on
alpha-glucans and chitin

Rozprawa doktorska
Doctoral thesis

Rozprawa doktorska przygotowana pod kierunkiem
Promotora: prof. dr hab. Andrzeja Bieganowskiego
oraz
dr hab. Adama Waśko, prof. Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

© Katarzyna Złotko

Lublin 2021

OŚWIADCZENIE PROMOTORA ROZPRAWY

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

Data.....17/06/2021..... Podpis promotora rozprawy.....Andrzej Bigdanowski.....

OŚWIADCZENIE PROMOTORA ROZPRAWY

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

Data.....17.06.2021..... Podpis promotora rozprawy.....Adam Wolski.....

OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY

Świadomy odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza rozprawa jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data.....17.06.2021..... Podpis autora rozprawy.....Katarzyna Piotko.....

Streszczenie

W przyrodzie występuje wiele przykładów akumulacji różnego rodzaju związków przez organizmy żywe. Do szczególnie szkodliwych związków należą metale ciężkie. Ich obecność w organizmach żywych wywołuje wiele negatywnych skutków. Jednak człowiek może wykorzystać potencjał akumulacyjny zarówno samych organizmów jak i substancji pochodzących z tych organizmów do usuwania zanieczyszczeń ze środowiska w procesie bioremediacji.

Od wielu już lat znane są zdolności grzybów do wiązania metali ciężkich, jednak w większości opublikowanych prac badane były całe owocniki. Trudno jest znaleźć prace, w których autorzy pogłębiali badania i określali jakie komponenty owocników, i w jakim stopniu odpowiadały za sorpcję metali. Podobnie, niewiele wiadomo na temat możliwości wykorzystania owadów, lub substancji z nich pochodzących do sorpcji metali ciężkich. Chcąc, choć w niewielkim stopniu uzupełnić dostrzeżoną lukę, podjęto badania nad wykorzystaniem naturalnych biopolimerów do wiązania metali ciężkich.

Zasadniczym celem niniejszej rozprawy było zbadanie zdolności sorpcyjnych naturalnych biopolimerów, tj. (1→3)- α -D-glukanów pochodzących z grzybów oraz chityny pochodzącej z owada (*Hermetia illucens*), jako sorbentów metali ciężkich, w kontekście ich potencjalnego wykorzystania w procesie bioremediacji.

Realizując założony cel:

- w badaniach skринingowych określono zdolność sorpcyjną α -glukanów pozyskanych z różnych gatunków grzybów. Na tej podstawie wytypowano α -glukan z grzyba *Lentinus edodes* (shiitake) do dalszych badań. Kryterium wyboru była duża zdolność sorbowania metali oraz ogromna dostępność substancji odpadowych po produkcji tego bardzo popularnego w świecie grzyba,
- określono właściwości fizykochemiczne (1→3)- α -D-glukanu pozyskanego z *Lentinus edodes*,
- wyizolowano chitynę z muchy *Hermetia illucens*, wybierając wcześniej najlepszą metody jej izolacji,
- scharakteryzowano właściwości chityny,
- wykorzystując pozyskane biopolimery przeprowadzono sorpcję metali ciężkich charakteryzując sam proces jak i właściwości biopolimerów po procesie sorpcji.

Przeprowadzone badania potwierdziły wysoką zdolność biosorbowania metali ciężkich przez oba badane biopolimery. Biorąc pod uwagę, że badania prowadzono na materiałach odpadowych (po hodowli grzybów i owadów) otwiera to możliwość nowego sposobu zagospodarowania bardzo dużej (w skali świata) ilości biomasy, która do tej pory była głównie kompostowana, lub co gorzej składowana na wysypiskach odpadów.

Słowa kluczowe: (1→3)- α -D-glukan, chityna, *Hermetia illucens*, sorpcja, bioremediacja, metale ciężkie

Abstract

In nature, there are many examples of the accumulation of various types of compounds by living organisms. Heavy metals are particularly harmful compounds. Their presence in living organisms causes many negative effects. However, man can use the accumulation potential of the organisms and the substances derived from these organisms to remove pollutants from the environment in the bioremediation process.

The ability of fungi to bind heavy metals has been known for many years, the research but in most publications was focused on whole fruiting bodies. It is difficult to find publications where the authors extended their research to determine what components of fruiting bodies and to what extent were responsible for metal sorption. Likewise, little is known about the possible use of insects or substances derived from these animals for sorption of heavy metals. In order to fill this gap, although only to a small extent, research was conducted on the use of natural biopolymers to bind heavy metals.

The main goal of this dissertation was to investigate the sorption capacity of natural biopolymers, i.e. (1→3)- α -D-glucans derived from fungi and chitin derived from an insect (*Hermetia illucens*), as heavy metal sorbents in the context of their potential use in the bioremediation process.

By implementing the assumed goal:

- in screening tests, the sorption capacity of α -glucans obtained from various species of fungi was determined. On this basis, α -glucan from *Lentinus edodes* (shiitake) was selected for further research. The selection criterion was the high sorption capacity of metals and the enormous availability of waste substances after the production of this very popular fungus in the world,
- the physicochemical properties of (1→3)- α -D-glucan obtained from *Lentinus edodes* were determined,
- chitin was isolated from the *Hermetia illucens* fly before selecting the best methods of isolation,
- the properties of chitin were characterized,
- using the obtained biopolymers, the sorption of heavy metals was carried out, and the process itself and the properties of the biopolymers after the sorption process were characterized.

The study confirmed the high capability of heavy metal biosorption in both tested biopolymers. The research was carried out on waste materials (after the cultivation of mushrooms and *H. illucens*), which opens the possibility of a new way of managing a very large (on a world scale) amount of biomass, which until now has mainly been composted, or worse, stored in landfills.

Keywords: (1→3)- α -D-glucan, chitin, *Hermetia illucens*, sorption, bioremediation, heavy metal

Lista publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska oparta jest na cyklu trzech publikacji, które stanowią uzupełniającą się całość dotyczącą tematyki: „Sorpcja metali ciężkich na alfa-glukanach i chitynie”:

Złotko K., Wiater A., Waśko A., Pleszczyńska M., Paduch R., Jaroszek-Ścisielec J., Bieganski A. A Report on Fungal (1→3)- α -D-Glucans: Properties, Functions and Application. MOLECULES 2019, 24, 3972. (publikacja nr 1)

Nowak K., Wiater A., Choma A., Wiącek D., Bieganski A., Siwulski M., Waśko A. Fungal (1→3)- α -D-glucans as a newkind of biosorbent for heavy metals. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES 2019, 137, 960–965. (publikacja nr 2)

Złotko K., Waśko A., Kamiński D.M., Budziak-Wieczorek I., Bulak P., Bieganski A. Isolation of Chitin from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) and its usage to metal sorption. POLYMERS 2021, 13, 818. (publikacja nr 3)

W każdej z w/w prac udział autorki niniejszego opracowania był wiodący i większościowy. W znaczącym stopniu (przy współudziale promotorów):

- była pomysłodawczynią prac,
- opracowała ich koncepcję,
- samodzielnie wykonywała część pomiarów,
- opracowała uzyskane wyniki,
- przygotowała pierwszą wersję manuskryptów,
- merytorycznie (i technicznie) opracowała sugestie i poprawki przedstawione przez współautorów publikacji.

Spis treści

1. Wstęp	7
1.1 Bioremediacja jako proces usuwania zanieczyszczeń ze środowiska	7
1.2 Glukany: podział, występowanie, funkcje	7
1.3 Grzybowe (1→3)- α -D-glukany: właściwości, funkcje, zastosowanie	12
1.4 (1→3)- α -D-glukany jako składnik odpowiedzialny za wiązanie metali w grzybach	14
1.5 Chityna - występowanie, właściwości, zastosowanie	14
1.6 Chityna jako sorbent metali ciężkich	17
1.7 <i>Hermetia illucens</i> jako źródło chityny	18
2. Cel pracy	20
3. Materiały i metody	21
3.1 Metody wspólne dla obu publikacji	21
3.2 Metody charakterystyki (1→3)- α -D-glukanów (publikacja nr 2)	22
3.3 Metody charakterystyki chityny (publikacja nr 3)	24
4. Wyniki i dyskusja.....	26
4.1 Wyniki dotyczące (1→3)- α -D-glukanów (publikacja nr 2).....	26
4.1.1 Wybór optymalnego (1→3)- α -D-glukanu w kontekście sorpcji metali ciężkich	26
4.1.2 Charakterystyka (1→3)- α -D-glukanu pozyskanego z odmiany SH 37 <i>Lentinus edodes</i>	28
4.2 Wyniki dotyczące chityny (publikacja nr 3)	30
4.2.1 Izolacja chityny z wylinek <i>H. illucens</i>	30
4.2.2 Charakterystyka chityny z wylinek <i>H. illucens</i>	30
4.2.3 Wybór procedury izolacji chityny.....	32
4.2.4 Sorpcja jonów niklu	32
5. Wnioski	34
6. Bibliografia	35
7. Teksty publikacji wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia autorów.....	47

1. Wstęp

1.1. Bioremediacja jako proces usuwania zanieczyszczeń ze środowiska

Bioremediacja to proces wykorzystujący materiał biologiczny do oczyszczania środowiska, obejmujący różne rodzaje zanieczyszczeń (organiczne i nieorganiczne) (Vidali, 2001; Megharaj i in., 2011; Sardar i in., 2018). W procesie tym wykorzystuje się żywe organizmy takie jak bakterie, grzyby i rośliny (Vidali, 2001; Zaidi i in., 2011), ale również owady (Bulak i in., 2018), czy materiał biologiczny, np. biomasę grzybową, roślinną (Sanghi i in., 2009). Organizmy, jak i materiał biologiczny, rozkłada lub unieszkodliwia substancje niebezpieczne dla zdrowia ludzi i zwierząt oraz toksyczne dla środowiska (Vidali, 2001).

W zależności od rodzaju zanieczyszczeń, jak i warunków i otoczenia bioremediację można przeprowadzić w miejscu występowania zanieczyszczenia (*in situ*), eliminując potrzebę transportu odpadów, jak i poza tym miejsce (*ex situ*).

Bioremediacja jakkolwiek generalnie bardzo korzystna, ma również swoje wady. Jest to z pewnością procesem długotrwałym. Ograniczeniem może być również dobór odpowiedniego materiału do przeprowadzenia procesu – mikroorganizmy wymagają określonych warunków środowiska, dostępu do odpowiednich ilości składników odżywczych, ale również zanieczyszczeń w odpowiednim stężeniu. Należy również pamiętać, że nie każdy związek ulega całkowitej degradacji, a czasem produkty biodegradacji mogą być bardziej toksyczne i trwałe niż związek wyjściowy (Vidali, 2001).

Bioremediacja staje się coraz bardziej popularną metodą usuwania zanieczyszczeń, a w ostatnich latach pojawiają się jej różne odmiany (Bhunia i in., 2018; Bulak i in., 2018; K i in., 2018). Przykładem bioremediacji może być fitoremediacja z użyciem roślin. Ten typ rekultywacji może być wykorzystywany do gromadzenia, immobilizacji i przekształcania zanieczyszczeń o niskich stężeniach, szczególnie do zanieczyszczeń organicznych i skażenia metalami (Vidali, 2001). Innym przykładem bioremediacji jest entomoremediacja z zastosowaniem owadów (Ewuim, 2013), np. *Hermetia illucens* (Bulak i in., 2018).

W kontekście bioremediacji należy wspomnieć również o mykoremediacji (Thomas et al., 1999), tj. o wykorzystywaniu zdolności grzybów do tolerancji i detoksykacji metali. Odbywa się to przez kilka mechanizmów obejmujących transformację, wewnątrz- i pozakomórkowe wytrącanie oraz pobieranie czynne. Stosując materiał biologiczny, w tym biomasę grzybową, można poprzez biosorpcję bezpiecznie, ekonomicznie i efektywnie usunąć metale ciężkie (Zaidi i in., 2011) zagospodarowując jednocześnie biomasę odpadową.

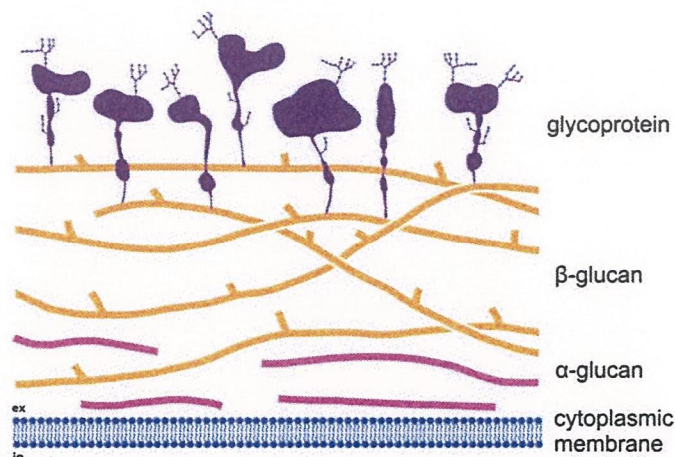
1.2. Glukany: podział, występowanie, funkcje

Glukany są polimerami glukozy dlatego klasyfikowane są do grupy polisacharydów. Podziału glukanów można dokonać m.in. ze względu na anomeryczną konfigurację jednostek glukozy, pod względem kolejności i położenia wiązań glikozydowych, rodzaju i stopnia rozgałęzienia wiązań oraz masy cząsteczkowej (Synytsya i Novák, 2014). Dlatego też glukany można podzielić zgodnie

z anomeryczną konformacją glukozy na: α -glukany, β -glukany i α,β -glukany oraz ze względu na położenie wiązań glikozydowych na: (1 \rightarrow 3)-, (1 \rightarrow 4)- i (1 \rightarrow 6)-glukany (Synytsya i Novák, 2013).

Glukany, to najpowszechniejsze polisacharydy występujące w przyrodzie. Najbardziej znanymi przykładami α -glukanów jest glikogen, czyli (1 \rightarrow 4)- α -glukan z rozgałęzieniami połączonymi wiązaniami (1 \rightarrow 6)- α -glikozydowymi, obecny w grzybach i zwierzętach, oraz skrobia, czyli (1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6)- α -glukan występujący w algach i roślinach. Przykładem β -glukanów jest roślinna celuloza, tj. β -glukan z wiązaniami (1 \rightarrow 4)- lub (1 \rightarrow 3)- oraz liczne (1 \rightarrow 3)- β -glukany występujące w grzybach. Glukany ekstrahowane są z roślin, zbóż (szczególnie z owsa i jęczmienia), wodorostów, grzybów, rzadziej z drobnoustrojów (Freitas i in., 2009; Kagimura i in., 2015; Ruiz-Herrera i Ortiz-Castellanos, 2019).

Wraz z glikoproteinami glukany są m.in. składnikami ścian komórkowych grzybów. Związki te nadają kształt komórkom i tworzą barierę, która chroni przed stresem środowiskowym. Najbardziej zewnętrzną warstwę ściany komórkowej składa się z glikoprotein, a pod nią znajduje się warstwa wewnętrzna, którą tworzą polimery glukozy (β -(1 \rightarrow 3)-glukany, β -(1 \rightarrow 6)-glukany, α -(1 \rightarrow 3)-glukany) i chityna (Grün, 2003; Wiater i in., 2008). Udowodniono, że β -glukany są połączone wiązaniami kowalencyjnymi z łańcuchami chityny, a sieć ta znajduje się pod warstwą glikoprotein. Nie ma jednoznacznych doniesień o położeniu łańcuchów α -glukanów. Według Gröna warstwa (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanów znajduje się pod wszystkimi warstwami biopolimerów, tuż nad błoną cytoplazmatyczną (Rys. 1) (Grün, 2003). Jednak najnowsze doniesienia wskazują, że lokalizacja (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanów jest dość płynna i zależy od wielu czynników, w tym gatunku grzyba (Beauvais i in., 2014; Erwig i Gow, 2016). Ponadto w ramach tego samego gatunku np. *Aspergillus fumigatus* (1 \rightarrow 3)- α -D-glukany mogą znajdować się w innym miejscu, w zależności od formy rozwojowej grzyba (konidia lub grzybnia wegetatywna) (Erwig i Gow, 2016). Choma i in. (2013) znaleźli (1 \rightarrow 3)- α -D-glukany w strzępkach *Aspergillus wentii*, a szczególnie duże ilości w przegrodach strzępkowych. Obecność (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanów stwierdzono u wielu gatunków grzybów (Miyazaki i in., 1974; Rappleye i in., 2007; Reese i in., 2007; Fujikawa i in., 2009). W większych ilościach α -glukany występują u przedstawicieli podstawczaków (*Basidiomycetes*). Ich zawartość wynosi 44–53% (w suchej masie owocnika) w patogenie brzożowym *Fomitopsis betulina*, a nawet 75–88% w owocniku *Laetiporus sulphureus* (Jelsma i in., 1978; Jelsma i Kreger, 1979). W mniejszych ilościach zidentyfikowano α -glukany u przedstawicieli workowców *Ascomycetes* np. *Aspergillus niger* (9%). W niektórych rodzajach drożdży nie występują α -glukany (np. *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans*) (Bobbitt i in. 1977), ale *Histoplasma capsulatum* zawiera ich aż 46,5% (Kanetsuna i in., 1974).



Rys. 1. Budowa ściany komórkowej grzyba według Grüna (Grün, 2003).

Glukany wykazują szereg nietypowych funkcji, stąd ich wykorzystanie w różnych dziedzinach. Duże zainteresowanie α -glukanami w kontekście medycznym wiąże się z ich aktywnością immunomodulacyjną. Do najbardziej aktywnych modulatorów i stymulatorów odpowiedzi immunologicznej należą nie tylko (1→3)-, (1→4)- i (1→6)- β -D-glukany, ale także (1→4)-, (1→6)- i (1→3)- α -D-glukany. Polisacharydy, w tym glukany, są zdolne do indukowania aktywności i różnicowania komórek odpornościowych, takich jak makrofagi, leukocyty, czy komórki NK. Wśród nich, aktywację monocytów uważa się za etap inicjujący odpowiedź immunologiczną po kontakcie z glukanem (Lo i in., 2011).

Aktywność (1→3)- α -D-glukanów jest pośrednio wywoływana przez specyficzne procesy, obejmujące zwiększenie liczby MHC (ang. major histocompatibility complex) i cząsteczek kostymulujących, ale również poprzez wzmocnienie prezentacji antygeny, szlaki dopełniacza i wydzielanie rozpuszczalnych mediatorów, czy aktywację i stymulację ruchliwości komórek fagocytarnych (Moreno-Mendieta i in., 2017). α -D-Glukany mogą działać wieloaspektowo na odpowiedź immunologiczną, ale również ich aktywność immunomodulacyjna może być ukierunkowana poprzez zmiany w długości polimeru, masy cząsteczkowej, stopnia rozgałęzienia i zmianę rodzaju wiązań, a także rozpuszczalność i ładunek cząsteczki (Moreno-Mendieta i in., 2017). Modyfikacja α -D-glukanów, poprzez siarczanowanie, aminopropylację, hydroksyetylację lub metylację powoduje, że związki te stają się rozpuszczalne w wodzie i są znacznie bardziej aktywne biologicznie niż formy natywne. Ponadto, po chemicznej modyfikacji glukany stają się mniej toksyczne ogólnoustrojowo niż uznane cytostatyki (Jin i in., 2004; Huang i in., 2006; Wiater i in., 2012; Wiater i in., 2015). α -D-Glukany mogą bezpośrednio oddziaływać na komórki odpornościowe, głównie poprzez wiązanie się z określonymi receptorami, np. TLR (ang. toll-like receptors) (Tabarsa i in., 2015). Jednak immunomodulujące i przeciwnowotworowe działanie α -D-glukanów na ogół polega raczej na aktywacji układu odpornościowego gospodarza niż bezpośrednim wpływie cytotoksycznym glukanu na komórki docelowe (Tronchin i in., 1995). W działaniu przeciwnowotworowym glukanów pośredniczą głównie limfocyty T i mechanizmy zależne od grasicy (Wasser i in., 2002). α -D-Glukan wyizolowany z grzyba maitake (*Grifola frondosa*) ma udowodnione działanie wzmacniania aktywności przeciwnowotworowej gospodarza (Masuda i in., 2017).

Nie można jednak wykluczyć bezpośredniego działania przeciwnowotworowego lub cytotoksycznej aktywności α -D-glukanów indukujących apoptozę transformowanych komórek (Stuelp-Campelo i in., 2002). Znaczną aktywność przeciwnowotworową wykazuje (1 \rightarrow 3)- α -D-glukan wyizolowana z *Geoderma lucidum*, a dokładniej jego sulfonowana pochodna, co potwierdzono w doświadczeniu przeprowadzonym *in vivo* na mysim modelu nowotworu jamy brzusznej. (Bao i in., 2001; Wiater i in., 2011). Inna pochodna tego polisacharydu wyizolowanego z *Pleurotopus ostreatus*, tym razem karboksymetylowana również wykazuje aktywność cytotoksyczną i antyproliferacyjną względem komórek nowotworowych linii HeLa, zaś natywna forma glukanu nie posiada właściwości przeciwnowotworowych (Wiater i in. 2011).

Kolejnym możliwym wykorzystaniem (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanów jest produkcja enzymów: (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanaz, gdzie glukan pełni rolę induktora syntezy enzymu. (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanazy to enzymy katalizujące hydrolizę wiązań glukozydowych w (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanach, a wytwarzane są przez mikroorganizmy, grzyby i bakterie (Zonneveld, 1972; Wei i in., 2001). Niektóre (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanazy (zwane także mutanazami) posiadają zdolność do hydrolizy rozgałęzionych wiązań glukozydowych (1 \rightarrow 3)- i (1 \rightarrow 6)- α -D-glukanów (mutanów) syntetyzowanych przez próchnicogenne paciorkowce jamy ustnej (paciorkowe mutany). Mutany są kluczowym składnikiem zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych, tworzących szkielet biofilmu próchnicotwórczego (płytki nazębna) (Hotz i in., 1972; Davis i in., 1986; Aires i in., 2011). Kiedy mutanazy, które nie występują naturalnie w jamie ustnej, są dodane do jamy ustnej wraz z produktami higienicznymi (takie jak płyny do ust, pasta do zębów czy guma do żucia), mogą skutecznie wspomagać czyszczenie zębów poprzez rozkład mutanów płytki nazębnej (Pleszczyńska i in., 2015). Niestety produkcja mutanazy drobnoustrojów jest utrudniona z uwagi na brak dostępnego induktora do syntezy tych enzymów. Mutan byłby najlepszym induktorem, gdyby nie potencjalna chorobotwórczość bakterii, niska wydajność syntezy i duże zróżnicowanie strukturalne. Możliwe jest jednak zastąpienie mutanu w tej roli łatwiej dostępnym grzybowym (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanem. Stosowano w tym celu preparaty ze ścian komórkowych różnych grzybów oraz glukany o różnym poziomie czystości. Uzyskano wysoką aktywność glukanazy z *Bacillus circulans* WL-12 poprzez uzupełnienie pożywki całymi komórkami *Schizosaccharomyces pombe* lub oczyszczony liniowy (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanem (pseudonigeran) wyizolowanym z *Aspergillus niger* (Meyer i Phaff, 1980). Pseudonigeran był stosowany również do indukcji glukanazy w *Trichoderma viride* (Hasegawa i in., 1966). Imai i in. (1977) wyprodukowali mutanazę poprzez hodowle *Streptomyces* KI-8 na (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanie wyizolowanym z suszonych owocników *Lentinus edodes* (Imai i in. 1977). (1 \rightarrow 3)- α -D-Glukan wyizolowany z grzyba *Cerrena unicolor* również posłużył jako induktory syntezy mutanazy przez *Trichoderma harzianum* (Osińska-Jaroszuk i in., 2017).

Co więcej, α -glukany mogą być wykorzystywane do immobilizacji enzymów. Dzięki obecności wolnych grup hydroksylowych posiadają zdolność do tworzenia wiązań z różnymi cząsteczkami (Wang i in., 2006). Immobilizacja jest powszechną metodą stabilizacji enzymów i opiera się na wysokim powinowactwie między ligandem a biomolekułą (Fishman i in., 2002). Proces ten chroni enzymy przed denaturacją (Villalonga i in., 2000), co czyni je tańszymi i stabilniejszymi podczas użytkowania i przechowywania w porównaniu do natywnego enzymu (Hertzberg i in., 1992). Wang i in. (2006) podają, że α -glukan wyizolowany z *Penicillium chrysogenum* jest wysoce skuteczny w immobilizacji

lipazy z *Candida sp.* Wyniki potwierdzają większą stabilność podczas przechowywania, lepszą stabilność termiczną immobilizowanej lipazy i aktywność w czasie kilkukrotnego użycia. Jednak enzym immobilizowany miał jednocześnie nieco mniejszą aktywność właściwą niż enzym nieimmobilizowany (spadek o 4,1%). Zdaniem autorów takie immobilizowane enzymy można skutecznie wykorzystać jako biokatalizatory (Wang i in., 2006).

Dostępne są prace dotyczące właściwości prebiotycznych polisacharydów grzybowych. Okazuje się, że glukany silniej stymulują wzrost *Lactobacillus* niż popularna inulina, a co więcej są odporne na soki żołądkowe (pozostają w ponad 90% w formie niestrawionej) (Nowak i in., 2018, Wiater i in., 2020). Nowak i in. badali polisacharydy wyizolowane z 53 gatunków polskich grzybów i wyniki wskazują, że związki te są substratem do wzrostu szczepu *L. acidophilus* i dwóch szczepów *L. rhamnosus* (Nowak i in., 2018). Synytsya i in. (2009) badali prebiotyczne właściwości różnych ekstraktów z grzybów *P. ostreatus* i *P. eryngii*, w tym ekstrakty rozpuszczalne w alkaliach zawierające (1→3)- α -D-glukan. Ekstrakty testowano na dziewięciu szczepach probiotycznych z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus* i w większości przypadków wyciągi z grzybów stymulowały wzrost bakterii probiotycznych (Synytsya i in., 2009)

Obecność α -glukanów może przynosić również negatywne skutki w odróżnieniu od opisanych powyżej przykładów. (1→3)- α -D-glukany odgrywają ważną rolę w przebiegu infekcji roślin. Wydaje się, że kluczową funkcją α -glukanów jest ochrona β -glukanów i chityny przed enzymatyczną degradacją (to znaczy blokowanie uwalniania egzoelicytorów), uniemożliwienie ich rozpoznania przez roślinę oraz zablokowanie wytworzenie odpowiedzi obronnej (Fujikawa i in., 2009; Rappleye i in., 2007; Snarr i in., 2017). Podczas infekcji, receptory rośliny rozpoznają specyficzne wzorce molekularnych związane ze ścianą komórkową patogenu PAMP (ang. Pathogen Associated Molecular Patterns) czy mikroorganizmu MAMP (ang. Microbe Associated Molecular Patterns), a co dalej prowadzi do wywołania odpowiedzi immunologicznej (Fujikawa i in., 2009; Rappleye i in., 2007). Najważniejsze grzybowe PAMP obejmują β -glukany, mannany i chitynę (Reese i in., 2007; Zhang i in., 2005; Brown i Gordon, 2005; Poulain i Jouault, 2004; Theis i Stahl, 2004). Grzybowe patogeny roślin reorganizują składniki swojej ściany komórkowej w odpowiedzi na specyficzne związki roślin wydzielane podczas infekcji (Otaka i in., 2016). Dochodzi do deacetylacji chityny, co powoduje powstaniem chitozanu oraz zmniejsza się ilość β -glukanów. Zmienia się również położenie (1→3)- α -D-glukan, zajmują one bardziej zewnętrzne warstwy (Geoghegan i in., 2017). Ponieważ (1→3)- α -D-glukany są opornymi polisacharydami dla roślin, jest wysoce prawdopodobne, że nagromadzenie powierzchniowe (1→3)- α -D-glukanów chroni ściany komórkowe grzybów przed działaniem czynników przeciwwgrzybiczych, np. enzymów degradujących ścianę komórkową, które grzyby napotykają podczas infekcji (Fujikawa i in., 2009). Rappleye i in. (2007) udowodnili, że (1→3)- α -D-glukan maskuje (1→3)- β -D-glukan w strzępkach infekcyjnych *Histoplasma capsulatum* i chroni je przed enzymatyczną degradacją poprzez blokowanie zdolności rośliny do rozpoznawania tych polimerów (Rappleye i in., 2007). Zdolność α -glukanów do maskowania ściany komórkowej grzybowego patogenu wykorzystano do ochrony roślin przed chorobami powodowanymi przez grzyby. Dla przykładu, Fujikawa i wsp. (2012) zmodyfikowali ryż, aby wydzieliał bakteryjną α -(1→3)-glukanazę, która rozkładała (1→3)- α -D-glukany z powierzchni grzyba. Okazała się, że taki

transgeniczny ryż był bardziej odporny na patogeny, a odpowiedź odpornościowa na grzyby była znacznie szybsza (Fujikawa i in., 2012).

(1→3)- α -D-glukan odgrywa znaczną rolę w patogenezie aspergilozy płuc w grzybie *Aspergillus fumigatus* (Beauvais i in., 2014). *A. fumigatus* jest patogenem wywołującym ogólnoustrojowe zakażenie zwane aspergilozą, szczególnie u osób z osłabioną odpornością, na przykład po przeszczepie lub chemioterapii. Ściana komórkowa *A. fumigatus* składa się głównie z (1→3)- α -D-glukanów (Maubon i in., 2006). Jego biosynteza jest determinowana przez trzy geny znane jako *AGS1*, *AGS2* i *AGS3*. Usunięcie genu odpowiedzialnego za biosyntezę α -glukanu nie zawsze ogranicza jego niekorzystne skutki (Beauvais i in., 2013). Spadek zawartość α -glukanu w ścianie komórkowej powoduje brak genu *AGS1*. Jednak delecja genów *AGS1* i *AGS2* nie zmniejsza wirulencji szczepu (Beauvais i in., 2005; Maubon i in., 2006). Istnieją doniesienia, że to gen *AGS3* bezpośrednio uczestniczy w biosyntezie α -glukanu i wpływa na zmianę zjadliwości *A. fumigatus* (Maubon i in., 2006). W eksperymencie Maubon i Spark (2006) wykazano, że szczepy pozbawiony tego genu, wywoływały szybsze i silniejsze objawy choroby w porównaniu ze szczepem pierwotnym (Maubon i in., 2006). Według Beauvais, Bozza i Kniemeyer (2013) (Beauvais i in., 2013), delecja trzech genów skutkuje brakiem (1→3)- α -D-glukanów w komórkach ściany grzybów, ale ogranicza również wzrost grzybów. Takie zmutowane grzyby były mniej chorobotwórcze niż szczepy bez modyfikacji. Delecja zmienia strukturę ścian komórkowych konidiów, powodując zmniejszenie żywotności konidiów *in vivo*, to znaczy zmniejszyła zjadliwości mutanta. Badanie wykorzystujące mysz model aspergilozy wykazało, że mutant bez α -glukanu był mniej wirulentny niż szczep natywny (Beauvais i in., 2013). Stwierdzono brak kiełkowania zarodników i wzrostu wegetatywnego w płucach myszy zainfekowanej zmutowanymi konidiami. Strukturalne zmiany w ścianie komórkowej zmutowanych konidiów spowodowały, że konidia były łatwiej fagocytowane przez makrofagi gospodarza. Ponadto, w przeciwieństwie do rodzimego szczepu, na powierzchni zmutowanych konidii można było zobaczyć β -glukan i chitynę, a te polisacharydy wywołują odpowiedź immunologiczną przeciwko grzybom.

1.3. Grzybowe (1→3)- α -D-glukany: właściwości, funkcje, zastosowanie

W literaturze dostępnych jest wiele informacji o grzybowych β -glukanach, ale α -glukany, które są również często występującymi polisacharydami w grzybach, nie zostały jeszcze w pełni scharakteryzowane. Praca Grūna z 2003 r. stanowi obszerny zbiór informacji o tych biopolimerach jednak nie wyczerpuje całości tematu (Grūn, 2003). W ostatnich latach przeprowadzono szereg badań dotyczących α -glukanów, które rzucają nowe światło na strukturę, właściwości i funkcje tych polimerów (Yoshimi i in., 2017; Choma i in., 2018; Wiater i in., 2020).

Grūn (2003) wskazał dwa mechanizmy biosyntezy (1→3)- α -D-glukanów, jednostopniowy w ścianach zarodników i dwustopniowy w *Schizosaccharomyces pombe* (Grūn, 2003). Yoshimi i in. (2017) obszernie opisali mechanizm biosyntezy α -glukanów, w tym geny i enzymy zaangażowanych w ten proces (Yoshimi i in., 2017).

W literaturze istnieje kilka procedur izolowania α -glukanów (Wiater i in., 2008). Najogólniej, metody te obejmują etap odbarwiania, będącego jednocześnie etapem usuwania frakcji rozpuszczalnej w wodzie, następnie etap otrzymania frakcji rozpuszczalnej w alkaliach, neutralizacji i płukania

(Hasegawa i in., 1969; Kiho i in., 1994; Mizuno in., 1998; Wiater i in., 2008). Grün zastosował do izolacji α -glukanów odmienne odczynniki i metodykę izolacji (Grün, 2003).

Właściwości związków, zwłaszcza cząsteczek biologicznie czynnych zależą od ich budowy, konformacji i masy cząsteczkowej. (1 \rightarrow 3)- α -D-Glukany składają się z monomerów glukozy połączonych głównie wiązaniami (1 \rightarrow 3)-glikozydowymi, ale ich struktura różni się w zależności od gatunku grzyba. W α -glukanach występują nie tylko wiązania (1 \rightarrow 3)- tworzące liniowy polimer, takich jak w przypadku *Amanita muscaria* (Kiho i in., 1994), ale mogą również występować niewielkie ilości wiązań (1 \rightarrow 4)- (np. w *Neurospora crassa*) (Cardemil i Pincheira, 1979), a także związki typu niger, gdzie naprzemiennie występują wiązania (1 \rightarrow 3)- i (1 \rightarrow 4)- (np. w *Parmelia caperata*) (Takeda i in., 1970). Dla przykładu, badano strukturę polisacharydów rozpuszczalnych w alkaliach, które wyizolowano z borowika szlachetnego. Polimer ten składał się głównie z łańcuchów (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanu (około 67%), ale zawierał również α -(1 \rightarrow 3)-D-mannan (28%) (Choma i in., 2018). Dodatkowo, Choma i in. (2013) scharakteryzowali nierozpuszczalny w wodzie polisacharyd wyizolowany z *Aspergillus wentii* i podali, że badany polimer to liniowy α -D-glukan o masie cząsteczkowej 850 kDa. Składał się z 25 podjednostek, a każda podjednostka składała się z 200 reszt α -D-glukozy połączonych wiązaniami (1 \rightarrow 3)-, oddzielonymi krótkimi fragmentami α -D-glukozy połączonych wiązaniami (1 \rightarrow 4)- (Choma i in., 2013).

α -Glukany o odmiennej budowie tworzą się na płycie nazębnej, gdzie jednostki glukozy połączone są wiązaniem (1 \rightarrow 3)- w łańcuchu głównym i (1 \rightarrow 6)- w łańcuchach bocznych (Wiater i in., 2006). (1 \rightarrow 3)- α -D-Glukany są nierozpuszczalne w wodzie ze względu na obecność silnych wiązań wodorowych. Obecność tych wiązań utrudnia określenie masy cząsteczkowej i konformacji cząsteczek. Zhang i in. (Zhang i in., 2000) zastosowali roztwory mocznika i NaOH do rozbicia wiązań wodorowych i określili masę cząsteczkową glukanu wyizolowanego z *Lentinus edodes* jako $5,21 \cdot 10^5$. Masa cząsteczkowa glukanu wpływa bezpośrednio na stopień polimeryzacji, który dla tego polimeru wynosi od 60 do 3500 (Grün, 2003).

Przeprowadzono również badania dotyczące konformacji i krystaliczności α -glukanów. W 1979 roku Ogawa i in. (Ogawa i in., 1979) wykorzystując analizę rentgenowską scharakteryzowali konformację (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanu. Ustalili, że cząsteczka ma kształt zbliżony do helisy 2/1 (Ogawa i in., 1979; Zhang i in., 2005). Według innych doniesień glukan w roztworze może występować jako pojedyncza, podwójna lub potrójna helisa (Zhang i in., 1999). W roztworze LiCl/DMSO α -glukan występuje jako elastyczny łańcuch (Chen i in., 1998a; Chen i in., 1998). (1 \rightarrow 3)- α -D-Glukany występują w różnych formach krystalicznych (polimorfach), w zależności od gatunku grzyba, rodzaju badanej tkanki (tkanka reprodukcyjna lub niereprodukcyjna) oraz warunków prowadzenia izolacji (Jelsma i Kreger, 1979). Jelsma i Kreger (1979) badali cztery gatunki grzybów (*Laetiporus sulphureus*, *Piptoporus betulinus*, *Schizophyllum commune* i *Aspergillus nidulans*) przy użyciu dyfrakcji rentgenowskiej. Badania wykazały, że α -glukany mogą występować w trzech odmianach polimorficznych (I, II i III). Pierwsza forma (I) występuje w tkance natywnej *L. sulphureus* i *P. betulinus*, drugą formę (II) może uzyskać przez wytrącanie z roztworu alkalicznego. Trzecia postać krystaliczna nie jest uwodniona, w przeciwieństwie do dwóch pozostałych, a zatem można ją otrzymać poprzez suszenie odmiany polimorficznej I w temperaturze 60°C (zmiana całkowita) i odmiany polimorficznej II w temperaturze 95°C w próżni (Jelsma i Kreger, 1979).

1.4. (1→3)- α -D-glukany jako składnik odpowiedzialny za wiązanie metali w grzybach

Zdolność grzybów do wiązania metali jest znana od dawna. Do tej pory badania koncentrowały się na zawartość metali w całych owocnikach grzybów, nie skupiając uwagi na konkretnym składniku odpowiedzialny za zdolność sorpcyjną (Falandysz i in., 2001; Stijve i Besson, 1976; Falandysz i Borovička, 2013). W naturze istnieją dwa mechanizmy, dzięki którym grzyby gromadzą metale ciężkie: pobieranie bierne (biosorpcja) i pobieranie aktywne (bioakumulacja). W pierwszym przypadku martwa biomasa (również grzybowa) wiąże metale na powierzchni ściany komórkowej (Garnham i in., 1992) a mechanizmy oparte są na oddziaływaniach fizykochemicznych między jonami metali a grupami funkcyjnymi obecnymi na powierzchni komórki. Oddziaływania te to np. oddziaływania elektrostatyczne, wymiana jonowa, chelatowanie, kompleksowanie, czy mikrostrącanie (Wang i Chen, 2009). Pobieranie aktywne jest zależne od metabolizmu komórki, zależy również od światła i temperatury oraz przebiega wolniej w porównaniu z procesem pobierania biernego (Garnham i in., 1992; Dönmez i Aksu, 1999). W literaturze większość definiuje mechanizm pobierania metali przez żywe komórki jako proces dwufazowy - początkowy szybki etap biosorpcji, po którym następuje wolniejsze pobieranie aktywne (Garnham i in., 1992; Dönmez i Aksu, 1999; Malik, 2004). Najnowsze badania z wykorzystaniem żywych kultury alg morskich wskazują, że wewnątrzkomórkowa zawartość kadmu jest często wyższa niż ta biosorbowana, co dowodzi większej efektywności usuwania metali przez pobieranie aktywne (Matsunaga et al., 1999; Perez-Rama i in., 2002; Malik, 2004).

Ludzie wykorzystali zdolność grzybów do wiązania metali w procesie bioremediacji (Vidali, 2001; Megharaj, i in., 2011; Sardar i in., 2018), a dokładniej mykoremediacji (Akhtar i Amin-ul Mannan, 2020). Są one wykorzystywane do różnego typu zanieczyszczeń, w tym również tych trudnych do utylizacji, np. wielopierściovych węglowodorów aromatycznych, metali ciężkich (Bennet i in. 2002; Adenipekun i Lawal, 2012) i pestycydów (Kaur i in., 2016). Grzyby wykorzystywano również do oczyszczania gleby zanieczyszczonej olejem silnikowy (Adenipekun i Isikhuemhen, 2008), a więc ich potencjał bioremediacyjny jest szeroki. Jednocześnie nie jest wymagana jakakolwiek obróbka wstępna zanieczyszczeń przed ich biotransformacją przez grzyby (Chatterjee i in., 2017).

1.5. Chityna - występowanie, właściwości, zastosowanie

Chityna (poli- β -1,4-N-acetylo-D-glukozamina) to biopolimer zbudowany z merów N-acetylo-D-glukozaminy połączonych wiązaniami β -(1→4)-glikozydowymi. Chityna jest to drugi, po celulozie, najbardziej rozpowszechniony związek chemiczny na Ziemi (Dutta i in., 2004; Rinaud, 2006; Marinez i in., 2014; Caligiani i in., 2018). Warto przy tym zaznaczyć że jest zasobem odnawialnym (Krajewska, 2004).

Chityna szeroko występuje w świecie eukariontów, jest obecna m. in. w grzybach, stawonogach, nicieniach, glonach, czy mięczakach, natomiast nie występuje w roślinach i kręgowcach. Pełni rolę głównie ochronną i strukturalną, podobnie jak celuloza u roślin (Marinez i in., 2014). Powiązane ze sobą liczne łańcuchy cukrowe chityny tworzą uporządkowaną strukturę, mikrofibryle nadają chitynie wytrzymałość fizyczną oraz nierozpuszczalność w większości rozpuszczalników (Martinez i in., 2014). Masa cząsteczkowa chityny wynosi od 30 do 3000 kDa, a jej stopień deacetylacji przekracza

90% (Mourya i in., 2011). Dla przykłądu masa molowa chityny wyizolowana z pszczoły miodnej z wydajnością 18% (w stosunku do masy początkowej pszczoły) wynosiła od $318 \cdot 10^3$ do $424 \cdot 10^3$ Da (Draczyński, 2008).

Polimer ten występuje w trzech odmianach krystalicznych α , β , γ (Brugnerotto i in., 2001; Rinaudo, 2006; Lavall i in., 2007). Najczęściej spotykaną formą w przyrodzie jest odmianą alfa, która występuje m. in. w owocnikach grzybów, drożdżach, skorupiakach (kryl, krab) oraz szkielecie owadów (Rinaudo, 2006), np. w *H. illucens* (Waško i in., 2016). Odmiana β nie występuje tak często w przyrodzie. Spotykana jest tam gdzie elementy budowy ciała danego organizmu oprócz dużej wytrzymałości muszą być również elastyczne, np. u kałamarnic (Rudall, 1969; Gaill i in., 1992; Kurita, 2001). Forma γ jest bardzo rzadka i uważana jest za pochodną odmiany α (Atkins, 1985). Chityna w przyrodzie nie występuje w czystej postaci, ale jest powiązana z innymi związkami, głównie białkami poprzez wiązania kowalencyjne (Poulicek i in., 1986; Jang i in., 2004).

Istnieje wiele źródeł pozyskiwania chityny. Organizmy, które często wykorzystywane są do izolacji chityny to: krewetki, kraby, kry i kalmary (Cuong i in., 2016; Chen i in., 2017; Fadlaou i in., 2019; Tolesa i in. 2019), ale również szkielety gąbek (Ehrlich i in., 2010; Abo Elsoud i in., 2019). Chityna stanowi składnik ściany komórkowej grzybów (Grün, 2003), a jej źródłem mogą być również owady (Badawy i in., 2015; Abidin i in., 2020; Hahn i in., 2020), a wśród nich *Hermetia illucens* (Waško i in., 2016; Antonov i in., 2019; Smets i in., 2020).

Najpopularniejszą pochodną chityny jest chitozan otrzymywany w wyniku częściowej deacetylacji chityny, która polega na zasadowej hydrolizie grup N-acetyloaminowych tego polimeru do grup aminowych. Otrzymuje się w ten sposób chitozan o różnym stopniu deacetylacji (60-80%) oraz różnych masach molowych w zależności od sposobu prowadzenia procesu. Ta pochodna chityny wykazuje wiele właściwości bioaktywnych, głównie z uwagi na rozpuszczalność w roztworach wodnych kwasów organicznych (Rinaud, 2006; Draczyński, 2013).

Chitynooligosacharydy (skrót ang. COS) są kolejną grupą pochodnych chityny, które są homolub heterooligomerami N-acetyloglukozaminy i D-glukozaminy. Można je otrzymać poprzez reakcje enzymatyczne, metody chemiczne lub ich kombinacje z chityny, ale również z chitozanu. Mają one mniejszą masę cząsteczkową niż chityna i chitozan, która wynosi od 0.2 do 30 kDa. Chitynooligosacharydy charakteryzują się lepszą rozpuszczalnością w wodzie niż chityna i posiadają szereg właściwości biologicznych (Aam i in., 2010; Mourya i in., 2011).

Chityna jako naturalny biopolimer jest coraz szerzej wykorzystywana w różnych zastosowaniach, w tym m.in. w medycynie, farmacji, stomatologii, przemyśle spożywczym, czy ochronie środowiska (Synowiecki i Al-Khateeb, 2003; Park i Kim, 2010). Od bardzo dawna stosowana była np. do gojenia ran w postaci okładu ze sproszkowanych skorupiaków (Draczyński, 2013). Jednak z uwagi na nierozpuszczalność chityny w wodzie nie może być ona stosowana wewnątrz organizmów żywych. Znane jest ich działanie przeciwzapalne (Kim i in., 2004; Yoon i in., 2007), przeciwdrobnoustrojowe (przeciwko bakteriom, drożdżom czy grzybom), (Jeon i in., 2001; Tsai i in., 2002) antyoksydacyjne (Ngo i in., 2008; Ngo i in., 2009) i przeciwnowotworowe (Huang i in., 2006; Shen i in., 2009). Wykorzystywane są w systemach dostarczania (transportu) leków w organizmie, zmniejszając skutki uboczne ich stosowania, czy poprawiając ich wchłanianie (Park i Kim, 2010).

Chityna i jej pochodna karboksymetylochityna stymulują układ odpornościowy. Dostępne są badania *in vivo* dotyczące zdolności chityny do aktywacji makrofagów co prowadzi do zahamowania wzrostu komórek nowotworowych u myszy. Biopolimer ten aktywuje również niespecyficzną odporność komórek gospodarza przeciw patogenowi, np. *Escherichia coli* (Hudson i Jenkins, 2001). Pomimo, że chityna nie wykazuje sama w sobie działania przeciwnowotworowego, to wykorzystywana była do tworzenia koniugatów, czyli kompleksów, w których pełniła rolę nośnika leków, np. fluorouracylu.

Chityna wykazuje również działanie przeciwutleniające (Jeon i Kim, 2000), jednak z uwagi na nierozpuszczalność stosuje się jej pochodne N-acetylochitoooligasacharydy, które mogą hamować utlenianie DNA i białek, zwiększać zdolność zmiatania wolnych rodników przez makrofagi oraz działać hamująco na stres oksydacyjny w komórkach (Ngo i in., 2009).

Kolejną właściwością chityny i jej pochodnych jest działanie przeciwzakrzepowe. Siarczanowa pochodna chitozanu wykazywała większą aktywność przeciwzakrzepową (dwukrotnie większą) niż heparyna. Stąd możliwe zastosowanie siarczanu chityny jako heparynoid (antykoagulanty krwi; lek przeciwzakrzepowy) w dializie krwi (Hirano, 1999).

Dodatkowo, chitynę i chitozan stosowane są jako składnik past do zębów, płynów do płukania ust i gum do żucia. Odświeżają oddech i zapobiegają tworzeniu się płytki nazębnej i próchnicy zębów. Chityna może być również stosowana jako wypełniający materiał dentystyczny. Co więcej, zarówno chityna, jak i chitozan posiadają zdolność absorbowania drożdżaków *Candida*, które gromadzą się na protezach zębowych, umożliwiając tym samym utrzymanie ich higieny (Dutta i in., 2004).

Kolejnym zastosowaniem chityny jest wykorzystanie jej do unieruchamiania enzymów oraz całych komórek. Jest to możliwe dzięki takim właściwościom polimeru jak: biodegradowalność, biokompatybilność, nietoksyczność, obojętność fizjologiczna, dobre powinowactwo do białek, dostępność reaktywnych grup funkcyjnych (Krajewska, 2004; Rinaud, 2006). Dla przykładu immobilizowane przy użyciu chityny enzymy (α - i β -amylazy oraz invertaza) są wykorzystywane m. in. w przemyśle spożywczym, do klarowania soków owocowych, czy w przemyśle mleczarskim. (Krajewska, 2004). Co więcej sproszkowaną chitynę wykorzystano do immobilizacji proteazy alkalicznej, co ma zastosowanie w produkcji detergentów do prania (Abdel-Naby i in., 1998) oraz do immobilizacji dekstranazy w środkach do czyszczenia zębów (Abdel-Naby i in., 1999)

Szerokie zastosowanie wykazują biowłókna otrzymane na bazie chityny i jej pochodnych w tym chitozanu. Są wykorzystywane zarówno w przemyśle tekstylnym, medycynie i biotechnologii (Hirano, 2001) z uwagi na różnorodne właściwości (przeciwzakrzepowe, przeciwdrobnoustrojowe, biokompatybilne, biodegradowalne, hemostatyczne, zdolność chelatowania metali, zdolność do gojenia ran) (Hirano, 2001). Włókna na bazie chityny i chitozanu są zazwyczaj wykorzystane jako materiał powlekający włókna celulozowe, nylonowe, bawełniane i wełniane, ponieważ same włókna chityny mają małą wytrzymałość na rozciąganie, a włókna z chitozanu nie są odporne na pH poniżej 5,5. Takie zmodyfikowane włókna wykorzystuje się do produkcji opatrunków na rany, w odzieży medycznej, do produkcji ubrań niealergizujących oraz o właściwościach antybakteryjnych, w tym odzieży sportowej (Hudson, 1997; Wieczorek i Mucha, 1997; Synowiecki i Al-Khateeb, 2003).

1.6. Chityna jako sorbent metali ciężkich

Jednym z możliwych zastosowań chityny jest jej wykorzystanie jako sorbent metali ciężkich. Komercyjną chitynę wykorzystano do sorpcji jonów żelaza, a doświadczenia obejmowały badania wpływu dawki i wielkości cząstek adsorbentu, czasu prowadzenia procesu, początkowego stężenia adsorbentu, temperatury oraz obecności dodatkowych anionów i kationów. Na podstawie funkcji termodynamicznych stwierdzono, że proces adsorpcja żelaza (III) jest spontaniczny, endotermiczny i korzystny. Cząstki sorbetu o wielkości 0,21 mm wykazywały większą skuteczność usuwania metali niż cząstki o wielkości 0,50-0,71 mm. Równowagę kinetyczną osiągnięto po 8 min. Wraz ze wzrostem stężenia jonów chlorkowych i azotanowych zmniejszała się sorpcja jonów żelaza, obecność kationów (Cu^{2+} , Zn^{2+} i Cr^{6+}) również negatywnie wpływała na sorpcję, szczególnie obecność jonów Cu^{2+} . Wraz ze wzrostem temperatury zwiększała się efektywność usuwania żelaza (Karthikeyan i in., 2005). Chitynę z różowej krewetki (*Solenocera melantho*) wykorzystano również do badania sorpcji jonów Pb^{2+} z roztworów wodnych. Najwyższa wydajność biosorpcji wyniosła 99,7%, przy pH roztworu równym 9, a równowagę układ osiągnął w ciągu 200 min (Forutan i in., 2016). Xiong zastosował zakupioną chitynę do adsorpcji jonów Cd^{2+} (Xiong, 2010). Maksymalna efektywność sorpcji kadmu na badanej chitynie wynosiła 93,9 mg/g. Stwierdzono, również, że wzrost temperatury z 15°C do 45°C zwiększa efektywność sorpcji od 87,1 do 102 mg/g. Widma FTIR próbek chityny przed i po adsorpcji jonów Cd^{2+} wykazały, że w usuwanie metalu uczestniczyły grupy acetyloaminowe i hydroksylowe (Xiong, 2010). Chitynę otrzymaną z muszli kraba wykorzystano do badania sorpcji pięciu metali (ołowiu, miedzi, niklu, kadmu i cynku) z roztworów wodnych. Badany proces był endotermiczny i zachodził spontanicznie. Modele Freundlicha posłużył do analizy danych doświadczalnych dla wszystkich badanych układów, a model Langmuira posłużył jedynie do opisu izoterm Pb(II) i Cu(II) na chitynie, dla pozostałych metali był nieskuteczny (Boulaiche i in., 2019).

Wszystkie opisane prace dotyczą chityny pozyskanej z krewetek, czy krabów. Są to najczęstsze źródła pozyskiwania chityny. Nie ma jednak badań dotyczących sorpcji metali ciężkich na chitynie z *H. illucens*. Do tej pory chityna otrzymana z tego owada posłużyła jako sorbent barwnika organicznego (błękitu bromofenolowego) (de Souza i in., 2020). Z drugiej strony, w literaturze dostępnych jest kilka publikacji dotyczących akumulacji metali ciężki w *H. illucens*, zarówno w poczwarkach, larwach, jak i dorosłych osobnikach (Diener i in., 2015; van der Fels-Klerx i in., 2016; Gao i in., 2017; Purschke i in., 2017; Bulak i in., 2018), a więc owad ten wykazuje potencjał sorpcyjny do tego typu zanieczyszczeń.

1.7. *Hermetia illucens* jako źródło chityny

Hermetia illucens znana również jako black soldier fly to owad należący do rodziny lwinkowatych (łac. *Stratiomyidae*) rzędu muchówki (łac. *Diptera*). Owad ten pochodzi z Ameryki, a obecnie występuje w regionach tropikalnych i umiarkowanych (Sheppard i in., 1994; Čičková i in. 2015). *Hermetia illucens* charakteryzuje się krótkim, holometabolicznym cyklem życiowy (rozwój zupełny) obejmujący cztery stadia: jaja, larwy, poczwarki i imago (Li i in. 2011), a czas rozwoju tego owada od larwy do postaci dorosłej waha się od 38 do 43 dni (May, 1961; Tingle i in., 1975; Sheppard i in., 2002; Tomberlin i in., 2002; Tomberlin i in., 2005;). W naturze żywi się rozkładającą materią organiczną i odchodami zwierzęcymi (Veldkamp i in., 2012).

Owad ten jest hodowany na dużą skalę z uwagi na szerokie zastosowanie. Optymalna temperatura tolerowana dla rozwoju larw wynosi 27°C, ale tolerowana waha się od 24-40°C, (Sheppard i in., 2002). Przyjmuje się, że optymalna dawka pokarmu potrzebna do rozwoju larw to 100 mg/ na dzień/ na larwę (Diener et al. 2015).

Hermetia illucens może stanowić źródło pożywienia dla ludzi i zwierząt, co jest szczególnie ważne z uwagi na ciągły wzrost liczby ludności na świecie. Szacuje się że w 2050 r. Ziemię będzie zamieszkiwać 9 miliardów ludzi. Owady wydają się być interesującą alternatywą dla mięsa, ryb i roślin (FAO 2013, van Huis 2013). Szczególnie, że ich produkcja powoduje znacząco mniejszą emisję CO₂ niż innych zwierząt hodowlanych. Owady dostarczają niezbędnych składników takich jak białko, tłuszcze, minerały i witaminy, są źródłem energii (Rumpold i Schlüter, 2013; Ramos-Elorduy i in., 1997). Dodatkowo, owady są wszystkożerne, szybko się namnażają, mają małe zapotrzebowanie na miejsce, a więc są proste w hodowli (Rumpold i Schlüter, 2013). Do wad entomofagii należą natomiast potencjalne reakcje alergiczne wywoływane po ich spożyciu (Phillips i Burkholder, 1995) oraz możliwość gromadzenia substancji toksycznych w ich biomasie (Berenbaum, 1993).

H. illucens wykorzystana jest również do produkcji pasz, co stanowi jednocześnie sposób zagospodarowania biomasy odpadowej. Wykorzystano obornik z hodowli kur, który stanowił pokarm dla larw *H. illucens*. Otrzymana w ten sposób pasza zawierała do 42% białka i do 35% tłuszczu przy jednoczesnej redukcji obornika o co najmniej 50%, co nie wymagało dodatkowych nakładów energii i szczególnych warunków hodowli owadów (Sheppard i in., 1994). Dodatkowo, Borrelli i inni (2017) wykorzystywali larwy *H. illucens* do karmienia kur i zaobserwowali wpływ takiej paszy na mikrobiom jelita ptaków. Autorzy stwierdzili, że takie pożywienie ma właściwości prebiotyczne z uwagi na zawartą w niej chitynę (Borrelli i in., 2017).

Ze względu na fakt wykorzystania *H. illucens* jako pokarmu lub paszy przeprowadzono badania nad wpływem zanieczyszczeń w postaci mykotosyn, metali ciężkich i pestycydów na wzrost i skład larw. Larwy karmiono podłożem kukurydzianym z domieszką zanieczyszczeń i stwierdzono, że metale ciężkie ograniczały ich wzrost, a dodatkowo kadm i ołów akumulował się w owadzie. Pestycydy i mykotoksyny natomiast nie wpływały znacząco na wzrost i nie akumulowały się w organizmach (Purschke i in., 2017). Szereg przeprowadzonych badań dowodzi, że karma oparta na larwach *H. illucens* może stanowić alternatywę dla mączki rybnej i suplementów białka roślinnego w hodowli zwierząt oraz w akwakulturze (Elwert i in.2010, Kroeckel, i in., 2012, St-Hilaire i in. 2007).

Co więcej, larwy *H. illucens* są w stanie przekształcić odpady organiczne, również te o niskiej wartości, w bogatą w białko i tłuszcze w biomasę zawierającą 35-50% białka oraz 17-36% oleju (w suchej masie) (St-Hilaire i in. 2007; Kroeckel i in., 2012; Barroso i in. 2014). *H. illucens* posłużyła między innymi do utylizacji odpadów po ekstrakcji mleka z bielma kokosowego (Mohd-Noor, 2017).

Larwy *H. illucens* żywią się zarówno materią roślinną, jak i zwierzęcą, obornikiem, czy resztkami pokarmu, czyli materią bogatą w liczne mikroorganizmy. Wymaga to wytworzenia odpowiednich mechanizmów odpornościowych. Stąd zainteresowanie ich odpowiedzią immunologiczną na zakażenie. Okazuje się, że peptydy zawarte w tym owadzie wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe w stosunku do bakterii Gram-dodatnich (*Bacillus subtilis* i *Micrococcus luteus*) oraz bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli* i *Pseudomonas fluorescens*) (Zdybicka-Barabas i in., 2017; Vogel i in., 2018).

Ze względu na dużą zawartość tłuszczu w biomasie larwy *H. illucens* mogą być wykorzystana w produkcji biodiesla (Zheng i in., 2012; Li i in., 2015; Wang i in. 2017). *H. illucens* może stanowić także istotne źródło chityny i chitozanu (Waśko i in., 2016; Caligiani et al., 2018; Khayrova i in., 2019).

Owady, a wśród nich *H. illucens* może służyć do oczyszczania środowiska z różnego rodzaju zanieczyszczeń w procesie zwanym entomoremediacją (Ewuim, 2013; Bulak i in., 2018). Bulak i in. (2018) wykorzystali larwy *H. illucens* do redukcji biomasy w postaci zanieczyszczonych metalami ciężkimi liści kukurydzy. Średnio po 36 dniach zredukowano badaną biomasę o 49%. Stanowi to alternatywę dla powszechnie stosowanego kompostowania (Bulak i in., 2018).

2. Cel pracy

Zasadniczym celem pracy było sprawdzenie zdolności sorpcyjnych naturalnych biopolimerów jako sorbentów metali ciężkich w kontekście potencjalnego ich wykorzystania w bioremediacji.

Cel zasadniczy został zrealizowany przez realizację celów cząstkowych:

- charakterystyka grzybowych (1 → 3)- α -glukanów;
- określenie zdolności sorpcyjnych (1 → 3)- α -glukanów pozyskanych z różnych gatunków grzybów, wyselekcjonowanie najlepszego grzybowego α -glukanu, tj. z grzyba *Lentinus edodes* (shiitake) oraz ocena jego właściwości fizykochemicznych;
- wyizolowanie chityny z owada *Hermetia illucens* i wybór najlepszej metody izolacji;
- charakterystyka chityny wyizolowanej w oparciu o wybraną metodę;
- ocena zdolności sorpcyjnych chityny wyizolowanej w oparciu o wybraną metodę.

Hipoteza badawcza

Naturalne biopolimery, takie jak grzybowy (1→3)- α -glukan oraz chityna posiadają zdolność sorbowania jonów metali ciężkich i mogą być wykorzystywane w procesie biosorpcji.

3. Materiały i metody

3.1. Metody wspólne dla obu publikacji

Metody mikroskopowe

Powierzchnię α -glukanów zobrazowano wykorzystując mikroskop optyczny Nikon Eclipse MA200 (Japonia). Pomiary prowadzono w spolaryzowanym świetle odbitym, przy różnych powiększeniach od 50x do 500x. Ponadto w obu przypadkach materiał analizowano także przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowo-jonowego (SEM) FEI Quanta 3D FEG, przy powiększeniu od 250 \times do 3500 \times . Przed pomiarem próbki pokryto warstwą Pd-Au, aby wyeliminować niekorzystne efekty elektrostatyczne. Obrazy uzyskano metodą wysokopróżniowej detekcji elektronów wtórnych.

W badaniach chityny wykorzystano także mikroskopię konfokalną. Do tego celu posłużył ten sam mikroskop co w przypadku mikroskopii optycznej tj. Nikon Eclipse MA 200 (Japonia) wyposażony dodatkowo konfokalną nasadką Eclipse C1 umożliwiającą pomiaru w fioletowym świetle lasera o długość fali = 405 nm.

Spektroskopia FT-Raman i FT-IR

Widma FT-Ramana glukanów uzyskano z użyciem spektrometru FTIR Nicolet 8700A wyposażony w moduł Nicolet NXR oraz detektor InGaAs (Thermo Scientific, USA). Próbki naświetlano laserem neodymowym Nd (YVO4) o maksymalnej mocy 2W oraz długość fali 1064 cm^{-1} . Widmo rejestrowano w zakresie 4000–100 cm^{-1} . Zaś widma FT-IR po procesie sorpcji otrzymano za pomocą spektrometru Nicolet 8700 (Thermo Scientific). Sproszkowany preparat (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanów umieszczono na kryształach ATR. Widma rejestrowano w zakresie 4000–400 cm^{-1} .

Analizę FT-IR chityny przeprowadzono za pomocą spektrometru Nicolet 6700 FTIR (Thermo Scientific, USA) wyposażonego w przystawkę Smart Orbit TR diamond ATR, gdzie wykorzystuje się metodę jednokrotnego, całkowitego wewnętrznego odbicia promieniowania IR od kryształu diamentu. Widma FTIR rejestrowano w zakresie 4000–400 cm^{-1} .

ICP-OES

W celu określenia zawartości zaadsorbowanego metalu roztwory analizowano za pomocą optycznej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-OES) (Thermo Scientific iCAP Series 6500, USA). Spektrometr był kontrolowany przez oprogramowanie iTEVA.

XRPD

Materiał organiczny w postaci α -glukanu i chityny analizowano stosując technikę proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej (XRPD) wykorzystując dyfraktometr Empyrean (Malver PANalytical, Wielka Brytania) wyposażony w anodę miedzianą jako źródło promieniowania rentgenowskiego oraz szybki detektor wysokiej rozdzielczości, PIXcel3D (40 kV, 20 mA i 2 θ). Pomiary dyfrakcyjne próbek zostały wykonane w zakresie skanowania kąta 2 θ : 4°-70° dla glukanu i 4°-90° dla chityny oraz

z wielkością kroku $0,026^\circ$ dla glukanu i $0,013^\circ$ dla chityny. Indeks krystaliczności dla grzybowego glukanu obliczono według poniższego wzoru:

$$\text{CrI}_{110} = [(I_{110} - I_{\text{am}})/I_{110}] \times 100$$

gdzie I_{110} to maksymalne natężenie przy $2\theta \cong 20^\circ$, a I_{am} to intensywność dyfrakcji amorficznej przy $2\theta \cong 16^\circ$; według Liu i wsp. (Liu i in., 2012).

Zaś stopień krystaliczności chityny oszacowano na podstawie oprogramowania WaxFit (WAXSFIT), które bazuje na stosunku pola powierzchni pod krzywymi fazy krystalicznej do sumy pola powierzchni pod krzywymi fazy amorficznej i fazy krystalicznej. Dodatkowo, dane dyfrakcyjne chityny porównano za pomocą oprogramowania ReX (ReX Powder diffraction) ze strukturą α -chityny z prezentowaną w pracy Sikorsi i in. (2009).

Analiza statystyczna

Podane w pracy wartości liczbowe są średnimi z trzech niezależnie przeprowadzonych eksperymentów \pm odchylenie standardowe. Wykorzystano test Tukeya HSD (STATISTICA 8.0, StatSoft, Inc., USA) do określenia różnic istotnych statystycznie (poziom istotności statystycznej $p < 0,05$). Dodatkowo, w przypadku wyników dotyczących chityny do opracowania statystyki wykorzystano również test t Studenta.

3.2. Metody charakterystyki (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanów (publikacja nr 2)

Izolacja (1 \rightarrow 3)- α -glukanów

Do izolacji (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanów wykorzystano grzyby pozyskane z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, z Wydziału Warzywnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, z Centraalbureau voor Schimmelcultures w Holandii, z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych w Warszawie, a niektóre owocniki grzybów zostały zebrane w okolicach Poznania.

W pierwszym etapie (skrining) izolację (1 \rightarrow 3)- α -D-glukanów przeprowadzono z następujących grzybów:

- *Aspergillus awamori*
- *Aspergillus nidulans*
- *Aspergillus oryzae*
- *Aspergillus wentii*
- *Penicillium lanosum*
- *Penicillium notatum*
- *Boletus edulis*
- *Ganoderma lucidum*
- *Hericium erinaceus*
- *Pleurotus citrinopileatus*
- *Pleurotus djamor*

- *Pleurotus eryngii*
- *Pleurotus ostreatus*
- *Pleurotus precoce*
- *Piptoporus betulinus*
- *Lentinus edodes*

oraz odmiany grzyba *Lentinus edodes* (zarówno zdrowe owocniki jak i materiał odpadowy):

- Mycelia 3790
- Sylvan 4080
- SH 37

Do przeprowadzenia etapu izolacji wykorzystano zliofilizowane i zmielone materiały grzybowe oraz kwas azotowy (36% HNO₃) (POCH, Gliwice, Polska), wodorotlenek sodu (Merck, Darmstadt, Niemcy) i wodę destylowaną.

Izolacja glukanów obejmowała kilka etapów i polegała w pierwszej kolejności na usunięciu frakcji rozpuszczalnej w wodzie poprzez zalanie zliofilizowanych i zmielonych grzybni i owocników wodą destylowaną i gotowanie w autoklawie w 120°C przez 1,5 godziny. Kolejno, zawieszę odwirowano (10 000 rpm przez 30 min) i usunięto supernatant (czynności powtarzano trzykrotnie). Drugi etap polegał na otrzymaniu frakcji rozpuszczalnej w alkaliach, którą to frakcję stanowią α -glukany. W tym celu, odwirowany wcześniej osad zalewano 1M NaOH i mieszano z wykorzystaniem mieszadła magnetycznego przez ok. 12 godzin, w temperaturze pokojowej. Następnie zawartość ponownie odwirowano, a do dalszej izolacji wykorzystano supernatant, który neutralizowano przy użyciu 1M HCl. nierozpuszczalną frakcję w postaci osadu odwirowano i przemywano wodą aż do momentu, gdy supernatant był bezbarwny. Po tym czasie osad zliofilizowano uzyskując tym samym (1 \rightarrow 3)- α -glukan w postaci białego proszku.

Sorpccja metali ciężkich

Zdolność sorpcyjną (1 \rightarrow 3)- α -glukanów badano na przykładzie czterech metali ciężkich: niklu, kadmu, cynku i ołowiu. Do eksperymentu użyto roztworów metali o stężeniu 100 mg/dm³ (pH 5), którymi zalewano odważoną wcześniej porcję α -glukanu (0,1 g). Następnie próbki wytrząsano w temperaturze 22 \pm 2°C przez 24 godziny, a po tym czasie oddzielono roztwór od osadu poprzez wirowanie (12000 rpm). Wykorzystując technikę ICP-OES określono stężenie zaadsorbowanego metalu jako różnicę między stężeniem początkowym metalu a stężeniem w supernatancie po procesie sorpcji. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Analiza metylacyjna

Monocukry otrzymano z polisacharydów poprzez hydrolizę stosując 2M kwas trifluoroctowy (w 100°C prze 4 godziny). Następnie monocukry zostały zredukowane do octanów alditolu stosując NaBD₄, a później przeprowadzono etap peracetylacji (według metody Sawardeker i in., 1965). Bezwzględna konfiguracja monocukrów ustalono na podstawie analizy peracetylowanych R-(-)-2-butylowych glikozydów (zgodnie z metodą Gerwing i in., 1978). Pochodne cukrów analizowano metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (GC-MS).

NMR

Widma jedno- i dwuwymiarowego (1D i 2D) NMR rejestrowano w roztworze Me₂SO-d₆ w 80°C przy użyciu spektrometru Varian Inova plus 500 (działający z częstotliwością 499,81 MHz dla ¹H NMR i 125,69 MHz dla ¹³C NMR) oraz stosując standardowe oprogramowanie Varian. Dodatkowo, przeprowadzono następujące eksperymenty dwuwymiarowe NMR - homojądrowy: DQF-COSY, TOCSY, NOESY i heterojądrowy: ¹H-¹³C HSQC. W eksperymentach TOCSY zastosowano czas mieszania 100 ms i 150 ms dla NOESY. Rezonanse ¹H i ¹³C zmierzono w stosunku do sygnału grupy metylowej związku Me₂SO-d₆ (δ_H 2,50 i δ_C 39,50).

3.3. Metody charakterystyki chityny (publikacja nr 3)

Izolacja chityny

Do izolacji chityny wykorzystano poczwarki *H. illucens*. Owady hodowane były w skali laboratoryjnej w Instytucie Agrofizyki PAN w Lublinie. Larwy hodowano w temperaturze 26 ± 2°C na podłożu (EUROECO Beszczyński, Polska) przy wilgotności 50–80%. Po ok. trzech tygodniach następowało przepoczwarczenie, a wylinki z poczwarek stanowiły materiał do pozyskania chityny.

Do izolacji chityny zastosowano następujące odczynniki chemiczne: wodorotlenek sodu (NaOH) i kwas solny (HCl) (oba produkty Merck, Niemcy) użyte na etapie demineralizacji i deprotonizacji; nadtlenek wodoru (30% H₂O₂) (Standard, Polska), manganian (VII) potasu (KMnO₄) (POCH, Gliwice, Polska) i kwas szczawiowy (C₂H₂O₄) (STANLAB, Polska) zastosowane w etapie depigmentacji.

W badaniach sorpcji użyto roztwor jonów niklu (Ni²⁺) otrzymanego przez rozpuszczenie azotanu niklu (Ni(NO₃)₂·6H₂O) (POCH, Gliwice, Polska), w wodzie redestylowanej.

Warianty izolacji chityny z *H. illucens* zostały oparte na metodologii Draczyńskiego (Draczyński, 2008). Aby znaleźć najlepszą procedurę (tj. najlepszą wydajność i najlepszą jakość materiału), w kolejnych etapach wprowadzono różne modyfikacje. Wylinki poczwarki przed izolacją zostały oczyszczone (przy użyciu etanolu i wody), wysuszone (60°C) i zmielone. Do każdej procedury izolacji pobierano około 10 g wylinek. Izolacja chityny składała się z trzech etapów: demineralizacji, deprotonizacji oraz depigmentacji. Dwa pierwsze etapy były takie same we wszystkich wariantach. Warianty depigmentacji przedstawiono w Tab. 1.

Tab. 1. Warianty metod izolacji chityny przedstawione w pracy. Numery wariantów określone w tej tabeli są używane w całym tekście.

Wariant Nr	Demineralizacja	Deprotonizacja	Depigmentacja
1			Bez etapu depigmentacji
2	1M HCl w 22°C przez 1h, aby uzyskać kwaśne środowisko reakcji.	1M NaOH w 80°C przez 24 h, aby uzyskać zasadowe środowisko reakcji. Następnie HCl, aby zobojętnić roztwór, na koniec płukanie wodą destylowaną.	Woda w 100°C przez 24h
3	Następnie NaOH, aby zobojętnić roztwór, na koniec płukanie wodą destylowaną.		9% H ₂ O ₂ w 80°C przez 2,5h
4			9% H ₂ O ₂ w 80°C przez 5h
5			1% KMnO ₄ w 80°C przez 20 min. Następnie kwas szczawiowy (4% C ₂ H ₂ O ₄), aby usunąć nadmiar KMnO ₄ , kolejno NaOH, aby wytrącić mangan, a na koniec płukanie wodą destylowaną.
6	Sorpacja jonów Ni ²⁺ na chitynie wyizolowanej wg wariantu nr 3		

Uzyskaną chitynę zważono, a efektywność procesu została obliczona według poniższego wzoru.

$$\text{wydajność chityny} = \frac{m}{w} \times 100\%$$

gdzie m jest masą wyizolowanej chityny, a w masą wylinki *Hermetii illucens*.

Sorpacja niklu

Sorpację jonów Ni²⁺ przeprowadzono na chitynie pozyskanej przy zastosowaniu wariantu 3 (Tab. 1). W tym celu naważkę chityny (0,1 g) zalano 10 cm³ roztworu metalu o pH równym 5, a proces sorpcji prowadzono przez 24 h. Zastosowano pięć stężeń roztworu jonów Ni²⁺, które wynosiły 10, 20, 40, 80 i 180 mg/dm³. Następnie zawiesinę w postaci roztworu jonu metalu oraz chityny wirowano z prędkością 12000 rpm. Stężenie metalu mierzono w supernatancie za pomocą techniki ICP-OES (Thermo Scientific iCAP Series 6500, USA). Cały proces prowadzony był w stałej temperaturze 22 ± 2°C. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

Spektroskopia rentgenowska z dyspersją energii (EDX)

Analizę wykonano za pomocą mikroskopu FEI Quanta 3D FEG. Zliofilizowane próbki chityny (natywne i wzbogacone jonami Ni²⁺) przed pomiarem zostały sprasowane w celu uzyskania płaskiej i gładkiej powierzchni. Widma EDX uzyskano z pięciu różnych obszarów dla każdej próbki. Skład pierwiastkowy próbek obliczono za pomocą oprogramowania EDAX Genesis.

Analiza termogravimetryczna (TG, DTG, DTA)

Analizę termogravimetryczną chityny przeprowadzono przy użyciu aparatu Derivatograph C (Paulik, Paulik i Erdey, MOM, Węgry) z tyglami korundowymi. Wcześniej zważone porcje próbek (około 10 mg) analizowano w zakresie temperatur 20–600°C w obojętnej atmosferze azotu, przy tempie wzrostu temperatury 10°C/min.

4. Wyniki i dyskusja

4.1. Wyniki dotyczące (1→3)- α -D-glukanów (publikacja nr 2)

4.1.1. Wybór optymalnego (1→3)- α -D-glukanu w kontekście sorpcji metali cięzkich

Zawartość rozpuszczalnych w zasadach (1→3)- α -D-glukanów w grzybach wahała się od 2,2% do 10% suchej masy grzybowej. Tabela 2 przedstawia zdolność sorpcyjną grzybowych α -glukanów testowanych pod kątem wiązania czterech metali cięzkich (Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}). Stwierdzono, że glukany wyekstrahowane z *Ganoderma lucidum*, *Boletus edulis* i *Lentinus edodes* (shiitake) wykazują najlepsze zdolności sorpcyjne względem badanych metali. Jednakże to *L. edodes* został wybrany do dalszych badań. Przesłanki, które zadecydowały o tym wyborze były następujące: i) sorpcja metali, jakkolwiek nie największa, także była stosunkowo duża; ii) pozyskanie materiału z grzybów *Ganoderma lucidum*, *Boletus edulis* jest wieloetapowe i czasochłonne, a co za tym idzie - drogie. Natomiast *L. edodes* jest uprawiany w świecie w ogromnych ilościach (shiitake jest trzecim najczęściej uprawianym grzybem na świecie), a materiał po jego produkcji, możliwy do wykorzystania przy pozyskaniu (1→3)- α -D-glukanów, jest dotychczas zagospodarowywany głównie przez kompostowanie lub produkcję biogazu.

W kolejnym etapie badano właściwości sorpcyjne (1→3)- α -D-glukanów pozyskanych z różnych odmian *L. edodes*. Ostatecznie do dalszych analiz wybrano grzyba *L. edodes* odmiana SH 37. W dalszej części pracy wybrany (1→3)- α -D-glukan określony będzie skrótowo jako α -glukan.

Tab. 2. Efektywność biosorpcji metali ciężkich przez grzybowe (1→3)-α-D-glukany.

Gatunek	Rodzaj	α-(1→3)-D-glukan (sucha masa) (%)	MRE* (%)			MRE* (µg/h mg)					
			Ni ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺	Ni ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺	
vegetative mycelium											
<i>Aspergillus awamori</i>		6,0	3,8	4,8	3,6	8,2	1,5	1,9	1,8	2,9	2,9
<i>Aspergillus nidulans</i>		9,4	6,8	14	14	37	2,7	5,5	6,8	14	14
<i>Aspergillus oryzae</i>		10	5,0	13	16	39	2,0	5,0	7,9	14	14
<i>Aspergillus wentii</i>		6,5	5,1	9,2	10	28	2,0	3,7	4,9	9,9	9,9
<i>Penicillium lanosum</i>		6,9	15	20	19	38	6,2	8,2	9,6	14	14
<i>Penicillium notatum</i>		9,0	7,8	7,6	3,8	13	2,7	2,9	1,8	4,6	4,6
fruiting bodies											
<i>Boletus edulis</i>		2,2	40	79	46	96	18	33	18	36	36
<i>Ganoderma lucidum</i>		6,1	23	45	23	90	9,4	19	8,8	33	33
<i>Hericium erinaceus</i>		5,0	5,5	15	5,0	28	2,2	6,3	1,9	10	10
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>		2,7	2,7	10	4,8	21	1,1	4,3	1,6	7,8	7,8
<i>Pleurotus djamar</i>		3,3	1,9	13	4,3	24	1,1	5,3	1,6	8,8	8,8
<i>Pleurotus eryngii</i>		2,6	7,0	3,8	0	13	2,8	1,6	0	4,8	4,8
<i>Pleurotus ostreatus</i>		4,3	9,7	13	9,2	36	3,7	5,1	4,3	14	14
<i>Pleurotus precece</i>		4,7	0	16	9,6	28	0	8,1	5,7	17	17
<i>Piptoporus betulinus</i>		8,0	27	11	29	91	11	4,5	12	34	34
<i>Lentinus edodes</i> (<i>Lentinula</i>)		9,0	22	38	23	72	8,8	16	8,4	27	27
<i>Lentinus edodes</i>											
	Mycelia 3790 A	-	11	24	4,2	51	9,2	18	3,1	35	35
	Mycelia 3790 B	-	11	22	9,2	51	8,4	17	6,8	37	37
	Sylvan 4080 A	-	8,9	18	5,0	49	7,4	15	3,9	34	34
	Sylvan 4080 B	-	13	27	15	54	11	21	11	37	37
	SH 37 A	-	13	25	14	50	9,9	19	9,9	33	33
	SH 37 B	-	13	23	12	48	10	18	0,30	34	34

¹ MRE: Efektywność usuwania metalu (ang. metal removal efficiency); A: materiał odpadowy; B: zdrowe owocniki

4.1.2. Charakterystyka (1→3)- α -D-glukanu pozyskanego z odmiany SH 37 *Lentinus edodes*

Metody mikroskopowe

Analiza SEM wykazała złozoną morfologię powierzchni α -glukanu z *Lentinus edodes*. Struktura przypominała płatki, co może wpływać korzystnie na efektywność sorpcji metali cięzkich z uwagi na dużą powierzchnię badanego materiału (Bayramođlu i Arica, 2008).

XRPD

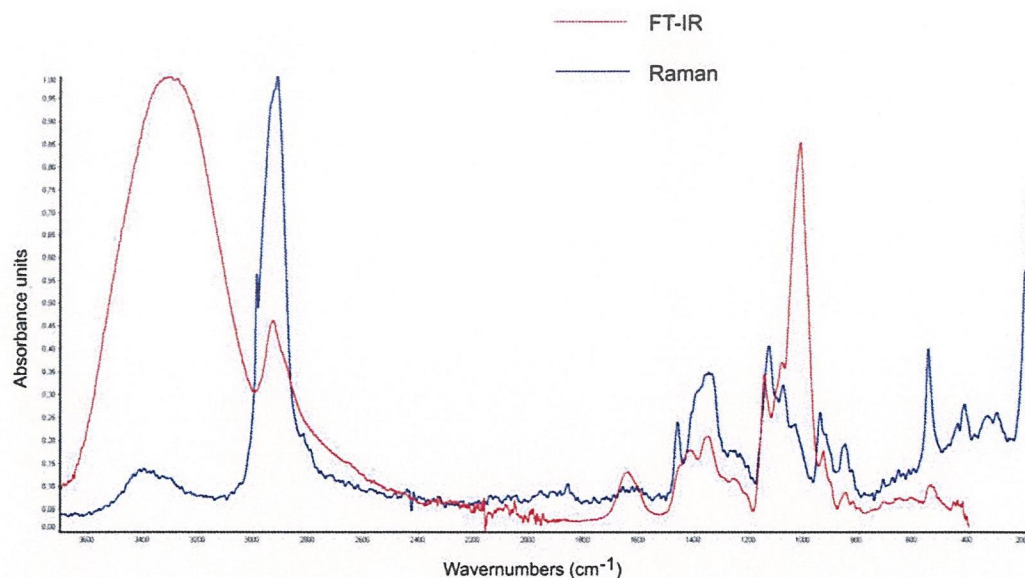
Wykorzystujac technikę dyfrakcji rentgenowskiej określono, że indeks krystaliczności α -glukanu wyniósł 8,5%. Jednakże ta niska krystaliczność badanego polisacharydu nie musi determinować słabych zdolności wiązania metali cięzkich. Zhang i in. donoszą na przykladzie innego naturalnego polimeru – chitozanu (otrzymanego z chityny uzyskanej ze skorupy kraba), że prawdopodobnie zwiększona krystaliczność moze zmniejszacz dostępnosc miejsc wiązania metalu ze wzgledu na szczelniesze upakowanie włókien, tworząc tym samym przeszkody sferyczne dla metalu (Zhang i in., 2005).

FT-IR i FT-Raman

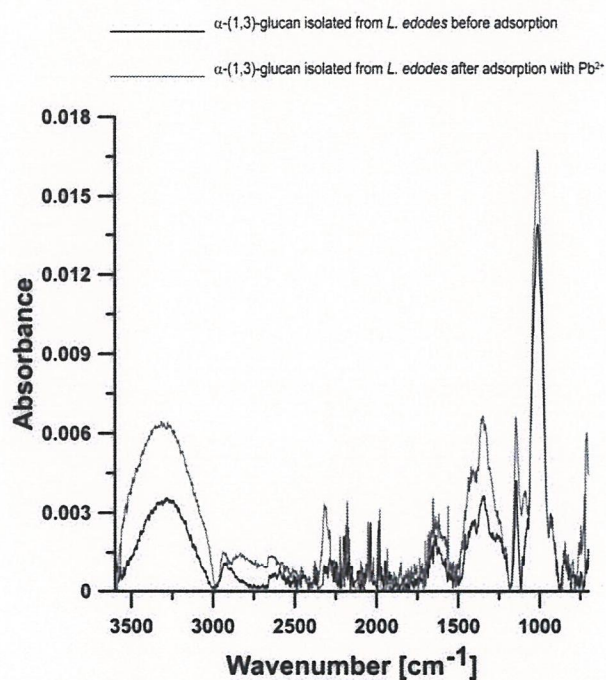
W oparciu o techniki spektroskopowe potwierdzono obecność charakterystycznych grup funkcyjnych dla polisacharydów, a także połozenie wiązań glikozydowych i ich anomeryczną konfigurację.

W charakterystyce strukturalnej α -glukanu ważne są dwa obszary: „region anomeryczny” (950–750 cm^{-1}) oraz „region cukrowy” (1200–900 cm^{-1}) (Synytsya i Novak, 2014) (Rys. 2). Charakterystyczne wiązania dla polisacharydu zawierającego wiązaniem α -(1→3)- występują przy 930 cm^{-1} , 840 cm^{-1} i 820 cm^{-1} (Choma i in., 2013; Osińska-Jaroszuk i in., 2017). Ponadto widoczny był pik przy 1140 cm^{-1} odpowiadający wiązaniom α -(1→3)-glikozydowym (Seymour i in., 1980; Choma i in., 2013), a więc również te wiązania są obecne w badanym polimerze. Przy 3300 cm^{-1} występował szeroki, intensywny pik charakterystyczny dla drgań rozciągających grupy O-H, dlatego można wywnioskować, o ich obecności w badanym polisacharydzie (Qian i in., 2009; Osińska-Jaroszuk i in., 2017).

Wyniki uzyskane dla α -glukanu z grzyba shiitake porównano z wynikami dla tego samego materiału po sorpcji (Rys. 3). Zaobserwowano zmiany w widmie w postaci przesunięć pasm z 3282 cm^{-1} na 3314 cm^{-1} i z 2914 cm^{-1} na 2950 cm^{-1} . Pasma te są charakterystyczne dla drgań rozciągających grupy –OH. Kolejno, przesunięcie pasma z 1635 cm^{-1} (–OH z adsorbowanej H_2O) na 1653 cm^{-1} . Różnice między obydwoimi widmami pokazują, że adsorpcja jonów Pb^{2+} zachodzi poprzez grupy hydroksylowe (Iqbal i in., 2009).



Rys. 2. Porównanie widm FT-IR (linia czerwona) i FT-Ramana (linia niebieska) próbki α -(1 \rightarrow 3)-D-glukanu z *L. edodes*.



Rys.3. Widma FT-IR α -(1 \rightarrow 3)-D-glukanu z *L. edodes* oraz po procesie sorpcji z jonami Pb^{2+} .

Analiza metylacyjna

Analiza metylacyjna potwierdziła, że badany α -glukan, rozpuszczalny w alkaliach, zawierał dwie heksozy: glukozę (75,9%) i mannozę (19,5%) oraz niewielką ilość pentozy (4,5%) zidentyfikowanej jako ksyloza. Wyniki wskazują, że główny łańcuch polimerowy składał się z glukozy połączonej wiązaniami (1 \rightarrow 3)- (86,5%), a dodatkowo występowały fragmenty glukozy połączone wiązaniami

(1→4)- (5,3%) oraz terminalna glukoza (glukoza na końcu łańcucha glukanu) (8,2%). Badana frakcja to głównie polimer glukozy. Należy jednak pamiętać, że nie jest możliwe wyizolowanie frakcji materiału biologicznego zawierającego tylko jeden rodzaj polisacharydu i jeden rodzaj wiązań między nimi.

NMR

Do określenia struktury oraz konfiguracji anomerycznej glukozy wykorzystano jedno- (1D) i dwuwymiarowy (2D) homojądrowy ^1H NMR (DQF-COSY, TOCSY, NOESY) oraz dwuwymiarowy (2D) heterojądrowy ^1H - ^{13}C NMR (HSQC). Zidentyfikowano dwa układy spinowe, oba charakterystyczne dla α -D-glukozy, a więc dwa rodzaje polimerów na bazie α -D-glukozy są składnikami badanego materiału. Główna frakcja to (1→3)- α -D-glukan (86%), a towarzyszy jej sześciokrotnie mniejsza ilość polimeru podobnego do amylozy (14%). Opierając się wyłącznie na danych spektroskopowych NMR, trudno stwierdzić czy te dwa składniki są związane chemicznie tworząc jeden duży nierozpuszczalny w wodzie polimer, czy są mieszaniną polimerów, którą można oddzielić metodą ekstrakcji alkalicznej. Nie wykryto natomiast spodziewanych sygnałów odpowiadającym rozgałęzionej glukozie i terminalnej glukozie (tj. ich ilość była poniżej 0,5% granicy wykrywalności metody).

4.2. Wyniki dotyczące chityny (publikacja nr 3)

4.2.1. Izolacja chityny z wylinek *H. illucens*

Informacje dotyczące skuteczności izolacji chityny przedstawiono w Tabeli 3. Wydajność izolacji chityny w odniesieniu do poszczególnych wariantów izolacji wynosiła od 5,69% do 7,97%. Zaobserwowano przy tym, że im mocniejszy odczynnik użyty na etapie depigmentacji, tym niższa wydajność izolacji.

Tab. 3. Wydajność izolacji chityny z wylinek poczwarki *H. illucens* w zależności od wariantu izolacji (średnie i odchylenie standardowe, $n = 3$). Warianty opisano w Tabeli 1. Ta sama litera oznacza, że nie było różnic istotnych statystycznie (test HSD Tukeya; $p < 0,05$).

Numer wariantu	1	2	3	4	5
Wydajność [%]	7,95 ± 0.20 ^b	7,97 ± 0.10 ^b	7,01 ± 0.12 ^c	5,98 ± 0.08 ^a	5,69 ± 0.28 ^a

4.2.2. Charakterystyka chityny z wylinek *H. illucens*

Mikroskopia optyczna i konfokalna

Uzyskane próbki chityny poddano ocenie za pomocą mikroskopii optycznej i konfokalnej. Próbki ze wszystkich wariantów izolacji wykazywały podobną strukturę tj. miały regularną powierzchnię składającą się z sześciokątnych jednostek przypominającą plaster miodu oraz posiadały strukturę

porowatą. Porowatość była szczególnie widoczna w próbkach pozyskanych w wariantcie 3 izolacji. Ta cecha jest ważna z punktu widzenia sorpcji – im większa porowatość tym sorpcja powinna być bardziej efektywna (Synowiecki i Al-Khateeb, 2003). Ta obserwacja była jedną z przesłanek wyboru wariantu 3 do dalszych badań dotyczących sorpcji jonów niklu.

Na podstawie zdjęć z mikroskopu konfokalnego można stwierdzić, że wszystkie badane próbki wykazywały niewielką fluorescencję, która dotyczyła tylko niektórych obiektów ze względu na absorpcję światła monochromatycznego oraz przesunięciu barwy w kierunku fal o większej długości (niebieska i czerwona), a większość próbek chityny świeciła światłem odbitym (fiolet). Silniejszą fluorescencję niektórych obiektów wykazywał wariant nr 4, a to prawdopodobnie spowodowane było użyciem silnego utleniacz (H_2O_2) przez dostatecznie długi czas (5 h). Ogólnie, chityna nie posiada zdolności do autofluorescencji (Lee i in., 2009). Przeprowadzenie tego typu badań na chitynie z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego wymaga użycia odpowiedniego odczynnika (np. fluostain) (Moussian i in., 2005).

XRPD

Dyfraktogramy proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej wykonano dla wszystkich próbek. Na podstawie porównania danych eksperymentalnych z bazami danych dyfrakcji proszkowej oraz z danymi literaturowymi (Sikorski in., 2009) zidentyfikowano chitynę jako odmianę alfa. We wszystkich przypadkach wielkość krystalitu wynosi ~ 80 nm jak wskazano w analizie Rietvelda opartej na krystalograficznych danych strukturalnych dostarczonych przez Sikorski i wsp. (Sikorski in., 2009). Oszacowano, że stopień krystaliczności próbek wynosi około 60%. Można stwierdzić, że metoda izolacji chityny nie ma wpływu na krystalit chityny. Śladowe ilości krzemionki (SiO_2) wykryto w dwóch wariantach (nr 1 i 2).

Analiza termogravimetryczna (TG, DTG, DTA)

Na podstawie przeprowadzonych analiz termogravimetrycznych stwierdzono, że rozkład chityny uzyskanej przy różnych wariantach zachodził w dwóch etapach, co widoczne było w postaci dwóch pików endotermicznych. Pierwsze przejście endotermiczne związane było z odparowaniem wody w zakresie temperatur 80–100°C. Drugie przejście, to rozkład samej chityny w temperaturze 356–392°C, w zależności od próbki. Zastosowane metody izolacji wpływały na temperaturę rozkładu chityny, zatem można wnioskować, że metoda izolacji wpłynęła na skład otrzymanej chityny. Ubytek masy podczas rozkładu dla poszczególnych próbek określony na podstawie krzywej TG wynosił między 67,2% a 73,1%, w zależności od próbki. Najwyższa temperatura rozkładu chityny nastąpiła w próbkach pozyskanych przy zastosowaniu wariantu nr 3 izolacji (czyli chitynie traktowanej H_2O_2 przez 2,5 h). Ponieważ daje to możliwość szerokiego wykorzystania tej chityny (tj. w najszerszym przedziale temperatur) to była to druga przesłanka wyboru wariantu nr 3 do badań sorpcji jonów Ni^{2+} .

FT-IR

Technika FT-IR została wykorzystana do określenia rodzaju allomorfów chityny (alfa, beta i gamma) (Kaya i in., 2015) oraz do porównania wariantów chityny otrzymanej różnymi procedurami izolacji. W otrzymanych widmach FT-IR chityny widoczny jest podział pasma amidu I rzędu na 1620 cm^{-1} i 1652 cm^{-1} , co wskazuje, że chityna pochodząca z owada *H. illucens* miała postać alfa, co zostało niezależnie potwierdzone techniką XRPD. Piki te występujące w próbkach niezależnie od

metody izolacji. Wyniki uzyskane w tych analizach potwierdzają doniesienia literaturowe mówiące, że w owadach występuje odmiana alfa chityny (Kaya i in., 2015a).

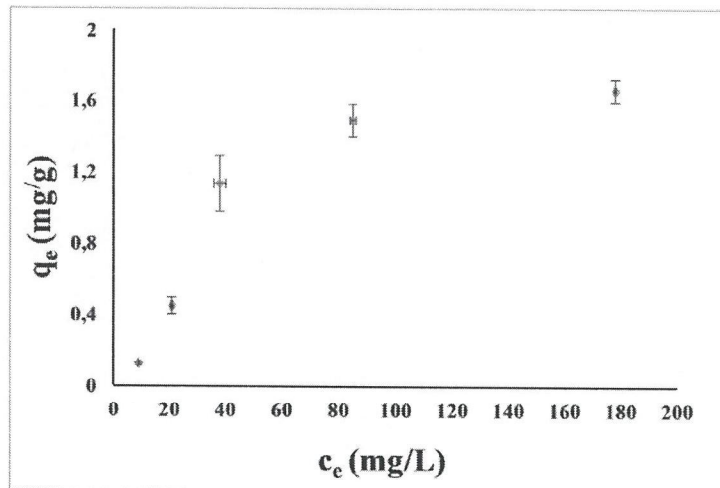
Warianty nr 2–5 nie wykazały istotnych różnic między widmami. Różnice (w stosunku do pozostałych wariantów) widoczne były w przypadku wariantu 1. W wariacie tym widoczne są dodatkowe piki w widmie FT-IR próbki. Piki te wynikały z obecności substancji, które nie zostały usunięte w etapie depigmentacji (w wariacie nr 1 nie było tego etapu).

4.2.3. Wybór procedury izolacji chityny

Wyboru metody izolacji, jaką zastosowano do pozyskania chityny do badań sorpcji dokonano nie tylko na podstawie wydajności, ale także właściwości przedstawionych w powyższych rozdziałach. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki wybrano wariant 3 tj. depigmentację z użyciem 9% H₂O₂ w 80°C przez 2,5 h.

4.2.4. Sorpcja jonów niklu

Izoterma adsorpcji niklu na chitynie wykazała stopniowy wzrost adsorpcji wraz ze wzrostem stężenia metalu, po czym osiągnięta została równowaga i powierzchnię sorbentu wysyciła się metalem (Rys. 4). Chityna zaadsorbowała maksymalnie 1,66 mg/g jonów niklu, przy początkowym stężeniu niklu 178 mg/dm³ i pH roztworu równym 5,0. Otrzymaną izotermę testowano na dwóch modelach adsorpcyjnych (Langmuira i Freundlicha), a parametry każdego z nich przedstawiono w Tabeli 4. Analiza danych wykazała, że lepsze dopasowanie uzyskano dla izoterma Freundlicha.



Rys. 4. Izoterma adsorpcji jonów Ni²⁺ na chitynie wyizolowanej z *H. illucens* (średnie (n=3) ± SD (słupki)) zgodnie z procedurą nr 3 (patrz Tabela 1), gdzie c_e to stężeniem równowagowym Ni²⁺; q_e to ilość Ni²⁺ zaadsorbowanego w stanie równowagi.

Tab. 4. Parametry izoterm otrzymanych podczas sorpcji Ni²⁺ na chitynie

Langmuir			q _{e exp} [mg/g]	Freundlich		
K _L	q _m [mg/g]	R ²		K	1/n	R ²
0,008	3,086	0,620	1,662	0,010	1,179	0,860

q_m - maksymalna teoretyczna zaadsorbowana ilość (pojemność sorpcyjna), K_L – stała Langmuira - quasi-gaussowska heterogeniczność energetyczna układu adsorpcyjnego, R - współczynnik determinacji, q_{e exp} - maksymalna eksperymentalna ilość zaadsorbowana w czasie równowagi, K, n - stałe empiryczne wskazujące na pojemność i intensywność sorpcji.

W celu określenia mechanizmu sorpcji Ni na chitynie przeprowadzono analizy z wykorzystaniem technik EDX oraz FT-IR.

Wyniki EDX wykazały obecność Al i Ca przed sorpcją jonów niklu, a pierwiastki te nie występowały po procesie sorpcji, zmniejszyła się również ilość Na po sorpcji. Zmiany w zawartości wspomnianych pierwiastków w próbkach mogą być spowodowane wymianą jonową. Chociaż technika EDX mierzy tylko ograniczoną powierzchnię i głębokości próbki, uśrednione wyniki z licznych pomiarów wykonane w różnych niezależnych punktach chityny potwierdzają powyższe rozumowanie.

Widmo FT-IR chityny z sorbowanymi jonami Ni²⁺ bardzo przypominało to przedstawione dla wariantów nr 2–5. Po procesie sorpcji metalu nastąpiło niewielkie przesunięcie pasm 3369 cm⁻¹ i 2910 cm⁻¹ w kierunku dłuższej długości fali (odpowiednio 3380 cm⁻¹ i 2920 cm⁻¹). Pasma te odpowiadają drganiom rozciągającym grup –OH, stąd można wnioskować, że uczestniczą one w adsorpcji metalu. Sorpcja badanego metalu była prawdopodobnie oparta na kompleksowaniu grup –OH na powierzchni użytego sorbentu (chityny).

Tak więc wydaje się, że sorpcja jonów Ni²⁺ przebiega w wyniku dwóch równoległych mechanizmów tj. wymianie jonowej oraz kompleksowaniu.

5. Wnioski

1. Grzyby mogą być bardzo dobrym źródłem pozyskiwania (1→3)- α -D-glukanów.
2. Z badanych 16 gatunków grzybów najlepsza sorpcja metali cięzkich wystąpiła w przypadku α -glukanów wyizolowanych z *Ganoderma lucidum*, *Boletus edulis* i *Lentinus edodes* (shiitake).
3. Grzybowy (1→3)- α -D-glukan wyizolowany z grzyba *L. edodes* (shiitake) wykazuje dobre właściwości sorpcyjne ze względu na dobrze rozwiniętą powierzchnię, niską krystaliczność oraz dużą liczbę grup hydroksylowych obecnych na powierzchni polimeru.
4. Biorąc pod uwagę łatwość uzyskania (1→3)- α -D-glukanu z materiału odpadowego, z grzyba shiitake może on być używany jako nowy biosorbent metali cięzkich do zanieczyszczonych roztworów wodnych, również z uwagi na jego nierozpuszczalność w wodzie.
5. Wylinki z muchy *Hermetia illucens* (black soldier fly) mogą być bardzo dobrym źródłem chityny.
6. Z przebadanych wariantów izolacji chityny najlepszym była trójetapowa procedura polegająca na:
i) demineralizacji 1M HCl w 22°C przez 1 h; ii) deprotenizacji 1M NaOH w 80°C przez 24 h oraz
iii) depigmentacji 9% H₂O₂ w 80°C przez 2,5 h. Wydajność tej procedury wyniosła 7%.
7. Wyizolowana z *H. illucens*, w oparciu o wybraną procedurę chityna posiada formę alfa, ze stopniem krystaliczności 60% i maksymalną temperaturą rozkładu ~ 392°C.
8. Biorąc pod uwagę skuteczność wykorzystania badanej chityny w sorpcji jonów niklu, chityna może stanowić łatwo dostępny i tani materiał wykorzystywany w procesach oczyszczania środowiska z metali cięzkich.
9. Sorpcja jonów niklu na chitynie z *H. illucens* zachodzi z dużym prawdopodobieństwem na skutek dwóch równoległych mechanizmów tj. wymiany jonowej i kompleksowania.

6. Literatura

1. Aam, B.B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sørli, M., Vårum, K.M., Eijsink, V.G.H., 2010. Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. *Marine Drugs* 8(5), 1482–1517. doi:10.3390/md8051482
2. Abdel-Naby M.A., Ismail A.-M.S., Ahmed S.A., Abdel-Fattah A.M., Abdel-Fattah A.F., 1999. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. *Process Biochem.* 34, 391–8.
3. Abdel-Naby, M.A., Ismail, A.-M.S., Ahmed, S.A., Fattah, A.F.A., 1998. Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycooides*. *Bioresource Techn.* 64(3), 205–210. doi:10.1016/s0960-8524(97)00160-0
4. Abidin, N.A.Z., Kormin, F., Abidin, N.A.Z., Anuar, N.A.F.M., Bakar, M.F.A., 2020. The Potential of Insects as Alternative Sources of Chitin: An Overview on the Chemical Method of Extraction from Various Sources. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 4978. <https://doi.org/10.3390/ijms21144978>
5. Abo Elsoud, M.M., El Kady, E.M., 2019. Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. *Bull. Natl. Res. Cent.* 43, 1–12, doi:10.1186/s42269-019-0105-y.
6. Adenipekun C.O., Isikhuemhen O.S., 2008. Bioremediation of engine oil polluted soil by the tropical white rot fungus, *Lentinus squarrosulus* Mont. (Singer). *Pak J. Biol. Sci.* 11, 1634–1637. DOI: 10.3923/pjbs.2008.1634.1637
7. Adenipekun C.O., Lawal R., 2012. Uses of mushrooms in bioremediation: a review. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 7, 62–68.
8. Aires, C.P., Tenuta, L.M.; Carbonero, E.R., Sasaki, G.L., Iacomini, M., Cury, J.A., 2011. Structural characterization of exopolysaccharides from biofilm of a cariogenic streptococci. *Carbohydr. Polym.* 84, 1215–1220. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.076>
9. Akhtar, N., Amin-ul Mannan, M., 2020. Mycoremediation: expunging environmental pollutants. *Biotechnology Reports* 26, e00452. doi:10.1016/j.btre.2020.e00452
10. Antonov, A., Ivanov, G., Pastukhova, N., Bovykina, G., 2019. Production of chitin from dead *Hermetia Illucens*. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 315, 042003, doi:10.1088/1755-1315/315/4/042003.
11. Atkins E., 1985. Conformations in polysaccharides and complex carbohydrates, *J. Biosci.* 8, 375. doi:10.1007/bf02703990
12. Badawy, R.M., Mohamed, H.I., 2015. Chitin extration, Composition of Different Six Insect Species and Their Comparable Characteristics with That of the Shrimp. *J. Am. Sci.* 11, 127–134.
13. Bao, X., Duan, J., Fang, X., Fang, J., 2001. Chemical modifications of the (1→3)- α -D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity. *Carbohydrate Research* 336, 127-140. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00238-5)
14. Barroso, F.G., Sánchez-Muros, M.-J., Segura, M., Morote, E., Torres, A., Ramos, R., Guil, J.-L. 2017. Insects as food: Enrichment of larvae of *Hermetia illucens* with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 8–13. doi:10.1016/j.jfca.2017.04.008
15. Bayramoğlu, G., Arica, M.Y., 2008. Removal of heavy mercury(II), cadmium(II) and zinc(II) metal ions by live and heat inactivated *Lentinus edodes* pellets, *Chem. Eng. J.* 143, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.01.002>
16. Beauvais, A., Bozza, S., Kniemeyer, O., Formosa, C., Balloy, V., Henry, C., Roberson, R.W., Dague, E., Chignard, M., Brakhage, A.A., Romani, L., Latgé, J.-P., 2013. Deletion of the α -(1,3)-glucan synthase genes induces a restructuring of the conidial cell wall responsible for the avirulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 9(11), e1003716. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003716>

17. Beauvais, A., Fontaine, T., Aïmanianda, V., Latgé, J.P., 2014. *Aspergillus* cell wall and biofilm. *Mycopathologia* 178, 371–377. DOI 10.1007/s11046-014-9766-0
18. Beauvais, A., Maubon, D., Park, S., Morelle, W., Tanguy, M., Huerre, M., Perlin, D.S., Latgé, J.P., 2005. Two (1-3)-Glucan Synthases with Different Functions in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1531–1538. DOI: 10.1128/AEM.71.3.1531-1538.2005
19. Bennet J.W., Wunch K.G., Faison B.D., 2002. Use of fungi in biodegradation: of fungi in bioremediation. In: *Manual of environmental microbiology*. ASM Press, Washington D.C., 960–971
20. Berenbaum, M.R., 1993. Sequestered plant toxins and insect palatability. *Food Insects Newsl.* 6, 1, 6–9.
21. Bhunia, B., Prasad Uday, U.S., Oinam, G., Mondal, A., Bandyopadhyay, T.K., Tiwari, O.N. 2018. Characterization, genetic regulation and production of cyanobacterial exopolysaccharides and its applicability for heavy metal removal. *Carbohydrate Polymers* 179, 228–243. doi:10.1016/j.carbpol.2017.09.091
22. Bobbitt, T.F., Nordin, J.H., Roux, M., Revol, J.F., Marchessault, R.H., 1977. Distribution and conformation of crystalline nigeran in hyphal walls of *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. *J. Bacteriol.* 132, 691–703.
23. Borelli, L., Coretti, L., Dipineto, L., Bovera, F., Menna, F., Chiariotti, L., Nizza, A., Lembo, F., Fioretti, A., 2017. Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut microbiota composition and SCFAs production in laying hens. *Sci. Rep.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16560-6>.
24. Boulaiche, W., Hamdi, B., Trari, M., 2019. Removal of heavy metals by chitin: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Appl. Water. Sci.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13201-019-0926-8>
25. Brown, G.D., Gordon, S., 2005. Immune recognition of fungal β -glucans. *Cell. Microbiol.* 7, 471–479. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00505.x>
26. Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., Rinaudo, M., 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42(8), 3569–3580. doi:10.1016/s0032-3861(00)00713-8
27. Bulak, P., Polakowski, C., Nowak, K., Waśko, A., Wiącek, D., Bieganski, A., 2018. *Hermetia illucens* as a new and promising species for use in entomoremediation. *Science of The Total Environment* 633, 912–919. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.03.252.
28. Caligiani, A., Marseglia, A., Leni, G., Baldassarre, S., Maistrello, L., Dossena, A., Sforza, S., 2018. Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin. *Food Res. Int.* 105, 812–820. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.012>
29. Cardemil, L., Pincheira, G., 1979. Characterization of the carbohydrate component of fraction I in the *Neurospora crassa* cell wall. *J. Bacteriol.* 137, 1067–1072.
30. Chatterjee, S., Sarma, M.K., Deb, U., Steinhäuser, G., Walther, C., Gupta, D.K., 2017. Mushrooms: from nutrition to mycoremediation. *Environmental Science and Pollution Research* 24(24), 19480–19493. doi:10.1007/s11356-017-9826-3
31. Chen, J., Zhang, L., Nakamura, Y., Norisuye, T., 1998a. Viscosity behavior and chain conformation of a (1→3)- α -glucan from *Ganoderma lucidum*. *Polym. Bull.* 41, 471–478.
32. Chen, J., Zhou, J., Zhang, L., Nakamura, Y., Norisuye, T., 1998. Chemical structure of the water-insoluble polysaccharide isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Polym. J.* 30, 838–842.
33. Chen, X., Jiang, O., Xu, Y., Xia, W., 2017. Recovery of Chitin from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) Shell Waste by Microbial Deproteinization and Demineralization. *J. Aquat. Food Product Technol.* 26, 1210–1220. <https://doi.org/10.1080/10498850.2015.1094686>

34. Choma, A., Wiater, A., Komaniecka, I., Paduch, R., Pleszczyńska, M., Szczodrak, J., 2013. Chemical characterization of a water insoluble (1→3)- α -D-glucan from an alkaline extract of *Aspergillus wentii*, Carboh. Polym. 91, 603–608. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.060>
35. Choma, A., Nowak, K., Komaniecka, I., Waśko, A., Pleszczyńska, M., Siwulski, M., Wiater, A., 2018. Chemical characterization of alkali-soluble polysaccharides isolated from a *Boletus edulis* (Bull.) fruiting body and their potential for heavy metal biosorption. Food Chem. 2018, 266, 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.023>
36. Čičková, H., Newton, G.L., Lacy, R.C., Kozánek, M., 2015. The use of fly larvae for organic waste treatment. Waste Manag. 35, 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.09.026>
37. Cuong, H.N., Minh, N.C., Van Hoa, N., Trung, T.S., 2016. Preparation and characterization of high purity β -chitin from squid pens (*Loligo cheniensis*). Int. J. Biol. Macromol. 93, 442–447. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.085>
38. Davis, H.M., Hines, H.B., Edwards, J.R., 1986. Structural elucidation of a water-insoluble glucan produced by a cariogenic oral *Streptococcus*. Carbohydr. Res. 156, 69–77. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90100-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90100-9)
39. de Souza, P.R., do Carmo Ribeiro, T.M., Lôbo, A.P., Tokumoto, M.S., de Jesus, R.M., Lôbo, I.P., 2020. Removal of bromophenol blue anionic dye from water using a modified exuviae of *Hermetia illucens* larvae as biosorbent. Environ. Monit. Assess. 192, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8110-z>
40. Diener, S., Zurbrügg, C., Tockner, K., 2015. Bioaccumulation of heavy metals in the black soldier fly, *Hermetia illucens* and effects on its life cycle. J. Insect Food Feed 1, 261–270. <https://doi.org/10.3920/JIFF2015.0030>
41. Dönmez, G., Aksu, Z., 1999. The effect of copper(II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. Process. Biochem. 35, 135–142. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00044-8)
42. Draczyński, Z. 2008. Honeybee corpses as an available source of chitin. Journal of Applied Polymer Science 109(3), 1974–1981. doi:10.1002/app.28356
43. Draczyński, Z., 2013. Kopoliesterbutyrylo-acetylowy Chityny Jako Nowy Aktywny Składnik Nanokompozytów Polimerowo Włóknistych, Zeszyty naukowe nr 1159, Rozprawy Naukowe, Z. 449, Politechnika Łódzka Łódź, Poland, 24–31.
44. Dutta, P.K., Dutta, J., Tripathi, V.S., 2004. Chitin and chitosan: Chemistry, Properties and applications. J. Sci. Ind. Res. 63, 20–31.
45. Ehrlich, H., Ilan, M., Maldonado, M., Muricy, G., Bavestrello, G., Kljajic, Z., Carballo, J.L., Schiaparelli, S., Ereskovsky, A., Schupp, P., i in., 2010. Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin. Inter. J. Biolog. Macromol. 47, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.05.007>
46. Elwert, C., Knips, I., Katz, P. 2010. A novel protein source: maggot meal of the Black Soldier fly (*Hermetia illucens*) in broiler feed. Proceedings of the 11 Tagung Schweine- und Geflügelernährung, Wittenberg, Germany.
47. Erwig, L.P., Gow, N.A.R., 2016. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. Nat. Rev. Microbiol. 14, 163–176. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.21>
48. Ewuim, S.C., 2013. Entomoremediation – a novel in-situ bioremediation approach. Anim. Res. Int. 10, 1681–1684.
49. Fadlaoui, S., El Asri, O., Mohammed, L., Sihame, A., Omari, A., Melhaoui, M., 2019. Isolation and characterization of chitin from shells of the freshwater crab *Potamon algeriense*. Prog. Chem. Appl. Chitin. Its Deriv. 24, 23–35. DOI: 10.15259/PCACD.24.002

50. Falandysz, J., Borovička, J., 2013. Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: Health benefits and risks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 477–501. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4552-8>
51. Falandysz, J., Szymczyk, K., Ichihashi, H., Bielawski, L., Guca, M., Frankowska, A., Yamasaki, S.-I., 2001. ICP/MS and ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Poland. *Food Addit. Contam.* 18, 503–513. doi:10.1080/02652030010027624
52. FAO. 2013. Edible insects - Future prospects for food and feed security. Rome. 0258-6150.
53. Fishman, A., Levy, I., Cogan, U., Shoseyov, O., 2002. Stabilization of horseradish peroxidase in aqueous-organic media by immobilization onto cellulose using a cellulose-binding-domain. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 18, 121–131. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00075-9](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00075-9)
54. Forutan, R., Ehsandoost, E., Hadipour, S., Mobaraki, Z., Saleki, M., Mohebbi, G. Kinetic and equilibrium studies on the adsorption of lead by the chitin of pink shrimp (*Solenocera melantho*). *Entomol. Appl. Sci. Lett.* 2016, 3, 20–26.
55. Freitas, F., Alves, V.D., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., Hilliou, L., Oliveira, R., Reis, M.A.M., 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresource Technology* 100(2), 859–865. doi:10.1016/j.biortech.2008.07.002
56. Fujikawa, T., Kuga, Y., Yano, S., Yoshimi, A., Tachiki, T., Abe, K., Nishimura, M., 2009. Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Mol. Microbiol.* 73, 553–570. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06786.x>
57. Fujikawa, T., Sakaguchi, A., Nishizawa, Y., Kouzai, Y., Minami, E., Yano, S., Koga, H., Meshi, T., Nishimura, M., 2012. Surface α -1,3-glucan facilitates fungal stealth infection by interfering with innate immunity in plants. *PLoS Pathogens* 8, e1002882. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002882>
58. Gaill, F., Persson, J., Sugiyama, P., Vuong, R., Chanzy, H., 1992. The chitin system in the tubes of deep sea hydrothermal vent worms, *J. Struct. Biol.* 109, 116-128. [https://doi.org/10.1016/1047-8477\(92\)90043-A](https://doi.org/10.1016/1047-8477(92)90043-A)
59. Gao, Q., Wang, X., Wang, W., Lei, C., Zhu, F., 2017. Influences of chromium and cadmium on the development of black soldier fly larvae. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 8637–8644. doi:10.1007/s11356-017-8550-3
60. Garnham, G., Codd, G., Gadd, G., 1992. Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 270–276. <https://doi.org/10.1007/BF00178183>
61. Geoghegan, I., Steinberg, G., Gurr, S., 2017. The role of the fungal cell wall in the infection of plants. *Trends Microbiol.* 25, 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.015>
62. Gerwig, G.J., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., 1978. Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary g.l.c. *Carbohydr. Res.* 62, 349–357. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)80881-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80881-2)
63. Grün, C.H., 2003. Structure and Biosynthesis of Fungal α -Glucans. Ph.D. Thesis, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands.
64. Hahn, T., Tafi, E., Paul, A., Salvia, R., Falabella, P., Zibek, S., 2020. Current state of chitin purification and chitosan production from insects. *J. Chem. Tech. Biotech.* 95, 2775–2795. <https://doi.org/10.1002/jctb.6533>
65. Hasegawa, S., Kirkwood, S., Nordin, J.H., 1966. An alpha-1,3-glucanase from a fungal source. *Chem. Ind.* 25, 1033.
66. Hasegawa, S., Nordin, J.H., Kirkwood, S., 1969. Enzymes that hydrolyze fungal cell wall polysaccharides. I. Purification and properties of an endo- α -D-(1→3)-glucanase

- from *Trichoderma Viride* J. Biol. Chem. 244, 5460–5470. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63587-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63587-2)
67. Hertzberg, S., Kvittingen, L., Anthonsen, T., Skjåk-Bræk, G., 1992. Alginate as immobilization matrix and stabilizing agent in a two-phase liquid system: Application in lipase-catalysed reactions. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 42–47. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90024-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90024-1)
68. Hirano S., 1999. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials, *Polym. Int.* 48, 732.
69. Hirano, S., 2001. Wet-spinning and applications of functional fibers based on chitin and chitosan. *Macromol. Symp.*, 168, 21–30. doi:10.1002/1521-3900(200103)168:1<21::aid-masy21>3.0.co;2-d
70. Hotz, P., Guggenheim, B., Schmid, R., 1972. Carbohydrates in pooled dental plaque. *Caries Res.* 6, 103–121. <https://doi.org/10.1159/000259783>
71. Huang, Q., Zhang, L., Cheung, P.C.K., Tan, X., 2006. Evaluation of sulfated α -glucans from *Poria cocos* mycelia as potential antitumor agent. *Carbohydr. Polym.* 64, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.12.001>
72. Hudson, S.M., 1997. Application of chitin and chitosan as fiber and textile chemicals, in: Domard, A., Roberts, G.A.F., Varum, K., (Eds.), *Advances in Chitin Science*, Lyon, Jacques Andre Publishers, p. 590–599.
73. Hudson, S.M., Jenkins, D.W., 2001. Chitin and chitosan, in: Mark H.F. (Eds.), *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Wiley, Hoboken, N.J., p. 569–580.
74. Imai, K., Kikuta, T., Kobayashi, M., Matsuda, K., 1977. An α -1,3-glucanase from *Streptomyces* sp. KI-8 production and purification. *Agric. Biol. Chem.* 41, 1339–1346. <https://doi.org/10.1080/00021369.1977.10862680>
75. Iqbal, M., Saeed, A., Zafar, S.I., 2009. FTIR spectrophotometry, kinetics and adsorption isotherms modeling, ion exchange, and EDX analysis for understanding the mechanism of Cd^{2+} and Pb^{2+} removal by mango peel waste, *J. Hazard. Mater.* 164, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.141>
76. Jang, M.K., Kong, B.G., Jeong, Y.I., Lee, C.H., Nah, J.W., 2004. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 42, 3423–3432. <https://doi.org/10.1002/pola.20176>
77. Jelsma, J., Kreger, D.R., 1978. Observations on the cell-wall compositions of the bracket fungi *Laetiporus sulphureus* and *Piptoporus betulinus*. *Arch. Microbiol.* 119, 249–255. <https://doi.org/10.1007/BF00405403>
78. Jelsma, J., Kreger, D.R., 1979. Polymorphism in crystalline (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan from fungal cell-walls. *Carbohydr. Res.* 71, 51–64. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)86060-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)86060-7)
79. Jeon, Y., Kim, S., 2000. Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system. *Process Biochem.* 35, 623–632. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00118-1)
80. Jeon, Y., Park, P., Kim, S., 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr. Polym.* 44, 71–76. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00200-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00200-9)
81. Jin, Y., Zhang, L., Tao, Y., Zeng, C., Chen, Y., Cheung, P.C.K., 2004. Solution properties of a water-insoluble (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan isolated from *Poria cocos* mycelia. *Carbohydr. Polym.* 57, 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.04.013>
82. K, K.R., Sardar, U.R., Bhargavi, E., Devi, I., Bhunia, B., Tiwari, O.N., 2018. Advances in exopolysaccharides based bioremediation of heavy metals in soil and water: A critical review. *Carbohydrate Polymers* 199, 353–364. doi:10.1016/j.carbpol.2018.07.037

83. Kagimura, F.Y., da Cunha, M.A.A., Barbosa, A.M., Dekker, R.F.H., Malfatti, C.R.M., 2015. Biological activities of derivatized d-glucans: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 588–598. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.008
84. Kanetsuna, F., Carbonell, L.M., Gil, F., Azuma, I., 1974. Chemical and ultrastructural studies on the cell walls of the yeast like and mycelial forms of *Histoplasma capsulatum*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 54, 1–13. <https://doi.org/10.1007/BF02055967>
85. Karthikeyan, G., Andal, N.M., Anbalagan, K., 2005. Adsorption studies of iron(III) on chitin. *Journal of Chemical Sciences* 117(6), 663–672. doi:10.1007/bf02708296
86. Kaur H., Kapoor S., Kaur G., 2016. Application of ligninolytic potentials of a white-rot fungus *Ganoderma lucidum* for degradation of lindane. *Environ. Monit. Assess* 188, 588. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5606-7>
87. Kaya, M., Baran, T., Asan-Ozusaglam, M., Cakmak, Y.S., Tozak, K.O., Mol, A., Sezen, G., 2015. Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). *Biotech. Bioprocess Eng.* 20, 168–179. DOI 10.1007/s12257-014-0391-z
88. Kaya, M., Erdogan, S., Mol, A., Baran, T., 2015a. Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 797–805. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.034>
89. Khayrova, A., Lopatin, S., Varlamov, V., 2019. Black Soldier Fly *Hermetia illucens* as a Novel Source of Chitin and Chitosan, *International Journal of Science* 8, 81-86. DOI: 10.18483/ijSci.2015;
90. Kiho, T., Yoshida, I., Katsuragawa, M., Sakushima, M., Usui, S., Ukai, S., 1994. Polysaccharides in fungi. XXXIV. A polysaccharide from the fruiting bodies of *Amanita muscaria* and the antitumor activity of its carboxymethylated product. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 1460–1462. <https://doi.org/10.1248/bpb.17.1460>
91. Kim, M., You, H., You, M., Kim, N., Shim, B., Kim, H., 2004. Inhibitory Effect of water soluble chitosan on TNF α and IL 8 secretion from HMC 1. *Cells* 26, 401–409. <https://doi.org/10.1081/IPH-200026887>
92. Kroeckel, S., Harjes, A.G.E., Roth, I., Katz, H., Wuertz, S., Susenbeth, A., Schulz, C., 2012. When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre-pupae meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute — Growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*. 364–365, 345-352. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.041>
93. Kurita K., 2001. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.* 26, 1921. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00007-7)
94. Lavall, R., Assis, O., Campanafilho, S., 2007. β -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization. *Bioresource Technology* 98(13), 2465–2472. doi:10.1016/j.biortech.2006.09.002
95. Lee, S., Brown, R.L., Monroe, W., 2009. Use of confocal laser scanning microscopy in systematics of insects with a comparison of fluorescence from different stains. *Syst. Entomol.* 34, 10–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.00451.x>
96. Li, Q., Zheng, L., Cai, H., Garza, E., Yu, Z., Zhou, S., 2011. From organic waste to biodiesel: Black soldier fly, *Hermetia illucens*, makes it feasible. *Fuel* 90(4), 1545–1548. doi:10.1016/j.fuel.2010.11.016
97. Li, W., Li, Q., Zheng, L., Wang, Y., Zhang, J., Yu, Z., 2015. Potential biodiesel and biogas production from corncob by anaerobic fermentation and black soldier fly. *Bioresour. Technol.* 194, 276-82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.112>
98. Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C., Yang, Q., 2012. Extraction and Characterization of Chitin from the Beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules*. 17, 4604–4611. <https://doi.org/10.3390/molecules17044604>
99. Lo, T.C.-T., Hsu, F.-M., Chang, C.A., Cheng, J.C.-H., 2011. Branched α -(1,4)-Glucans from *Lentinula edodes* (L10) in combination with radiation enhance cytotoxic effect on human lung adenocarcinoma through the toll-like receptor 4 mediated induction of

- THP-1 differentiation/activation. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11997–12005. <https://doi.org/10.1021/jf202457r>
100. Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 30, 261–278. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.001>
101. Martínez, J.P., Falomir, M.P., Gozalbo, D., 2014. Chitin: A Structural Biopolysaccharide with Multiple Applications. eLS. doi:10.1002/9780470015902.a0000694.pub3
102. Masuda, Y., Nakayama, Y., Tanaka, A., Naito, K., Konishi, M., 2017. Antitumor activity of orally administered maitake α -glucan by stimulating antitumor immune response in murine tumor. *PLoS ONE* 12, 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu12051339>
103. Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T., Yamazawa, A., 1999. Screening of microalgae for bioremediation of cadmium polluted seawater. *J. Biotechnol.* 70, 33–8. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00055-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00055-3)
104. Maubon, D., Park, S., Tanguy, M., Huerre, M., Schmitt, C., Prévost, M.C., Perlin, D.S., Latgé, J.P., Beauvais, A., 2006. AGS3, an α -(1-3)glucan synthase gene family member of *Aspergillus fumigatus*, modulates mycelium growth in the lung of experimentally infected mice. *Fungal Genet. Biol.* 43, 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.01.006>
105. May, B.M., 1961. The occurrence in New Zealand and the life-history of the soldier fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: *Stratiomyidae*). *Nzj. Sci.* 4, 55–65.
106. Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R., 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ. Int.* 37, 1362–1375. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.003>
107. Meyer, M.T., Phaff, H.J., 1980. Purification and properties of (1,3)- α -glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. *Microbiol.* 118, 197–208. <https://doi.org/10.1099/00221287-118-1-197>
108. Miyazaki, T., Yamada, M., Ohno, T., 1974. Isolation and Structure of α -1,3-Linked Glucan from the Hyphal Wall of *Phytophthora infestans*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 22, 1666–1669. <https://doi.org/10.1248/cpb.22.1666>
109. Mizuno, K., Awazu, N., Tachiki, T., 1998. Purification and some properties of p-nitrophenyl- β -D-glucoside-hydrolyzing enzymes in culture filtrate of *Bacillus circulans* KA-304 grown on cell-wall preparation of *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 39–43. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.39>
110. Mohd-Noor, S.N., Wong, C.Y., Lim, J.W., Mah-Hussin, M.I.A., Uemura, Y., Lam, M.K., Ramli, A., Bashir, M.J.K., Tham, L., 2017. Optimization of self-fermented period of waste coconut endosperm destined to feed black soldier fly larvae in enhancing the lipid and protein yields. *Renew. Energy* 111, 646–654. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.067>
111. Moreno-Mendieta, S., Guillén, D., Hernández-Pando, R., Sánchez, S., Rodríguez-Sanoja, R., 2017. Potential of glucans as vaccine adjuvants: A review of the α -glucans case. *Carbohydr. Polym.* 165, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.030>
112. Mourya, V.K., Inamdar, N.N., Choudhari, Y.M., 2011. Chitooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications. *Polymer Science Series A* 53(7), 583–612. doi:10.1134/s0965545x11070066
113. Moussian, B., Schwarz, H., Bartoszewski, S., Nüsslein-Volhard, C., 2005. Involvement of Chitin in Exoskeleton Morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* 264, 117–130. <https://doi.org/10.1002/jmor.10324>
114. Ngo, D., Kim, M., Kim, S., 2008. Chitin oligosaccharides inhibit oxidative stress in live cells. *Carbohydr. Polym.* 74, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.02.005>
115. Ngo, D., Lee, S., Kim, M., Kim, S., 2009. Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells. *J. Funct. Foods* 1, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.008>

116. Nowak, R., Nowacka-Jechalke, N., Juda, M., Malm, A., 2018. The preliminary study of prebiotic potential of Polish wild mushroom polysaccharides: The stimulation effect on *Lactobacillus* strains growth. *Eur. J. Nutr.* 57, 1511–1521. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1436-9>
117. Ogawa, K., Misaki, A., Oka, S., 1979. Okamura, K. X-Ray diffraction data for (1→3)- α -D-glucan. *Carbohydr. Res.* 75, C13–C16. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84664-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84664-9)
118. Osińska-Jaroszuk, M., Wiater, A., Choma, A., Pleszczyńska, M., Jaszek, M., Janusz, G., Skowronek, M., Szczodrak, J., 2017. (1→3)- α -D-Glucan from Fruiting Body and Mycelium of *Cerrena unicolor* (Bull.) Murrill: Structural Characterization and Use as a Novel Inducer of Mutanase. *International Journal of Polymer Science* 1–9. doi:10.1155/2017/1249134
119. Otaka, J., Seo, S., Nishimura, M., 2016. Lutein, a natural carotenoid, induces α -1,3-glucan accumulation on the cell all surface of fungal plant pathogens. *Molecules* 21, 980. <https://doi.org/10.3390/molecules21080980>
120. Park, B.K., Kim, M.M., 2010. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 5152–5164. <https://doi.org/10.3390/ijms11125152>
121. Perez-Rama M., Alonoso J.A., Lopez C.H., Vaamonde E.T., 2002. Cadmium removal by living cells of the marine microalgae *Tetraselmis suecica*. *Bioresour. Technol.* 84, 265–70. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00045-7)
122. Phillips, J., Burkholder, W., 1995. Allergies related to food insect production and consumption. *Food Insects Newsl.* 8, 1–2.
123. Pleszczyńska, M., Wiater, A., Janczarek, M., Szczodrak, J., 2015. (1→3)- α -D-Glucan hydrolases in dental biofilm prevention and control: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 79, 761–778. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.052>
124. Poulain, D., Jouault, T., 2004. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: Elements for a decisive crosstalk. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.011>
125. Poulıcek, M., Voss-Foucart, M.F., Jeuniaux, Ch., 1986. Chitinoproteic complexes and mineralization in mollusk skeletal structures, in: Muzzarelli R.A., Jenieux R. Gooday G.W., (Eds.), *Chitin in Nature and Technology*. New York, Plenum Press. p.7-12. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2167-5>
126. Purschke, B., Scheibelberger, R., Axmann, S., Adler, A., Jäger, H., 2017. Impact of substrate contamination with mycotoxins, heavy metals and pesticides on the growth performance and composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) for use in the feed and food value chain. *Food Addit. Contam. Part A* 34, 1410–1420. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1299946>
127. Qian, J.-Y., Chen, W., Zhang, W.-M., Zhang, H., 2009. Adulteration identification of some fungal polysaccharides with SEM, XRD, IR and optical rotation: A primary approach, *Carbohydr. Polym.* 78, 620–625. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.05.025>
128. Ram Prasad, 2018. *Fungal Biology. Mycoremediation and Environmental Sustainability* 2, 1-3. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-77386-5>
129. Ramos-Elorduy, J., Moreno, J. M., Prado, E., Perez, M., Otero, J.L., de Guevara, O.L., 1997. Nutritional value of edible insects from the State of Oaxaca, Mexico. *J. Food Compos. Anal.* 10, 142–157. <https://doi.org/10.1006/jfca.1997.0530>
130. Rappleye, C.A., Eissenberg, L.G., Goldman, W.E., 2007. *Histoplasma capsulatum* α -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 1366–1370. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609848104>
131. Reese, A.J., Yoneda, A., Breger, J.A., Beauvais, A., Liu, H., Griffith, C.L., Bose, I., Kim, M.J., Skau, C., Yang, S., Sefko, J.A., Osumi, M., Latge, J.-P., Mylonakis, E., Doering, T.L., 2007. Loss of cell wall alpha(1–3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Mol. Microbiol.* 63, 1385–1398.

132. Rehman, K., Rerman, R., Aziz Somroo, A., Cai, M., Zheng, L., Xiao, X., Rehman, A., Rehman, A., Tomberlin, J., Yu, Z., 2019. Enhanced bioconversion of dairy and chicken manure by the interaction of exogenous bacteria and black soldier fly larvae. *J. Environ. Manag.* 237, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.048>.
133. ReX Powder diffraction. <https://www.rexpd.org/>
134. Rinaudo, M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and Application. *Prog. Polym. Sci.* 31, 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
135. Roussy, J., Van Vooren, M., Dempsey, B.A., Guibal, E., 2005. Influence of chitosan characteristics on the coagulation and the flocculation of bentonite suspensions. *Water Res.* 39, 3247–3258. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.05.039>
136. Rudall, K.M., 1969. Chitin and its association with other molecules. *J. Polym. Sci., C Polym. Symp.* 28, 83. <https://doi.org/10.1002/polc.5070280110>
137. Ruiz-Herrera, J., Ortiz-Castellanos, L. 2019. Cell wall glucans of fungi. a review. *The Cell Surface* 100022. doi:10.1016/j.tcs.2019.100022
138. Rumpold, B.A., Schlüter, O.K., 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 802–823. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200735>.
139. Sanghi, R., Sankararamakrishnan, N., Dave, B.C., 2009. Fungal bioremediation of chromates: Conformational changes of biomass during sequestration, binding, and reduction of hexavalent chromium ions. *Journal of Hazardous Materials* 169, 1074–1080. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.056
140. Sardar, U.R., Bhargavi, E., Devi, I., Bhunia, B., Tiwari, O.N., 2018. Advances in exopolysaccharides based bioremediation of heavy metals in soil and water: A critical review. *Carbohydr. Polym.* 199, 353–364. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.037>
141. Sawardeker, J.S., Sloneker, J.H., Jeanes, A., 1965. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. *Anal. Chem.* 37, 1602–1604.
142. Seymour, F.R., Julian, R.L., Jeanes, A., Lambert, B.L., 1980. Structure analysis of insoluble D-glucans by Fourier transform infrared difference-spectroscopy: Correlation between structures of dextrans from strains of *Leuconostoc mesenroides* and of D-glucans from strain of *Streptococcus mutans*. *Carbohydr. Res.* 86, 227–246. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85901-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85901-7)
143. Shen, K., Chen, M., Chan, H., Jeng, J., Wang, Y., 2009. Inhibitory effects of chitoooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1864–1871. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.044>
144. Sheppard, D.C., Newton, G.L., Thompson, S.A., Savage, S., 1994. A value-added manure management-system using the black soldier fly. *Bioresour. Technol.* 50, 275–279. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90102-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90102-3)
145. Sheppard, D.C., Tomberlin, J.K., Joyce, J.A., Kiser, B.C., 2002. Rearing methods for the black soldier fly (Diptera: *Stratiomyidae*). *J. Med. Entomol.* 39, 695–8. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.4.695>
146. Sikorski, P., Hori, R., Wada, M., 2009. Revisit of α -Chitin Crystal Structure Using High Resolution X-ray Diffraction Data. *Biomacromolecules* 10, 1100–1105. <https://doi.org/10.1021/bm801251e>
147. Smets, R., Verbinnen, B., van de Voorde, I., Aerts, G., Claes, J., Van Der Borght, M., 2020. Sequential Extraction and Characterisation of Lipids, Proteins, and Chitin from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae, Prepupae, and Pupae. *Waste Biomass Valorization* 11, 6455–6466. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00924-2>
148. Snarr, B., Qureshi, S., Sheppard, D., 2017. Immune recognition of fungal polysaccharides. *J. Fungi* 3, 47. <https://doi.org/10.3390/jof3030047>
149. St-Hilaire, S., Cranfill, K., McGuire, M.A., Mosley, E.E., Tomberlin, J.K., Newton, L., Sealey, W., Sheppard, C., Irving, S., 2007. Fish Offal Recycling by the Black Soldier

- Fly Produces a Foodstuff High in Omega-3 Fatty Acids. *Journal of the World Aquaculture Society* 8, 309-313. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00101.x>
150. Stijve, T., Besson, R., 1976. Mercury, cadmium, lead and selenium content of mushroom species belonging to the genus *Agaricus*. *Chemosphere* 5, 151–158. DOI:10.1016/0045-6535(76)90036-9
151. Stuelp-Campelo, P.M., De Oliveira, M.B.M., Leão, A.M.A.C., Carbonero, E.R., Gorin, P.A.J., Iacomini, M., 2002. Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. *Int. Immunopharmacol.* 2, 691–698. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(02\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(02)00003-6)
152. Synowiecki, J., Al-Khateeb, N., 2003. Production, Properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 145–171. <https://doi.org/10.1080/10408690390826473>
153. Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěvák, J., Erban, V., Kovářiková, E., Čopíková, J., 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydr. Polym.* 76, 548–556. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.021>
154. Synytsya, A., Novák, M., 2013. Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydr. Polym.* 92, 792–809. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.077>
155. Synytsya, A., Novak, M., 2014. Structural analysis of glucans, *Ann. Transl. Med.* 2, 17, 1-14. 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07
156. Tabarsa, M., Shin, I.-S., Lee, J.H., Surayot, U., Park, W., You, S., 2015. An immune-enhancing water-soluble α -glucan from *Chlorella vulgaris* and structural characteristics. *Food Sci. Biotechnol.* 24, 1933–1941. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0255-0>
157. Takeda, T., Nishikawa, Y., Shibata, S., 1970. A new α -glucan from the Lichen *Parmelia caperata* (L.) Ach. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 18, 1074–1075. <https://doi.org/10.1248/cpb.18.1074>
158. Theis, T., Stahl, U., 2004. Antifungal proteins: Targets, mechanisms and prospective applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 437–455. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3231-4>
159. Thomas, S.A., Becker, P., Pinza, M.R., Word, J.Q. 1999. Mycoremediation: A method for test- to pilot-scale application. Proceedings of the 5th International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, San Diego, United States.
160. Tingle, F.C., Mitchell E.R., Copeland, W.W., 1975. The soldier fly, *Hermetia illucens*, in poultry houses in north central Florida. *J. Ga. Entomol. Soc.* 10, 179–83.
161. Tolesa, L.D., Gupta, B.S., Lee, M.-J., 2019. Chitin and chitosan production from shrimp shells using ammonium-based ionic liquids. *Inter. J. Biol. Macromol.* 130, 818–826. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.018>
162. Tomberlin J.K., Sheppard D.C., Joyce J.A., 2002. Selected life-history traits of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) reared on three artificial diets. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95, 79–86.
163. Tomberlin J.K., Sheppard D.C., Joyce J.A., 2005. Black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae) colonization of pig carrion in south Georgia. *J. Forensic. Sci.* 50, 152–3. DOI: 10.1520/JFS2003391
164. Tronchin, G., Bouchara, J.P., Ferron, M., Larcher, G., Chabasse, D., 1995. Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: Correlation between adherence, agglutination, and rearrangements of the cell wall. *Can. J. Microbiol.* 41, 714–721. doi:10.1139/m95-098
165. Tsai, G., Su, W., Chen, H., Pan, C., 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisher. Sci.* 68, 170–177. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00404.x>
166. van der Fels-Klerx, H.J., Camenzuli, L., van der Lee, M.K., Oonincx, D.G.A.B., 2016. Uptake of cadmium, lead and arsenic by *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* from

- contaminated substrates. PLoS One 11, e0166186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166186>.
167. van Huis, A., 2013. Potential of insects as food and feed in assuring food security. Annual review of entomology. 58, 563-583. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>
168. Veldkamp, T., Van Duinkerken, G., Van Huis, A., Iakemond, C.M.M., Ottevanger, E., Bosch, G., Van Boekel, M.A.J.S. 2002. Insects as a Sustainable Feed Ingredient in Pig and Poultry Diets – A Feasibility Study. Wageningen UR Livest. Res., Report 638.
169. Vidali, M., 2001. Bioremediation. An overview. Pure Appl. Chem. 73, 1163–1172. <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>
170. Villalonga, R., Villalonga, M.L., Gómez, L., 2000. Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. J. Mol. Catal. B Enzym. 10, 483–490. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00003-5)
171. Vogel, H., Müller, A., Heckel, D.G., Gutzeit, H., Vilcinskas, A., 2018. Nutritional immunology: diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens*. Dev. Comp. Immunol. 78, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.09.008>
172. Wang, H., ur Rehman K., Liu X., Yang Q., Zheng L., Li W., Cai M., Li Q., Zhang J., Yu, Z., 2017. Insect biorefinery: a green approach for conversion of crop residues into biodiesel and protein. Biotechnol. Biofuels. 10, 304. DOI.org/10.1186/s13068-017-0986-7.
173. Wang, J., Chen, C., 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. Biotechnol. Adv. 27, 195–226. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>
174. Wang, T., Li, H., Nie, K., Tan, T., 2006. Immobilization of lipase on epoxy activated (1→3)- α -D-glucan isolated from *Penicillium chrysogenum*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 2883–2888. <https://doi.org/10.1271/bbb.60292>
175. Waśko, A., Bulak, P., Polak-Berecka, M., Nowak, K., Polakowski, C., Bieganowski, A., 2016. The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from *Hermetia illucens*. Int. J. Biol. Macromol. 92, 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.038>.
176. Wasser, S., 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 258–274. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
177. WAXSFIT. http://www2.ath.bielsko.pl/~{ }mrabiej/waxsfrit/sub/main_en/
178. Wei, H., Scherer, M., Singh, A., Liese, R., Fischer, R., 2001. *Aspergillus nidulans* α -1,3-glucanase (mutanase), mutA, is expressed during sexual development and mobilizes mutan. Fungal Genet. Biol. 34, 217–227. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2001.1303>
179. Wiater A., Paduch R., Pleszczyńska M., Próchniak K., Choma A., Kandefier-Szerszeń M., Szczodrak J., 2011. α -(1→3)-D-Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. Biotechnology Letters 33, 787-795. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0502-7>
180. Wiater, A., Paduch, R., Choma, A., Pleszczyńska, M., Siwulski, M., Dominik, J., Janusz, G., Tomczyk, M., Szczodrak, J., 2012. Biological study on carboxymethylated (1→3)- α -D-glucans from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. Int. J. Biol. Macromol. 51, 1014–1023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.017>
181. Wiater, A., Paduch, R., Choma, A., Sylwia, S., Pleszczyńska, M., Tomczyk, M., Locatelli, M., Janusz, S., 2015. (1→3)- α -D-Glucans from *Aspergillus* spp.: Structural characterization and biological study on their carboxymethylated derivatives. Curr. Drug Targets 16, 1488–1494.
182. Wiater, A., Pleszczyńska, M., Szczodrak, J., Próchniak, K., 2008. (1→3)- α -D-glukan ściący komórkowej żółciaka siarkowego – *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill–izolacja, charakterystyka i zastosowanie do indukcji syntezy. Biotechnologia 2, 174–189.

183. Wiater, A., Pleszczyńska, M., Szczodrak, J.A., 2006. Enzymy rozkładające α -(1-3)-glukany. Część I - Źródła mikrobiologiczne, produkcja, właściwości, genetyka. *Biotechnologia* 2, 206–220.
184. Wiater, A., Szczodrak, J., Pleszczyńska, M., 2008. Mutanase induction in *Trichoderma harzianum* by cell wall of *Laetiporus sulphureus* and its application for mutan removal from oral biofilms. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1335-1341.
185. Wiater, A., Waško, A., Adamczyk, P., Gustaw, K., Pleszczyńska, M., Wlizło, K., Skowronek, M., Tomczyk, M., Szczodrak, J., 2020. Prebiotic potential of oligosaccharides obtained by acid hydrolysis of α -(1→3)-glucan from *Laetiporus sulphureus*: A pilot study. *Molecules* 25, 5542; doi:10.3390/molecules25235542
186. Wieczorek, A. and Mucha, M.. 1997. Application of chitin derivatives and their composites to biodegradable paper coatings. in: Domard, A., Roberts G.A.F., Varum K.M., (Eds.), *Advances in Chitin Science*, Lyon, Jaques Andre Publisher, 890–896.
187. Xiong, C., 2010. Adsorption of cadmium (II) by chitin. *J. Chem. Soc. Pak.* 32, 429–435.
188. Yoon, H., Moon, M., Park, H., Im, S., Kim, Y., 2007. Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 954–959. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.042>
189. Yoshimi, A., Miyazawa, K., Abe, K., 2017. Function and biosynthesis of cell wall α -1,3-glucan in fungi. *J. Fungi* 3, 63. <https://doi.org/10.3390/jof3040063>
190. Zaidi, A., Oves, M., Ahmad, E., and Khan, M.S., 2012. Importance of free-living fungi in heavy metal remediation, in: Khan, M.S., Zaidi, A., Goel, R., Musarrat, J. (Eds.), *Biomangement of Metal-Contaminated Soils*, Springer Science Publishers, 479–494. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1914-9_21
191. Zaidi, A., Oves, M., Ahmad, E., Khan, M.S., 2011. Importance of Free-Living Fungi in Heavy Metal Remediation. *Biomangement of Metal-Contaminated Soils* 479–494. doi:10.1007/978-94-007-1914-9_21
192. Zdybicka-Barabas, A., Bulak, P., Polakowski, C., Bieganski, A., Waško, A., Cytryńska, M., 2017. Immune response in the larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Invertebr. Surviv. J.* 14, 9–17. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v14i1.9-17>
193. Zhang P., Zhang L., Cheng S., 1999. Chemical Structure and Molecular Weights of α -(1→3)-D-Glucan from *Lentinus edodes*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63, 1197-1202. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.1197>
194. Zhang, H., Schiewer, S. 2005. Arsenic (V) Sorption on Crab Shell Based Chitosan. *Impacts of Global Climate Change*. doi:10.1061/40792(173)296
195. Zhang, L., Chen, L., Xu, X., Lin, Y., Cheung, P.C.K., Kennedy, J.F., 2005. Comparison on chain stiffness of a water-insoluble (1→3)- α -D-glucan isolated from *Poria cocos* mycelia and its sulfated derivative. *Carbohydr. Polym.* 59, 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.09.017>
196. Zhang, P., Zhang, L., Cheng, S., 2000. Effects of urea and sodium hydroxide on the molecular weight and conformation of α -(1→3)-D-glucan from *Lentinus edodes* in aqueous solution. *Carbohydr. Res.* 327, 431–438. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00077-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00077-X)
197. Zheng, L., Li, Q., Zhang, J., Yu, Z., 2012. Double the biodiesel yield: Rearing black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*, on solid residual fraction of restaurant waste after grease extraction for biodiesel production. *Renewable Energy* 41, 75–79. doi:10.1016/j.renene.2011.10.004
198. Zonneveld, B., 1972. Morphogenesis in *Aspergillus nidulans* the significance of α -1,3-glucan of the cell wall and α -1,3-glucanase for cleistothecium development. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 273, 174–187. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(72\)90205-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(72)90205-X)

7. Teksty publikacji wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia autorów

Review

A Report on Fungal (1→3)- α -D-Glucans: Properties, Functions and Application

Katarzyna Złotko ^{1,*}, Adrian Wiater ², Adam Waśko ³, Małgorzata Pleszczyńska ², Roman Paduch ^{4,5}, Jolanta Jaroszuk-Ścisiel ² and Andrzej Bieganowski ¹

¹ Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland; a.bieganowski@ipan.lublin.pl

² Department of Industrial and Environmental Microbiology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland; adrianw2@poczta.umcs.lublin.pl (A.W.); m.pleszczyńska@poczta.umcs.lublin.pl (M.P.); jolanta.jaroszuk-scisiel@poczta.umcs.lublin.pl (J.J.-Ś.)

³ Department of Biotechnology, Human Nutrition and Food Commodity Science, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland; awasko1@tlen.pl

⁴ Department of Virology and Immunology, Maria Curie-Skłodowska University, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland; rpaduch@poczta.umcs.lublin.pl

⁵ Department of General Ophthalmology, Medical University, Chmielna 1, 20-079 Lublin, Poland

* Correspondence: nowak.katarzyna11@gmail.com

Academic Editor: Juraj Majtan

Received: 16 October 2019; Accepted: 31 October 2019; Published: 2 November 2019



Abstract: The cell walls of fungi are composed of glycoproteins, chitin, and α - and β -glucans. Although there are many reports on β -glucans, α -glucan polysaccharides are not yet fully understood. This review characterizes the physicochemical properties and functions of (1→3)- α -D-glucans. Particular attention has been paid to practical application and the effect of glucans in various respects, taking into account unfavourable effects and potential use. The role of α -glucans in plant infection has been proven, and collected facts have confirmed the characteristics of *Aspergillus fumigatus* infection associated with the presence of glucan in fungal cell wall. Like β -glucans, there are now evidence that α -glucans can also stimulate the immune system. Moreover, α -D-glucans have the ability to induce mutanases and can thus decompose plaque.

Keywords: fungi; cell walls; polysaccharides; (1→3)- α -D-glucans

1. Introduction

Glucans are glucose polymers and are, therefore, classified as polysaccharides. Although their simple composition might be taken as indicative of an uncomplicated construction, differences can be found among glucans in terms of the anomeric configuration of glucose units and glycosidic linkages (sequence and position), the type and degree of bond branching and molecular size [1]. Glucans can, therefore, be divided according to the anomeric conformation of glucose (α -glucans, β -glucans and α,β -glucans) as well as the position of the glycosidic bonds (1,3-, 1,4- and 1,6-glucans) [2].

Along with glycoproteins, glucans are components of fungal cell walls. These compounds shape fungal cells and form a barrier, which protects the cells against environmental stress. The outermost layer of the cell wall consists of glycoproteins, and beneath this is an inner layer, which is formed by glucose polymers (β -1,3-glucans, β -1,6-glucans, α -1,3-glucans and chitin) [3,4]. It has been proved that β -glucans are connected by covalent bonds with chitin chains, and this network is under the glycoprotein layer. There are no unambiguous reports as to the position of α -glucans chains. Grün reported that the (1→3)- α -D-glucans layer is beneath all the layers of biopolymers, just above the cytoplasmic membrane (Figure 1) [3]. However, the latest reports indicate that the location of

(1→3)- α -D-glucans is quite fluid and depends on many factors, including the fungus species [5,6]. In addition, within the same species (*A. fumigatus*), (1→3)- α -D-glucans may be in a different location, depending on the developmental form of the fungus (conidia or vegetative mycelium) [5] and the type of plant cultures [6].

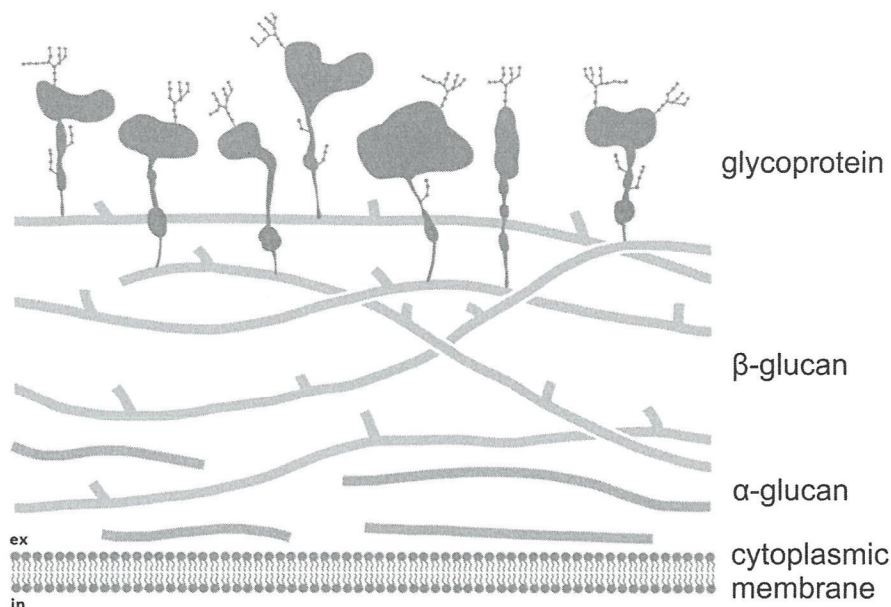


Figure 1. Structure of fungal cell walls by Grün [3].

The fluorescently labelled antibodies method is used to determine the location of α -glucans in cells [7,8]. Choma et al. (2013) found (1→3)- α -D-glucan in the hyphae of *Aspergillus wentii* and particularly large quantities in hyphal septa [7]. Fujikawa, Kuga and Yano et al. (2009) used fluorescent labels to study the distribution of infected cell wall polysaccharides in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. The results obtained with immunoelectron microscopy showed that α -1,3-glucan and β -1,3-glucan were mixed in the cell wall of hyphae, but a larger deployment of α -1,3-glucan occurred further from the cell membrane [8].

(1→3)- α -D-glucans have been found in numerous fungi [8–11]. In larger quantities, α -glucans occur in representatives of the *Basidiomycetes* class. Their content reaches 44–53% of the dry weight of fruiting bodies of the birch pathogen *Fomitopsis betulina* (Bull.: Fr.), and even 75–88% in the fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill [12,13]. In smaller quantities, α -glucans were found in representatives of the *Ascomycetes* class, i.e., *Aspergillus niger* (9%). Some kinds of yeast may not have α -glucans (e.g., *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*) [14], but *Histoplasma capsulatum* contains 46.5% [15]. Table 1 presents an overview of the latest literature (since 2000) relating to the content of (1→3)- α -D-glucans and their properties in individual species of fungi [7,16–25]. The table is a supplement to the information contained in Grün's publication, which provided an analogous review of the literature on (1→3)- α -D-glucans content in individual fungi [3]. Thus, both works fully document the occurrence of (1→3)- α -D-glucans in fungi.

Table 1. Review of fungal species that contain (1→3)- α -D-glucans, along with their brief characteristics.

Species of Fungus.	Molecular Mass Weight [kDa]	Viscosity [mPa·s]	Optical Rotation [$[\alpha]_D^{25}$ °]	(1→3)- α -D-glucan Content in Fungus (Dry Fungal Mass %)	Structure	Reference
<i>Aspergillus fumigatus</i>		16.7	+286	12.5	The backbone chain is formed mainly (91.3–97.8%) of glucose linked by (1→3), while (1→4) linkages are in the minority (1.3–7.2%). There are small amounts of three types of doubly substituted glucose residues, i.e., \rightarrow 2,3)-GlcP-(1→, \rightarrow 3,4)-GlcP-(1→ and \rightarrow 3,6)-GlcP-(1→.	[16]
<i>Aspergillus nidulans</i>		12.2	+384	9.4	as above	[16]
<i>Aspergillus niger</i>		8.8	+254	8.4	as above	[16]
<i>Aspergillus wentii</i>	850	17.0	+216	6.5	A linear polymer with 25 subunits; each subunit is constructed of about 200 residues of (1→3)- α -D-glucoses separated by a short spacer of (1→4)- α -D-glucoses.	[7]
<i>Cerevia unicolor</i>		2.12 (Fruiting body) 7.55 (Mycelium)	+206 (Fruiting body) +200 (Mycelium)	46.1	About 90% of the (1→3)- linkages; there are also \rightarrow 4)- α -D-GlcP-(1→ (7.4–4.4%) and \rightarrow 3,4)- α -D-GlcP-(1→(3.2–2.5%).	[18]
<i>Ganoderma lucidum</i>		1.94–1.98	+25 to +39	1.53–3.06	The backbone chain is formed mainly (74.9–87.9%) of glucose linked by (1→3), while (1→4)- linkages are in the minority (6.7–8.7%). There are small amounts of three types of doubly substituted glucose residues, i.e., \rightarrow 2,3)-GlcP-(1→, \rightarrow 3,4)-GlcP-(1→ and 3,6)-GlcP-(1→.	[19]
<i>Lentinus atodes</i>	72.4–521			9	The chain consists mainly of (1→3)-bonds (67%) with a small number of (1→4)-bonds (27.3%) and \rightarrow 3,6)-GlcP-(1→ and \rightarrow 4,6)-GlcP-(1→.	[20–22]
<i>Lactiporus sulphureus</i>				57	The chain consists mainly of (1→3)-bonds (91.2%) and a small number of (1→4)-bonds (3%).	[22]
<i>Penicillium chrysogenum</i>	180			6		[23]
<i>Fomitopsis betulina</i> (earlier <i>Piptoporus betulinus</i>)	270			24	The chain consists mainly of (1→3)-bonds (84.6%) and a small number of (1→4)-bonds (6%).	[22,24]
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>				4.0	91.2% of the (1→3)- linkages	[25]
<i>Pleurotus djamor</i>				3.1	73.8% of the (1→3)- linkages	[25]
<i>Pleurotus eryngii</i>				2.0	89.4% of the (1→3)- linkages	[25]
<i>Pleurotus ostreatus</i>				6.1	The chain consists mainly of (1→3)-bonds (82.8%) and a small number of (1→4)-bonds (7.4%).	[22]
<i>Pleurotus procece</i>				2.7	84.7% of the (1→3)- linkages	[25]
<i>Ramaria botrytis</i>					A linear polymer is composed of \rightarrow 3)- α -D-GlcP-(1→ repeating units.	[17]

Biosynthesis of α -glucans has not been fully researched. In general, the synthesis of these polysaccharides involves glucose and (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan synthase [26]. Grün (2003) indicated two (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans biosynthesis mechanisms [3]. The first is a single-step biosynthesis mechanism, which occurs in the walls of the spores and involves a single α -glucan monomer. The two-step mechanism in *Schizosaccharomyces pombe* involves α -glucan, which has a dimeric structure composed of two covalently linked building blocks, each consisting of a linear (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan segment with a small number of (1 \rightarrow 4)-residues at its reducing end. In another publication, Grün et al. studied biosynthesis of α -glucans in yeast [27]. Hochstenbach et al. (1998) specifically identified α -glucan synthase in *Schizosaccharomyces pombe*, i.e., Ags1p and its three domains: an intracellular synthase domain, a C-terminal multipass transmembrane domain, and an N-terminal extracellular domain, which might act as a transglycosylase [28]. *Aspergillus nidulans* has two α -1,3-glucan synthase genes (agsA and agsB), but studies show that only AgsB is necessary for normal growth [29]. Yoshimi et al. (2017) have extensively described the α -glucan biosynthesis mechanism, including issues related to signalling the integrity of the cell wall, the genes and enzymes involved in this process, and a detailed description of the biosynthesis in *Schizosaccharomyces pombe* [30]. They have also suggested a biosynthesis and degradation model for (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan in *Aspergillus nidulans*.

In the literature, there is a lot of information about fungal β -glucans, but α -glucans (which are also frequently occurring polysaccharides in fungi) have not yet been fully characterized. The starting point for discussion is the work of Grün from 2003 [3]. In recent years, a variety of analyses of α -glucans have been performed, shedding light on the structure, properties and functions of these polymers. However, a conclusive report on cell wall location and the functions of α -glucans is missing. For this reason, it is worthwhile collecting information about these as yet little-known polysaccharides. The report presented here is one of the few reviews on the subject of α -glucans. In addition to current information on their structure and functions, the review describes miscellaneous applications of (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans, e.g., as a mutanase inducer [31–35], as support for lipase immobilization, as a prebiotic [36] and, finally, based on recent research undertaken by our group, a new application as a heavy metal sorbent [37,38].

2. Methods for Isolating (1 \rightarrow 3)- α -D-Glucans

In the literature, there are several procedures for isolating α -glucans [4]. Table 2 shows the different isolation methods and compares the reagents used in these. Generally, the methods presented consist of the decolorization stage, which is also the stage of removing the water-soluble fraction, further obtaining the alkali-soluble fraction, neutralization and rinsing [39–42].

Table 2. Summary of α -glucans isolation methods detailing the reagents used in each isolation step.

Species of Fungi Used	Decolorization and Removal of the Water-Soluble Fraction	Neutralization Stage	Rinsing Stage	Reference
<i>Trichoderma viride</i>	Sodium borohydride, Sodium hydroxide, methanol, methanol water solution	Methanol-acetic acid solution	Methanol-water solution Water, boiled in water Ethanol	[39]
<i>Amanita muscaria</i>	Methanol, 0.9% sodium hydroxide, hot water, 5% Na ₂ CO ₃ 1M NaOH solution with sodium borohydride (200 mg)	1M HCl	Water	[40]
<i>Schizophyllum commune</i>	Water 5% KOH activated charcoal	Acetic acid	Water	[41]
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Water NaOH	HCl	Water	[42]

For α -glucans isolation, Grün [3] used different reagents and a method of isolating. The milled fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* were treated with a solution containing EDTA, Tris and pH 7.6 solution, and these were then blended. SDS and 2-mercaptoethanol were added and boiled to remove cytosolic impurities. The suspension was centrifuged and washed in water. Following this, the milling

and extraction steps were repeated. The centrifuged material was suspended in ice-cold NaBH_4 and KOH , and stirred for 30 min at 4 °C. The undissolved material was removed by centrifugation. Acetic acid was added to the centrifuged supernatant to bring the solution to pH 6.0. The water-insoluble fraction was mixed at 4 °C for 24 h, after which the pellet was centrifuged and resuspended in sodium azide, 2-mercaptoethanol, citrate-phosphate buffer and pH 5.3 containing Zymolyase-100T (Seikagaku, Tokyo, Japan) to remove (1→3)- β -D-glucans. After stirring overnight at 37 °C, the insoluble fraction was collected by centrifugation and washed twice with water. Alkaline extraction and enzymatic hydrolysis were repeated once more. Finally, the material was re-extracted with SDS and 2-mercaptoethanol and washed with sodium azide.

3. Structure and Property of Fungal (1→3)- α -D-Glucans

The properties of compounds (especially biologically active molecules) depend on their structure, conformation and molecular weight. In order to determine the structure, molecular weight and other physicochemical properties of (1→3)- α -D-glucans, different techniques are used: spectroscopic, chemical, and separation methods [1], for example, size-exclusion (gel permeation) chromatography (SEC or GPC), laser light scattering (LLS), and viscometry. This analysis is difficult due to α -glucans being insoluble in water, so specific solvents or chemical modification are required [1].

(1→3)- α -D-glucans consist of glucose monomers linked with mainly 1,3-glycosidic bonds, but their structure varies depending on the fungus species. However, in α -glucans, there are not only 1,3 bonds (such as those in the *Amanita muscaria*) [40], but there may also be small amounts of 1,4-linkages (*Neurospora crassa*) [43] as well as compounds of the nigeran type, where alternate 1,3- and 1,4- bonds exist (*Parmelia caperata*) [44]. The structure of alkali-soluble polysaccharides isolated from *Boletus edulis* was also studied. This polymer consists mainly of α -(1→3)-D-glucan chains (about 67%) but also α -(1→3)-D-mannans (28%) [38]. In another construction, α -glucans form on dental plaque, where the glucose units are linked by binding 1,3- in the main chain and 1,6- in the side chains [26].

(1→3)- α -D-glucans are insoluble in water due to the presence of strong hydrogen bonds. The presence of these bonds makes it difficult to determine the molecular weight or conformation of the molecules. Zhang et al. (2000) [21] used urea and NaOH solutions to break the hydrogen bonds, and determined the molecular weight and viscosity of the α -glucan from the *Lentinus edodes* as 5.21×10^5 and $148 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. The molecular weight of the glucan was directly influenced by the degree of polymerization, which was between 60 and 3500 [3].

By 1979, the structure of (1→3)- α -D-glucans had already been defined by Ogawa et al. [45], who used X-ray analysis and defined conformation as extended, close to a 2/1 helix [45,46]. Moreover, in LiCl/DMSO solution, (1→3)- α -D-glucans occurs as a flexible chain [47,48] and (according to other reports) as a random coil [20] due to the breaking of hydrogen bonds.

(1→3)- α -D-glucans occur in different crystal forms (polymorphs), depending on the fungus species, type of tissue investigated (reproductive or non-reproductive tissue) and preparation conditions [13]. Jelsma and Kreger (1979) [13] investigated four species of fungi using X-ray diffraction: *Laetiporus sulphureus*, *Piptoporus betulinus*, *Schizophyllum commune*, and *Aspergillus nidulans*. They reported that α -glucan can present in three polymorphs (I, II and III). The first form (I) occurs in native tissue of *L. sulphureus* and *P. betulinus*. The second form (II) can be obtained by precipitation from alkaline solution. The third crystalline form is not hydrated, in contrast to the other two, and can, therefore, be obtained by drying polymorph I at 60 °C (total change) and polymorph II at 95 °C in a vacuum. It seems that form II is the most energy stable, but the less stable form is generally preferred in nature [13]. These changes are presented schematically in Figure 2, based on Jelsm's work [13].

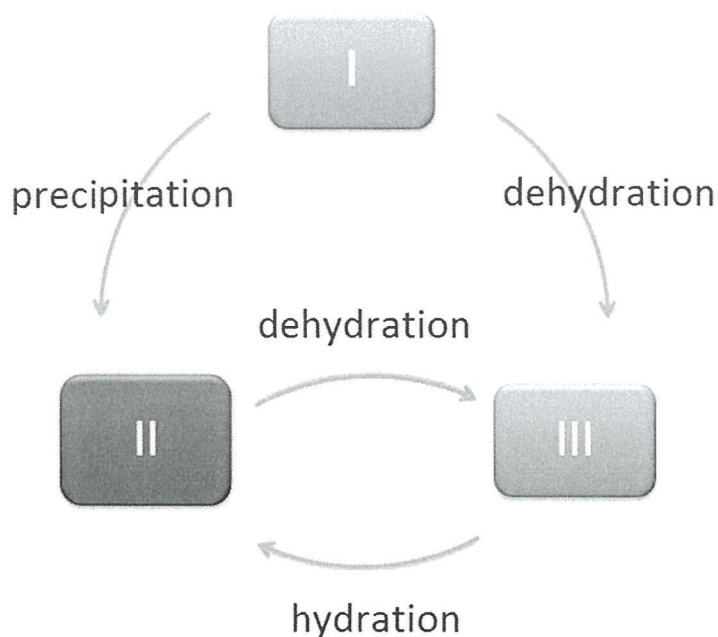


Figure 2. Mutual transformations of crystalline/polymorphic forms of (1→3)- α -D-glucans, based on Jelsma et al. [13].

Choma et al. (2013) [7] characterized water-insoluble polysaccharide from *Aspergillus wentii* and reported that the studied polymer was linear α -D-glucan with a molecular weight of 850 kDa. The glucan was composed of 25 subunits, and each subunit consisted of 200 α -D-glucose residuals with (1→3)-bonds separated by short fragments of α -D-glucoses linked by (1→4)-bonds.

4. Functions of (1→3)- α -D-Glucans

The role of cell wall components of fungi is generally known; they provide cell rigidity to protect against the external environment and, at the same time, provide flexibility, which enables cell growth. The typical role of α -glucans in cell walls is controversial [3]. Zonneveld (1972) reported that α -glucan in *Aspergillus nidulans* stores material which has accumulated in the cell wall during vegetation growth [49]. However, the mutant of this fungus which lacked α -glucan showed normal growth, suggesting that α -glucan in *Aspergillus nidulans* is an unnecessary compound for this process [50]. Glucans play a significant role in yeast because they are essential for ensuring the integrity of fission yeast cells and are a major constituent of fission yeast spore walls. The spore wall (like the cell wall of haploid cells) maintains structural integrity, regulates cell permeability and protects the cell from environmental stresses [3]. Moreover, the observed correlation between a lack of α -glucans in the cell wall of fungus is temperature sensitive. The mutant of *Schizosaccharomyces pombe* (with a mutation in the gene responsible for α -glucan biosynthesis) has been found to be sensitive to temperature and its cells wall lysed at 37 °C [28].

In a medical context, extensive interest in glucans is associated with their anti-tumour properties. More specifically, β -glucans have these properties, but α -glucans have little or no anti-tumour effect due to being insoluble in water. However, modified α -glucans (for example, carboxymethylated or sulphated derivatives) are soluble in water and have potent anti-tumour activity [22,51–53]. Wiater et al. (2011) reported that carboxymethylated α -glucans from *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Piptoporus betulinus* and *Laetiporus sulphureus* have a biological activity potential (express cytotoxic or mitochondrial metabolism-modulating effects), but they do not show free radical scavenging activity [22]. Moreover, glucan-based preparations that stimulate the immune system are commercially available. Bao et al. (2001) reported that modified α -glucans (carboxymethylated derivatives) have stimulating effects on lymphocyte proliferation and antibody production [54].

In addition, the report by Yoshimi et al. [30] cited diverse applications of glucans, e.g., a possible use as thermoplastic materials due to their thermostable properties [55] or in the fermentation industry due to enzymes and metabolites secreted by fungi [56].

The presence of α -glucans also has a negative effect, and the correlation between the presence of α -glucan and fungal virulence is known [57,58]. Fujikawa et al. [8,59] report that many fungi that cause plant diseases through the presence of α -glucans impair the immune response of plants, and, in some species, these polysaccharides are used to maintain the infectivity of structures.

Moreover, α -glucans enables aggregation of swollen conidia, which occurs in biofilm during pulmonary aspergilloma (caused by *A. fumigatus*) [60]. It has been proven that α -glucan in mutants streptococci causes virulence in the aetiology of dental caries in humans through the glucans' cell-cell and cell-surface adhesion, especially adhesion to hard surfaces [61–63]. On the other hand, by using α -glucans for the production of (1 \rightarrow 3)- α -glucanases, glucosidic bonds in the mutant synthesized by cariogenic oral streptococci can be hydrolysed, thereby removing dental plaque mutants [64–66].

Table 3 provides a summary of the medical properties of fungal (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans [16,22,25,33,34,36,42,51–54,57,58,60,64–84].

Table 3. Medical properties and potential application of fungal (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans.

Medicinal Property of (1 \rightarrow 3)- α -D-Glucans	Application	Reference
Anti-tumour properties	Potential anti-cancer drug	[22,25,51–53,67–72]
Immunological activity	Adjuvants in vaccination	[16,25,54,67–75]
<i>Mutanase inducers</i>	Active ingredient of oral hygiene products (mouthwashes, toothpastes, or chewing gums),	[33,34,42,64–66,76–78]
Role in the pathogenicity of <i>Aspergillus fumigatus</i>	Vaccine and diagnostic test systems	[57,60,79–83]
Prebiotic properties	New prebiotic source	[36,84]

5. The Biological Role of (1 \rightarrow 3)- α -D-GLucans

5.1. Fungal (1 \rightarrow 3)- α -D-Glucans Is Essential for Successful Plants Infection

The effect of fungus-plant host interaction results from the establishment of a balance between fungal virulence and plant resistance [85–88]. Disturbance of the balance (resulting from a lowered plant self-protection ability or increased fungal virulence) leads to development of disease [89–92]. The fungus-plant interaction constitutes a dynamic system involving numerous processes directly inhibiting pathogen growth and indirectly affecting the growth of both organisms (resistance induction) as well as co-regulation of metabolite formation [93]. Plant protection against pathogen invasion (provided by the direct action of microorganisms) is enhanced by indirect induction of plant resistance by elicitors produced during inhibition of pathogen growth by rhizosphere microorganisms employing mechanisms of direct action [94–96].

Cell walls are the most important sources of molecular designs associative with microorganisms/pathogens (microbe/pathogen-associated molecular patterns, MAMPs/PAMPs) [8,10]. Fungal MAMPs include β -glucans, mannans and chitin, which induce an immune response in both plant and mammalian cells [11,46,97–99]. They are identified by binding proteins that make up the receptor complex. Chitin and β -1,3-glucan in fungal walls are the most important and best known MAMPs, which cause an immune response in plants [11,100–102].

Elicitors are plant-resistance inducers released from the cell walls of a host (endoelicitors) and invading microorganism (exoelicitors). Elicitors already recognized can be classified as members of the race-specific group that determines induction of gene-to-gene resistance. They can also be included in the particularly interesting group of common elicitors of so-called race non-specific resistance, which interact with all varieties of an infected host species and originate from various pathotypes of pathogenic and/or non-pathogenic strains [85,103–107].

The latest reports indicate that (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans may be a factor in the virulence of some pathogens [50], with a role in the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus nidulans* [108] and

showing elicitor activity [9,109]. Compared with β -glucans, α -glucans are less well understood in terms of their ability to induce plant resistance and their anti-cancer properties. Water-soluble α -glucan from the lichen fungus *Ramalina celastri* (a linear polymer of glucose with α -(1,3)- and α -(1,4)- in a ratio of 3:1) has an in vitro anti-cancer property against HeLa cells and in vivo murine macrophage-macrophage activation capacity, stimulating phagocytosis and increasing the production of hydrogen peroxide [67]. (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan presents in the wall of the non-pathogenic binucleated fungus *Rhizoctonia* (BNR) (an effective factor in biological protection, inducing plant resistance against diseases caused by pathogenic strains of *R. solani*) has been found to not only induce resistance to the infection in potato stems but also induce protection against cancer and dry rot caused by *Rhizoctonia* [110–112]. The (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans strongly induce activity markers of resistance-related proteins of pathogenicity (PR): (1 \rightarrow 3)- β -glucanase (PR-2) and chitinase (PR3) [113]. Kinetics of induction of (1 \rightarrow 3)- β -glucanase in the stems of potato mycelium are similar to those induced by (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan isolated from the cell wall of BNR. Wolski et al. [112] have, for the first time, detected α -glucanase activity in plant tissues using (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans as a substrate (derived from a *Rhizoctonia* cell wall). It has been shown that accumulation of (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan depends on the MAP kinase pathway (Mps1), which can be activated by an endoelicitor, such as that originating from degradation of wax 1.16-hexadecanodiol [8]. Rappleye et al. (2007) proved that the (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan both spatially and functionally masks the (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan in infection hyphae of *Histoplasma capsulatum* (and protects them against enzymatic degradation) by blocking the plant host's ability to recognize these polymers [10].

It seems that the key function of α -glucans are protection of β -glucans and chitin against degrading enzymes (that is, against the release of exoelicitors), against recognition by the plant and for running the defence response [8,10,114]. This mechanism seems to be universal and can be observed in both fungal-mammal [10] and fungal-plant interaction [8,30]. There seems to be a clear relationship between the amount of α -glucan in fungal cell wall (FCW) and the ability of a fungus to infect host cells (virulence). Studies contributing to our understanding of the fungal-host defence response prevention strategy have indicated the location of polysaccharides in cell walls using fluorescent marking during differentiation of infection structures in *Magnaporthe grisea* [8,115]. Immunomicroscopic analysis showed that infectious cell wall fragments of rice pathogen *Magnaporthe grisea* (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan and (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan are intertwined with each other, but (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan remains further away from the cell membrane. When infective *Magnaporthe grisea* hypha was developing on a hydrophobic plastic surface, (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan was only found in an appressorium. On the other hand, when infective *Magnaporthe grisea* hypha developed on the surface of plants, (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan was found with both hypha-growing from a conidium (germ tube) and an appressorium [115].

Fungal plant pathogens reorganize their cell wall components in response to specific plant-derived compounds, which these pathogens may encounter during infection [116]. Figure 3 shows specific changes in the fungal cell wall structure during plant infection in a simplified manner as the exact distribution of polysaccharides in the wall is unknown. In addition, the arrangement of cell wall proteins has been omitted for the sake of clarity. Chitin, (1 \rightarrow 3)- β - and (1 \rightarrow 6)- β -glucans are present in all cell types and form a specific grid. The extracellular matrix (EM) is the glycoprotein outer layer. Plant infection causes deacetylation of chitin, forming chitosan and causing a decrease in β -glucans content. The distribution of (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans also changes, occupying the outer layers [117].

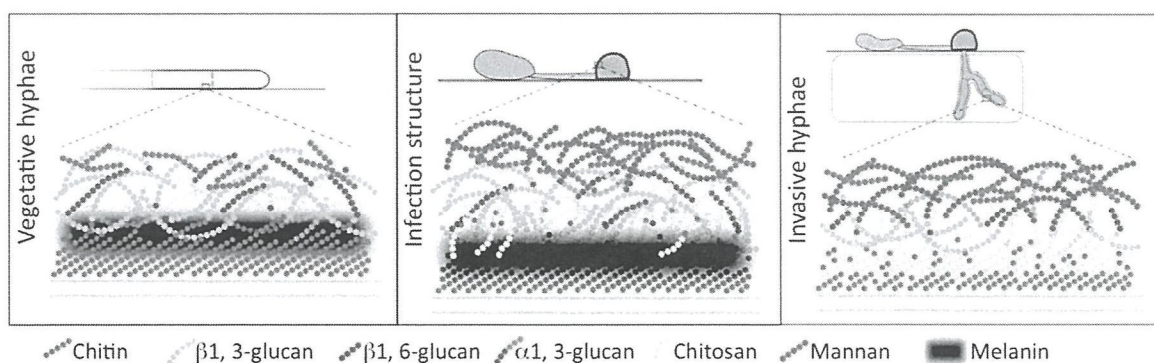


Figure 3. Changes in the structure of the fungus cell wall during plant infection, according to Geoghegan et al. [117].

Because (1→3)- α -D-glucans are a refractory polysaccharides for plants, it is highly likely that surface accumulation of (1→3)- α -D-glucans protects the fungal cell walls from antifungal agents, such as cell wall degrading enzymes, which fungi encounter during infection [8].

5.2. The Role of (1→3)- α -D-Glucans in the Pathogenicity of *Aspergillus Fumigatus*

Aspergillus fumigatus is a human pathogen that causes systemic infections in immunodeficient patients, for example, after transplantation or chemotherapy. Ghazaei et al. prepared a review on pathogenesis and infection by *Aspergillus fumigatus*, where they discussed various factors affecting the virulence of this fungus (e.g., thermotolerance, nutrient uptake, adhesins, toxins) including the effect of cell wall components [80]. The cell wall of *Aspergillus fumigatus* is mainly composed of (1→3)- α -D-glucan [79]. This polysaccharide is present in the extracellular matrix which surrounds the fibrillar core, composed of (1→3)- β -D-glucan and chitin [58]. In *A. fumigatus*, α -glucan has a structural role in the cell wall, providing cell rigidity. The absence of this polymer in cells is compensated for by increasing chitin and/or β -glucan content, so it can be concluded that α -glucan is a key component of the cell wall and is not required for vegetative growth [118]. However, α -glucan participates in the process of germination of *Aspergillus fumigatus* conidia, more precisely, in the aggregation of germinating conidia. This aggregation (i.e., cell-cell interaction) is characteristic of the *Phanerochaete*, *Syncephalastrum*, and *Aspergillus* species [119–123]. An experiment conducted by Fontaine and Beauvais (2010) using beads coated with (1→3)- α -D-glucan has shown that these polysaccharide chains interact with one another, and the results confirmed the ability of α -glucan to aggregate conidia [60]. On the other hand, Henry et al. (2011) reported that a lack of α -glucan does not disrupt the process of conidial germination. The germination level of the mutant (without genes determining the biosynthesis of α -glucan) was found to be similar to the parental strain [118].

In *A. fumigatus*, α -glucan also has a different role, that is, this polysaccharide causes virulence. Removal of the gene responsible for its biosynthesis does not always limit its adverse effects. Biosynthesis of α -glucan is determined by three genes successively known as *AGS1*, *AGS2*, and *AGS3* [58]. Decreased α -glucan content in the cell wall only causes a lack of the gene *AGS1*. However, even the loss of α -glucan is enough to keep the virulence of *A. fumigatus*, and deletion of *AGS1* and *AGS2* does not reduce virulence in the strain [57,79]. There are reports that *AGS3* has a role in the biosynthesis of α -glucan and changes the virulence of *A. fumigatus* [79]. In an experiment by Maubon and Spark (2006), a strain lacking this gene was shown to produce faster and more robust disease compared with the original strain [79]. Its virulence was related to greater resistance to H₂O₂, the ability to germinate more rapidly [81] and an increase in melanin in the cell wall of conidia (which results in a resistance to phagocytic killing) [82]. According to Beauvais, Bozza, and Kniemeyer (2013) [58], deletion of the three genes results in a lack of (1→3)- α -D-glucans in fungal wall cells but no reduction in growth of the fungi. These mutant fungi are less pathogenic than the strain without modification. Deletion changes the structure of conidial cell walls, causing a reduction in the viability

of conidia in vivo, that is, a decrease in the virulence of the mutant. A study using a model of murine aspergillosis reported that a mutant without α -glucan was less virulent than the native strain [58]. A lack of germination and vegetative growth was found in the lungs of mice infected with mutated conidia. Structural changes in the cell wall of mutant conidia caused conidia to be more easily phagocytosed by macrophages. In addition, unlike the native strain, β -glucan and chitin could be seen on the surface of mutant germinating conidia. These polysaccharides cause an immune response against fungi [6].

Beauvais et al. (2005) [57] suggest that α -glucan in the cell wall of *A. fumigatus* has an additional function to other pathogenic fungi. In *A. fumigatus*, α -glucan acts as a cement for the other cell wall components. It does not cause masking or anchoring of the cell wall surface molecules, which is probably what causes pathogenicity. For this reason, there are differences in the virulence of different species of pathogenic fungi; absence of the α -glucan synthetase gene does not reduce the virulence of the mutant when compared to the native strain [57].

Komarova et al. have used the relationship between the presence of (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan and the virulence in *Aspergillus fumigatus* in practice. They synthesized a pentasaccharide and neoglycoconjugates, which are related to α -glucan. This discovery will be used in the future to develop a diagnostic test system and vaccine to detect and combat this pathogen [83].

6. Applications of (1 \rightarrow 3)- α -D-Glucans

6.1. Immunological Activity

Polysaccharides have been found to be good modulators and stimulators of immune responses. The most active include not only (1 \rightarrow 3)-, (1 \rightarrow 4)- and (1 \rightarrow 6)- β -D-glucans but also (1 \rightarrow 4)-, (1 \rightarrow 6)- and (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans. These are considered as Toll-like receptor 4 (TLR4) ligands, and they induce receptor-mediated signal transduction via TLR4/IKK/NK- κ B molecular pathways. Polysaccharides, including glucans, are known to induce activity and differentiation of immune cells, such as macrophages, leukocytes, or natural killer (NK) cells. These compounds belong both to innate (mainly macrophage-dependent immune system responses) and adaptive immunity (including B- and T-cell activity). Among them, monocyte activation is considered to be an initiating stage of immune responses after glucan impact [124]. Further immunomodulatory activity includes other cells like subsets of lymphocytes, NK, dendritic and myeloid cells, and their soluble mediators. (1 \rightarrow 4)- α -D-glucans induce TNF- α , nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (PGE2) production by macrophages, as well as pro- and anti-inflammatory cytokines (such as IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 or IFN- γ) by lymphocytes and other immunocompetent cells [125,126].

For a considerable time, (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan molecules were thought to have no significant biological activity. Nevertheless, given the source of the glucan, chemical modification of its structure and the presence of specific receptors on immune cells (which recognize glucan epitopes), it can exert a significant immunomodulatory effect. Currently, α -D-glucans are considered as promising compounds useful as adjuvants, especially for mucosal vaccination [126]. This activity is mediated through specific processes, including upregulation of MHC and co-stimulatory molecules, enhancement of antigen presentation, complement pathways and secretion of soluble mediators, as well as activation and stimulation of phagocytic cell motility [126]. Despite the multifaceted activity of α -D-glucans on immune responses, their immunomodulatory activity can be targeted through changes in the polymer length, molecular weight, branching degree and type of bonds, as well as solubility and charge of the molecule [126]. It has been shown that α -D-glucans with a mass higher than 10 kDa express poorer macrophage lineage activation properties than polymers with lower molecular mass [74,126]. This is clearly not always the case, however, and other variants often appear demonstrating the reverse. As with many other antigens, α -D-glucan charge is also important in the stimulation of immune cells, indicating that molecules with a high charge are often poorly immunogenic. Similarly, immune response is dependent on the type of glycosidic bonds, indicating differences in the stimulation of macrophage activity dependent on prevalence of (1 \rightarrow 3)- α - or (1 \rightarrow 6)- α - bonds within the polymer. Nonetheless,

soluble and insoluble (1→3)- α -D-glucans or (1→6)- α -D-glucans are able to stimulate an immune response and soluble mediator secretion by immunocompetent cells. However, water-soluble forms are postulated to be more immunogenic. Modification of α -D-glucans like sulphation, aminopropylation, hydroxyethylation, or methylation also causes these agents to become much more biologically active than the native, underivatized components. Moreover, after chemical modification of glucans, they express less systemic toxicity than approved cytostatics [16,19,68,127]. These modifications also make polymers more soluble in water and, finally, may increase their biological activity. Chemical modification of α -D-glucans is thus an important procedure leading to an increase in the solubility of glucans in water, with simultaneous enhancement of their immunomodulatory activity [25].

Immune cells may be directly affected by α -D-glucans, mainly through binding to specific TLRs, CRs or dectin-1/2, expressed on the surface of these cells. This activation is followed by, e.g., NF- κ B molecular pathway activation, leading to production of pro- and anti-inflammatory cytokines. These mediators stimulate antigen presentation in dendritic cells (DCs) and phagocytosis or secretion of other cytokines macrophages. The appropriate micro-environment, conditioned by the presence of glucan, also determines the most effective stimulation of the immune system and thus effective defence of the body against pathogens or neoplastic transformed cells [75]. However, the immunomodulatory and anti-tumour activities of α -D-glucans are generally mediated via host immune system activation rather than direct cytotoxic impact on target cells [123]. Stephen-Victor et al. reported that α -(1,3)-glucan isolated from *A. fumigatus* may play an important role in vaccination settings in patients after infections with this fungal pathogen [73]. The anti-tumour activity of glucans is mainly mediated by T lymphocyte activity and thymus-dependent mechanisms [69]. Maitake α -D-glucan (YM-2A; *Grifola frondosa*) has been found to enhance host anti-tumour action, activating CD4+ and CD8+ lymphocytes in the spleen and CD8+ cells in tumour-draining lymph nodes. This compound increases anti-tumour activity in CD11b+ myeloid cells, macrophages of the peritoneum and DCs. Moreover, this polymer stimulates secretion of soluble mediators in Peyer's patches, indicating systemic activation of an anti-tumour immune response in the host [70]. Nevertheless, one cannot exclude direct anti-cancer or cytotoxic activity of α -D-glucans inducing apoptosis of transformed cells [67].

The role of these compounds is based on general tumourigenesis prevention. In particular, it should include limitation of tumour cell proliferation (especially sulphated forms of glucans), potentiation of the immune response against pathologic tissue, as well as preventive effects on the motility and metastasis of cancer cells. Moreover, they may induce tumour mass infiltration by natural killer (NK) cells and cytotoxic T lymphocytes, and consequently limit the volume of tumour growth [71]. Potential α -D-glucans anti-tumour activity should thus be linked (besides immune) with nervous or hormone systems stimulation and consequently whole-body mobilization [69,72,128].

6.2. (1→3)- α -D-Glucans as a Mutanase Inducers

(1→3)- α -D-glucans isolated from fungal cell walls can be also used for the production of (1→3)- α -glucanases, which are inducible enzymes catalysing the hydrolysis of glucosidic bonds in various (1→3)- α -D-glucans. (1→3)- α -glucanases are produced by microorganisms, fungi and bacteria, whose enzymes are involved in the processes of nutrition, including, inter alia, mobilization of cell wall α -D-glucans in response to carbon and energy source exhaustion [49,129], or, in the case of some yeasts, participate in morphogenetic processes during development and differentiation [130,131]. Some (1→3)- α -glucanases (also called mutanases) have the ability to hydrolyse the glucosidic bonds in mutans (branch (1→3)- and (1→6)- α -D-glucans) synthesized by cariogenic oral streptococci. Mutans are a key component of extracellular polymeric substances, forming a framework of cariogenic biofilm (dental plaque) [64–66]. When mutanases not naturally present in the oral cavity are added to oral hygiene products (such as mouth rinses, toothpaste or chewing gum), they can effectively support the cleaning of teeth through decomposition of dental plaque mutans [76]. Unfortunately, production of microbial mutanases is hampered by the lack of an available inducer for the synthesis of these enzymes. Mutan would be the best inducer if it were not for the potential pathogenicity of its producers, low

synthesis yield and great structural diversity. However, it is possible to replace mutan in this role with more easily available fungal (1→3)- α -D-glucans. Cell walls preparations of various fungi or glucans with different levels of purity have been used for this purpose. High glucanase activities were obtained from *Bacillus circulans* WL-12 by supplementing the media with whole *Schizosaccharomyces pombe* cells or purified linear (1→3)- α -D-glucan (pseudonigeran) from *Aspergillus niger* [77]. Pseudonigeran was also used to induce *Trichoderma viride* glucanase [78]. Imai et al. (1977) [132] produced mutanase by culturing *Streptomyces* KI-8 on (1→3)- α -D-glucan isolated from dried fruiting bodies of *Lentinus edodes*. A cell wall preparation of *Schizophyllum commune* or *Botrytis cinerea* was used as a (1→3)- α -glucanase inducer in *Bacillus circulans* KA-304 [31,32] and in *Trichoderma asperellum*, respectively [33]. The fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* are a particularly good source of the inducer for fungal and bacterial mutanases [34,42]. This basidiomycetous fungus grows worldwide on dead or weakened trees, producing very large, edible fruiting bodies and can be readily cultivated on a large scale [35]. A relatively high amount of (1→3)- α -D-glucan in the cell wall material of the fungus (up to 80%, which is several times more than other fungi) [3] can make the production of mutanases profitable.

6.3. (1→3)- α -D-Glucans as a Prebiotic

Intestinal microflora affects overall health, including the risk of cancer, so it is important for humans to maintain a balance of intestinal flora. For this reason, food and new probiotics are sought, which have a positive effect on intestinal flora [36,133]. It has been reported that fungal polysaccharides have prebiotic properties. They stimulate growth of *Lactobacillus* more strongly than the popular inulin and are also resistant to gastric juices (remaining more than 90% undigested) [36]. Nowak et al. studied polysaccharides isolated from 53 species of Polish mushrooms, and the results indicate that these compounds are a substrate for growth of the reference strain *L. acidophilus* and two strains of *L. rhamnosus* [36]. Synytsya et al. (2009) studied the prebiotic properties of various extracts of *P. ostreatus* and *P. eryngii* mushrooms, including alkali-soluble extracts containing (1→3)- α -D-glucans. The extracts were tested on nine probiotic strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus*. In most cases, the fungal extracts stimulated the growth of probiotic bacteria, and the intensity of growth depended on the type of the extract used. In general, the extract from *P. eryngii* had better prebiotic properties. Studies show that (1→3)- α -D-glucans are prebiotic compounds and can stimulate the growth of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* bacteria [84].

6.4. (1→3)- α -D-Glucans as a Support for Enzyme Immobilization

The presence of free hydroxyl groups in the structure of α -glucans means they have the ability to form bonds with various molecules, and this property of polysaccharides is used for the immobilization of enzymes [134]. Immobilization is a common treatment to stabilize enzymes, and it is based on the high affinity between the ligand and biomolecule [135]. This process protects the enzymes against denaturation [136], which makes them cheaper and more stable during use and storage in comparison to the native enzyme [137]. Most fungi cell walls have α -glucans (especially *Laetiporus sulphureus*) [13], and they can be easy to obtain. For this reason, these polymers may be successfully used to support enzymes, and studies have confirmed this. Wang et al. (2006) report that α -glucan from *Penicillium chrysogenum* is highly effective for the immobilization of lipase from *Candida sp.* The results show increased stability during storage and improved thermal stability of immobilized lipase, although the enzyme immobilized at the same time had a slightly lower specific activity than the free enzyme (down 4.1%). According to the authors, these mobilized enzymes may be effectively used as a biocatalyst [134].

7. Sorption Properties of (1→3)- α -D-Glucans

The ability of fungi to bind metals has been known for a long time. Until now, research has focused on the content of metals in the whole fruiting bodies and has not considered a specific component responsible for sorption capacity [138–140]. It is now known that (1→3)- α -D-glucans have the ability to bind metals thus constituting a structural component responsible for the accumulation of elements

in fungi [37,38]. In nature, there are two mechanisms by which fungi accumulate heavy metals: passive uptake (biosorption) and active uptake. In the former, heavy metals can be captured in the cellular structure and then biosorbed onto binding sites. In addition, this process is energy independent. The mechanisms of biosorption are generally based on physicochemical interactions between the metal ions and functional groups present on the cell surface, such as electrostatic interactions, ion exchange, and metal ion chelation or complexation [141]. Most literature defines the mechanism of metal uptake by viable cells as a two-phase process—an initial rapid stage of biosorption, followed by slower active uptake [142–144]. Humans have used the ability of fungi to bind metals through bioremediation, a process which uses biological material for purification of the environment, targeting various types of pollution (organic and inorganic pollution) [145–147]. By using fungal material as a sorbent, heavy metals can be removed (e.g., from industrial wastewater), and, at the same time, waste can be managed. In the sorption process, it is important to choose the sorbent and external conditions, such as pH, temperature and process time. Studies have been conducted on many (1→3)- α -D-glucans isolated from different species of fungi, and these indicate the most effective sorbent to be (1→3)- α -D-glucans from *Boletus edulis* and *Lentinus edodes* [37]. The sorption abilities of these polymers result from the developed and porous surface of glucan and a large number of functional groups on the surface, which contain oxygen. An interesting result of the research is the correlation between low crystallinity of studied polysaccharides and good sorption properties [37,38].

8. Conclusions

This review complements and systematizes existing knowledge of (1→3)- α -D-glucans, especially in terms of their application and function. (1→3)- α -glucans are glucose polymers with 1,3- glycosidic bonds, but 1,4- and 1,6-bonds can also be found in small amounts. Depending on the species of fungus, the molecular weight of α -glucan ranges from several to 850 kDa, as does the degree of polymerization, which ranges from 60 to 3500. Several methods of α -glucan isolation are reported in the literature, but these are generally based on separately water-soluble fractions and on preparation of alkaline-soluble (1→3)- α -glucans. (1→3)- α -glucans can be an inducer of (1→3)- α -glucanases, which can be used in the cleaning of teeth through decomposition of dental plaque mutans. Due to their structure, α -glucans free hydroxyl groups are capable of immobilizing enzymes, giving them more stability and reducing susceptibility to denaturation. These polymers potentiate immune responses and have prebiotic properties. However, α -glucans also have a negative effect. For example, they are involved in infection of plants by fungi and can be responsible for the pathogenicity of *Aspergillus fumigatus*.

Author Contributions: Conceptualization: K.Z., A.W. (Adrian Wiater), A.W. (Adam Waško) and A.B.; investigation: A.W. (Adrian Wiater), M.P., R.P., and J.J.-Ś.; preparation of the first draft: K.Z., A.W. (Adrian Wiater), A.W. (Adam Waško), M.P., R.P., J.J.-Ś and A.B.; visualization: K.Z. and A.W. (Adrian Wiater).

Funding: This research received no external funding.

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

References

1. Synytsya, A.; Novak, M. Structural analysis of glucans. *Ann. Transl. Med.* **2014**, *2*, 17. [CrossRef] [PubMed]
2. Synytsya, A.; Novák, M. Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 792–809. [CrossRef] [PubMed]
3. Grün, C.H. Structure and Biosynthesis of Fungal α -Glucans. Ph.D. Thesis, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands, 2003.
4. Wiater, A.; Pleszczyńska, M.; Szczodrak, J.; Próchniak, K. α -(1→3)-Glukany odciany komórkowej żółciaka siarkowego—*Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill—izolacja, charakterystyka i zastosowanie do indukcji syntezy. *Biotechnologia* **2008**, *2*, 174–189.
5. Erwig, L.P.; Gow, N.A.R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 163–176. [CrossRef]

6. Beauvais, A.; Fontaine, T.; Aïmanianda, V.; Latgé, J.P. Aspergillus cell wall and biofilm. *Mycopathologia* **2014**, *178*, 371–377. [CrossRef]
7. Choma, A.; Wiater, A.; Komanięcka, I.; Paduch, R.; Pleszczyńska, M.; Szczodrak, J. Chemical characterization of a water insoluble (1→3)- α -D-glucan from an alkaline extract of *Aspergillus wentii*. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *91*, 603–608. [CrossRef]
8. Fujikawa, T.; Kuga, Y.; Yano, S.; Yoshimi, A.; Tachiki, T.; Abe, K.; Nishimura, M. Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Mol. Microbiol.* **2009**, *73*, 553–570. [CrossRef]
9. Miyazaki, T.; Yamada, M.; Ohno, T. Isolation and Structure of α -1, 3-Linked Glucan from the Hyphal Wall of *Phytophthora infestans*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1974**, *22*, 1666–1669. [CrossRef]
10. Rappleye, C.A.; Eissenberg, L.G.; Goldman, W.E. Histoplasma capsulatum α -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1366–1370. [CrossRef]
11. Reese, A.J.; Yoneda, A.; Breger, J.A.; Beauvais, A.; Liu, H.; Griffith, C.L.; Bose, I.; Kim, M.J.; Skau, C.; Yang, S.; et al. Loss of cell wall alpha (1–3) glucan affects *Cryptococcus neoformans* from ultrastructure to virulence. *Mol. Microbiol.* **2007**, *63*, 1385–1398. [CrossRef]
12. Jelsma, J.; Kreger, D.R. Observations on the cell-wall compositions of the bracket fungi *Laetiporus sulphureus* and *Piptoporus betulinus*. *Arch. Microbiol.* **1978**, *119*, 249–255. [CrossRef]
13. Jelsma, J.; Kreger, D.R. Polymorphism in crystalline (1→3)- α -D-glucan from fungal cell-walls. *Carbohydr. Res.* **1979**, *71*, 51–64. [CrossRef]
14. Bobbitt, T.F.; Nordin, J.H.; Roux, M.; Revol, J.F.; Marchessault, R.H. Distribution and conformation of crystalline nigeran in hyphal walls of *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori*. *J. Bacteriol.* **1977**, *132*, 691–703. [PubMed]
15. Kanetsuna, F.; Carbonell, L.M.; Gil, F.; Azuma, I. Chemical and ultrastructural studies on the cell walls of the yeastlike and mycelial forms of *Histoplasma capsulatum*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* **1974**, *54*, 1–13. [CrossRef]
16. Wiater, A.; Paduch, R.; Choma, A.; Sylwia, S.; Pleszczyńska, M.; Tomczyk, M.; Locatelli, M.; Janusz, S. (1→3)- α -D-Glucans from aspergillus spp.: Structural characterization and biological study on their carboxymethylated derivatives. *Curr. Drug Targets* **2015**, *16*, 1488–1494. [CrossRef]
17. Bhanja, S.K.; Rout, D.; Patra, P.; Sen, I.K.; Nandan, C.K.; Islam, S.S. Water-insoluble glucans from the edible fungus *Ramaria botrytis*. *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre* **2014**, *3*, 52–58. [CrossRef]
18. Osieńska-Jaroszuk, M.; Wiater, A.; Choma, A.; Pleszczyńska, M.; Jaszek, M.; Janusz, G.; Skowronek, M.; Szczodrak, J. (1→3)- α -D-Glucan from fruiting body and mycelium of *cerrena unicolor* (Bull.) murrill: Structural characterization and use as a novel inducer of mutanase. *Int. J. Polym. Sci.* **2017**, *2017*, 1–9. [CrossRef]
19. Wiater, A.; Paduch, R.; Choma, A.; Pleszczyńska, M.; Siwulski, M.; Dominik, J.; Janusz, G.; Tomczyk, M.; Szczodrak, J. Biological study on carboxymethylated (1→3)- α -D-glucans from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 1014–1023. [CrossRef]
20. Zhang, P.; Zhang, L.; Cheng, S. Solution properties of an α -(1→3)-D-glucan from *Lentinus edodes* and its sulfated derivatives. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 155–160. [CrossRef]
21. Zhang, P.; Zhang, L.; Cheng, S. Effects of urea and sodium hydroxide on the molecular weight and conformation of α -(1→3)-D-glucan from *Lentinusedodes* in aqueous solution. *Carbohydr. Res.* **2000**, *327*, 431–438. [CrossRef]
22. Wiater, A.; Paduch, R.; Pleszczyńska, M.; Próchniak, K.; Choma, A.; Kandefer-Szerszeń, M.; Szczodrak, J. α -(1→3)-D-Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. *Biotechnol. Lett.* **2011**, *33*, 787–795. [CrossRef] [PubMed]
23. Wang, T.; Deng, L.; Li, S.; Tan, T. Structural characterization of a water-insoluble (1→3)- α -D-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum*. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *67*, 133–137. [CrossRef]
24. Olennikov, D.N.; Agafonova, S.V.; Rokhin, A.V.; Penzina, T.A.; Borovskii, G.B. Branched glucan from the fruiting bodies of *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr) Karst. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2012**, *48*, 65–70. [CrossRef]
25. Wiater, A.; Paduch, R.; Próchniak, K.; Pleszczyńska, M.; Siwulski, M.; Białas, W.; Szczodrak, J. Assessing biological activity of carboxymethylated derivatives of α -(1→3)-glucans isolated from fruiting bodies of cultivated *pleurotus* species. *Żywnosc. Nauka. Technol. Jakosc/Food Sci. Technol. Qual.* **2015**, *1*, 193–206. [CrossRef]
26. Wiater, A.; Pleszczyńska, M.; Szczodrak, J.A. Enzymy rozkładające α -(1-3)-glukany. Część I-Źródła mikrobiologiczne, produkcja, właściwości, genetyka. *Biotechnologia* **2006**, *2*, 206–220.

27. Grün, C.H. The structure of cell wall α -glucan from fission yeast. *Glycobiology* **2005**, *15*, 245–257. [CrossRef]
28. Hochstenbach, F.; Klis, F.M.; Van den Ende, H.; Van Donselaar, E.; Peters, P.J.; Klausner, R.D. Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9161–9166. [CrossRef]
29. Yoshimi, A.; Sano, M.; Inaba, A.; Kokubun, Y.; Fujioka, T.; Mizutani, O.; Hagiwara, D.; Fujikawa, T.; Nishimura, M.; Yano, S.; et al. Functional analysis of the α -1,3-glucan synthase genes *agsa* and *agsb* in *aspergillus nidulans*: *Agsb* is the major α -1,3-glucan synthase in this fungus. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54893. [CrossRef]
30. Yoshimi, A.; Miyazawa, K.; Abe, K. Function and biosynthesis of cell wall α -1,3-glucan in fungi. *J. Fungi* **2017**, *3*, 63. [CrossRef]
31. Yano, S.; Yamamoto, S.; Toge, T.; Wakayama, M.; Tachiki, T. Occurrence of a specific protein in basidiomycetelytic enzyme preparation produced by *Bacillus circulans* KA-304 inductively with a cell-wall preparation of *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 1976–1982. [CrossRef]
32. Yano, S.; Wakayama, M.; Tachiki, T. Cloning and expression of an α -1,3-glucanase gene from *Bacillus circulans* KA-304: The enzyme participates in protoplast formation of *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 1754–1763. [CrossRef] [PubMed]
33. Sanz, L.; Montero, M.; Redondo, J.; Llobell, A.; Monte, E. Expression of an α -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *FEBS J.* **2005**, *272*, 493–499. [CrossRef] [PubMed]
34. Pleszczyńska, M.; Wiater, A.; Szczodrak, J. Mutanase from *Paenibacillus* sp. MP-1 produced inductively by fungal α -1,3-glucan and its potential for the degradation of mutan and *Streptococcus mutans* biofilm. *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 1699–1704. [CrossRef]
35. Pleszczyńska, M.; Wiater, A.; Siwulski, M.; Szczodrak, J. Successful large-scale production of fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill on an artificial substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *29*, 753–758. [CrossRef] [PubMed]
36. Nowak, R.; Nowacka-Jechalke, N.; Juda, M.; Malm, A. The preliminary study of prebiotic potential of Polish wild mushroom polysaccharides: The stimulation effect on *Lactobacillus* strains growth. *Eur. J. Nutr.* **2018**, *57*, 1511–1521. [CrossRef] [PubMed]
37. Nowak, K.; Wiater, A.; Choma, A.; Wiącek, D.; Bieganowski, A.; Siwulski, M.; Waśko, A. Fungal (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans as a new kind of biosorbent for heavy metals. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**. [CrossRef] [PubMed]
38. Choma, A.; Nowak, K.; Komaniecka, I.; Waśko, A.; Pleszczyńska, M.; Siwulski, M.; Wiater, A. Chemical characterization of alkali-soluble polysaccharides isolated from a *Boletus edulis* (Bull.) fruiting body and their potential for heavy metal biosorption. *Food Chem.* **2018**, *266*, 329–334. [CrossRef]
39. Hasegawa, S.; Nordin, J.H.; Kirkwood, S. Enzymes that hydrolyze fungal cell wall polysaccharides. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 5460–5470.
40. Kiho, T.; Yoshida, I.; Katsuragawa, M.; Sakushima, M.; Usui, S.; Ukai, S. Polysaccharides in fungi. XXXIV. A polysaccharide from the fruiting bodies of *Amanita muscaria* and the antitumor activity of its carboxymethylated product. *Biol. Pharm. Bull.* **1994**, *17*, 1460–1462. [CrossRef]
41. Mizuno, K.; Awazu, N.; Tachiki, T. Purification and some properties of *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside-hydrolyzing enzymes in culture filtrate of *Bacillus circulans* KA-304 grown on cell-wall preparation of *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 39–43. [CrossRef]
42. Wiater, A.; Szczodrak, J.; Pleszczyńska, M. Mutanase induction in *Trichoderma harzianum* by cell wall of *Laetiporus sulphureus* and its application for mutan removal from oral biofilms. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *18*, 1335–1341. [PubMed]
43. Cardemil, L.; Pincheira, G. Characterization of the carbohydrate component of fraction I in the *Neurospora crassa* cell wall. *J. Bacteriol.* **1979**, *137*, 1067–1072. [PubMed]
44. Takeda, T.; Nishikawa, Y.; Shibata, S. A new α -glucan from the Lichen *Parmelia caperata* (L.) Ach. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1970**, *18*, 1074–1075. [CrossRef]
45. Ogawa, K.; Misaki, A.; Oka, S.; Okamura, K. X-Ray diffraction data for (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan. *Carbohydr. Res.* **1979**, *75*, C13–C16. [CrossRef]
46. Zhang, L.; Chen, L.; Xu, X.; Lin, Y.; Cheung, P.C.K.; Kennedy, J.F. Comparison on chain stiffness of a water-insoluble (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan isolated from *Poria cocos* mycelia and its sulfated derivative. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *59*, 257–263. [CrossRef]

47. Chen, J.; Zhang, L.; Nakamura, Y.; Norisuye, T. Viscosity behavior and chain conformation of a (1→3)- α -glucan from *Ganoderma lucidum*. *Polym. Bull.* **1998**, *41*, 471–478. [CrossRef]
48. Chen, J.; Zhou, J.; Zhang, L.; Nakamura, Y.; Norisuye, T. Chemical structure of the water-insoluble polysaccharide isolated from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. *Polym. J.* **1998**, *30*, 838–842. [CrossRef]
49. Zonneveld, B. Morphogenesis in *Aspergillus nidulans* the significance of α -1,3-glucan of the cell wall and α -1,3-glucanase for cleistothecium development. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* **1972**, *273*, 174–187. [CrossRef]
50. Zonneveld, B.J.M. Inhibitory effect of 2-deoxyglucose on cell wall α -1,3-glucan synthesis and cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* **1973**, *34*, 1–8. [CrossRef]
51. Kiho, T.; Yoshida, I.; Nagai, K.; Ukai, S.; Hara, C. (1→3)- α -D-glucan from an alkaline extract of *Agrocybe cylindracea*, and antitumor activity of its O-(carboxymethyl)ated derivatives. *Carbohydr. Res.* **1989**, *189*, 273–279. [CrossRef]
52. Zhang, L.; Zhang, M.; Chen, J.; Zhang, F. Solution properties of antitumor carboxymethylated derivatives of α -(1→3)-D-Glucan from *Ganoderma lucidum*. *J. Polym. Sci.* **2001**, *19*, 283–289.
53. Zhang, L.; Zhang, M.; Zhou, Q.; Chen, J.; Zeng, F. Solution Properties of Antitumor Sulfated Derivative of α -(1→3)-D-Glucan from *Ganoderma lucidum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 2172–2178. [CrossRef] [PubMed]
54. Bao, X.; Duan, J.; Fang, X.; Fang, J. Chemical modifications of the (1→3)- α -D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity. *Carbohydr. Res.* **2001**, *336*, 127–140. [CrossRef]
55. Puanglek, S.; Kimura, S.; Enomoto-Rogers, Y.; Kabe, T.; Yoshida, M.; Wada, M.; Iwata, T. In vitro synthesis of linear α -1,3-glucan and chemical modification to ester derivatives exhibiting outstanding thermal properties. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30479. [CrossRef]
56. Miyazawa, K.; Yoshimi, A.; Zhang, S.; Sano, M.; Nakayama, M.; Gomi, K.; Abe, K. Increased enzyme production under liquid culture conditions in the industrial fungus *Aspergillus oryzae* by disruption of the genes encoding cell wall α -1,3-glucan synthase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, *80*, 1853–1863. [CrossRef]
57. Beauvais, A.; Maubon, D.; Park, S.; Morelle, W.; Tanguy, M.; Huerre, M.; Perlin, D.S.; Latge, J.P. Two (1-3)-Glucan Synthases with Different Functions in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1531–1538. [CrossRef]
58. Beauvais, A.; Bozza, S.; Knemeyer, O.; Formosa, C.; Balloy, V.; Henry, C.; Roberson, R.W.; Dague, E.; Chignard, M.; Brakhage, A.A.; et al. Deletion of the α -(1,3)-glucan synthase genes induces a restructuring of the conidial cell wall responsible for the avirulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003716. [CrossRef]
59. Fujikawa, T.; Sakaguchi, A.; Nishizawa, Y.; Kouzai, Y.; Minami, E.; Yano, S.; Koga, H.; Meshi, T.; Nishimura, M. Surface α -1,3-Glucan Facilitates Fungal Stealth Infection by Interfering with Innate Immunity in Plants. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002882. [CrossRef]
60. Fontaine, T.; Beauvais, A.; Loussert, C.; Thevenard, B.; Fulgsang, C.C.; Ohno, N.; Clavaud, C.; Prevost, M.-C.; Latgé, J.-P. Cell wall α 1-3glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* **2010**, *47*, 707–712. [CrossRef]
61. Wiater, A.; Choma, A.; Szczodrak, J. Insoluble glucans synthesized by cariogenic streptococci: A structural study. *J. Basic Microbiol.* **1999**, *39*, 265–273. [CrossRef]
62. Wiater, A.; Szczodrak, J.; Pleszczyńska, M. Optimization of conditions for the efficient production of mutan in streptococcal cultures and post-culture liquids. *Acta Biol. Hung.* **2005**, *56*, 137–150. [CrossRef] [PubMed]
63. Schilling, K.M.; Bowen, W.H. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 284–295. [PubMed]
64. Aires, C.P.; Tenuta, L.M.; Carbonero, E.R.; Sasaki, G.L.; Iacomini, M.; Cury, J.A. Structural characterization of exopolysaccharides from biofilm of a cariogenic streptococci. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *84*, 1215–1220. [CrossRef]
65. Davis, H.M.; Hines, H.B.; Edwards, J.R. Structural elucidation of a water-insoluble glucan produced by a cariogenic oral Streptococcus. *Carbohydr. Res.* **1986**, *156*, 69–77. [CrossRef]
66. Hotz, P.; Guggenheim, B.; Schmid, R. Carbohydrates in pooled dental plaque. *Caries Res.* **1972**, *6*, 103–121. [CrossRef]

67. Stuelp-Campelo, P.M.; De Oliveira, M.B.M.; Leão, A.M.A.C.; Carbonero, E.R.; Gorin, P.A.J.; Iacomini, M. Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus ramalina celastris on macrophage activity. *Int. Immunopharmacol.* **2002**, *2*, 691–698. [CrossRef]
68. Huang, Q.; Zhang, L.; Cheung, P.C.K.; Tan, X. Evaluation of sulfated α -glucans from *Poria cocos* mycelia as potential antitumor agent. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *64*, 337–344. [CrossRef]
69. Wasser, S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *60*, 258–274. [CrossRef]
70. Masuda, Y.; Nakayama, Y.; Tanaka, A.; Naito, K.; Konishi, M. Antitumor activity of orally administered maitake α -glucan by stimulating antitumor immune response in murine tumor. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–15. [CrossRef]
71. Zhang, M.; Cui, S.W.; Cheung, P.C.K.; Wang, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, 4–19. [CrossRef]
72. Lavi, I.; Levinson, D.; Peri, I.; Tekoah, Y.; Hadar, Y.; Schwartz, B. Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 1977–1990. [CrossRef] [PubMed]
73. Stephen-Victor, E.; Karnam, A.; Fontaine, T.; Beauvais, A.; Das, M.; Hegde, P.; Prakhar, P.; Holla, S.; Balaji, K.N.; Kaveri, S.V.; et al. *Aspergillus fumigatus* cell wall α -(1,3)-glucan stimulates regulatory t-cell polarization by inducing PD-L1 expression on human dendritic cells. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, 1281–1294. [CrossRef] [PubMed]
74. Kakutani, R.; Adachi, Y.; Kajiura, H.; Takata, H.; Kuriki, T.; Ohno, N. Relationship between structure and immunostimulating activity of enzymatically synthesized glycogen. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 2371–2379. [CrossRef] [PubMed]
75. Tabarsa, M.; Shin, I.-S.; Lee, J.H.; Surayot, U.; Park, W.; You, S. An immune-enhancing water-soluble α -glucan from *Chlorella vulgaris* and structural characteristics. *Food Sci. Biotechnol.* **2015**, *24*, 1933–1941. [CrossRef]
76. Pleszczyńska, M.; Wiater, A.; Janczarek, M.; Szczodrak, J. (1 \rightarrow 3)- α -D-Glucan hydrolases in dental biofilm prevention and control: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *79*, 761–778. [CrossRef]
77. Meyer, M.T.; Phaff, H.J. Purification and properties of (1,3)- α -glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. *Microbiol.* **1980**, *118*, 197–208. [CrossRef]
78. Hasegawa, S.; Kirkwood, S.; Nordin, J.H. An alpha-1,3-glucanase from a fungal source. *Chem. Ind.* **1966**, *25*, 1033. [PubMed]
79. Maubon, D.; Park, S.; Tanguy, M.; Huerre, M.; Schmitt, C.; Prévost, M.C.; Perlin, D.S.; Latgé, J.P.; Beauvais, A. AGS3, an α -(1-3)glucan synthase gene family member of *Aspergillus fumigatus*, modulates mycelium growth in the lung of experimentally infected mice. *Fungal Genet. Biol.* **2006**, *43*, 366–375. [CrossRef]
80. Ghazaei, C. Molecular Insights into Pathogenesis and Infection with *Aspergillus fumigatus*. *Malaysian, J. Med. Sci.* **2017**, *24*, 10–20. [CrossRef]
81. Latgé, J.-P. *Aspergillus fumigatus*, a saprotrophic pathogenic fungus. *Mycologist* **2003**, *17*, 56–61. [CrossRef]
82. Jahn, B.; Langfelder, K.; Schneider, U.; Schindel, C.; Brakhage, A.A. PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. *Cell. Microbiol.* **2002**, *4*, 793–803. [CrossRef] [PubMed]
83. Komarova, B.S.; Orekhova, M.V.; Tsvetkov, Y.E.; Beau, R.; Aimanianda, V.; Latgé, J.-P.; Nifantiev, N.E. Synthesis of a pentasaccharide and neoglycoconjugates related to fungal α -(1 \rightarrow 3)-glucan and their use in the generation of antibodies to trace *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Chem. A Eur. J.* **2015**, *21*, 1029–1035. [CrossRef] [PubMed]
84. Synytsya, A.; Míčková, K.; Synytsya, A.; Jablonský, I.; Spěváček, J.; Erban, V.; Kovářiková, E.; Čopíková, J. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76*, 548–556. [CrossRef]
85. Heath, M.C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2000**, *3*, 315–319. [CrossRef]
86. Partida-Martínez, L.P.; Heil, M. The microbe-free plant: Fact or artifact? *Front. Plant. Sci.* **2011**, *2*, 1–16. [CrossRef]
87. Knogge, W. Plant-Fungal interactions and plant disease. In *Subcellular Biochemistry*, 1st ed.; Biswas, B.B., Das, H.K., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1998; Volume 29, pp. 215–251. [CrossRef]

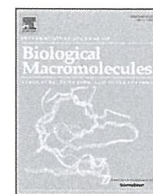
88. Zeilinger, S.; Gupta, V.K.; Dahms, T.E.S.; Silva, R.N.; Singh, H.B.; Upadhyay, R.S.; Gomes, E.V.; Tsui, C.K.-M.; Nayak, S.C. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40*, 182–207. [CrossRef]
89. Schulz, B.; Römmer, A.-K.; Dammann, U.; Aust, H.-J.; Strack, D. The endophyte-host interaction: A balanced antagonism? *Mycol. Res.* **1999**, *103*, 1275–1283. [CrossRef]
90. Parniske, M. Intracellular accommodation of microbes by plants: A common developmental program for symbiosis and disease? *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2000**, *3*, 320–328. [CrossRef]
91. Schulze-Lefert, P. Knocking on the heaven's wall: Pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2004**, *7*, 377–383. [CrossRef]
92. Schulz, B.; Boyle, C. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* **2005**, *109*, 661–686. [CrossRef]
93. Grant, M.R.; Jones, J.D.G. Hormone (Dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* **2009**, *324*, 750–752. [CrossRef] [PubMed]
94. Hahn, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1996**, *34*, 387–412. [CrossRef] [PubMed]
95. Ebel, J.; Mithöfer, A. Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **1998**, *206*, 335–348. [CrossRef]
96. Montesano, M.; Brader, G.; Palva, E.T. Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. *Mol. Plant. Pathol.* **2003**, *4*, 73–79. [CrossRef] [PubMed]
97. Brown, G.D.; Gordon, S. Immune recognition of fungal β -glucans. *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 471–479. [CrossRef] [PubMed]
98. Poulain, D.; Jouault, T. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: Elements for a decisive crosstalk. *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 342–349. [CrossRef] [PubMed]
99. Theis, T.; Stahl, U. Antifungal proteins: Targets, mechanisms and prospective applications. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 437–455. [CrossRef]
100. Altenbach, D.; Robatzek, S. Pattern Recognition Receptors: From the Cell Surface to Intracellular Dynamics. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **2007**, *20*, 1031–1039. [CrossRef]
101. De Wit, P.J.G.M. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 2726–2732. [CrossRef]
102. Felix, G.; Regenass, M.; Boller, T. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: Induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant. J.* **1993**, *4*, 307–316. [CrossRef]
103. Anderson, J.P.; Gleason, C.A.; Foley, R.C.; Thrall, P.H.; Burdon, J.B.; Singh, K.B. Plants versus pathogens: An evolutionary arms race. *Funct. Plant. Biol.* **2010**, *37*, 499. [CrossRef] [PubMed]
104. Thakur, M.; Sohal, B.S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *ISRN Biochem.* **2013**, *2013*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
105. Klarzynski, O.; Plesse, B.; Joubert, J.-M.; Yvin, J.-C.; Kopp, M.; Kloareg, B.; Fritig, B. Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol.* **2000**, *124*, 1027–1038. [CrossRef] [PubMed]
106. Shibuya, N.; Minami, E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **2001**, *59*, 223–233. [CrossRef]
107. De Ascensao, A.R.F.D.; Dubery, I.A. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 679–686. [CrossRef]
108. Miyazawa, K.; Yoshimi, A.; Kasahara, S.; Sugahara, A.; Koizumi, A.; Yano, S.; Kimura, S.; Iwata, T.; Sano, M.; Abe, K. Molecular mass and localization of α -1,3-glucan in cell wall control the degree of hyphal aggregation in liquid culture of *aspergillus nidulans*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2623. [CrossRef]
109. Schoffemeer, E.A.M.; Klis, F.M.; Sietsma, J.H.; Cornelissen, B.J.C. The cell wall of *fusarium oxysporum*. *Fungal Genet. Biol.* **1999**, *27*, 275–282. [CrossRef]
110. Wolski, E.A.; Daleo, G.R.; Andreu, A.B. Induction of pathogenesis related proteins on potato sprouts by an α -1,3-glucan from cell wall of binucleate non-pathogenic *Rhizoctonia* sp isolate. *Phytopathology* **2004**, *94*, S111. [CrossRef]
111. Wolski, E.A.; Lima, C.; Agusti, R.; Daleo, G.R.; Andreu, A.B.; De Lederkremer, R.M. An α -glucan elicitor from the cell wall of a biocontrol binucleate *Rhizoctonia* isolate. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 619–627. [CrossRef]

112. Wolski, E.; Maldonado, S.; Daleo, G.; Andreu, A. Cell wall α -1,3-glucans from a biocontrol isolate of *Rhizoctonia*: Immunocytolocalization and relationship with α -glucanase activity from potato sprouts. *Mycol. Res.* **2007**, *111*, 976–984. [CrossRef]
113. Wolski, E.A.; Maldonado, S.; Daleo, G.R.; Andreu, A.B. A novel α -1,3-glucan elicits plant defense responses in potato and induces protection against *Rhizoctonia solani* AG-3 and *Fusarium solani* f. sp. *eumartii*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **2006**, *69*, 93–103. [CrossRef]
114. Snarr, B.; Qureshi, S.; Sheppard, D. Immune recognition of fungal polysaccharides. *J. Fungi* **2017**, *3*, 47. [CrossRef] [PubMed]
115. Hamer, J.E.; Talbot, N.J. Infection-related development in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, *1*, 693–697. [CrossRef]
116. Otaka, J.; Seo, S.; Nishimura, M. Lutein, a natural carotenoid, induces α -1,3-glucan accumulation on the cell wall surface of fungal plant pathogens. *Molecules* **2016**, *21*, 980. [CrossRef] [PubMed]
117. Geoghegan, I.; Steinberg, G.; Gurr, S. The role of the fungal cell wall in the infection of plants. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 957–967. [CrossRef] [PubMed]
118. Henry, C.; Latgé, J.P.; Beauvais, A. α 1,3 glucans are dispensable in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **2012**, *11*, 26–29. [CrossRef]
119. Dute, R.R.; Weete, J.D.; Rushing, A.E. Ultrastructure of dormant and germinating conidia of *Aspergillus Ochraceus*. *Mycologia* **1989**, *81*, 772–782. [CrossRef]
120. Gerin, P.A.; Dufrene, Y.; Bellon-Fontaine, M.-N.; Asther, M.; Rouxhetl, P.G. Surface properties of the conidiospores of *phanerochaete chrysosporium* and their relevance to pellet formation. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 5135–5144. [CrossRef]
121. Grimm, L.H.; Kelly, S.; Hengstler, J.; Göbel, A.; Krull, R.; Hempel, D.C. Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *87*, 213–218. [CrossRef]
122. Hobot, J.A.; Gull, K. Changes in the organisation of surface rodlets during germination of *Syncephalastrum racemosum* sporangiospores. *Protoplasma* **1981**, *107*, 339–343. [CrossRef]
123. Tronchin, G.; Bouchara, J.P.; Ferron, M.; Larcher, G.; Chabasse, D. Cell surface properties of *Aspergillus fumigatus* conidia: Correlation between adherence, agglutination, and rearrangements of the cell wall. *Can. J. Microbiol.* **1995**, *41*, 714–721. [CrossRef] [PubMed]
124. Lo, T.C.-T.; Hsu, F.-M.; Chang, C.A.; Cheng, J.C.-H. Branched α -(1,4)-Glucans from *Lentinula edodes* (L10) in combination with radiation enhance cytotoxic effect on human lung adenocarcinoma through the toll-like receptor 4 mediated induction of THP-1 differentiation/activation. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 11997–12005. [CrossRef] [PubMed]
125. Koppada, R.; Norozian, F.M.; Torbati, D.; Kalomiris, S.; Ramachandran, C.; Totapally, B.R. Physiological effects of a novel immune stimulator drug, (1,4)- α -D-glucan, in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *105*, 217–221. [CrossRef] [PubMed]
126. Moreno-Mendieta, S.; Guillén, D.; Hernández-Pando, R.; Sánchez, S.; Rodríguez-Sanoja, R. Potential of glucans as vaccine adjuvants: A review of the α -glucans case. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *165*, 103–114. [CrossRef]
127. Jin, Y.; Zhang, L.; Tao, Y.; Zeng, C.; Chen, Y.; Cheung, P.C.K. Solution properties of a water-insoluble (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan isolated from *Poria cocos* mycelia. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *57*, 205–209. [CrossRef]
128. Zhang, P.; Zhang, L.; Cheng, S. Chemical structure and molecular weights of α -(1 \rightarrow 3)-glucan from *Lentinus edodes*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 1197–1202. [CrossRef]
129. Wei, H.; Scherer, M.; Singh, A.; Liese, R.; Fischer, R. *Aspergillus nidulans* α -1,3-glucanase (mutanase), mutA, is expressed during sexual development and mobilizes mutan. *Fungal Genet. Biol.* **2001**, *34*, 217–227. [CrossRef]
130. Dekker, N.; Speijer, D.; Grün, C.H.; van den Berg, M.; de Haan, A.; Hochstenbach, F. Role of the α -glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 3903–3914. [CrossRef]
131. Dekker, N.; van Rijssel, J.; Distel, B.; Hochstenbach, F. Role of the α -glucanase Agn2p in ascus-wall endolysis following sporulation in fission yeast. *Yeast* **2007**, *24*, 279–288. [CrossRef]
132. Imai, K.; Kikuta, T.; Kobayashi, M.; Matsuda, K. An α -1,3-glucanase from streptomyces sp. KI-8 production and purification. *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 1339–1346. [CrossRef]
133. Nosál'ová, V.; Bobek, P.; Cerná, S.; Galbavý, S.; Stvrtina, S. Effects of pleuran (beta-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus*) on experimental colitis in rats. *Physiol. Res.* **2001**, *50*, 575–581. [PubMed]

134. Wang, T.; Li, H.; Nie, K.; Tan, T. Immobilization of lipase on epoxy activated (1→3)- α -D-glucan isolated from *Penicillium chrysogenum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 2883–2888. [CrossRef] [PubMed]
135. Fishman, A.; Levy, I.; Cogan, U.; Shoseyov, O. Stabilization of horseradish peroxidase in aqueous-organic media by immobilization onto cellulose using a cellulose-binding-domain. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *18*, 121–131. [CrossRef]
136. Villalonga, R.; Villalonga, M.L.; Gómez, L. Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2000**, *10*, 483–490. [CrossRef]
137. Hertzberg, S.; Kvittingen, L.; Anthonsen, T.; Skjåk-Bræk, G. Alginate as immobilization matrix and stabilizing agent in a two-phase liquid system: Application in lipase-catalysed reactions. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 42–47. [CrossRef]
138. Falandysz, J.; Szymczyk, K.; Ichihashi, H.; Bielawski, L.; Gucia, M.; Frankowska, A.; Yamasaki, S.-I. ICP/MS and ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Poland. *Food Addit. Contam.* **2001**, *18*, 503–513. [CrossRef]
139. Stijve, T.; Besson, R. Mercury, cadmium, lead and selenium content of mushroom species belonging to the genus *Agaricus*. *Chemosphere* **1976**, *5*, 151–158. [CrossRef]
140. Falandysz, J.; Borovička, J. Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: Health benefits and risks. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 477–501. [CrossRef]
141. Wang, J.; Chen, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 195–226. [CrossRef]
142. Malik, A. Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* **2004**, *30*, 261–278. [CrossRef]
143. Garnham, G.; Codd, G.; Gadd, G. Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *37*, 270–276. [CrossRef]
144. Dönmez, G.; Aksu, Z. The effect of copper(II) ions on the growth and bioaccumulation properties of some yeasts. *Process. Biochem.* **1999**, *35*, 135–142. [CrossRef]
145. Vidali, M. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1163–1172. [CrossRef]
146. Megharaj, M.; Ramakrishnan, B.; Venkateswarlu, K.; Sethunathan, N.; Naidu, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ. Int.* **2011**, *37*, 1362–1375. [CrossRef] [PubMed]
147. Sardar, U.R.; Bhargavi, E.; Devi, I.; Bhunia, B.; Tiwari, O.N. Advances in exopolysaccharides based bioremediation of heavy metals in soil and water: A critical review. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *199*, 353–364. [CrossRef]



© 2019 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Fungal (1 → 3)- α -D-glucans as a new kind of biosorbent for heavy metals

Katarzyna Nowak^{a,*}, Adrian Wiater^b, Adam Choma^c, Dariusz Wiącek^a, Andrzej Bieganski^a, Marek Siwulski^d, Adam Waśko^e

^a Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland

^b Department of Industrial Microbiology, Institute of Microbiology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland

^c Department of Genetics and Microbiology, Institute of Microbiology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland

^d Department of Vegetable Crops, Poznań University of Life Sciences, Dąbrowskiego 159, 60-594 Poznań, Poland

^e Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2019

Received in revised form 26 June 2019

Accepted 4 July 2019

Available online 05 July 2019

Keywords:

Shiitake

Polysaccharide

(1 → 3)- α -D-glucans

Heavy metals

Biosorption

ABSTRACT

Although the fungal ability to bind heavy metals has been known for many years, it was not determined which component is responsible for this process. The aim of the study was to isolate (1 → 3)- α -D-glucans from various fungi, select the most efficient compound in the biosorption of heavy metals, and determine its characteristics. The best α -glucan for treatment of aqueous solutions from heavy metals (Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}) is the polymer isolated from Shiitake, especially its SH 37 variety. Using various techniques, it was confirmed that the studied polysaccharide consists mainly of glucose molecules (75.9%), i.e. glucose α -anomers linked by (1 → 3)-linkage (86%). The well-developed surface, low crystallinity, and the large number of -OH groups provide this polymer with good sorption properties. Probably, the main mechanism of metal uptake is metabolism-independent process that depends on the content and spatial structure of the glucans present in their cell wall.

© 2019 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Since 1907, there have been literature reports on the chemical composition and ability of fungi to accumulate metals [1]. However, credible results were achieved with the development of instrumental techniques and analytical methods only after 1970 [2–5]. The research on metal accumulation involved higher fungi [4,6] and filamentous fungi [7,8]. On the one hand, fungi contain magnesium, potassium, and selenium [6,9] which are essential elements required in the human diet. On the other hand, fungi accumulate toxic metals, e.g. cadmium, lead, and mercury [9].

The total global production of cultivated edible mushrooms exceeded 4×10^6 metric tons in 1991 and 6×10^6 t in 1997, while in 2009, it was estimated at 22×10^6 t [10–12]. In 2001–2002, the United States alone produced nearly $4 \cdot 10^6$ t of mushrooms [10]. *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus* spp., *Auricularia* spp., *Volvariella volvacea*, *Flammulina velutipes*, and *Tremella fuciformis* are the seven most important cultivated mushrooms. In China, the main emphasis is placed on *L. edodes* and *Pleurotus* spp., while *A. bisporus* occupies the fourth place among all cultivated mushrooms. Global trade in mushroom in 2013 was worth 63 billion US \$ [11]. Such a large production of mushrooms is associated with the generation of large quantities of totally untreated waste. However, they can be a valuable raw material for

further processing. For instance, some authors have stated that the mycelium or fruiting body (live or dead) and spent mushroom substrate (SMS) can be used for the preparation of an effective biosorbent of heavy metals [13,14].

In recent years, bioremediation and its various varieties is an increasingly popular method of removing heavy metals using biological material [15–17]. Extracellular polymeric substances can be used for this process, including β -1,3-glucan. These type of polymers are cheap, environmentally friendly and biodegradable materials [15]. These natural polymers can be used as a biosorbent due to the high carbon content, the availability of heavy metal binding sites through specific groups (hydroxyl groups in the case of polysaccharides), and the porous surface. The advantage of using fungal polysaccharide is the management of waste material from mushroom production, which is carried out on a significant scale, as described above. In addition, fungal glucans with good sorption properties are also insoluble in water; hence, they can be used as a sorbent in aqueous solutions. The disadvantage of this type of fungal sorbent is the low efficiency of α -glucan isolation from the fungal mass.

We propose a new biosorbent derived from biological waste as a source of (1 → 3)- α -D-glucans, which can be used for the biosorption of heavy metals from aqueous solutions. The high accumulation potential alkali-soluble fractions of α -glucans isolated from fungi are some of the advantages facilitating their application as new biosorbents. We screened (1 → 3)- α -D-glucans isolated from filamentous and higher fungi to assess their potential to remove metal ions: nickel, cadmium,

* Corresponding author.

E-mail address: k.nowak@ipan.lublin.pl (K. Nowak).

zinc, and lead from aqueous solutions. Based on these tests the glucan from *L. edodes*, in our opinion the best sorbent, was chosen and physico-chemically characterized.

2. Material and methods

2.1. Fungi and culture conditions

Four *Aspergillus* and two *Penicillium* species were used in the experiment, i.e. *A. awamori* DIM 3375 (Department of Industrial Microbiology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland), *A. nidulans* CIM 415 and *A. wentii* CIM 449 (Collection of Industrial Microorganisms, Warsaw, Poland), *A. oryzae* CBS 133.52 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands), *P. lanosum* DIM 110 and *P. notatum* DIM 102 (Department of Industrial Microbiology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland). The microorganisms were maintained on potato dextrose agar slants at 4 °C. The composition of the medium and the growth conditions were as described by Hasegawa et al. [18].

The fruiting bodies of *Boletus edulis* (Bull.) and *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. were harvested in the summer of 2011 in Poznań surroundings, Poland. The carpophores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst., *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler cv. "SH 37" (Department of Vegetable Crops of Poznań University of Life Sciences, Poland); "Sylvan 4080"; "Mycelia 3790", *Pleurotus citrinopileatus* Sing., *P. djamor* (Rumph. ex Fr.) Boedijn, *P. eryngii* (DC.) Quél., *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., and *P. precoce* (Fr.) Quél. were purchased from controlled cultivation carried out at the Department of Vegetable Crops of Poznań University of Life Sciences. Voucher specimens are deposited in the Department of Industrial Microbiology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland [18].

2.2. Isolation of the alkali-soluble polysaccharides from fungi

The cell wall was extracted according to the procedure described by Wiater et al. [19]. Table 1 shows the efficiencies of alkali-soluble polysaccharides isolation from individual fungal species.

Table 1
Biosorption capacity of fungi α -(1 \rightarrow 3)-glucans to heavy metals.^a

Species	Type	α -(1 \rightarrow 3)-glucan (dry matter) (%)	MRE* (%)				MRE* ($\mu\text{g h}^{-1} \text{mg}^{-1}$)			
			Ni ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺	Ni ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺
Vegetative mycelium										
<i>Aspergillus awamori</i>		6.0	3.8	4.8	3.6	8.2	1.5	1.9	1.8	2.9
<i>Aspergillus nidulans</i>		9.4	6.8	14	14	37	2.7	5.5	6.8	14
<i>Aspergillus oryzae</i>		10	5.0	13	16	39	2.0	5.0	7.9	14
<i>Aspergillus wentii</i>		6.5	5.1	9.2	10	28	2.0	3.7	4.9	9.9
<i>Penicillium lanosum</i>		6.9	15	20	19	38	6.2	8.2	9.6	14
<i>Penicillium notatum</i>		9.0	7.8	7.6	3.8	13	2.7	2.9	1.8	4.6
Fruiting bodies										
<i>Boletus edulis</i>		2.2	40	79	46	96	18	33	18	36
<i>Ganoderma lucidum</i>		6.1	23	45	23	90	9.4	19	8.8	33
<i>Hericium erinaceus</i>		5.0	5.5	15	5.0	28	2.2	6.3	1.9	10
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>		2.7	2.7	10	4.8	21	1.1	4.3	1.6	7.8
<i>Pleurotus djamor</i>		3.3	1.9	13	4.3	24	1.1	5.3	1.6	8.8
<i>Pleurotus eryngii</i>		2.6	7.0	3.8	0	13	2.8	1.6	0	4.8
<i>Pleurotus ostreatus</i>		4.3	9.7	13	9.2	36	3.7	5.1	4.3	14
<i>Pleurotus precoce</i>		4.7	0	16	9.6	28	0	8.1	5.7	17
<i>Piptoporus betulinus</i>		8.0	27	11	29	91	11	4.5	12	34
<i>Lentinus edodes</i> (<i>Lentinula</i>)		9.0	22	38	23	72	8.8	16	8.4	27
<i>Lentinus edodes</i>	Mycelia 3790 A	–	11	24	4.2	51	9.2	18	3.1	35
	Mycelia 3790 B	–	11	22	9.2	51	8.4	17	6.8	37
	Sylvan 4080 A	–	8.9	18	5.0	49	7.4	15	3.9	34
	Sylvan 4080 B	–	13	27	15	54	11	21	11	37
	SH 37 A	–	13	25	14	50	9.9	19	9.9	33
	SH 37 B	–	13	23	12	48	10	18	0.30	34

^a MRE: Metal removal efficiency; A: waste type; B: consumption type.

2.3. Chemicals

Stock metal ion solutions of Ni(II), Cd(II), Zn(II), and Pb(II) ions (1000 mg·dm⁻³ each) were obtained by dissolution of the following salts: Ni(NO₃)₂·6H₂O, Cd(NO₃)₂·4H₂O, ZnSO₄·6H₂O, and Pb(NO₃)₂ (POCH, Gliwice, Poland), in redistilled water. A nitric acid (HNO₃ 36%) (POCH, Gliwice, Poland) and NaOH (Merck, Darmstadt, Germany) were used for adjustment of the pH of the solutions.

2.4. Sorption experiment

The sorption capacity of the studied (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans for Ni²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, and Pb²⁺ was determined using single metal systems at an initial pH 5 (regulated by NaOH and HNO₃). The initial concentrations of each of the studied ions were 100 mg·dm⁻³. 0.1 g of each glucan was mixed with 10 cm⁻³ solutions of the analysed heavy metals. The solutions were shaken (250 rpm) at room temperature (22 \pm 2 °C) for 24 h. Then, the solutions were centrifuged at a speed of 12·10³ min⁻¹ and the concentration of heavy metals were measured in the supernatant using an ICP-OES (Thermo Scientific iCAP Series 6500). All the experiments were carried out in three repetitions and mean values were used in the analysis of data.

2.5. Microscopic methods

2.5.1. SEM

The topographies and morphologies of the polymer surface were examined with an FEI Quanta 3D FEG at a magnification range from 250 \times to 3500 \times . Before measurement, the samples were covered with Pd–Au to eliminate the adverse electrostatic effects. Surface images of the (1 \rightarrow 3)- α -D-glucans were obtained with the high vacuum secondary electron detection method.

2.5.2. Optical microscopy

Detailed information regarding the optical microscope analysis is presented in SI.

2.6. XRD

Detailed information regarding X-ray diffraction analysis is presented in SI.

2.7. FT-Raman and FT-IR

FT-Raman spectra were obtained on an FT-Raman (NXR FTRaman) for a Nicolet 8700 FT-IR using an InGaAs detector (Thermo Scientific). The samples were illuminated using an Nd: YVO₄ excitation laser operating at 1064 nm. The maximum laser power was 2 W. The spectra were recorded over the range of 100–4000 cm⁻¹. The FT-IR spectra were obtained using Nicolet 8700 spectrometer (Thermo Scientific) for Fig. 2. Powdered (1 → 3)-α-D-glucans preparation was placed on ATR crystal. Spectra were recorded in the range of 400–4000 cm⁻¹.

2.8. Methylation analysis

Monosugars were liberated from the polysaccharides by hydrolysis using 2 M trifluoroacetic acid (100 °C, 4 h). Next, they were converted into alditol acetates by reduction with NaBD₄ and peracetylation, as was described elsewhere [20]. The absolute configuration of the monosugars was established by analysis of peracetylated R-(–)-2-butyl glycosides, according to the method described by Gerwig and co-workers [21]. The sugar derivatives were analysed by GC-MS.

2.9. NMR

1D and 2D NMR experiments were recorded in a Me₂SO-d₆ solution at 80 °C (353 K) using a Varian Inova plus 500 spectrometer (operating frequencies: 499.81 MHz for ¹H NMR and 125.69 MHz for ¹³C NMR) and applying standard Varian software. The following two-dimensional NMR experiments were performed: (homonuclear: ¹H, ¹H DQF-COSY, TOCSY, NOESY, and heteronuclear ¹H, ¹³C HSQC). A mixing time of 100 and 150 ms was used in TOCSY and NOESY experiments, respectively. The ¹H and ¹³C resonances were measured relative to the methyl group signal of Me₂SO-d₆ (δ_H 2.50 and δ_C 39.50).

2.10. Statistical analysis

The values from all tests are the means of three separate experiments ± standard deviation. Tukey's HSD test (STATISTICA 8.0, StatSoft, Inc., USA) was used for the determination of statistical differences with the significance denoted at *p* < 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Sorption experiments

The total content of alkali-soluble of (1 → 3)-α-D-glucans ranged from 2.2 to 10 g/100 g on dry weight (DW)¹ basis of the crude polysaccharide extract. Interestingly, the (1 → 3)-α-D-glucans content of extracted polysaccharides expressed on DW basis of vegetative mycelium was significantly higher than the amounts of α-glucans isolated from fruiting bodies [20].

Table 1 also shows the sorption capacity of α-glucan materials isolated from the different species of the fungi tested for binding to four metals (Ni²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺). The polysaccharides extracted from *G. lucidum*, *Boletus edulis*, and *L. edodes* (Shiitake) seem to be the best in terms of heavy metal adsorption.

However, for economic reasons, *L. edodes* was selected due to the complicated, multi-stage, and time-consuming cultivation processes of the other two species. Choosing the best biosorbent, the efficiency of

glucan isolation was taken into consideration. In addition, the Shiitake mushroom is the third most common fungus in the world, but its production waste has not been subjected to treatment so far. The next stage of screening involved both the consumable and waste types of this fungus. Eventually, the *L. edodes* SH 37 variety was chosen (Table 1).

3.2. Microscopic methods

The SEM analysis showed the complex surface morphology of the polysaccharide from *Lentinus edodes*. The SEM image series (Fig. 1) documents the petal polysaccharide morphology. The subtle structure of biopolymer chains is also visible. Bayramoğlu and Arica [22] studied the surface morphology of dried live fungal pellets from *L. edodes* using SEM. They reported that these pellets had a fibrous and porous surface structure, likewise the polysaccharide studied by us. This structure influences the total surface area, which can increase the efficiency of heavy metal sorption. Qian et al. [23] studied alkali-soluble polysaccharides of *L. edodes* and reported that the polysaccharides had a smooth surface and a clearly regular shape, i.e. these were round particles. Probably, these different results are related to the use of different extraction methods. The results obtained with SEM are confirmed by the images from the optical microscope (Fig. S1), which shows a structure like the flake with an inhomogeneous surface.

3.3. XRD

X-ray diffraction was used to define the structure of the fungal polysaccharide [23]. The XRD patterns of α-glucans extracted from *Lentinus edodes* are shown in Fig. S2. There are three peaks: the first broad peak around 9° and two peaks around 18° and 21°. These results are similar to previous studies of polysaccharides extracted from *L. edodes* [23,24]. In the literature, peaks around 2θ at 16° and 22.5° are characteristic of cellulose I [25]; therefore, the studied material resembles slightly the structure of this polymer. Similar to our study Ifuku et al. [26] have reported that in the case of *Hypsizygus marmoreus* the X-ray diffractogram contains crystal patterns of cellulose. Generally, the crystallization capacity of this type of polysaccharide is poor, which can be seen as bun-shaped X-ray diffraction curves [24] but the presence of the first broad peak is consistent with small and imperfect crystallites. The crystallinity index of the fungal polysaccharide sample was 8.5%. Aranaz et al. [27] have shown that another natural polymer chitin with a low crystallinity degree has a high capacity for heavy metal removal. Thus, the low crystallinity may determine the binding capacity of heavy metals by the polymer. In contrast, Jelmsa and Kreger [28] reported that (1 → 3)-α-D-glucans may have the ability to crystallize and can exist in three crystal forms (I, II, III). These forms depend on the type of fungus and the tissue in which they occur.

3.4. FT-IR and FT-Raman

The FT-IR and FT-Raman spectra of (1 → 3)-α-D-glucan from *Lentinus edodes* ranged from 4000 to 100 cm⁻¹, as shown in Fig. 2. These spectroscopy techniques were used to confirm the presence of specific groups as well as the position of glycosidic linkages and their anomeric configuration in glucan. Two spectral areas are important for the structural characterization of glucan: the "anomeric region" (750–950 cm⁻¹) and the "sugar region" (900–1200 cm⁻¹) [29]. Characteristic bands for a polysaccharide with α-1,3-linkages are present at 930, 840, and 820 cm⁻¹ [30]. Moreover, a peak at 1140 cm⁻¹ corresponds to α-1,4-glycoside bonds [30,31]; hence, this type of polysaccharide is present in this preparation as well. There is a broad intense peak at 3300 cm⁻¹ characteristic of O—H stretching vibrations; therefore, it can be concluded that there are hydroxyl groups in the polysaccharide structure [23]. There is a clear peak at 2900 cm⁻¹ characteristic for C—H stretching vibrations and a broad band at 900–1200 cm⁻¹ for C—O and C—C stretching and C-OH bending vibrations [32,33]. The

¹ Abbreviation: DW, dry weight

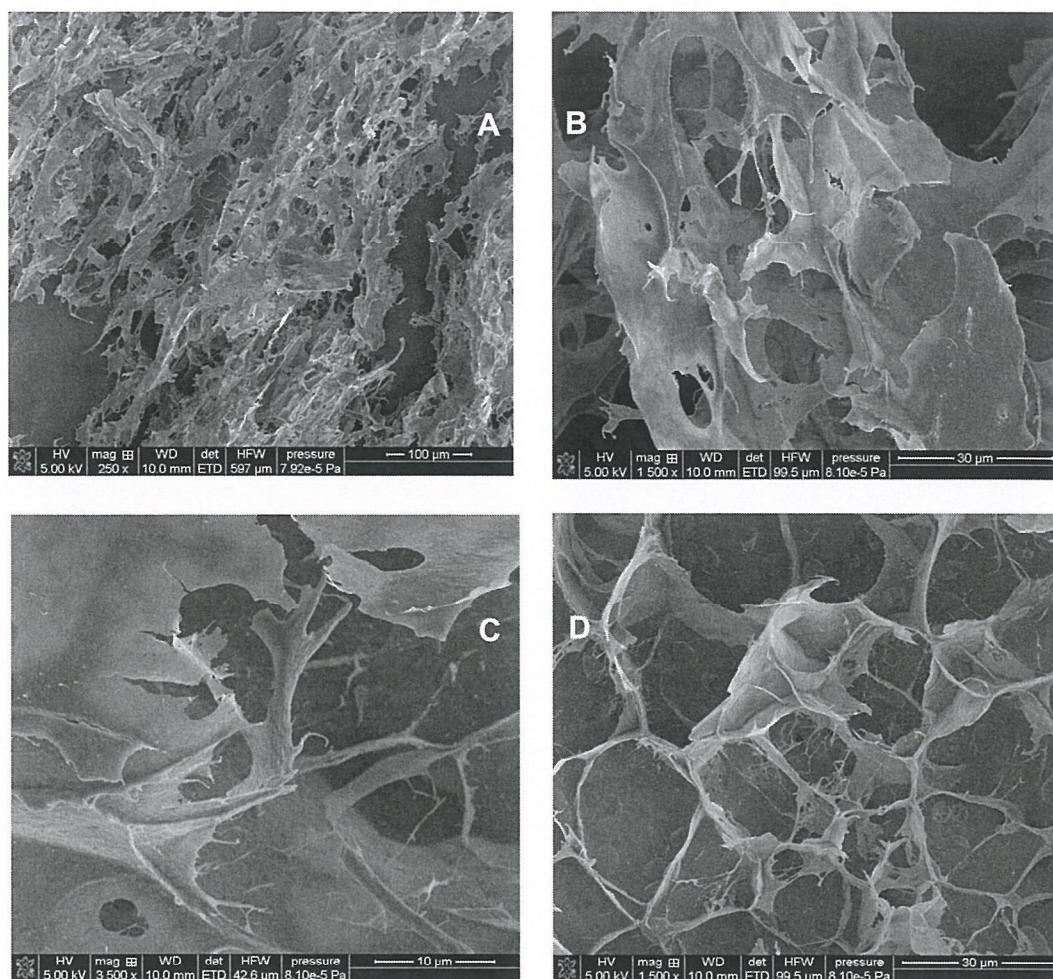


Fig. 1. SEM photographs of the α -(1 \rightarrow 3)-glucan (A–D) of *L. edodes* at 250–3500 \times magnification.

most important peaks obtained with the FT-IR and Raman techniques overlap; hence, the presented results are reliable.

Further, the FT-IR analysis of α -glucan (*L. edodes*) was performed after the biosorption with Pb^{2+} ions and the results were compared with the native glucan (Fig. S3). The changes observed in the spectrum were shifted from 3282 and 2914 to 3314 and 2950, respectively. These bands are characteristic of the stretching vibrations of the $-\text{OH}$ group. Secondly, a shift of the peak from 1635 ($-\text{OH}$ from adsorbed H_2O vibration) to 1653 cm^{-1} and from 1015 to 1024 cm^{-1} was noticed. The differences between both spectra show that the adsorption of Pb^{2+} ions occurs through the hydroxyl groups [34]. Analogous spectra of glucan with sorbed Ni^{2+} , Cd^{2+} , and Zn^{2+} ions were obtained (not shown). The analysed heavy metal ions are complexed on the surface by oxygen-containing groups.

3.5. Methylation analysis

The monosaccharide analysis proved that the studied alkali-soluble polysaccharide contained two hexoses: glucose (75.9%) and mannose (19.5%) and a small amount of pentose (4.5%) identified as xylose. Linkage analysis showed that (1 \rightarrow 3) linked Glc_p is the major chain constituent (86.5%) in addition to (1 \rightarrow 4)-linked Glc_p (5.3%) and terminal glucose (8.2%). Bao et al. [35] isolated three polysaccharide fractions from *Ganoderma lucidum*. The polysaccharide material shows that it does not consist of glucose exclusively but there are also other polysaccharides, for example mannose or rhamnose, and the individual units combined different types of glycosidic bonds [35]. In summary, these results indicate that the studied fraction is mainly a glucose polymer or

glucan. However, it is impossible to isolate polysaccharide fractions from biological material that contain only one type of polysaccharide and one type of bonds between them.

3.6. NMR

The 1D and 2D ^1H NMR (DQF-COSY, TOCSY, NOESY) and 2D ^1H – ^{13}C NMR (HSQC) experiments were performed to determine the structure of the investigated preparation as well as the anomeric configuration of glucose (the major sugar component) residues. The NMR data are listed in Table 2. Two spin systems (marked by A and B) both characteristic of α -D-glucose were identified. Therefore, it can be claimed that two types of α -D-glucose-based polymers were constituents of the test material. The major fraction, represented by the A spin system, was (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan (86%). It is accompanied by a six-fold smaller amount of an amylose-like polymer (14%, B spin system). The HSQC spectrum (Fig. S4) contained only signals attributed to correlations between directly bonded carbon and proton nuclei, whereas the ^1H NMR and ^1H – ^{13}C 2D NMR-correlated spectra contained hydroxyl proton signals as well (not shown). These signals were present because of the hygroscopic nature of both the solvent ($\text{DMSO } d_6$) and the glucan preparation. It was difficult to avoid the presence of residual water (δ at 3.14 ppm) absorbed from the surrounding environment. Three resonances (at 4.22, 4.51, 4.91 ppm) could be assigned to protons from the hydroxyl groups of (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan and other three small signals (at 4.32, 4.62, 4.98) from the (1 \rightarrow 4)-linked α -D-glucose polymer. The first group of signals were assigned to OH-6, OH-2, and OH-4 of the glucose ring of (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan and another three signals to OH-6, OH-

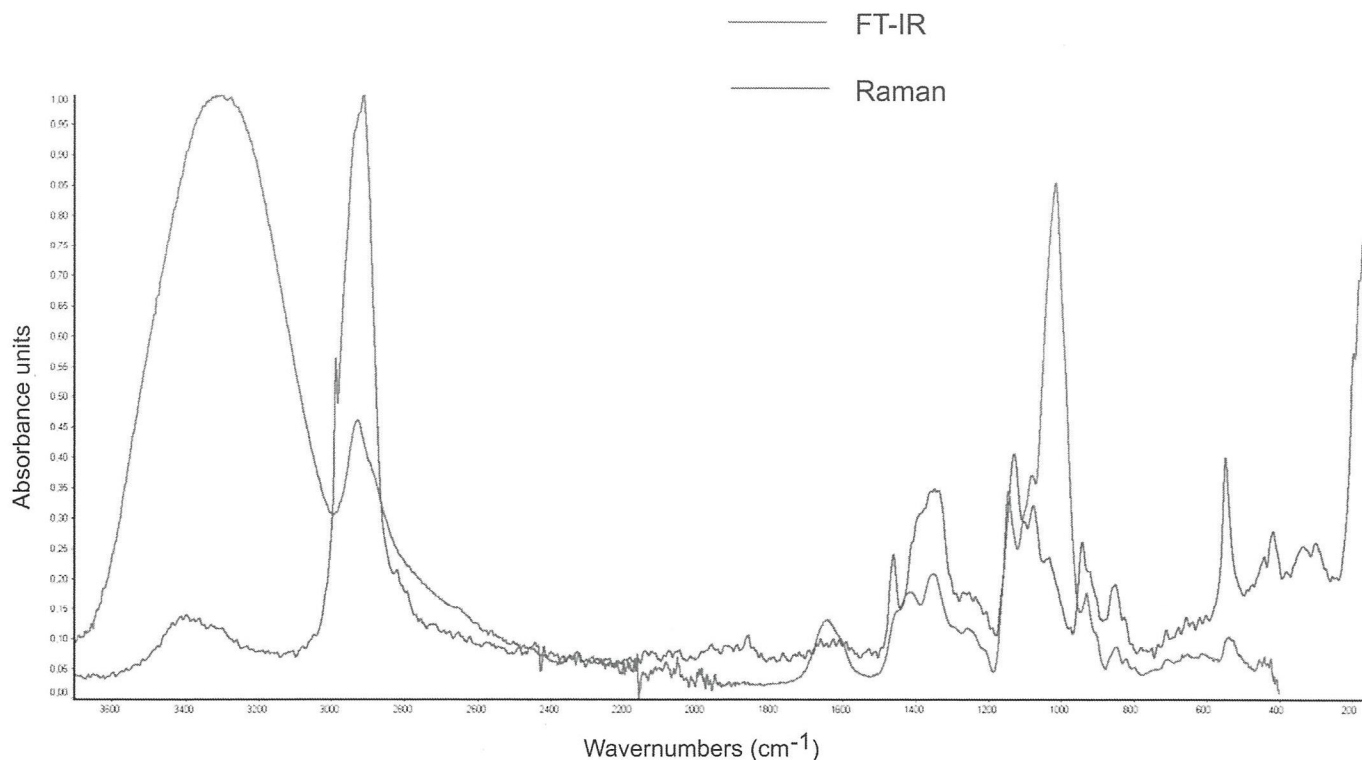


Fig. 2. Comparison of FT-IR (red line) and FT-Raman spectra (blue line) of sample α -(1 \rightarrow 3)-glucan of *L. edodes*. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

2, and OH-3 of the glucose ring of (1 \rightarrow 4)- α -D-glucan, respectively. In the case of the main component of the preparation, the absence of an OH-3 signal in the ^1H NMR spectrum together with a downfield shift of C-3 (83.6 ppm, Table 2) indicated that the glucose residues were (1 \rightarrow 3)-linked within the main polymer. The low field anomeric proton signal at 5.12 ppm and anomeric carbon at 100.1 ppm as well as the small value of the $^3J_{\text{H}1,\text{H}2}$ coupling constant (c.a. 3.0 Hz) are typical for the α -anomer of glucose.

Based only on NMR spectroscopic data, it is difficult to conclude whether the two components are chemically bonded to form one large water-insoluble polymer or are a co-separated mixture of polymers (using the alkaline extraction procedure) from the fungal (*L. edodes*) tissue. Expected signals corresponding to branching glucose and to terminal glucose were not detected by the NMR spectroscopy (i.e. the amounts of the residues were below the 0.5% detection limit of the method). Another glucan from *L. edodes* was reported [36], which contained a main chain of (1 \rightarrow 4) and (1 \rightarrow 3)-linked glucopyranose residues. This water-soluble glucan had (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan having

two (1 \rightarrow 6)- β -glucopyranoside branches for every five (1 \rightarrow 3)- β -glucopyranoside linear linkages was the main structure [37].

4. Conclusion

The fungal (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan isolated from Shiitake has good sorption properties because of well-developed surface, low crystallinity and a large number of hydroxyls on the surface. Probably the main mechanism of metal uptake by fungi is the metabolism-independent process taking place through the formation of bonds with oxygen-containing surface groups of cell-wall polysaccharides. Given the ease of obtaining this biological waste material, α -glucan from Shiitake can be used as a new heavy metal biosorbent for the treatment of aqueous solutions. To the best of our knowledge, (1 \rightarrow 3)- α -D-glucan isolated from *L. edodes* has many advantageous features, including water-insolubility as well as the low cost and availability of raw biosorbents.

Table 2

The assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectra and corresponding coupling constants of alkali-soluble polysaccharides from *Lentinus edodes*.

Spin system (% of residue)	Signals										
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6'	H-6	OH-2	OH-3	OH-4	OH-6
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6					
	$J_{1,2}$ [Hz]										
A \rightarrow 3)- α -D-Glc(1 \rightarrow (86%) ^b	5.12	3.47	3.69	3.49	3.89	3.57	3.70	4.46	nd ^a	4.86	4.17
	100.1	71.0	83.6	70.4	72.5	61.1	-	-	-	-	-
	<3 Hz										
B \rightarrow 4)- α -D-Glc(1 \rightarrow (14%) ^b	5.18	3.37	3.75	3.63	3.46	3.51	3.63	4.62	4.98	nd ^a	4.32
	100.4	72.3	73.3	83.7	70.5	61.4	-	-	-	-	-
	<3 Hz										

^a nd - not exist in this polymer.

^b Percentage of the polymer determined on the basis of surface areas of anomeric signals (^1H NMR spectrum).

Appendix A. Supplementary data


Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.036>.

References

- [1] J. Zellner, Chemistry of Macrofungi, First, Verlag von Wilhelm Engelmann, 1907.
- [2] K. Drbal, P. Kalač, A. Šeflová, J. Šefl, Copper content in some edible macrofungi, Čes. Mycol. 29 (1975) 184–186.
- [3] T. Stijve, R. Besson, Mercury, cadmium, lead and selenium content of mushroom species belonging to the genus agaricus, Chemosphere 5 (1976) 151–158.
- [4] J. Falandysz, J. Borovička, Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks, Appl. Microbiol. Biotechnol. 97 (2013) 477–501.
- [5] J. Falandysz, K. Szymczyk, H. Ichihashi, L. Bielawski, M. Gućia, A. Frankowska, S.-I. Yamasaki, ICP/MS and ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Poland, Food Addit. Contam. 18 (2001) 503–513.
- [6] F. Costa-Silva, G. Marques, C.C. Matos, A.L.R.N.A. Barros, F.M. Nunes, Selenium contents of Portuguese commercial and wild edible mushrooms, Food Chem. 126 (2011) 91–96.
- [7] T. Tan, P. Cheng, Biosorption of metal ions with *Penicillium chrysogenum*, Appl. Biochem. Biotechnol. 104 (2003) 119–128.
- [8] K. Tsekova, D. Todorova, S. Ganeva, Removal of heavy metals from industrial wastewater by free and immobilized cells of *Aspergillus niger*, Int. Biodeterior. Biodegradation 64 (2010) 447–451.
- [9] C. Sarikurkcu, M. Copur, D. Yildiz, I. Akata, Metal concentration of wild edible mushrooms in Soguksu National Park in Turkey, Food Chem. 128 (2011) 731–734.
- [10] R.C. Upadhyay, M. Singh, Production of edible mushrooms, in: K. Esser (Ed.), The Mycota, 2nd ed. Springer, Heidelberg 2010, pp. 79–97.
- [11] D.J. Roysse, J. Baars, Q. Tan, Current overview of mushroom production in the world, in: C.Z. Diego, A. Pardo-Giménez (Eds.), Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications, John Wiley & Sons, Inc, New York 2017, pp. 5–13.
- [12] S.T. Chang, World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinula edodes* (Berk) sing. In China, Int. J. Med. Mush. 1 (1999) 291–300.
- [13] J. Wang, C. Chen, Biosorbents for heavy metals removal and their future, Biotechnol. Adv. 27 (2009) 195–226.
- [14] R. Dhankhar, A. Hooda, Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions, Environ. Technol. 32 (2011) 467–491.
- [15] K.R. K, U.R. Sardar, E. Bhargavi, I. Devi, B. Bhunia, O.N. Tiwari, Advances in exopolysaccharides based bioremediation of heavy metals in soil and water: a critical review, Carbohydr. Polym. 199 (2018) 353–364.
- [16] B. Bhunia, U.S. Prasad Uday, G. Oinam, A. Mondal, T.K. Bandyopadhyay, O.N. Tiwari, Characterization, genetic regulation and production of cyanobacterial exopolysaccharides and its applicability for heavy metal removal, Carbohydr. Polym. 179 (2018) 228–243.
- [17] P. Bulak, C. Polakowski, K. Nowak, A. Waško, D. Wiąćek, A. Bieganski, *Hermetia illucens* as a new and promising species for use in entomoremediation, Sci. Total Environ. 633 (2018) 912–919.
- [18] S. Hasegawa, S. Kirkwood, J.H. Nordin, An alpha-1,3-glucanase from a fungal source, Chem. Ind. 25 (1966) 1033.
- [19] A. Wiater, J. Szczodrak, M. Pleszczyńska, Mutanase induction in *Trichoderma harzianum* by cell wall of *Laetiporus sulphureus* and its application for mutan removal from oral biofilms, J. Microbiol. Biotechnol. 18 (2008) 1335–1341.
- [20] J.S. Sawardeker, J.H. Sloneker, A. Jeanes, Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography, Anal. Chem. 37 (1965) 1602–1604.
- [21] G.J. Gerwig, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegenthart, Determination of the d and l configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary g.l.c., Carbohydr. Res. 62 (1978) 349–357.
- [22] G. Bayramoğlu, M.Y. Anca, Removal of heavy mercury(II), cadmium(II) and zinc(II) metal ions by live and heat inactivated *Lentinus edodes* pellets, Chem. Eng. J. 143 (2008) 133–140.
- [23] J.-Y. Qian, W. Chen, W.-M. Zhang, H. Zhang, Adulteration identification of some fungal polysaccharides with SEM, XRD, IR and optical rotation: a primary approach, Carbohydr. Polym. 78 (2009) 620–625.
- [24] K.-P. Wang, J. Wang, Q. Li, Q.-l. Zhang, R.-X. You, Y. Cheng, L. Luo, Y. Zhang, Structural differences and conformational characterization of five bioactive polysaccharides from *Lentinus edodes*, Food Res. Int. 62 (2014) 223–232.
- [25] A. Kumar, Y.S. Negi, N.K. Bhardwaj, V. Choudhary, Synthesis and characterization of methylcellulose/PVA based porous composite, Carbohydr. Polym. 88 (2012) 1364–1372.
- [26] S. Ifuku, R. Nomura, M. Morimoto, H. Saimoto, Preparation of chitin nanofibers from mushrooms, Materials (Basel) 4 (2011) 1417–1425.
- [27] I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Panos, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras, Functional characterization of chitin and chitosan, Curr. Chem. Biol. 3 (2009) 203–230.
- [28] J. Jelsma, D.R. Kreger, Observations on the cell-wall compositions of the bracket fungi *Laetiporus sulphureus* and *Piptoporus betulinus*, Arch. Microbiol. 119 (1978) 249–255.
- [29] A. Synytsya, M. Novak, Structural analysis of glucans, Ann. Transl. Med. 17 (2(2)) (2014) 1–14.
- [30] A. Choma, A. Wiater, I. Komaniecka, R. Paduch, M. Pleszczyńska, J. Szczodrak, Chemical characterization of a water insoluble (1→3)-α-d-glucan from an alkaline extract of *Aspergillus wentii*, Carbohydr. Polym. 91 (2013) 603–608.
- [31] F.R. Seymour, R.L. Julian, A. Jeanes, B.L. Lambert, Structure analysis of insoluble d-glucans by Fourier transform infrared difference-spectroscopy: correlation between structures of dextrans from strains of *Leuconostoc mesenteroides* and of d-glucans from strain of *Streptococcus mutans*, Carbohydr. Res. 86 (1980) 227–246.
- [32] A. Choma, A. Wiater, I. Komaniecka, R. Paduch, M. Pleszczyńska, J. Szczodrak, Chemical characterization of a water insoluble (1→3)-α-d-glucan from an alkaline extract of *Aspergillus wentii*, Carbohydr. Polym. 91 (2013) 603–608.
- [33] C. Liu, X. Li, Y. Li, Y. Feng, S. Zhou, F. Wang, Structural characterisation and antimutagenic activity of a novel polysaccharide isolated from *Sepiella maindroni* ink, Food Chem. 110 (2008) 807–813.
- [34] M. Iqbal, A. Saeed, S.I. Zafar, FTIR spectrophotometry, kinetics and adsorption isotherms modeling, ion exchange, and EDX analysis for understanding the mechanism of Cd²⁺ and Pb²⁺ removal by mango peel waste, J. Hazard. Mater. 164 (2009) 161–171.
- [35] X.-F. Bao, X.-S. Wang, Q. Dong, J.-N. Fang, X.-Y. Li, Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*, Phytochemistry 59 (2002) 175–181.
- [36] Z. Yu, G. Ming, W. Kaiping, C. Zhixiang, D. Liquan, L. Jingyu, Z. Fang, Structure, chain conformation and antitumor activity of a novel polysaccharide from *Lentinus edodes*, Fitoterapia 81 (2010) 1163–1170.
- [37] Y. Zhang, S. Li, X. Wang, L. Zhang, P.C.K. Cheung, Advances in lentinan: isolation, structure, chain conformation and bioactivities, Food Hydrocoll. 25 (2011) 196–206.

Article

Isolation of Chitin from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) and Its Usage to Metal Sorption

Katarzyna Złotko ¹, Adam Waśko ², Daniel M. Kamiński ³ , Iwona Budziak-Wieczorek ⁴ , Piotr Bulak ¹ 
and Andrzej Bieganski ^{1,*} 

¹ Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland; k.zlotko@ipan.lublin.pl (K.Z.); p.bulak@ipan.lublin.pl (P.B.)

² Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, University of Life Sciences in Lublin, Skromna, 20-950 Lublin, Poland; awasko1@tlen.pl

³ Department of Crystallography, Faculty of Chemistry, Maria Curie-Skłodowska University, Maria Curie Skłodowska, Square 3, 20-031 Lublin, Poland; daniel.kaminski@poczta.umcs.lublin.pl

⁴ Department of Chemistry, University of Life Sciences in Lublin, Skromna, 20-950 Lublin, Poland; iwona.budziak@up.lublin.pl

* Correspondence: a.bieganski@ipan.lublin.pl; Tel.: +48-81-744-50-61

Abstract: Chitin has become a desirable raw material used in various areas of life. The black soldier fly (*Hermetia illucens*) can be a source of this substance. In the literature, there are many methods of obtaining chitin but there is no one universal method of isolating it. In this publication, we present various procedures for the isolation of chitin from *H. illucens* pupal exuviae. The obtained chitin variants were characterized using different techniques (optical and confocal microscopy, FTIR, XRD, EDX, thermogravimetric analysis). The tested chitin isolated with an efficiency of 5.69–7.95% was the α form with a crystallinity degree of 60% and maximum degradation temperature of 392 °C. Furthermore, we characterized the nickel ion biosorption process on chitin and proposed the mechanism of this process to be ion exchange and complexation. There have been no such studies thus far on the isolation of chitin from *H. illucens* exuviae or on the biosorption of nickel ions on this type of biosorbent. The conducted research can be used to develop the application of chitin as a metal biosorbent that can be obtained with relatively high efficiency and good sorption properties.

Keywords: black soldier fly; *Hermetia illucens*; chitin isolation; heavy metals



Citation: Złotko, K.; Waśko, A.; Kamiński, D.M.; Budziak-Wieczorek, I.; Bulak, P.; Bieganski, A. Isolation of Chitin from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) and Its Usage to Metal Sorption. *Polymers* **2021**, *13*, 818. <https://doi.org/10.3390/polym13050818>

Academic Editor: Farayde Matta Fakhouri

Received: 15 February 2021

Accepted: 1 March 2021

Published: 7 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 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

It is known that many species of insects play an important role in human life. There are about 2 billion people for whom insects are also part of their traditional diets. Because of the increasing cost and demand for animal protein and the continued growth in human population, insects as a source of food appear to be a great solution for both people and the environment [1]. They contain a high amount of fat, protein, vitamin, fibres and minerals [2]. Other examples of insect use include feed production [1], as a source of chitin and chitosan [3], utilization of organic wastes [4], and biocontrol of pests [5]. They can even participate in the recycling of materials and can be used in the production of soil fertilizer [1]. Chitin is a natural biopolymer whose importance is growing all the time in many industries. It is used for instance in:

- Medicine—in artificial tendons, ligaments, dressings, and wound healing; materials produced from chitin are characterized by haemostatic and antibacterial activity and biodegradability [6–8];
- Dietetics—it is used in the production of supplements, food thickeners and pharmaceuticals [9];
- Cosmetics: hair care, skin care, oral care; chitin can be also found in toothpaste, mouthwashes and chewing gum [9,10];

- Others, such as: food packaging industry, additive in paper production, textile industry, adhesives or as a carrier in ion exchange resins [6,10–12].

There are many sources from which chitin can be obtained. Examples of frequently used organisms are shrimp, crab, krill and squid [13–16]. Another source of chitin is sponge skeleton [17,18]. Yet another source of chitin are insects [19–21] and among them is *Hermetia illucens*, also known as the black soldier fly or black fly [3,22,23].

Many methods of chitin isolation have been developed in recent years [24,25]. Depending on the raw material used to isolate the chitin, there are various undesirable components present in the material that have to be removed. In the case of insects, chitin is present in the chitin–melanin complex [26], in fungi in the chitin–glucan complex [27], in crustaceans, chitin forms a network with proteins where calcium carbonate is deposited [24]. To isolate pure chitin, different chemical (using various reagents) as well as biological (enzymatic deproteinization, fermentation) methods are used. However, there is no one standard method of isolating chitin [24]. Therefore, it is best to experimentally optimize the chitin isolation method based on the raw material used.

One of the possibilities of chitin application is its use as a sorbent in the sorption process [28,29]. For instance, chitin obtained from *H. illucens* has been used as a sorbent of organic dye [30]. Chitin obtained from other sources is a good sorbent for heavy metals [31–33]. However, there is a lack of studies on the possibility of using chitin from *H. illucens* in the sorption of heavy metals.

The aim of this work was first to find the best procedure of chitin isolation from *H. illucens* pupal exuviae and usage it as the sorbent for nickel ions (as a representative of bivalent metals) were used.

2. Materials and Methods

2.1. Insect Material

H. illucens was taken from laboratory scale cultivation in the Institute of Agrophysics (Lublin, Poland). Larvae were grown at 26 ± 2 °C with substrate (EUROECO Beszczyński, Chełmża, Poland) humidity of 50–80%. Metamorphosis occurred after three weeks. After metamorphosis the pupal exuviae were used for chitin isolation.

2.2. Chemicals

Sodium hydroxide (NaOH) and hydrochloric acid (HCl) (both Merck, Darmstadt, Germany) were used in the demineralization and deproteinization stage. Hydrogen peroxide (H₂O₂, 30%) (Standard, Lublin, Poland), potassium manganate (VII) (KMnO₄) (POCH, Gliwice, Poland) and oxalic acid (C₂H₂O₄) (STANLAB, Lublin, Poland) were used in the depigmentation stage.

Nickel ion (Ni²⁺) solution (1000 mg·dm⁻³) was obtained by the dissolution of nickel nitrate (Ni(NO₃)₂·6H₂O) (POCH, Gliwice, Poland), in redistilled water. nitric acid (HNO₃, 36%) (POCH, Gliwice, Poland) was used for the pH adjustment of the Ni²⁺ solution.

2.3. Chitin Isolation from *Hermetia Illucens Exuviae*

Our variants of the chitin isolation from *H. illucens* were based on Draczyński's methodology [34]. To find the best procedure (i.e., the best efficiency and the best quality material), we introduced various modifications in the subsequent stages. Insect pupal exuviae were used, which had been previously cleaned (using ethanol and water), dried (60 °C) and ground. About 10 g of the exuviae were taken for each isolation procedure. First, demineralization was performed with 1 M HCl for 1 h, followed by filtration, and the precipitate was neutralized with NaOH and washed with water. Subsequently, deproteinization was performed with NaOH at 80 °C for 24 h. The precipitate was filtered, neutralized (with HCl), and washed with water. The last stage, i.e., depigmentation, varied depending on the variant. As there are procedures for chitin isolation without the depigmentation stage [35,36], we omitted this stage in one of our variants (variant No. 1). In variant No. 2, depigmentation was carried out by boiling the sample in water at 100 °C for 24 h. In variant

No. 3, H₂O₂ was used at 80 °C for 2.5 h and for 5 h for variant No. 4. Variant No. 5 was obtained according to the Draczynski procedure using 1% KMnO₄ at 80 °C for 20 min (as an oxidant) and 4% oxalic acid (as a reducing agent) at 80 °C for 1 h [34]. The final product was obtained by filtration and then neutralized (using NaOH), washed with water and dried at 60 °C for 24 h. The obtained chitin was weighed and the efficiency of the process was calculated according to the formula below.

$$\text{Chitin yield} = \frac{m}{w} \times 100\% \quad (1)$$

where m is the weight of the isolated chitin and w is the weight of *Hermetia illucens* exuviae.

The isolations were carried out in three replications for all variants. All the methods described in this work are presented in Table 1.

Table 1. Variants of the isolation methods presented in this work. Variant numbers specified in this table are used in the entire text.

Variant No.	Demineralization Stage	Deproteinization Stage	Depigmentation Stage
1			Without the stage of depigmentation
2			Water at 100 °C for 24 h
3	1 M HCl to obtain acidic reaction at 22 °C for 1 h. Then NaOH to obtain neutral reaction. Rinsing by distilled water	1 M NaOH at 80 °C to obtain alkaline reaction for 24 h. Then HCl to obtain neutral reaction. Rinsing by distilled water.	9% H ₂ O ₂ at 80 °C for 2.5 h
4			9% H ₂ O ₂ at 80 °C for 5 h
5			1% KMnO ₄ at 80 °C for 20 min. Then oxalic acid (4% C ₂ H ₂ O ₄) to reduce the excess of KMnO ₄ . Then NaOH to precipitate the manganese. Rinsing by distilled water
6			Sorption of Ni ²⁺ on chitin isolated in variant 3 procedure

The isolations were carried out in three replications for all variants.

2.4. Nickel Sorption

The isotherms (variant No. 6) were recorded during the sorption of Ni²⁺ ions on chitin isolated according to the procedure described as variant No. 3 (Table 1). This procedure was as follows: the solution of Ni²⁺ ions was adjusted to an initial pH 5. 0.1 g of chitin was mixed with 10 cm⁻³ of Ni²⁺ solution. Five Ni²⁺ ion solutions were used whose concentrations were 10, 20, 40, 80 and 180 mg·dm⁻³. Then, the suspensions of the Ni²⁺ ion solutions and chitin were centrifuged at a speed of 12,000 r.p.m. The concentration of metal was measured in the supernatant using an ICP-OES (Thermo Scientific iCAP Series 6500, Waltham, MA, USA). The entire process was carried out at a constant temperature of 22 ± 1 °C. All the tests were carried out in three repetitions.

2.5. Methods of Chitin Characterization and Sorption Effect

The methods described in the following subchapters were used for the characterization of both chitin itself and the chitin with sorbed nickel.

2.5.1. Optical and Confocal Microscopy

Micrographs of the same fragment of the chitin samples and at the same microscope magnification were taken in reflected white light and in the violet light of a laser with a wavelength of $\lambda = 405$ nm. The photos were taken with a Nikon Eclipse MA 200 metallographic microscope (Japan) with the Eclipse C1 confocal attachment.

2.5.2. X-Ray Powder Diffraction (XRPD)

The dry organic material was analysed without further grinding, using a powder X-ray diffraction technique with an Empyrean (Malver PANalytical, Cambridge, UK) diffractometer equipped with a Cu anode as the source of $\text{CuK}\alpha$ X-ray radiation ($\lambda = 1.5405$ Å) and multilayer optics. The input slits were set to $\frac{1}{2}$ and the detector had a background reducing collimator. Both the incident beam path and detector path were corrected with Soller slits (0.02 rad). During measurement, samples were rotated with a speed of 8 r.p.m. All samples were measured over a 2θ range of 4° to 90° with a step size of 0.013° and an exposition time per step of 1 s. All data were collected at 20°C . The degree of crystallinity was estimated with the use of WaxFit software [37], which is based on the ratio of surface area under curves of crystalline phase to the sum of the area under the curves of the amorphous phases and crystalline phases. All peaks were described (estimated) by Gauss–Cauchy functions. Before fitting, background data was taken into account and smoothed with the Savitzky–Golay method. Diffraction data was compared using ReX software [38] with the α chitin structure from the CIF file presented in the work of Sikorsi et al. [39]. In the fitting procedure, only scale, size of crystallites and background were used.

2.5.3. Thermogravimetric Analysis (TG, DTG, DTA)

Thermogravimetric analysis was performed using a Derivatograph C (Paulik, Paulik and Erdey, MOM, Budapest, Hungary) with corundum crucibles. Previously weighed portions of chitin samples (approximately 10 mg) were analysed in the temperature range of 20 – 600°C in an inert nitrogen atmosphere, at a temperature increase rate of $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

2.5.4. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The FTIR spectra were recorded using a Nicolet 6700 FTIR spectrometer (Thermo Scientific, Madison, WI, USA) equipped with a diamond attenuated total reflectance (ATR) attachment. The FTIR spectra were recorded between 4000 and 400 cm^{-1} .

2.5.5. Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX)

The lyophilized samples of chitins (native and enriched with Ni ions) were attached to an aluminium stub using carbon adhesive tape. As is necessary in EDX analysis, the samples were pressed to obtain a flat and smooth surface. A FEI Quanta 3D FEG scanning microscope was used. EDX spectra were obtained from five different areas of each sample. To increase the representativeness of measurements, multiple measurements were carried out. Elemental composition of the samples was calculated with the use of EDAX Genesis software.

2.6. Statistical Analysis

The values from all tests were the mean values of three separate experiments \pm standard deviation. Tukey's HSD test and Student t-test (STATISTICA 8.0, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) was used for the determination of statistical differences with the significance denoted at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Chitin Isolation from *H. illucens* Pupal Exuviae

Information concerning chitin isolation efficiency is presented in Table 2. It can be seen that the less aggressive last stage of chitin isolation (depigmentation) gave the higher isolation yield. The pigment was destroyed using 9% hydrogen peroxide (H_2O_2) (variant

Nos. 3 and 4) while in variant No. 5 we used potassium permanganate (KMnO_4). For variant No. 2, the sample was boiled in water for 24 h to remove the pigment. Generally, we observed that type of oxidant, time and temperature are the likely cause of chitin degradation in this step of the procedure. The best isolation method was selected based on the yield and the purified material properties (the biggest pore-like structure which should favour the sorption process and the highest temperature decomposition which should favour a wide range of applications).

Table 2. The efficiency of chitin isolation from *H. illucens* pupal exuviae depending on the isolation variant (means and SD, $n = 3$). The variants are described in Table 1. The same letter means that there were no statistically significant differences (Tukey's HSD test; $p < 0.05$).

Variant Number	1	2	3	4	5
Yield (%)	7.95 ± 0.20^b	7.97 ± 0.10^b	7.01 ± 0.12^c	5.98 ± 0.08^a	5.69 ± 0.28^a

3.2. Optical and Confocal Microscopy

Examples of photos made by both of the microscopes are presented in Figure 1.

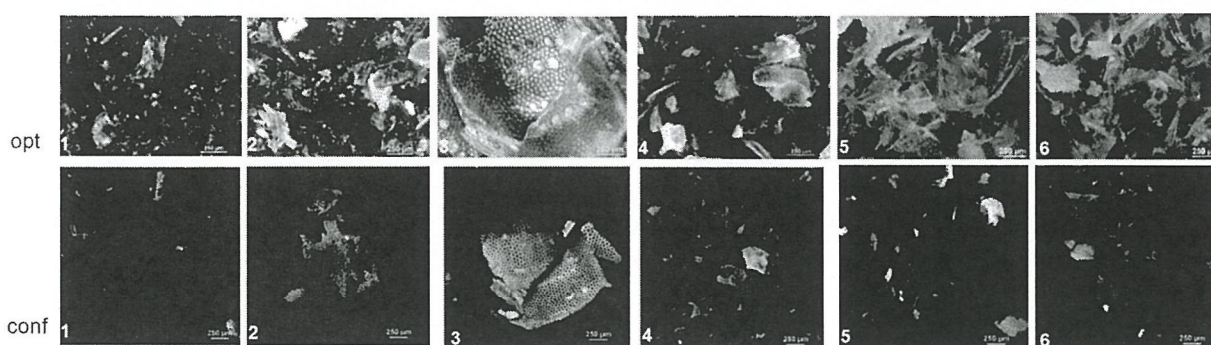


Figure 1. Examples of photographs of the investigated samples obtained by optical microscope (**top row**) and confocal microscope (**bottom row**). The numbers in the bottom left corners correspond to the numbers of the variants (Table 1).

It is difficult to notice significant changes in the optical microscope images for individual variants. Generally, it can be stated that the chitin surface resembles a honeycomb or porous structure, especially in variant 3.

Based on the confocal photos it can be stated that variant No. 1 showed fluorescence of only some objects due to the absorption of monochromatic light and a colour shift in the direction of longer wavelengths (blue and red), and most of the chitin sample glowed with reflected light (violet); variant Nos. 2 and 6 were similar. Variant 3 showed a slightly higher fluorescence, although most of the sample was still illuminated with reflected (violet) light. Next, variant No. 4 showed strong fluorescence of the objects, while the variant No. 5 had lower fluorescence than variant No. 4.

3.3. X-ray Powder Diffraction (XRPD)

Figure 2 shows the X-ray powder diffraction patterns of all samples. Comparison of the experimental data to records from powder diffraction databases and with the literature [39] indicates the data are related to the alpha chitin. The crystallite size is ~ 80 nm in all cases as indicated by Rietveld analysis based on the crystallographic structural data provided by Sikorski et al. [39].

The degree of crystallinity of the samples was estimated to be around 60%. Summarising this part of the results it can be stated that the preparation method has no effect on the chitin crystallite.

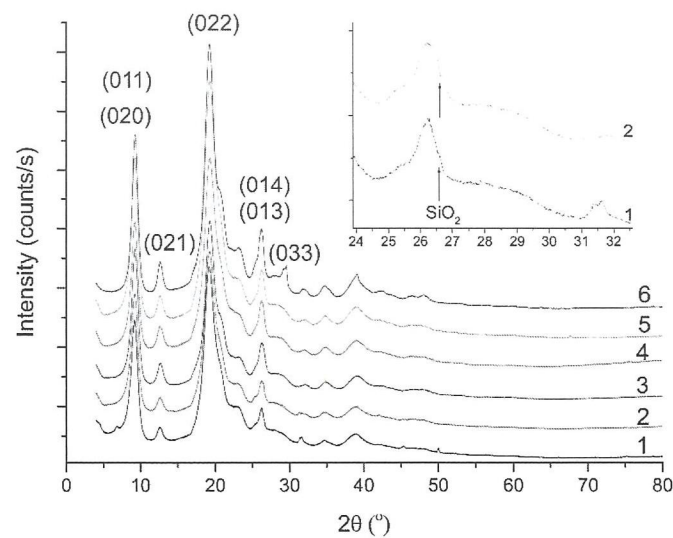


Figure 2. The diffraction pattern of α chitin for all isolation variants and after Ni^{2+} sorption. The presented data corresponds to the six variants from Table 1. The background was used to estimate the degree of crystallinity. The inset shows a trace of SiO_2 in samples 1 and 2.

Trace silica (quartz- α SiO_2) amounts were found in two variants (Nos. 1 and 2), as it is indicated by weak reflection at $2\theta = 26.6^\circ$ (Figure 2, insets).

3.4. Thermogravimetric Analysis (TG, DTG, DTA)

All the curves obtained from thermogravimetric measurements are presented in Figure 3 (Thermogravimetric—TG and Derivative Thermogravimetry—DTG) and 4 Differential Thermal Analysis curves (DTA). On the basis of these, it was found that the chitin mass changes are related to two endothermic transitions. The evaporation of water at temperatures in the range of 80–100 °C was the first (inset 1). The second was the decomposition of chitin itself at temperatures in the range of 356–392 °C, depending on the sample (Figure 3). The loss of mass during decomposition for individual samples was determined from the TG curve and it was between 67.2% and 73.1%, depending on the sample.

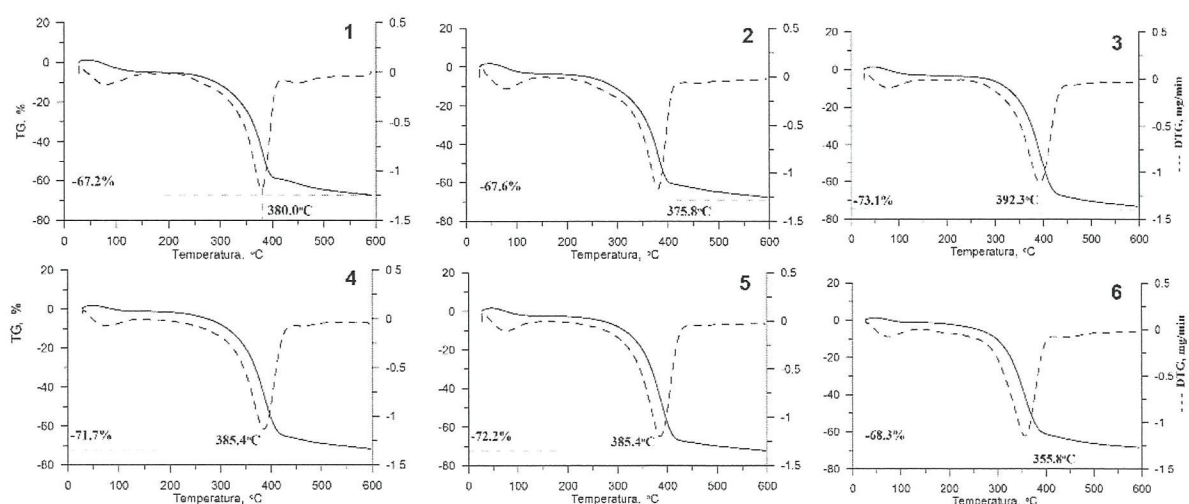


Figure 3. Thermogravimetric analysis (TG) (solid line) and Derivative Thermogravimetry (DTG) (dotted line) curves of chitin from black soldier fly obtained by the isolation variants and after the Ni^{2+} sorption process. Numbers are related to the variants presented in Table 1.

The highest temperature of chitin decomposition and the highest weight loss occurred in variant No. 3 (i.e., chitin treated with H₂O₂ for 2.5 h), the lowest in the variant No. 6 (i.e., after Ni²⁺ ions sorption).

There were no clearly visible peaks in the DTA curves for any of the samples tested (Figure 4). However, it can be seen that at about 80 °C there was an endothermic transformation (for all samples except variant No. 3), and this reaction was probably caused by the evaporation of water; and another at 300 °C associated with the exothermic decomposition of chitin.

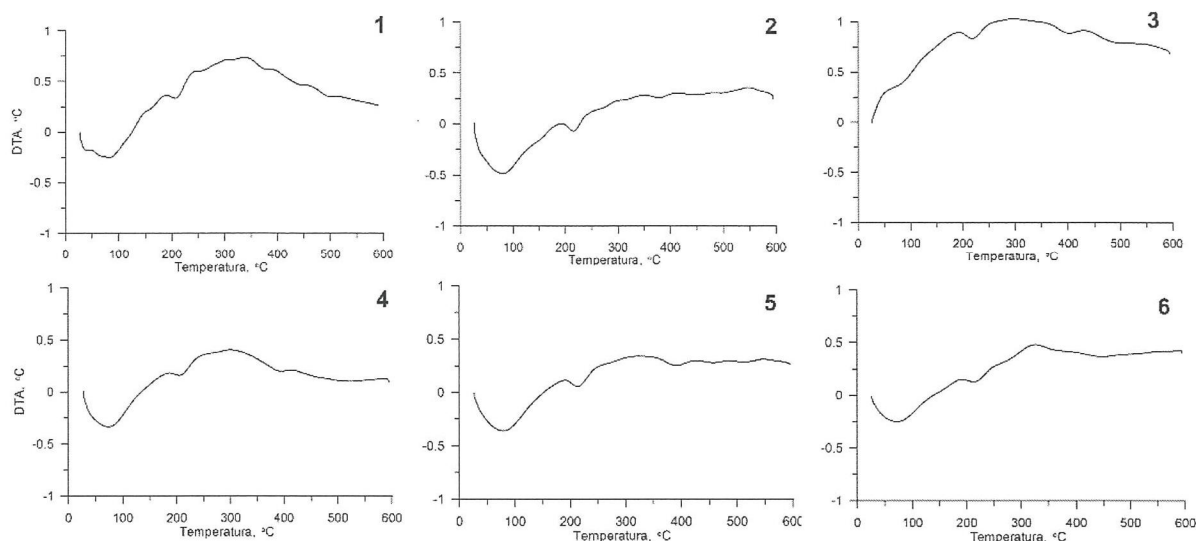


Figure 4. Differential Thermal Analysis (DTA) curves of chitin from black soldier fly for all variants of chitin isolation and after the Ni²⁺ sorption process. Numbers are related to the variants presented in Table 1.

3.5. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The results of infrared spectroscopy on the different variants of chitin are represented in Figure 5A,B, respectively. Variants Nos. 2–5 showed no significant differences between the FTIR spectra (Figure 5B), while additional peaks are visible in the FTIR spectrum of the sample in which the depigmentation process was not performed (variant No. 1) (Figure 5A). The sample without the depigmentation decolourization step presented much sharper peaks than samples isolated with the depigmentation steps. The spectra of the samples isolated with variant Nos. 2–5 have two characteristic bands, one at 1620 cm⁻¹ and another at 1652 cm⁻¹. These bands are attributed to the amide I vibrations, especially C=O secondary amide stretching vibration. Additionally, the band at 1552 cm⁻¹ correspond to a N–H bending, C–N stretching typically characteristic for amide II. The sharp band at 1307 cm⁻¹ corresponds to a –CH₂–group (amide III), due to the formation of CO–NH components of protein. The other FTIR spectrum bands were observed as the following: 1377 cm⁻¹ (C–H bend, –CH₃ symmetric deformation), 1557 cm⁻¹ (N–H deformation of amine II), 1067 cm⁻¹ (C–O–C asymmetric stretching in phase ring), 1008 cm⁻¹ (C–O asymmetric stretching in phase ring) and 951 cm⁻¹ (–CH₃ wagging).

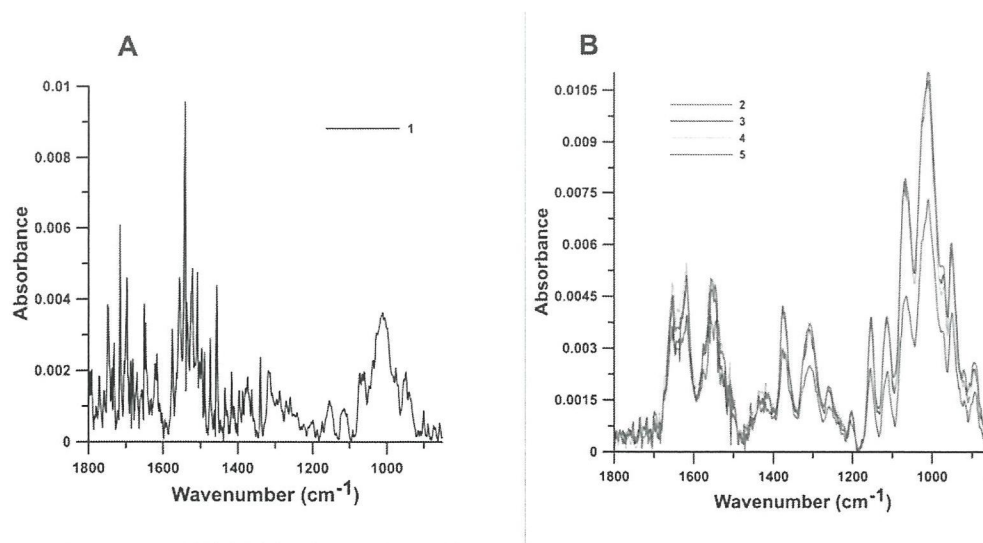


Figure 5. FTIR spectra for different variants of chitin isolation. Numbers are related to the variants presented in Table 1. Because the spectrum of variant No. 1 was completely different than the others (B) it was presented as a separate spectrum (A).

3.6. Sorption of Nickel Ions

The isotherm showed a gradual increase in adsorption with increasing metal concentration, after which equilibrium was reached and the sorbent surface was saturated with metal (Figure 6). The obtained adsorption isotherm of Ni onto chitin was tested on two adsorption models (Langmuir and Freundlich). The parameters of each model are presented in Table 3. Analysis of these data showed that the better fit was obtained for the Freundlich isotherm.

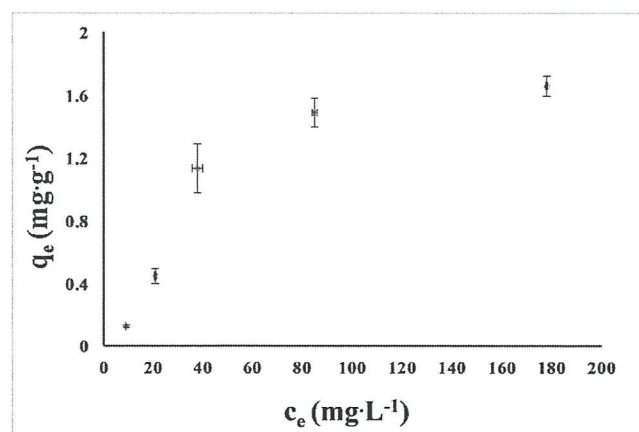


Figure 6. Isotherm curve for the adsorption of Ni²⁺ onto chitin isolated from *H. illucens* (means ($n = 3$) \pm SD (bars)) by procedure No. 3 (see Table 1) where c_e is the equilibrium Ni²⁺ concentration; q_e is the amount of Ni²⁺ adsorbed at equilibrium.

Table 3. Parameters of isotherms obtained during the sorption of Ni²⁺ on chitin.

K_L	Langmuir q_m [mg·g ⁻¹]	R^2	$q_{e \text{ exp}}$ [mg·g ⁻¹]	K	Freundlich 1/n	R^2
0.008	3.086	0.620	1.662	0.010	1.179	0.860

q_m —the maximal theoretical adsorbed amount (sorption capacity), K_L —the Langmuir constant—the quasi Gaussian energetic heterogeneity of the adsorption system, R —determination coefficient, $q_{e \text{ exp}}$ —the maximal experimental amount adsorbed at equilibrium time, K, n—empirical constants indicative of sorption capacity and sorption intensity.

3.7. Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX)

EDX analysis was performed mainly to confirm nickel ion sorption on chitin and study the biosorption mechanism. Therefore, for this purpose the chitin sample depigmented with H₂O₂ for 2.5 h (variant No. 3) and the same sample after Ni²⁺ sorption (variant No. 6) were used. Table 4 presents percentage content of individual elements. The analysed chitin samples consisted of about 60% carbon, about 25–28% oxygen, and about 9–12% nitrogen. Other elements included in the chitin were sodium and chlorine, possibly in the form of contaminating NaCl and traces of Al, Si and Ca. The content of Ni on the surface of the tested chitin after adsorption was 0.23%. A decrease in the content of elements (Na, Al, Si, S and Ca) was observed after the sorption. There were no statistically significant differences between variants Nos. 3 and 6, except for chlorine and elements whose determined amount was below the lower limit of quantification.

Table 4. The content of individual elements in the sample of chitin variant 3 and samples of chitin variant 3 with sorbed of Ni²⁺ determined by EDX (means and SD, *n* = 5).

	Variant No. 3	Variant No. 6
%C	61.56 ± 7.40	62.71 ± 3.35
%N	11.60 ± 3.64	10.90 ± 1.69
%O	25.88 ± 4.93	25.28 ± 3.19
%Na	0.37 ± 0.19	0.18 ± 0.12
%Al	0.18 ± 0.15	-
%Si	0.11 ± 0.10	-
%S	0.33	0.07 ± 0.04
%Cl	0.33 ± 0.16	0.64 ± 0.19
%Ca	0.07	-
%Zn	-	-
%Cd	-	-
%Ni	-	0.23 ± 0.06
%Pb	-	-

4. Discussion

4.1. Chitin Isolation from *H. illucens* Pupal Exuviae

The chitin isolation yield for individual variants ranged from 5.69% to 7.97% and depended on the reagent used in the depigmentation step—the stronger the reagent, the lower the isolation yield. The literature data on the isolation yield varies considerably, e.g., the isolation yield of chitin from silkworm was 2.59–4.23% [40], and from bees 18% [34], or even 19–36.8% [41]. However, these are results for chitin isolated from other sources, and the organisms differ in their chitin content [22]. Chitin was isolated from *Hermetia illucens* with a yield of about 20%, so much higher than in this study [22,25,42]. The first difference between our work and the cited studies is the source of chitin isolation—in our case it was pupal exuviae, while the other authors used dead flies. A recent study by Shin et al. confirm that chitin yield from different stages of the life cycle of the insect (larvae, pupa, and adults) showed values between 3.9% and 14.2% [43]. Another difference between the presented work and the results from the literature is the use of different concentrations of the same reagents for a different period of time and at a different temperature. Previously, chitin was isolated from *Hermetia illucens* using hydrochloric acid (5%) (at room temperature, for 2 h) and sodium hydroxide (5%) (at 100 °C, for 3 h), then the obtained precipitate was washed with ethanol, and its residues were removed with chloroform [22]. On the other hand, Hahn et al. used three different methods to measure chitin content in various insects (also *Hermetia illucens*): acid detergent fibre (ADF), acid detergent lignin (ADL), a combination of both (ADF-ADL) and acetyl group measurement. The authors concluded that the best is ADF-ADL, taking into account the statistical analysis of the results, equipment requirements, accuracy and universality of the method [42]. Brigode et al. compared the conventional method of chitin isolation from black soldier fly using acid and base (1 M HCl at 100 °C for 30 min and 1 M NaOH for 24 h) with the ADF, ADL and ADF-ADL

methods [25]. The yield of chitin obtained by the conventional and ADF-ADL methods was similar, higher results were obtained for the ADF method (3–10% higher) [25].

Abidin et al. conducted an extensive review of the literature on chitin and chitosan. They compared the methods of chemical isolation and raw materials used. Insects have been given particular attention as an alternative source to commonly used crustaceans [20]. It is difficult to choose one single method of chitin isolation that could be used for any raw material. When selecting the isolation method, it is most important not to degrade the chitin during its purification [20]. It was also noticed that the method of obtaining chitin affects the properties of the sample, so the choice of method should take into account the future use of the chitin [20]. Based on data collected by previous researchers [20], results from our work indicate that the isolation procedures (especially variant No. 3) used in this study can be used for the extraction of chitin from pupal exuviae *H. illucens*.

4.2. Optical and Confocal Microscopy

The obtained chitin samples were visually assessed with the use of optical and confocal microscopes. All samples tested had a regular surface consisting of hexagonal units. Similar results had been obtained previously using an SEM microscope [3,25]. Chitin does not have the ability of autofluorescence [44]. Chitin studies have been conducted using a confocal microscope, but the use of an appropriate reagent (e.g., fluostain) is required [45]. A new technique that enables chitin testing without sample preparation is nonlinear microscopy [46]. In this publication, the performed microscopic assessment of the samples does not provide information on the purity of the obtained materials and does not differentiate the samples but we observed a number of pores in the chitin surface (variant No 3). Same authors [10] have stated that this structure increased the chitin's ability to absorb metal ions. For this reason, this variant was chosen for the sorption of nickel ions. The strong fluorescence of the variant No. 4 is probably due to the use of a strong oxidant (H_2O_2) for a sufficiently long time (5 h) compared to the variant No. 5, where the fluorescence was weaker as $KMnO_4$ was used for depigmentation for much shorter time (20 min). It is difficult to notice significant differences in the images of the optical microscope between variant No. 6 (after sorption) and variant No. 3 (without sorption). Variant No. 6 showed weak fluorescence due to the absorption of monochromatic light; the practical total of the chitin sample glowed with reflected light (violet), while the fluorescence of variant No. 3 was slightly higher.

4.3. X-Ray Powder Diffraction (XRPD)

As mentioned above, chitin crystallite size was ~80 nm in all investigated isolation variants. A recent study confirmed these data concerning crystallite size in different forms of chitin [47]. This should be expected because the source of the chitin was the same in all cases and the isolation procedures used should not affect the crystallographic pattern.

Sorption of Ni^{2+} on chitin isolated in variant No. 3 leads to more sharp reflections in the XRPD diffraction pattern. Only this sample has a clear and sharp (0 3 3) reflection.

The degree of chitin crystallinity was similar in all chitin isolation variants and was around 60%. In the literature, the values for this parameter are very wide. Kaya et al. [48] reported that chitin crystallinity was in the range 40–80%. However it is also possible to find lower values, for instance: 25.2% from *H. illucens* pupae [49], 35% from pupae and 24.9% for imago chitin [3] or 38.82% from *H. illucens* prepupae [50]. The degree of crystallinity is strongly influenced materials sorption properties [51]. However, it should be remembered that the longer the grinding time of the sample, the smaller degree of crystallinity [52]. Therefore, it is more important to pay attention to the dependence of the degree of deacetylation (related to the presence of amino groups) and the sorption capacity [53–55].

4.4. Thermogravimetric Analysis (TG, DTG, DTA)

The decomposition of the tested chitin obtained with various isolation variants took place in two stages, which is consistent with the literature data [49,56], although there are also older articles describing a single-stage decomposition process [57–59]. The temperatures for the individual stages of different chitin variants were consistent with the literature data [49,60]. The decomposition temperature of chitin was in the range of 356–392 °C, and, for example, for the commercial chitin DTGmax it is 386 °C [48].

The applied methods of isolation affected the temperatures of decompositions and therefore it can be concluded that it influenced the composition of the obtained chitin. Although all tested samples were thermally stable, there were clear differences—up to 16 °C. The DTG max values (375.8–392.3 °C), which are the maximum decomposition temperatures, were similar for all samples of isolated chitin (variant Nos. 1–5). The highest decomposition temperature was obtained for variant No. 3 (i.e., chitin treated with H₂O₂ for 2.5 h), which makes this procedure the most favourable because the higher the decomposition temperature, the wider the possibility of chitin usage. In previous studies, it has been seen that the DTG max value of alpha chitin varied between 350 and 400 °C [61,62].

The mass loss for the tested chitins from the exuviae was 67.2–73.1%, these values are lower compared to the literature for the same material (95%) [49]. Purkayastha et al. studied chitin isolated from *Hermetia illucens*, but the DTA curves showed clear exothermic peaks in the range 339–430 °C [5]. The most comparable result was obtained for variant No. 3.

4.5. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Infrared spectroscopy is one of the classical methods for chitin identification, FTIR spectra provides detailed information on the presence of amide and amine groups and, therefore, is one of the most commonly used methods for the characterization of the degree of acetylation in chitin samples [63]. FTIR has been used to determine chitin allomorphs (alpha-, beta- and gamma-) [64] and to analyse the demineralization, deproteinization, and decolorization processes when isolating chitin from raw materials [65]. It is known that alpha chitin is found in insects [48]. In the FTIR spectra of the chitin isolated in this study, the amide I band was split at 1620 and 1652 cm⁻¹, which indicates that the chitin from *H. illucens* was in the alpha form, which has already been confirmed by the XRPD. These peaks presented in the samples regardless of the isolation method. Moreover, the chitin from *H. illucens* displayed the amide II band at wavenumber 1552 cm⁻¹ just as chitins from Orthoptera species examined by Kaya et al. [64]. The band 1307 cm⁻¹ was assigned to CON–H deformation and to the –CH₂– group (amide III). In addition, the wavenumbers at 1067 and 1008 cm⁻¹ were observed to correspond to the asymmetric and symmetric stretching vibration of the C–O–C group. Similar FTIR results have been obtained for alpha chitin isolated from various insect species [47].

The spectrum of chitin with sorbed Ni²⁺ ions was very similar to those presented in Figure 5B, i.e., for variants Nos. 2–5 and it was not presented in order not to reduce the clarity of the figure. However, one observation of this spectrum analysis seems to be important: a slight shift of bands 3369 and 2910 cm⁻¹ occurred towards longer lengths (3380 and 2920 cm⁻¹, respectively) after metal sorption. The bands correspond to the stretching vibrations of the –OH groups, hence it can be concluded that they participate in the adsorption of the metal.

Sorption was probably at least partly based on complexation involving –OH groups on the surface of the tested sorbent (chitin).

4.6. Sorption of Nickel Ions

Studies on the sorption of various heavy metals on native and modified chitin are available in the literature. The equilibrium sorption data fit both the Langmuir and Freundlich isotherms [66–69]. It is influenced by the type of metal used for sorption, but it also seems that chitin isolated from various sources also has different properties, which

also translates into metal sorption. In our study, the chitin adsorbed $1.66 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of nickel ions at pH 5.0 and nickel concentration $178 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$. It is difficult to compare the data on the sorption of metals on chitin due to the different method of conducting the adsorption process (using different weights of sorbent, different volumes of added metal solutions, different procedures and process durations). Karthik et al. studied commercial chitin modified with polypyrrole to remove Pb (II) and Cd (II) ions. The maximum metal removal capacity was 98.20% for Pb (initial $2.79 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ and final $0.05 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ concentration) and 95.77% for Cd (initial $2.84 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ and final $0.12 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$). The obtained isotherms showed similarity to the Freundlich isotherm [68]. Forutan et al. used pink shrimp chitin as a sorbent for lead ions. The highest ion removal capacity was 99.7%, with an initial metal concentration of 20 ppm. The designated isotherm showed a better fit to the Freundlich isotherm [67]. Xiang et al. studied the adsorption of Cd(II) ions on chitin. The maximum absorbed amount of metal was $93.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, and the obtained isotherm data showed similarity to the Langmuir equation [69]. Chui et al. removed metals (Cu, Cr and Ni) from aqueous solutions using chitin (derived from shrimp) packed in small columns using the Solid Phase Extraction (SFE) technique. The removal capacity of Cu and Cr was 95% and 96% respectively, while for Ni it was much lower and amounted to 44–70% (at the initial metal concentrations of 20–100 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) [70]. Yazidi et al. used ultrasonic modified chitin (from shrimp) for multi-component adsorption of Ni, Co, and Methylene Blue. The equilibrium concentration for Ni, Co and Methylene Blue was $58 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ and $6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. To determine the isotherms, 50 mL of solution containing three components with an initial concentration of up to $650 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ and 5 g of adsorbent were used [71]. Although no research has been done on metal sorption on chitin from *H. illucens*, the larvae of this insect have been used to treat municipal sewage sludge in China where heavy metals are a major problem. *H. illucens* showed great tolerance to heavy metals (including Ni, Cu, Hg, Cd); the examined metals did not significantly affect the metamorphosis and life of insects, but they slightly limited the increase in mass [72].

In order to determine the mechanism of Ni sorption on chitin, analyses were carried out using other techniques. It seems that the two sorption mechanisms presented by Kołodyńska et al. [73], i.e., ion exchange and complexation, should be taken into account. The EDX results (Table 4) showed the presence of Al and Ca before Ni sorption and these metals were not visible after sorption. The amount of Na decreased after Ni sorption. These decreases may be caused by ion exchange. Although EDX measured only a limited surface and limited depth of the material, the averaged results from multiplied measurements from different individual points on a given sample (Table 4) confirmed the above reasoning.

Information about the parallel second mechanism of sorption, i.e., complexation can be derived from FTIR results. The evidence for complexation mechanism is the shift of bands corresponding to stretching vibrations of the –OH groups. Similar conclusions regarding the sorption mechanism have already been reported [68,72]. Karthik et al. proposed that the sorption of Pb (II) and Cd (II) probably occurs through ion exchange and complexation [68]. According to other authors, the complexation of Cd (II) ions occurs through an acetylamino (–CONH–) and a hydroxyl (–OH) group [72].

4.7. Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX)

The EDX technique made it possible to compare the content of individual elements before and after sorption, and then to confirm the sorption process and make conclusions about its mechanism. In the variant No. 6, the presence of Ni ions on chitin was found, which confirms the biosorption of the tested metal. Comparing variant No. 3 and variant No. 6, a decrease in Na content can be seen. It can be assumed that this decrease may be due to ion exchange. Likewise, Acheampong et al. observed changes in the content of K and Mg in agricultural materials after the sorption process, which were replaced by the tested Cu ions [74].

5. Conclusions

In this study, we extracted chitin from *Hermetia illucens* pupal exuviae using different chemical methods. We obtained a chitin yield of 5.69–7.95% which is comparable with other insect-specific studies. Taking into account the isolation yield and the chitin properties determined by many methods (optical and confocal microscopy, FTIR, XRD, EDX, thermogravimetric analysis) we selected the best procedure of chitin isolation consisting of the following stages: (i) demineralization (1 M HCl at 22 °C for 1 h. Then neutralization with NaOH to obtain neutral pH. Rinsing by distilled water), (ii) deproteinization (1 M NaOH at 80 °C for 24 h. Then neutralization with HCl to obtain neutral pH. Rinsing with distilled water), (iii) depigmentation (9% H₂O₂ at 80 °C for 2.5 h). The longer use of H₂O₂ and more aggressive agent (KMnO₄) at the depigmentation stage resulted in a decrease in isolation yield without increasing the positive properties of chitin. The chitin extracted from *H. illucens* is in α -form, with a crystallinity degree of 60%, and maximum degradation temperature of ~392 °C. Furthermore, for the first time, we analysed and described the biosorption process of nickel ions on chitin from *H. illucens*. Sorption of Ni²⁺ ions on our chitin was comparable to the sorption on chitin of a different origin. However, it is difficult to make a detailed comparison because this type of research on nickel sorption on chitin obtained from *H. illucens* could not be found. We found that in this study, the mechanisms of ion exchange and complexation are responsible for the sorption process.

Author Contributions: Conceptualization, K.Z., A.W. and A.B.; methodology, K.Z., A.W., D.M.K., P.B. and A.B.; validation, K.Z., A.W., D.M.K. and P.B.; formal analysis, K.Z. and A.W.; investigation, K.Z., A.W., D.M.K., I.B.-W., P.B. and A.B.; resources, A.W., D.M.K. and A.B.; writing—original draft preparation, K.Z. and A.W.; writing—review and editing, K.Z., A.W., D.M.K., P.B. and A.B.; visualization, K.Z., A.W. and D.M.K.; supervision, A.W. and A.B.; funding acquisition, A.W., D.M.K. and A.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partly funded by EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND in the framework of the Polish Innovation Economy Operational Program (contract no. POIG.02.01.00-06-024/09—Centre of Functional Nanomaterials).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

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

References

1. Van Huis, A.; van Itterbeeck, J.; Klunder, H.; Mertens, E.; Halloran, A.; Muir, G.; Vantomme, P. *Edible Insects: Future Prospects for Food and Feed Security*, 1st ed.; Fao Forestry Paper: Rome, Italy, 2013; pp. 67–88.
2. Dossey, A.T.; Morales-Ramos, J.; Guadalupe Rojas, M. *Insects as Sustainable Food Ingredients, Production, Processing and Food Application*, 1st ed.; Elsevier: Cambridge, MA, USA, 2016; pp. 1–27. [CrossRef]
3. Waśko, A.; Bulak, P.; Polak-Berecka, M.; Nowak, K.; Polakowski, C.; Bieganski, A. The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from *Hermetia illucens*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *92*, 316–320. [CrossRef]
4. Čičková, H.; Newton, L.; Lacy, R.C.; Kozánek, M. The use of fly larvae for organic waste treatment. *Waste Manag.* **2015**, *35*, 68–80. [CrossRef]
5. Bzowska-Bakalarz, M.; Bulak, P.; Bereś, P.K.; Czarnigowska, A.; Czarnigowski, J.; Karamon, B.; Pniak, M.; Bieganski, A. Using gyroplane for application of *Trichogramma* spp. against the European corn borer in maize. *Pest Manag. Sci.* **2020**, *76*, 2243–2250. [CrossRef] [PubMed]
6. Draczyński, Z. *Kopoliesterbutyrylo-acetylowy Chityny Jako Nowy Aktywny Składnik Nanokompozytów Polimerowo Włóknistych*, 1st ed.; Zeszyty naukowe nr 1159, Rozprawy Naukowe; Z. 449 Politechnika Łódzka: Łódź, Poland, 2013; pp. 24–31.
7. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and Application. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 603–632. [CrossRef]
8. Park, B.K.; Kim, M.M. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 5152–5164. [CrossRef] [PubMed]
9. Majeti, N.V.; Kumar, R. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* **2000**, *46*, 1–27. [CrossRef]
10. Synowiecki, J.; Al-Khateeb, N. Production, Properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2003**, *43*, 145–171. [CrossRef] [PubMed]

11. Dutta, P.K.; Dutta, J.; Tripathi, V.S. Chitin and chitosan: Chemistry, Properties and applications. *J. Sci. Ind. Res.* **2004**, *63*, 20–31.
12. Heller, J.; Barr, J.; Ng, S.Y.; Schwach Abdellouai, K.; Gurny, R. Poly(ortho esters): Synthesis, characterization, properties and uses. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 1015–1039. [CrossRef]
13. Cuong, H.N.; Minh, N.C.; Van Hoa, N.; Trung, T.S. Preparation and characterization of high purity β -chitin from squid pens (*Loligo chinesis*). *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 442–447. [CrossRef]
14. Chen, X.; Jiang, O.; Xu, Y.; Xia, W. Recovery of Chitin from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) Shell Waste by Microbial Deproteinization and Demineralization. *J. Aquat. Food Product Technol.* **2017**, *26*, 1210–1220. [CrossRef]
15. Fadlaoui, S.; El Asri, O.; Mohammed, L.; Sihame, A.; Omari, A.; Melhaoui, M. Isolation and characterization of chitin from shells of the freshwater crab *Potamon algeriense*. *Prog. Chem. Appl. Chitin. Its Deriv.* **2019**, *24*, 23–35. [CrossRef]
16. Tolesa, L.D.; Gupta, B.S.; Lee, M.-J. Chitin and chitosan production from shrimp shells using ammonium-based ionic liquids. *Inter. J. Biol. Macromol.* **2019**, *130*, 818–826. [CrossRef]
17. Ehrlich, H.; Ilan, M.; Maldonado, M.; Muricy, G.; Bavestrello, G.; Kljajic, Z.; Carballo, J.L.; Schiaparelli, S.; Ereskovsky, A.; Schupp, P.; et al. Three-dimensional chitin-based scaffolds from Verongida sponges (Demospongiae: Porifera). Part I. Isolation and identification of chitin. *Inter. J. Biolog. Macromol.* **2010**, *47*, 132–140. [CrossRef] [PubMed]
18. Abo Elsoud, M.M.; El Kady, E.M. Current trends in fungal biosynthesis of chitin and chitosan. *Abo Elsoud El Kady Bull. Natl. Res. Cent.* **2019**, *43*, 1–12. [CrossRef]
19. Badawy, R.M.; Mohamed, H.I. Chitin extraction, Composition of Different Six Insect Species and Their Comparable Characteristics with That of the Shrimp. *J. Am. Sci.* **2015**, *11*, 127–134.
20. Abidin, N.A.Z.; Kormin, F.; Abidin, N.A.Z.; Anuar, N.A.F.M.; Bakar, M.F.A. The Potential of Insects as Alternative Sources of Chitin: An Overview on the Chemical Method of Extraction from Various Sources. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4978. [CrossRef]
21. Hahn, T.; Tafi, E.; Paul, A.; Salvia, R.; Falabella, P.; Zibek, S. Current state of chitin purification and chitosan production from insects. *J. Chem. Tech. Biotech.* **2020**, *95*, 2775–2795. [CrossRef]
22. Antonov, A.; Ivanov, G.; Pastukhova, N.; Bovykina, G. Production of chitin from dead *Hermetia Illucens*. *Iop Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2019**, *315*, 042003. [CrossRef]
23. Smets, R.; Verbinnen, B.; van de Voorde, I.; Aerts, G.; Claes, J.; Van Der Borght, M. Sequential Extraction and Characterisation of Lipids; Proteins; and Chitin from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae; Prepupae; and Pupae. *Waste Biomass Valorization* **2020**, *11*, 6455–6466. [CrossRef]
24. Younes, I.; Rinaudo, M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 1133–1174. [CrossRef] [PubMed]
25. Brigode, C.; Hobbi, P.; Jafari, H.; Verwilghen, F.; Baeten, E.; Shavandi, A. Isolation and physicochemical properties of chitin polymer from insect farm side stream as a new source of renewable biopolymer. *J. Clean. Prod.* **2020**, *275*, 122924. [CrossRef]
26. Kurchenko, V.P.; Kukulyanskaya, T.A.; Azarko, I.I.; Zueva, O.Y.; Khizmatullin, R.G.; Varlamov, V.P. Physicochemical Properties of Chitin–Melanin and Melanoprotein Complexes from Bee Corpses. *Appl. Biochem. Microb.* **2006**, *42*, 331–334. [CrossRef]
27. Pestov, A.V.; Drachuk, S.V.; Koryakova, O.V.; Yatluk, Y.G. Isolation and Characterization of Chitin-Glucan Complexes from the Mycothallus of Fungi Belonging to Russula Genus. *Chem. Sustain. Develop.* **2009**, *17*, 281–287.
28. Filipkowska, U.; Rodziewicz, J. Effectiveness of dye RB5 adsorption onto chitin and chitosan under static and dynamic conditions. *Prog. Chem. App. Chitin Its Deriv.* **2009**, *14*, 33–40.
29. Szymczyk, P.; Filipkowska, U.; Józwiak, T.; Kuczajowska-Zadrożna, M. Phosphate removal from aqueous solutions by chitin and chitosan in flakes. *Prog. Chem. App. Chitin Its Deriv.* **2016**, *21*, 192–202. [CrossRef]
30. Kousalyaa, G.N.; Gandhi, M.R.; Viswanathanc, N.; Meenakshi, S. Preparation and metal uptake studies of modified forms of chitin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47*, 583–589. [CrossRef]
31. Anastopoulos, I.; Bhatnagar, A.; Bikiaris, D.N.; Kyzas, G.Z. Chitin Adsorbents for Toxic Metals: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 114. [CrossRef]
32. Boulaiche, W.; Hamdi, B.; Trari, M. Removal of heavy metals by chitin: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Appl. Water. Sci.* **2019**, *9*, 1–10. [CrossRef]
33. de Souza, P.R.; do Carmo Ribeiro, T.M.; Lôbo, A.P.; Tokumoto, M.S.; de Jesus, R.M.; Lôbo, I.P. Removal of bromophenol blue anionic dye from water using a modified exuviae of *Hermetia illucens* larvae as biosorbent. *Environ. Monit. Assess.* **2020**, *192*, 1–16. [CrossRef]
34. Draczyński, Z. Honeybee corpses as an available source of chitin. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008**, *109*, 1974–1981. [CrossRef]
35. Percot, A.; Viton, C.; Domard, A. Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 12–18. [CrossRef] [PubMed]
36. Nwe, N.; Furuike, T.; Tamura, H. Chapter One—Isolation and Characterization of Chitin and Chitosan from Marine Origin. In *Advances in Food and Nutrition Research*, 1st ed.; Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; Volume 90, pp. 1–81. [CrossRef]
37. WAXSFIT. Available online: http://www2.ath.bielsko.pl/~{}mrabiej/waxsfite/sub/main_en/ (accessed on 4 January 2021).
38. ReX Powder diffraction. Available online: <https://www.rexpd.org/> (accessed on 4 January 2021).
39. Sikorski, P.; Hori, R.; Wada, M. Revisit of α -Chitin Crystal Structure Using High Resolution X-ray Diffraction Data. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1100–1105. [CrossRef] [PubMed]

40. Paulino, A.T.; Simionato, J.I.; Garcia, J.C.; Nozaki, J. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *64*, 98–103. [CrossRef]
41. Nemtsev, S.V.; Zueva, O.Y.; Khismatullin, M.R.; Albulov, A.I.; Varlamov, V.P. Isolation of Chitin and Chitosan from Honeybees. *Appl. Biochem. Microb.* **2004**, *40*, 39–43. [CrossRef]
42. Hahn, T.; Roth, A.; Febel, E.; Fijalkowska, M.; Schmitt, E.; Arsiwallab, T.; Zibeka, S. New methods for high-accuracy insect chitin measurement. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 5069–5073. [CrossRef] [PubMed]
43. Shin, C.-S.; Kim, D.-Y.; Shin, W.-S. Characterization of chitosan extracted from mealworm beetle (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*) and rhinoceros beetle (*Allomyrina dichotoma*) and their antibacterial activities. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *125*, 72–77. [CrossRef] [PubMed]
44. Lee, S.; Brown, R.L.; Monroe, W. Use of confocal laser scanning microscopy in systematics of insects with a comparison of fluorescence from different stains. *Syst. Entomol.* **2009**, *34*, 10–14. [CrossRef]
45. Moussian, B.; Schwarz, H.; Bartoszewski, S.; Nüsslein-Volhard, C. Involvement of Chitin in Exoskeleton Morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* **2005**, *264*, 117–130. [CrossRef]
46. Rabasović, M.D.; Pantelić, D.V.; Jelenković, B.M.; Ćurčić, S.B.; Rabasović, M.S.; Vrbica, M.D.; Lazović, V.M.; Ćurčić, B.P.M.; Krmpota, A.J. Nonlinear microscopy of chitin and chitinous structures: A case study of two cave-dwelling insects. *J. Biomed. Opt.* **2015**, *20*, 016010. [CrossRef]
47. Tsurkan, M.V.; Voronkina, A.; Khrunyk, Y.; Wysokowski, M.; Petrenko, I.; Ehrlich, H. Progress in chitin analytics. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *252*, 117204. [CrossRef]
48. Kaya, M.; Erdogan, S.; Mol, A.; Baran, T. Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 797–805. [CrossRef]
49. Purkayastha, D.; Sarkar, S. Physicochemical Structure Analysis of Chitin Extracted from Pupa Exuviae and Dead Imago of Wild Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*). *J. Polym. Environ.* **2020**, *28*, 445–457. [CrossRef]
50. Zhou, P.; Li, J.; Yan, T.; Wang, X.; Huang, J.; Kuang, Z.; Ye, M.; Pan, M. Selectivity of deproteinization and demineralization using natural deep eutectic solvents for production of insect chitin (*Hermetia illucens*). *Carbohydr. Polym.* **2019**, *225*, 115255. [CrossRef]
51. Aranaz, I.; Mengibar, M.; Harris, R.; Paños, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G.; Heras, A. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr. Chem. Biol.* **2009**, *3*, 203–230. [CrossRef]
52. Ioelovich, M. Crystallinity and Hydrophilicity of Chitin and Chitosan. *Res. Rev. J. Chem.* **2014**, *3*, 7–14.
53. Guibal, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. *Sep. Purif. Tech.* **2004**, *38*, 43–74. [CrossRef]
54. Guibal, E.; Van Vooren, M.; Dempsey, B.A.; Roussy, J. A review of the use of chitosan for the removal of particulate and dissolved contaminants. *Sep. Sci. Technol.* **2006**, *41*, 2487–2514. [CrossRef]
55. Roussy, J.; Van Vooren, M.; Dempsey, B.A.; Guibal, E. Influence of chitosan characteristics on the coagulation and the flocculation of bentonite suspensions. *Water Res.* **2005**, *39*, 3247–3258. [CrossRef]
56. Georgieva, V.; Zvezdova, D.; Vlaev, L. Non-isothermal kinetics of thermal degradation of chitin. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2013**, *111*, 763–771. [CrossRef]
57. Stolarek, P.; Ledakowicz, S. Pyrolysis kinetics of chitin by non-isothermal thermogravimetry. *Thermochim. Acta* **2005**, *433*, 200–208. [CrossRef]
58. Wanjun, T.; Cunxin, W.; Donghua, C. Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan. *Polym. Degrad. Stabil.* **2005**, *87*, 389–394. [CrossRef]
59. Arora, S.; Lal, S.; Kumar, S.; Kumar, M.; Kumar, M. Comparative degradation kinetic studies of three biopolymers: Chitin, chitosan and cellulose. *Arch. Appl. Sci. Res.* **2011**, *3*, 188–201.
60. Kaya, M.; Lelešius, E.; Nagrockaitė, R.; Sargin, I.; Arslan, G.; Mol, A.; Baran, T.; Can, E.; Bitim, B. Differentiations of Chitin Content and Surface Morphologies of Chitins Extracted from Male and Female Grasshopper Species. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0115531. [CrossRef] [PubMed]
61. Wang, Y.; Chang, Y.; Yu, L.; Zhang, C.; Xu, X.; Xue, Y.; Li, Z.; Xue, C. Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 90–97. [CrossRef]
62. Sajomsang, W.; Gonil, P. Preparation and characterization of α -chitin from cicada sloughs. *Mater. Sci. Eng. C* **2010**, *30*, 357–363. [CrossRef]
63. Kumirska, J.; Czerwicka, M.; Kaczyński, Z.; Bychowska, A.; Brzozowski, K.; Thöming, J.; Stepnowski, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 1567–1636. [CrossRef]
64. Kaya, M.; Baran, T.; Asan-Ozusaglam, M.; Cakmak, Y.S.; Tozak, K.O.; Mol, A.; Sezen, G. Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). *Biotech. Bioprocess Eng.* **2015**, *20*, 168–179. [CrossRef]
65. Poerio, A.; Petit, C.; Jehl, J.-P.; Arab-Tehrany, E.; Mano, J.-F.; Cleymand, F. Extraction and Physicochemical Characterization of Chitin from *Cicada orni* Sloughs of the South-Eastern French Mediterranean Basin. *Molecules* **2020**, *25*, 2543. [CrossRef] [PubMed]
66. Karthikeyan, G.; Andal, N.M.; Anbalagan, K. Adsorption studies of iron(III) on chitin. *J. Chem. Sci.* **2005**, *117*, 663–672. [CrossRef]
67. Forutan, R.; Ehsandoost, E.; Hadipour, S.; Mobaraki, Z.; Saleki, M.; Mohebbi, G. Kinetic and equilibrium studies on the adsorption of lead by the chitin of pink shrimp (*Solenocera melantho*). *Entomol. Appl. Sci. Lett.* **2016**, *3*, 20–26.
68. Karthik, R.; Meenakshi, S. Chemical modification of chitin with polypyrrole for the uptake of Pb(II) and Cd(II) ions. *Intern. J. Biol. Macromol.* **2015**, *78*, 157–164. [CrossRef]

69. Xiong, C. Adsorption of cadmium (II) by chitin. *J. Chem. Soc. Pak.* **2010**, *32*, 429–435.
70. Chui, V.W.D.; Mok, K.W.; Ng, C.Y.; Luong, B.P.; Ma, K.K. Removal and recovery of copper(II), chromium(III), and nickel(II) from solutions using crude shrimp chitin packed in small columns. *Environ. Intern.* **1996**, *22*, 463–468. [[CrossRef](#)]
71. Yazidi, A.; Sellaoui, L.; Badawi, M.; Dotto, G.L.; Bonilla-Petriciolet, A.; Lamine, A.B.; Erto, A. Ternary adsorption of cobalt, nickel and methylene blue on a modified chitin: Phenomenological modeling and physical interpretation of the adsorption mechanism. *Interj. Biol. Macromol.* **2020**, *158*, 595–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Cai, M.; Hu, R.; Zhang, K.; Ma, S.; Zheng, L.; Yu, Z.; Zhang, J. Resistance of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to combined heavy metals and potential application in municipal sewage sludge treatment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 1559–1567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Kołodziejka, D.; Wnętrzak, R.; Leahy, J.J.; Hayes, M.H.B.; Kwapiński, W.; Hubicki, Z. Kinetic and adsorptive characterization of biochar in metal ions removal. *Chem. Eng. J.* **2012**, *197*, 295–305. [[CrossRef](#)]
74. Acheampong, M.A.; Pereira, J.P.C.; Meulepas, R.J.W.; Lens, P.N.L. Biosorption of Cu(II) onto agricultural materials from tropical regions. *J. Chem. Techn. Biotech.* **2011**, *86*, 1184–1194. [[CrossRef](#)]

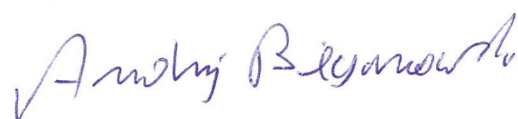
prof. dr hab. Andrzej Bieganowski
Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego
Instytut Agrofizyki PAN w Lublinie

Lublin, dnia 01/06/2021

O Ś W I A D C Z E N I E

Niniejszym oświadczam, że:

1. Jestem współautorem trzech następujących publikacji:
 - Złotko K., Wiater A., Waśko A., Pleszczyńska M., Paduch R., Jaroszek-Ścisła J., Bieganowski A. A Report on Fungal (1→3)- α -D-Glucans: Properties, Functions and Application. MOLECULES 2019, 24, 3972.
 - Nowak K., Wiater A., Choma A., Wiącek D., Bieganowski A., Siwulski M., Waśko A. Fungal (1→3)- α -D-glucans as a new kind of biosorbent for heavy metals. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES 2019, 137, 960–965.
 - Złotko K., Waśko A., Kamiński D.M., Budziak-Wieczorek I., Bulak P., Bieganowski A. Isolation of Chitin from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) and its usage to metal sorption. POLYMERS 2021, 13, 818.
2. Jako promotor wyrażam zgodę, żeby powyższe publikacje zostały wykorzystane w przewodzie doktorskim p. mgr Katarzyny Złotko
3. Pomysł podjęcia badań był opracowany w zespole: Doktorantka i obaj promotorzy. Jednakże to wkład intelektualny p. mgr Katarzyny Złotko był największy, a rola promotorów polegała na ukierunkowaniu i wspomaganie Doktorantki.
4. Doktorantka wykonała samodzielnie wiele pomiarów przedstawionych w w/w pracach. Część pomiarów wykonana była przez współautorów.
5. Doktorantka przygotowała pierwsze wersje manuskryptów wszystkich powyższych prac oraz przygotowała prace do druku.
6. Mój wkład w każdą z powyższych prac polegał na:
 - a) współtworzeniu koncepcji pracy;
 - b) pomocy w realizacji pracy na wszystkich jej etapach
 - c) korekcie manuskryptu.



O Ś W I A D C Z E N I E

Niniejszym oświadczam, że:

1. Jestem współautorem trzech następujących publikacji:
 - Złotko K., Wiater A., Waśko A., Pleszczyńska M., Paduch R., Jaroszuk-Ściśeł J., Bieganski A. A Report on Fungal (1→3)- α -D-Glucans: Properties, Functions and Application. MOLECULES 2019, 24, 3972.
 - Nowak K., Wiater A., Choma A., Wiącek D., Bieganski A., Siwulski M., Waśko A. Fungal (1→3)- α -D-glucans as a new kind of biosorbent for heavy metals. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES 2019, 137, 960–965.
 - Złotko K., Waśko A., Kamiński D.M., Budziak-Wieczorek I., Bulak P., Bieganski A. Isolation of Chitin from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) and its usage to metal sorption. POLYMERS 2021, 13, 818.
2. Jako promotor wyrażam zgodę, żeby powyższe publikacje zostały wykorzystane w przewodzie doktorskim p. mgr Katarzyny Złotko
3. Pomysł podjęcia badań był opracowany w zespole: Doktorantka i obaj promotorzy. Jednakże to wkład intelektualny p. mgr Katarzyny Złotko był największy, a rola promotorów polegała na ukierunkowaniu i wspomaganie Doktorantki.
4. Doktorantka wykonała samodzielnie wiele pomiarów przedstawionych w w/w pracach. Część pomiarów wykonana była przez współautorów.
5. Doktorantka przygotowała pierwsze wersje manuskryptów wszystkich powyższych prac oraz przygotowała prace do druku.
6. Mój wkład w każdą z powyższych prac polegał na:
 - a) współtworzeniu koncepcji pracy;
 - b) pomocy w realizacji pracy na wszystkich jej etapach
 - c) korekcie manuskryptu.



O Ś W I A D C Z E N I E

Niniejszym oświadczam, że:

1. Jestem współautorem publikacji:
 - Złotko K., Waśko A., Kamiński D.M., Budziak-Wieczorek I., Bulak P., Bieganowski A. Isolation of Chitin from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) and its usage to metal sorption. POLYMERS 2021, 13, 818.
2. Wyrażam zgodę, żeby powyższa publikacja została wykorzystana w przewodzie doktorskim p. mgr Katarzyny Złotko.
3. Pomysł podjęcia tych badań oraz większość prac związana z przygotowaniem powyższej publikacji jest wkładem intelektualnym p. mgr Katarzyny Złotko.
4. Mój wkład w powyższą pracę polegał na:
 - a) Pomocy w opracowaniu metodyki izolacji chityny
 - b) Pomocy w pracach laboratoryjnych oraz w opracowaniu wyników w zakresie izolacji chityny
 - c) korekcie manuskryptu.

Piotr Bulak

dr hab. Daniel M. Kamiński, profesor uczelni
Katedra Chemii Ogólnej, Koordynacyjnej i Krystalografii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Lublin, dnia 01/06/2021

O Ś W I A D C Z E N I E

Niniejszym oświadczam, że:

1. Jestem współautorem publikacji:
 - Złotko K., Waśko A., Kamiński D.M., Budziak-Wieczorek I., Bulak P., Bieganowski A. Isolation of Chitin from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) and its usage to metal sorption. POLYMERS 2021, 13, 818.
2. Wyrażam zgodę, żeby powyższa publikacja została wykorzystana w przewodzie doktorskim p. mgr Katarzyny Złotko.
3. Pomysł podjęcia tych badań oraz większość prac związana z przygotowaniem powyższej publikacji jest wkładem intelektualnym p. mgr Katarzyny Złotko.
4. Mój wkład w powyższą pracę polegał na:
 - a) Przeprowadzeniu pomiarów przy wykorzystaniu rentgenowskiej dyfraktometrii proszkowej. Wiązało się to z opracowaniem metodyki pomiaru, walidacji, przeprowadzeniu pomiarów oraz wizualizacji otrzymanych wyników.
 - b) korekcie manuskryptu.



dr hab. Roman Paduch, profesor uczelni
Katedra Wirusologii i Immunologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Lublin, dnia 01/06/2021

O Ś W I A D C Z E N I E

1. Jestem współautorem publikacji:
 - Złotko K., Wiater A., Waśko A., Pleszczyńska M., Paduch R., Jaroszuk-Ściseł J., Bieganowski A. A Report on Fungal (1→3)- α -D-Glucans: Properties, Functions and Application. MOLECULES 2019, 24, 3972.
2. Wyrażam zgodę, żeby powyższa publikacja została wykorzystana w przewodzie doktorskim p. mgr Katarzyny Złotko.
3. Pomysł podjęcia tych badań oraz większość prac związana z przygotowaniem powyższej publikacji jest wkładem intelektualnym p. mgr Katarzyny Złotko.
4. Mój wkład w powyższą pracę polegał na przygotowaniu pierwszej wersji rozdziałów 6.1. (Immunological Activity) oraz 6.2. (1→3)- α -d-Glucans as a Mutanase Inducers) oraz korekcie manuskryptu.
Uwaga: Ponieważ w rozdziałach tych znalazły się fragmenty opisujące moje badania dlatego, w sekcji „Author Contributions” zostało to uwzględnione. Należy jednak zaznaczyć, że badania te nie były związane z przygotowaniem i napisaniem pracy przeglądowej w MOLECULES.



O Ś W I A D C Z E N I E

1. Jestem współautorem dwóch publikacji:
 - Nowak K., Wiater A., Choma A., Wiącek D., Bieganski A., Siwulski M., Waško A. Fungal (1→3)- α -D-glucans as a new kind of biosorbent for heavy metals. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES 2019, 137, 960–965.
 - Złotko K., Wiater A., Waško A., Pleszczyńska M., Paduch R., Jaroszuk-Ścisiel J., Bieganski A. A Report on Fungal (1→3)- α -D-Glucans: Properties, Functions and Application. MOLECULES 2019, 24, 3972.
2. Wyrażam zgodę, żeby obie publikacje zostały wykorzystane w przewodzie doktorskim p. mgr Katarzyny Złotko.
3. Pomysł podjęcia tych badań oraz większość prac związana z przygotowaniem powyższych publikacji jest wkładem intelektualnym p. mgr Katarzyny Złotko.
4. Mój wkład w powyższe prace polegał na:
 - a) w przypadku publikacji w MOLECULES: konsultacji na etapie tworzenia koncepcji pracy,
 - b) przygotowaniu pierwszej wersji rozdziałów 6.2. (1→3)- α -d-Glucans as a Mutanase Inducers), oraz korekcie manuskryptu.

Uwaga: Ponieważ w rozdziałach tych znalazły się fragmenty opisujące moje badania dlatego, w sekcji „Author Contributions” zostało to uwzględnione. Należy jednak zaznaczyć, że badania te nie były związane z przygotowaniem i napisaniem pracy przeglądowej w MOLECULES.
 - c) w przypadku publikacji w INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES na przeprowadzeniu pomiarów oraz opracowaniu wyników dotyczących, analizy metylacyjnej i NMR oraz korekcie manuskryptu.

Wiater Adrian

O Ś W I A D C Z E N I E

Niniejszym oświadczam, że:

1. Jestem współautorem publikacji:
 - Nowak K., Wiater A., Choma A., Wiącek D., Bieganowski A., Siwulski M., Waśko A. Fungal (1→3)- α -D-glucans as a new kind of biosorbent for heavy metals. INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES 2019, 137, 960–965.
2. Wyrażam zgodę, żeby powyższa publikacja została wykorzystana w przewodzie doktorskim p. mgr Katarzyny Złotko.
3. Pomysł podjęcia tych badań oraz większość prac związana z przygotowaniem powyższej publikacji jest wkładem intelektualnym p. mgr Katarzyny Złotko.
4. Mój wkład w powyższą pracę polegał na nadzorowaniu przeprowadzenia pomiarów oraz współdziałanie w opracowaniu wyników dotyczących analiz ICP.

D. Wiącek