



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA

DOTTORATO DI RICERCA

SCIENZE AMBIENTALI - XX CICLO

**ESTRAZIONE, PURIFICAZIONE E VALORIZZAZIONE
DI POLISACCARIDI DA BASIDIOMICETI**

(BIO/15)

Coordinatore: Prof. Maurizio Petruccioli

Tutor interno: Prof. Enrico Mincione

Tutor esterno: Dott. Umberto Tomati

Dottoranda: Dr.ssa Francesca Di Mario

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1. I funghi: generalità	pag. 1
1.2. Potenzialità dei basidiomiceti	pag. 2
1.2.1. <i>Aspetti alimentari</i>	pag. 4
1.2.2. <i>Aspetti farmacologici e terapeutici</i>	pag. 7
1.2.3. <i>I basidiomiceti come fonte di enzimi</i>	pag. 13
1.3. Gli esopolisaccaridi (EPS)	pag. 17
1.3.1. <i>Applicazioni degli esopolisaccaridi</i>	pag. 19
1.4. Polisaccaridi della parete cellulare	pag. 20
1.4.1. <i>Glucani</i>	pag. 21
1.4.1.1. Proprietà e applicazioni dei glucani	pag. 22
1.4.2. <i>Chitina e chitosano</i>	pag. 24
1.4.2.1. Proprietà ed applicazioni della chitina e del chitosano	pag. 26
1.4.2.1.1. Applicazioni in agricoltura	pag. 27
1.4.2.1.2. Applicazioni biomediche	pag. 27
1.4.2.1.3. Applicazioni ambientali	pag. 30
2. SCOPO DELLA RICERCA	pag. 31
3. MATERIALI E METODI	pag. 33
3.1. Organismi	pag. 33
3.2. Crescita dei miceli	pag. 33
3.3. Crescita dei carpofori	pag. 34
3.4. Estrazione delle frazioni polisaccaridiche	pag. 36
3.4.1. <i>Estrazione da micelio</i>	pag. 36
3.4.2. <i>Estrazione degli esopolisaccaridi</i>	pag. 36
3.4.2.1. Effetto dei diversi esopolisaccaridi sulla produzione di aflatossine	pag. 36
3.4.3. <i>Estrazione dei polisaccaridi della parete cellulare</i>	pag. 37
3.4.3.1. Estrazione dei glucani	pag. 38
3.4.3.2. Estrazione della chitina e del chitosano	pag. 38
3.5. Spettroscopia FT-IR	pag. 39
3.6. Grado di acetilazione di chitina e chitosano	pag. 39
3.7. Cristallinità della chitina	pag. 40
3.8. Glucosamina	pag. 40
3.9. Proteine	pag. 41
3.10. Deacetilazione della chitina	pag. 41
3.11. Peso molecolare del β-glucano	pag. 41
3.12. Adsorbimento dei metalli sulle diverse frazioni polisaccaridiche	pag. 42
3.12.1. <i>Rigenerazione del chitosano</i>	pag. 42
3.13. Analisi statistica	pag. 43
4. RISULTATI	pag. 44
4.1 Crescita dei miceli	pag. 44
4.2. Estrazione dei polisaccaridi	pag. 45
4.2.1. <i>Esopolisaccaridi (EPS)</i>	pag. 45
4.2.2. <i>β-glucani</i>	pag. 47

4.2.3. <i>Chitina e chitosano</i>	pag. 49
4.3. Deacetilazione della chitina	pag. 52
4.4 Adsorbimento dei metalli sulle diverse frazioni polisaccaridiche	pag. 55
4.4.1. <i>Rigenerazione del chitosano</i>	pag. 62
4.4.2. <i>Isoterme di adsorbimento</i>	pag. 63
5. DISCUSSIONE	pag. 66
5.1. Crescita dei miceli	pag. 66
5.2. Esopolisaccaridi (EPS)	pag. 66
5.3. Glucano da <i>P. ostreatus</i>	pag. 68
5.4. Chitina e chitosano	pag. 69
5.5. Adsorbimento dei metalli pesanti	pag. 72
5.5.1. <i>Rigenerazione del chitosano</i>	pag. 75
5.5.2. <i>Isoterme di adsorbimento</i>	pag. 76
6. CONCLUSIONI	pag. 78
7. BIBLIOGRAFIA	pag. 80

1. INTRODUZIONE

1.1. I funghi: generalita'

I funghi sono organismi eucarioti filamentosi immobili, privi di plastidi e di pigmenti fotosintetici. Essi costituiscono un regno a parte anche se per molto tempo sono stati inclusi tra i vegetali.

In base alle caratteristiche citologiche del micelio, tali organismi vengono suddivisi in:

- Funghi filamentosi inferiori, appartenenti alla divisione Zigomycota, con ife cenocitiche e multinucleate;
- Funghi superiori, appartenenti alle divisioni Ascomycota e Basidiomycota, con miceli settati e setti (o pareti trasversali) perforati (Raven et al., 1990; Mauset, 2000).

Negli ascomiceti e nei basidiomiceti il micelio può organizzarsi in una struttura grande, compatta e fortemente specializzata, indicata come corpo fruttifero, che permette la produzione di spore legate alla riproduzione sessuale (Raven et al., 1990; Mauset, 2000).

I basidiocarpi sono le strutture carnose preposte alla produzione di spore, caratteristiche dei Basidiomycota.

I corpi fruttiferi presentano una vasta area superficiale con numerose lamelle o tubuli, dove l'apice delle ife che terminano su queste superfici diventano basidi, cellule apicali di forma bastoncellare in cui avvengono cariogamia e meiosi e che portano all'esterno le basidiospore (Mauseth, 2000).

Una basidiospora, germinando, produce il micelio primario che si divide mediante setti in cellule monocarioti (uninucleate).

Il micelio secondario dicariote può generarsi dalla fusione di ife primarie appartenenti a opposte categorie sessuali (eterocariote) oppure da un'ifa primaria per la mancata formazione di setti dopo la divisione dei nuclei (omocariote).

In base al loro trofismo vengono suddivisi in tre gruppi:

- biotrofi (parassiti), i quali estraggono nutrienti lentamente dai loro ospiti, spesso senza ucciderli;
- necrotrofi, che attaccano gli organismi ospiti in maniera così virulenta da ucciderli e assorbire i nutrienti rilasciati;
- saprofiti, che si nutrono di materiale organico morto (Mauseth, 2000).

- simbionti, forma di interazione biologica nella quale entrambe le specie implicate traggono vantaggio per la crescita e la sopravvivenza (Raven et al., 1990).

Uno dei più interessanti e significativi esempi di mutualismo, la simbiosi micorrizica, riguarda le interazioni tra funghi e piante vascolari, in cui il fungo aiuta a procurare sostanze nutritive minerali al suo ospite e riceve dalla pianta una parte della sua risorsa di carbonio organico (Begon et al., 1997).

I funghi assorbono le sostanze nutritive dopo parziale digestione per mezzo degli enzimi secreti all'esterno dalle cellule del fungo (Raven et al., 1990).

Nella decomposizione del legno ad opera dei funghi, si possono riconoscere tre categorie principali di funghi specialisti, in relazione all'effetto visibile prodotto dalla loro crescita su tale tessuto vegetale:

- i funghi del marciume bruno, che sono capaci di decomporre la cellulosa ed ossidano in parte la lignina, ma non la eliminano, lasciando quindi un residuo bruno costituito in prevalenza da questa molecola;
- i funghi del marciume bianco, che decompongono principalmente la lignina e le emicellulose, lasciando un residuo cellulosico bianco, ricco di cellulosa;
- i funghi del marciume soffice che sono ascomiceti e funghi imperfetti; essi degradano soprattutto emicellulosa e cellulosa, ma non sono adatti a degradare la lignina.

1.2. Potenzialità dei basidiomiceti

Le potenzialità dei basidiomiceti sono state oggetto di molti studi (Rajaratnam et al. 1992; Buswell & Chang, 1993; Hobbs, 1995; Chang & Buswell, 1996; Mizuno, ed., 1997). Durante le due fasi del loro ciclo vitale, vegetativo e fruttificazione, mostrano una grande varietà di attività fisiologiche che possono essere utilizzate per una vasta gamma di applicazioni (Fig. 1).

FUNGO

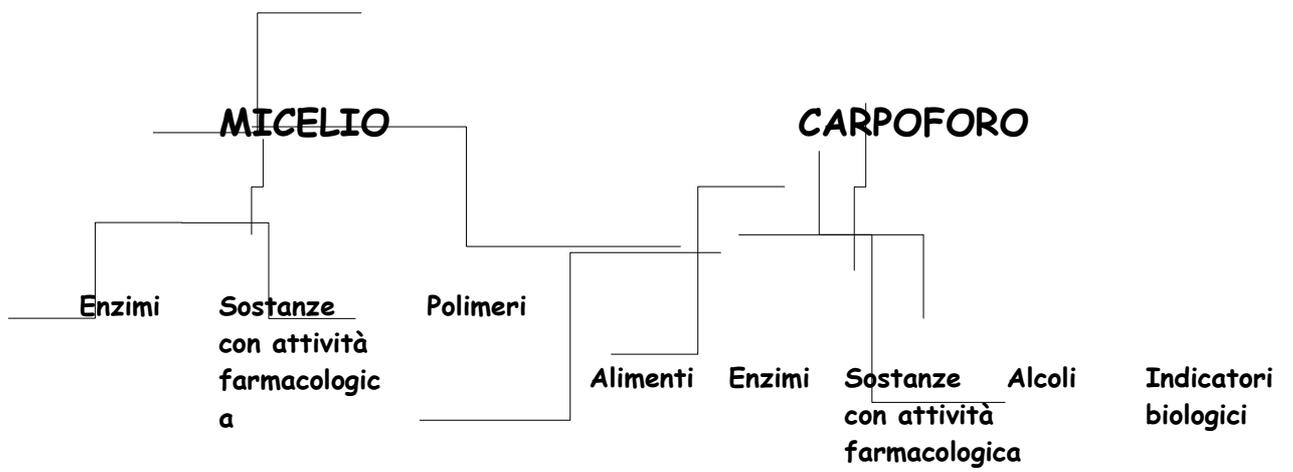


Fig.1 – Utilizzo dei basidiomiceti

1.2.1. Aspetti alimentari

I funghi contengono oltre ad una elevata percentuale di acqua, minerali e vitamine tutti gli amminoacidi essenziali e molti composti attivi. Dato il loro valore nutrizionale, sono raccomandati dalla FAO come complemento della dieta specialmente nei Paesi in via di sviluppo dove la carenza di proteine è un importante fattore nella malnutrizione delle popolazioni (FAO, 1973) ed anche in funzione della loro capacità di convertire residui vegetali in cibo di alta qualità (Rajarithnam et al., 1992).

Delle 38000 specie di funghi conosciute, circa 2000 sono commestibili; il loro valore nutrizionale, almeno per le specie commerciali, è stato oggetto di numerosi studi (Crisan & Sand, 1978; Breene, 1990; Garcha, 1993; Chang, 1993; Manzi et al., 2001; Manzi et al., 2004). La capacità dei basidiomiceti di crescere su substrati animali e vegetali in decomposizione è stata utilizzata nella coltivazione dei funghi, mirata alla produzione di cibi saporiti per le nazioni ricche, e di proteine per i Paesi in via di sviluppo.

Tra le 80 specie di funghi fatte crescere in condizioni sperimentali, circa 20 sono coltivate commercialmente e soltanto 5 o 6 prodotte industrialmente in molti Paesi (Chang, 1993). L'applicazione di tecniche di ibridazione alla coltivazione dei funghi hanno permesso di ottenere stabilità di resa e uniformità nelle dimensioni e qualità dei carpofori, adattati a specifici ambienti e coltivati su substrati di particolare composizione.

Il valore nutrizionale è, a volte, difficile da determinare a causa della mancanza di procedure uniformi di laboratorio. Il contenuto in nutrienti varia comunque grandemente tra le differenti specie e spesso anche all'interno della stessa specie in quanto dipende da numerosi fattori tra cui il substrato di crescita e lo stadio di maturità (Garcha, 1993).

Il contenuto di proteine varia dal 3.5 al 4% di peso fresco. Più del 40% degli aminoacidi presenti nei funghi sono essenziali.

I carboidrati e le fibre normalmente sono formati da pentosi come xilosio e ribosio; esosi come glucosio, galattosio e mannosio, alcool come mannitolo ed inositolo. I polisaccaridi comunemente includono il glicogeno e la chitina, il principale componente della fibra nei funghi.

I lipidi (2-8% peso secco) sono presenti nei funghi come mono-, di- e trigliceridi, steroli, esteri e fosfolipidi.

Molte vitamine, come tiamina, riboflavina, niacina, biotina e vitamina C, sono state trovate nei funghi insieme a minerali come fosforo, sodio, potassio e micronutrienti; la quantità dipende dalla concentrazione nel substrato di crescita (Breene, 1990).

I profili nutrizionali di alcune specie comuni commerciali sono riportate in tab. 1.

Tab.1 - Composizione nutrizionale di alcune specie coltivate di basidiomiceti (Fonte: Chang & Miles, 1989)

Genere	Umidità (% p.f.)	Proteine (% p.s.)	Lipidi (% p.s.)	Carboidrati (% p.s.)	Fibre (% p.s.)	Ceneri (% p.s.)	Valore Energetico (Kcal % p.s.)
<i>Agaricus bisporus</i>	78.3-90.5	23.9-24.8	1.7-8.0	51.3-62.6	3.0-10.4	7.7-12.0	328-368
<i>Agaricus campestris</i>	89.7	33.2	1.9	56.9	8.1	8.0	354
<i>Auricularia auricula-judae</i>	89.1	4.2	8.3	82.8	19.8	4.7	351
<i>Boletus edulis</i>	87.3	29.7	3.1	59.7	8.0	7.5	362
<i>Flammulina velutipes</i>	89.2	17.6	1.9	73.1	3.7	7.4	378
<i>Lentinula edodes</i>	90.0-91.8	13.4-17.5	4.9-8.0	67.5-78.0	7.3-8.0	3.7-7.0	387-392
<i>Pleurotus ostreatus</i>	73.7-90.8	10.5-30.4	1.6-2.2	57.6-81.8	7.5-8.7	6.1-9.8	345-367
<i>Volvariella displosia</i>	90.4	28.5	2.6	57.4	17.4	11.5	304
<i>Volvariella volvacea</i>	89.1	25.9	2.4	-	9.3	8.8	276

1.2.2. Aspetti farmacologici e terapeutici

Le proprietà farmacologiche e medicinali dei basidiomiceti, conosciute fin dagli albori della civiltà come confermato dal folklore e dalle tradizioni dei popoli di tutto il mondo (Hobbs, 1995), anche se ancora scarsamente conosciute, rappresentano un interessante campo di ricerca anche in vista di biotecnologie mirate alla produzione di composti farmacologicamente attivi. Intorno agli anni '80, si è riscontrato un notevole interesse verso i funghi come fonte di composti biologicamente attivi contro diverse patologie quali carcinomi, alcune classi di virus, immunopotenzianti, ipocolesterolemici ed epatoprotettori. Il mercato dei funghi medicinali e dei loro derivati nel mondo è stato di circa 1,2 bilioni di dollari nel 1991 e circa 3,6 bilioni nel 1994 (Chang, 1996). Nel 1999, il fatturato aveva raggiunto circa 6 bilioni (Wasser et al., 2000). Notevoli incrementi si sono registrati negli ultimi anni.

Questa nuova classe di composti, chiamati “nutraceutici” (Chang & Buswell, 1996), possono essere estratti sia dal micelio fungino sia dal carpoforo e rappresentano un'importante componente dell'industria biotecnologica dei funghi. I più importanti tra questi composti sono polisaccaridi, triterpeni e proteine immunomodulatorie. Sebbene tali composti siano ampiamente diffusi nei vegetali, alcune specie di funghi contengono polisaccaridi che sono particolarmente efficienti nel ritardare il progredire di varie forme di cancro ed altre malattie e di alleviare gli effetti della chemioterapia e radioterapia. Molti studi in Asia, e in particolar modo in Giappone e Cina, documentano un incremento di vita nei pazienti sottoposti ai trattamenti convenzionali integrati da somministrazione di estratti fungini (Mizuno et al., 1995; Liu, 1999; Chang & Mshigeni, 2000). Nello stesso tempo, tali estratti si sono dimostrati efficienti nel ridurre la possibilità di infezioni e nella stimolazione delle difese immunitarie.

L'80–85% di tutti i composti medicinali fungini derivano dai carpofori, come ad esempio il lentinano, un (1-3)- β -D-glucano con alto peso molecolare proveniente da *L. edodes*. Soltanto il 15% di tutti i prodotti sono basati su estratti da micelio. L'esempio più rilevante include la PSK (Crestina), un peptide legato ad un polisaccaride estratto da *Trametes versicolor*. Una percentuale minore di composti sono ottenuti da filtrati colturali, come lo schizofillano, un (1-6)- β -D-glucano ad alto peso molecolare, estratto da *Schizophyllum commune* Fr.: Fr.

I funghi indubbiamente mostrano interessanti proprietà biologiche. Le proprietà medicinali delle sostanze presenti nei basidiomiceti sono state principalmente correlate

a polisaccaridi e glicoproteine comunemente presenti nei funghi. Questi composti sono stati recentemente descritti da Wasser & Weiss (1999a) e Gunde-Cimerman (1999).

La maggior parte dei polisaccaridi con proprietà antitumorali sono glucani, composti da molecole di glucosio con legami di tipo β -D- (1-3) e β -D- (1-6).

Kosaka (1986) riporta che alcuni polisaccaridi, chiamati lentinani in quanto estratti per la prima volta da *Lentinula edodes*, accelerano la degenerazione delle cellule tumorali sia nell'uomo sia negli animali.

Aoki (1984), Lin & Huang (1987) e Liu (1988) riportano che il lentinano aumenta i linfociti T negli animali ed agisce inoltre come antivirale, immunostimolante e protettore del fegato .

Una glicoproteina solubile in acqua, isolata da *Trametes versicolor*, è capace di inibire il legame dell'HIV con i linfociti (Tochikura, 1987).

Frazioni polisaccaridiche estratte da *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus consor*, *C. cersicolor*, *Corticium certrifugum*, *Crepiotus spp*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *Phellinus linteus*, *Pholiota nameko*, *Poria coco*, *Schizophillum commune*, *Tricholoma aggregatum* e *Lentinula edodes* (Yoshioka et al., 1972; Wasser & Weiss, 1999b) hanno mostrato inibizione di alcune forme tumorali.

L'attività biologica degli estratti di *Auricularia auricula-judae* e *Tremella fuciformis* sulla biosintesi di linfociti DNA/RNA è stata riportata da Xia et al. (1987) e Misaki & Kakuta (1995). Un effetto protettivo antiulcera è stato descritto da Mizoguchi (1987). Proprietà antibiotiche, antivirali, ed attività biologiche sulla pressione del sangue e sul controllo di lipidi e zuccheri nel sangue sono stati dimostrati per un elevato numero di polisaccaridi e glicoproteine (Lindequist, 1990). I polisaccaridi non sono i soli costituenti attivi dei funghi. Molti altri composti, come terpeni e steroidi, esplicano attività biologiche contrastando alcune patologie. Agenti che impediscono l'emoagglutinazione degli eritrociti sono stati trovati in alcune specie di *Boletus*, *Clavaria*, *Lactarius*, *Russula*, *Pholiota* e *Flammulina* (Chao & Gruen, 1987; Hirano et al., 1987).

Composti in grado di diminuire l'ipertensione ed il colesterolo nel plasma sono stati isolati da *Lentinula edodes* e *Grifola frondosa* (Kabir & Kimura, 1989). Un'attività ipocolesterolemica dei funghi è stata anche riportata da Kaneda & Tokuda (1996), Arakawa et al. (1977) e Tam, (1986). Composti che possono essere impiegati nella terapia per la riduzione del diabete, dell'iperlipidemia sono stati isolati da *Pleurotus*, *Lentinula*, *Flammulina* e *Tricholoma* (Iwai et al., 1977).

Un genere particolarmente interessante è il *Pleurotus*. Le specie appartenenti al genere *Pleurotus* sono ampiamente diffuse in tutto il mondo. La medicina tradizionale in Asia, Africa, Centro e Sud America attribuisce al *Pleurotus* notevoli proprietà medicinali, incluse, tra queste, la prevenzione dell'ipertensione e dell'aterosclerosi. In accordo con la medicina tradizionale americana ed africana, la parte nutraceutica del fungo è legata alla frazione polisaccaridica del carpoforo (Liu & Yun-Sun, 1980; Gunde-Cimerman, 1999; Guzmàn, 2000).

Questi polisaccaridi sono principalmente (1-3)- β -D-glucani (Karàcsanyi & Kuniac, 1994) come il pleuromutilino (Jong & Donovich, 1989) ed il pleurano (Karàcsanyi & Kuniac, 1994).

I glucani attivano il sistema immunitario cellulare. Il loro effetto antineoplastico non è attribuito al risultato della citotossicità ma piuttosto alla stimolazione della risposta immunitaria all'ospite.

Differenti tipi di glucani provenienti dal genere *Pleurotus* spp. sono in grado di aumentare l'attività delle cellule natural-killer (NK) e di cellule killer attivate da linfocine (LAK) (Li et al., 1994).

Anche i pleurani mostrano effetti antivirali ed antinfiammatori (Zhang et al., 1994b; Gunde-Cimerman, 1999) dovuti ad una stimolazione della risposta immunitaria. Oltre ai polisaccaridi, i *Pleurotus* spp. sintetizzano terpeni con attività anticancerogena ed antibiotica come il pleurotino (Gunde-Cimerman, 1999).

Un altro interessante aspetto è la capacità di ridurre i lipidi nel sangue.

Un aumento nel sangue di lipoproteine a bassa densità (LDL) così come una riduzione dei livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL) sono tra i fattori di rischio nello sviluppo delle malattie coronariche, la principale causa di morbilità e di mortalità dei Paesi sviluppati.

Il primo passo nella prevenzione e trattamento delle malattie coronariche (CAD's) e nell'ipercolesterolemia è una modificazione del regime nutrizionale con una speciale dieta povera di grassi ed acidi grassi saturi e ricca di fibre.

Il genere *Pleurotus* è una buona fonte di carboidrati non amidacei con alto contenuto di fibre e basso contenuto calorico. L'efficienza ipolipidemica è stata principalmente attribuita all'interazione di fibre e chitosano con gli acidi della bile, che causa un aumento dell'escrezione ed una riduzione della circolazione enteroepatica della bile, accelerando il catabolismo del colesterolo attraverso un meccanismo a feedback (Bobek et al., 1994; Chobot et al. 1995).

I funghi producono metaboliti secondari come la mevilonina ed altri composti simili conosciuti come statine che sono dei potenti inibitori della 3-idrossi-3-metil-glutaril coenzima A reduttasi (HMG CoA reduttasi), il principale enzima limitante nella sequenza metabolica della biosintesi del colesterolo (Alberts et al., 1980; Endo, 1998). Tale enzima è considerato il primo ed unico bersaglio di farmaci oggi usati nella riduzione del colesterolo. Funghi appartenenti al genere *Pleurotus* sono in grado di sintetizzare mevilonina ed altri composti simili alle statine (Gunde-Cimerman et al., 1993a).

Alcuni differenti tipi di inibitori vengono prodotti da diverse specie appartenenti a *P. ostreatus*, *P. cornucopiae*, *P. sapidus*.

Le attività degli estratti di *Pleurotus* spp. insieme con composti attivi isolati purificati sono stati testati contro la HMG CoA reduttasi di cellule di ovario di criceto. Sia gli estratti che i composti isolati mevilonina-simili mostravano effetti inibitori (Gunde-Cimerman, 1993b). E' stato mostrato che l'aggiunzione del 5% (p.s.) di fungo ad una dieta ricca in colesterolo ne riduce effettivamente gli accumuli nel siero di ratto, lo ridistribuisce in favore delle HDL, riduce la produzione di VLDL ed LDL e riduce l'assorbimento del colesterolo e l'attività dell'HMG CoA reduttasi nel fegato (Bobek et al., 1994).

Studi clinici condotti su pazienti hanno mostrato che 15-20 g (p.s.) di fungo aggiunti alla dieta giornaliera per circa un mese aumenta il numero di pazienti con ipercolesterolemia ridotta (Bobek et al., 1998) e si osserva una considerevole riduzione delle VLDL ed LDL ed un aumento delle HDL.

La riduzione delle VLDL e delle LDL potrebbe essere spiegata attraverso l'azione combinata delle fibre e l'inibizione della HMG CoA reduttasi mentre il meccanismo attraverso il quale i funghi possono aumentare la concentrazione delle HDL non è ancora chiaro (Gunde-Cimerman, 1999).

In tab. 2 vengono riportate le principali proprietà biomedicinali dei basidiomiceti.

Tab.2 - Proprietà biomedicinali di alcune specie di basidiomiceti

Specie	Antifungini	Antinfiammatori	Antitumorali	Antibatterici e Antiparassitari	Antivirali	Regolatori di pressione sanguigna	Malattie cardiovascolari	Iperlipidemia	Antidiabetico	Immunomodulatore	Epatoprotettore	Problemi nervosi	Problemi respiratori	Problemi gastrici
<i>Agaricus bisporus</i>			X					X	X	X				
<i>Agaricus campestris</i>			X	X										
<i>Agrocybe aegeritas</i>	X	X						X				X		
<i>Amanita muscaria</i>			X									X		
<i>Armillaria mellea</i>	X				X	X						X		X
<i>Auricularia auricola-judae</i>			X		X	X	X					X	X	
<i>Boletus edulis</i>		X												
<i>Fomes fomentarius</i>		X	X	X										X
<i>Fomitopsis pinicola</i>		X					X					X		
<i>Ganoderma lucidum</i>		X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	
<i>Grifola frondosa</i>	X		X	X	X	X			X	X	X		X	
<i>Lentinula edodes</i>		X	X	X	X			X	X	X	X		X	
<i>Pleurotus ostreatus</i>			X	X	X	X	X	X	X	X		X		
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	X		X			X	X	X	X					
<i>Schizophyllum commune</i>		X	X	X								X		
<i>Trametes versicolor</i>			X	X	X						X	X		
<i>Tremella fuciformis</i>		X	X						X	X		X		
<i>Tricholoma matsutake</i>													X	X
<i>Volvariella volvacea</i>			X	X			X				X			

Un ulteriore interessante aspetto dell'attività biologica di alcuni basidiomiceti è la capacità di inibire la crescita di microfunghi parassiti e/o la produzione di micotossine. In particolare sono stati studiati l'*Aspergillus parasiticus* (Speare) e l'*A. flavus* (Link) che, utilizzando come substrato di crescita differenti prodotti alimentari di origine vegetale e animale, producono aflatossine (Ellis et al., 1991). Le aflatossine sono

composti cancerogeni, teratogeni e mutageni per l'uomo e per gli animali. Dalla metà dell'800 il problema della contaminazione di cibi ad opera di tali tossine ha coinvolto notevolmente la comunità scientifica. Nonostante i progressi ottenuti nella conservazione dei cibi per prevenire colonizzazioni fungine e produzione di aflatossine, si è ancora lontani dal raggiungimento del risultato. La strategia chimica per prevenire infezioni fungine punta sul controllo della contaminazione del suolo e sui prodotti di decadimento originati dai fungicidi che rimangono nelle derrate alimentari. Il controllo biologico della formazione di aflatossine è ancora agli inizi e sono necessari studi circa la loro formazione.

Le informazioni ottenute potrebbero contribuire al controllo della formazione di micotossine. Studi sull'argomento hanno dimostrato che la produzione di aflatossine è strettamente correlata alla perossidazione delle membrane cellulari fungine sia in vitro che in vivo (Fanelli et al., 1984). Composti come alometani e aldeidi attivati via citocromo P 450, producono radicali che incrementano la produzione di aflatossine da parte di *A. parasiticus* e *A. flavus*, attraverso la promozione della perossidazione dei lipidi insaturi delle membrane cellulari. Alcuni radicali e antiossidanti, testati su mezzi sintetici in presenza di composti che inducono aflatossine, ne inibiscono la stimolazione (Fanelli et al., 1985). E' stato messo in evidenza che filtrati di colture di *L. edodes* inibiscono la produzione di aflatossine da parte di *A. parasiticus* se aggiunti alla coltura liquida, mentre il micelio, precedentemente inoculato su semi, inibisce la crescita di *A. parasiticus* (Fanelli et al., 2000).

1.2.3. I basidiomiceti come fonte di enzimi

I materiali a matrice ligninocellulosica costituiscono il substrato elettivo per la crescita e lo sviluppo dei funghi in quanto tali organismi possiedono un adeguato corredo enzimatico costituito da cellulasi, emicellulasi, proteasi e ligninasi. Questa ultima classe è costituita da un complesso sistema enzimatico che include, tra l'altro, le polifenolossidasi.

La lignina è il più abbondante rinnovabile composto aromatico presente in natura e costituisce un materiale difficilmente degradabile a differenza degli altri componenti del legno, cellulosa ed emicellulosa, che vengono facilmente metabolizzati da numerosi batteri e ascomiceti. La lignina è presente in natura sotto differenti forme, normalmente classificate come hard-wood e soft-wood lignin, che possono essere degradate da

funghi che possiedono speciali corredi enzimatici (Zadrazil & Reineger, eds., 1988; Eriksson et al., 1990; Rajarathnam et al., 1992).

Le cellulasi sono complessi enzimatici che catalizzano l'idrolisi dei legami 1,4- β -D-glicosidici nella cellulosa. L'attività cellulastica è stata evidenziata in numerosissime specie fungine (Danilyak & Katsan, 1987; Semichaevskii, 1988). Ginterova et al. (1980a) hanno messo in evidenza l'attività cellulastica in quarantasette ceppi di *Pleurotus*. La maggiore attività è stata riscontrata in ceppi di *P. cornucopiae* e *P. japonicus*. Attività cellulastica è stata ritrovata in numerose altre specie, quali *Armillaria mellea* (Danilyak et al., 1989), *Chrysosporium lignorum* (Canevascini & Gattlen, 1981), *Irpex lacteus* (Kanda et al., 1983; Kubo & Nishizawa, 1983), *Panus tigrinus* (Danilyak et al., 1989), *Polyporus hirsutus* (Danilyak & Katsan, 1987; Danilyak et al., 1989) ed altre appartenenti al genere *Polyporus* (Nigam & Prabhu, 1988); *Phanerochaete chrysosporium* (Jafelice et al., 1988; Jafelice et al., 1990); *Sporotrichum spp* (Kim et al., 1985; Kashiwagi et al., 1985; Tamada et al., 1986; Klesov et al., 1985; Kvachadze et al., 1985; Canevascini & Gattlen, 1981; Cossar & Canevascini, 1986; Bhat & Maheswari, 1987); *Termitomyces clypeatus* (Sengupta & Sengupta, 1990).

L'attività e l'abbondanza delle cellulasi è oggetto di discussione in quanto esse dipendono dal metodo di estrazione, dal materiale di partenza, dal test enzimatico, dall'età della coltura e dalla specie, come è stato dimostrato da Mel' nichuk & Danyliac (1981) per *Armillaria mellea*, *Flammulina velutipes*, *Hypholoma sublateritium*, *Panus tigrinus*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus cornucopiae*, da Semichaevskii et al. (1985) per *Lentinus edodes*, da Ginterova et al. (1980b) per *Pleurotus spp*.

L'attività emicellulasica è stata messa in evidenza in numerose specie fungine. Rajaratham (1987) ha studiato lo sviluppo delle diverse emicellulasi del *P. flabellatus*. E' stato notato un aumento dell'attività durante la crescita. Simili risultati sono stati ottenuti per *P. sajor-caju*, (Madan & Bisaria, 1983) per *P. ostreatus* (Hong, 1976) e per *P. ostreatus var. floridae* (Sharma, 1987). Complessi emicellulosici capaci di degradare emicellulose a xilobiosio, glucosio e arabinosio, ma non a xilosio, sono state osservate per *Agaricus bisporus*.

Le proteasi sono normalmente presenti nei funghi (Tapia et al., 1981; Dosoretz et al., 1990) e catalizzano la rottura del legame peptidico tra il gruppo amminico ed il gruppo carbossilico fornendo l'azoto necessario per la sintesi di nuove proteine.

L'attività delle proteasi aumenta costantemente durante lo spawn e durante la fruttificazione. Un aumento dell'attività proteasica è spesso riscontrata quando la crescita del fungo viene effettuata su substrati carenti di azoto. Questo probabilmente permette ai funghi di degradare i composti azotati necessari per la biosintesi delle proteine (Rajaratnam et al., 1987).

Una proteasi con attività trombolitica è stata evidenziata in *Flammulina velutipes* (Gavrilova et al., 1980; Tapia et al., 1981). Proteasi con simili attività sono state isolate anche da *Phanerochaete chrysosporium* (Chao & Gruen, 1987; Dosoretz et al., 1990); *Pleurotus flabellatus* (Rajaratnam et al., 1987), *Auricularia auricula-judae*, e *Lentinula edodes* (Tapia et al., 1981).

Con il termine "ligninasi" si indica genericamente un gruppo di isoenzimi che catalizzano la depolimerizzazione della lignina. Le ligninasi sono enzimi extracellulari prodotti dalla quasi totalità dei funghi. Complessi enzimatici quali laccasi, perossidasi e catalasi, sono stati studiati in *Auricularia*, *Coriolus*, *Flammulina*, *Favolus*, *Lentinula*, *Pleurotus*, *Stereum*, *Trametes*, *Tremella* e *Tyromyces* (Wood & Kellogg, 1988). Particolarmente studiato è il complesso secreto da *Phanerochaete chrysosporium* (Tien & Kirk, 1983).

Le laccasi furono scoperte da Bertrand nel 1896 nell'albero della vernice (*Rhus vernicifera*) che secerne, qualora danneggiato, un lattice contenente fenoli e la laccasi in grado di riparare i danni con un meccanismo comparabile a quello del sistema di coagulo del sangue negli animali. Le laccasi, particolarmente studiate nel *Trametes versicolor* (Thurston, 1994), sono prodotte dalla maggior parte dei funghi degradatori della lignina. Nei funghi le laccasi sono coinvolte nella delignificazione, nella sporulazione (Leatham & Stahman, 1981), nella produzione dei pigmenti (Clutterbuck, 1972; Smith et al., 1989), e nella patogenesi di alcune piante (Marbach et al., 1985; Geiger et al., 1986).

Sono state riportate applicazioni delle laccasi in alcuni processi ossidativi industriali di delignificazione della polpa di legno e di sbiancamento dei residui colorati (Archibald et al., 1990), nella sintesi di polimeri, come ad esempio la produzione di polifenilenossidi a partire da acido sirigico (Ikeda et al., 1996).

Le laccasi vengono impiegate nella preparazione industriale della carta, processo che richiede la separazione e la degradazione della lignina per l'ottenimento di cellulosa. Pretrattamenti della pasta di legno con enzimi ligninolitici forniscono strategie meno invasive rispetto alle tecniche convenzionali di delignificazione/sbiancamento a base di

cloro, meno inquinanti e permettono di ottenere un prodotto in cui viene mantenuta integra la cellulosa (Kuhad et al., 1997).

Un'altra interessante applicazione è l'utilizzo delle laccasi nell'industria alimentare per l'eliminazione di fenoli, responsabili del colore bruno e dell'intorbidimento dei succhi di frutta, birra e vino (Rodríguez Couto & Toca Herrera, 2006).

Le perossidasi sono enzimi molto diffusi in natura, di fatto possono essere ritrovate in animali, piante e microrganismi dove svolgono un importante ruolo nelle reazioni di lignificazione, nella rimarginazione delle ferite e nel catabolismo dell'auxina.

Per quanto riguarda i funghi, specie come *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete sordida*, *Trametes hirsutus* e *Fusarium culmorum* hanno dimostrato eccezionale abilità nel degradare completamente la lignina a biossido di carbonio mediante un meccanismo d'azione di tipo radicalico che coinvolge un complesso sistema multienzimatico costituito dalle perossidasi e dagli enzimi produttori di H₂O₂ e che comprende alcol veratrilico, manganese e ossalato (Cameron et al., 2000). Gli enzimi che catalizzano la reazione di degradazione della lignina in *P. chrysosporium* sono la Lignina perossidasi (LiP) e la Manganese perossidasi (MnP): entrambe determinano l'ossidazione di mediatori radicalici, i quali, a loro volta, causano l'inizio della reazione di degradazione.

Le perossidasi trovano applicazione in ambiti diversi che spaziano dalla diagnostica clinico-analitica alla terapeutica, dalla biocatalisi di composti organici di interesse industriale alla decontaminazione di suoli e reflui industriali, dalla transgenomica alla bioinformatica.

Sebbene le perossidasi abbiano sicuramente un buon potenziale come biocatalizzatori le loro applicazioni commerciali sono per ora limitate.

Il campo commerciale più evoluto per l'applicazione delle perossidasi è la diagnostica analitica in cui si ritrovano sia nei saggi immunoenzimatici che nei biosensori.

Confrontate con i test che richiedono citocromo P-450 ed altre monoossigenasi, le perossidasi risultano maggiormente attraenti dal punto di vista economico poiché comportano l'utilizzo di ossidanti meno dispendiosi come i perossidi al posto dei più esosi ossigeno molecolare o NADPH.

La catalasi (EC 1.11.1.6) appartiene al gruppo delle perossidasi, utilizzando come substrato l'acqua ossigenata per la sua trasformazione in acqua ed ossigeno.

Ad eccezione dei microrganismi anaerobi, tutti gli esseri viventi contengono catalasi. Nei mammiferi essa è concentrata soprattutto nel fegato, nei reni e nei globuli rossi del sangue.

È l'enzima responsabile dell'intenso schiumeggiare del perossido di idrogeno ogni volta che viene messo in contatto con un tessuto.

La catalasi protegge le strutture viventi dall'azione nociva dell'acqua ossigenata che continuamente si forma nei tessuti per numerosi processi chimici fisiologici.

È usata nell'industria casearia per eliminare il perossido di idrogeno dal latte durante la produzione del formaggio. Un'altra sua applicazione si riscontra negli imballaggi per alimenti, in cui ne previene l'ossidazione, e nell'industria tessile. Recentemente, la catalasi è stata usata anche nell'industria cosmetica.

1.3. Gli Esopolisaccaridi (EPS)

I polisaccaridi extracellulari (EPS) sono una classe eterogenea di polisaccaridi, oligosaccaridi e glicoproteine. Le principali frazioni degli esopolisaccaridi (EPS) sono insolubili in acqua (circa l'80% del totale) e sono composti principalmente da (1,3) e (1,6) β -D-glucani. Le frazioni a peso molecolare minore, solubili in acqua, contengono D-glucosio, D-mannosio, D-galattosio e proteine e presentano residui di tipo amidico ed idrossilico che possono essere coinvolti nei legami proteina-polisaccaride (Gutiérrez et al., 1996). La differenza nella composizione, nel tipo di legame glicosidico e nel grado di ramificazione, l'influenza delle strutture secondaria e terziaria delle singole catene, determinano le proprietà che sono correlate alle loro funzioni fisiologiche e strutturali (Gutiérrez et al., 1996). Durante la crescita dei funghi, gli esopolisaccaridi sono coinvolti in diversi tipi di meccanismi come l'adesione al substrato, l'immobilizzazione di enzimi esocellulari, la prevenzione della disidratazione ifale e lo stoccaggio di nutrienti in eccesso (Manzoni & Rollini, 2001).

Molti funghi eduli e medicinali rispondono direttamente ai fattori ambientali e, per alcuni, le condizioni nutrizionali determinano il grado di formazione dell'esopolisaccaride (Yang & Liau, 1998; Bae et al., 2000; Jonathan & Fasidi, 2001a, Jonathan & Fasidi, 2001b; Park et al., 2001; Sinha et al., 2001; Kim et al., 2001, Kim et al., 2002; Fang & Zhong, 2002).

La produzione di esopolisaccaridi può essere influenzata non soltanto dalla fonte di carbonio utilizzata per la crescita dei miceli ma anche dalle condizioni biotecnologiche:

la produzione di metaboliti secondari è infatti spesso correlata sia alla morfologia fungina sia alla composizione del mezzo di coltura (Manzoni & Rollini, 2001). Durante la crescita fungina il problema del trasferimento di ossigeno alla biomassa aumenta all'aumentare della viscosità del brodo di coltura, che è frequentemente correlato alla produzione di EPS (Compere et al., 1980). D'altra parte la morfologia della biomassa stessa può essere modificata da parametri chimici e meccanici dipendenti dalle condizioni di coltura. In coltura sommersa, i fattori più importanti che influenzano la formazione del pellet sono le forze di taglio dell'agitatore, l'inoculo e la composizione del mezzo. Così il controllo della morfologia del fungo e le dimensioni delle particelle del pellet sono importanti per aumentare la produttività, l'ottimizzazione dell'ossigeno ed il suo trasferimento al substrato (Cui et al., 1997; Márquez-Rocha et al., 1999).

La maggior parte dei basidiomiceti sono potenziali produttori di esopolisaccaridi. Gli EPS ottenuti a partire da miceli cresciuti in coltura liquida sono facilmente recuperabili trattando il brodo di coltura soltanto con etanolo ed ottenendo una resa maggiore rispetto ai corpi fruttiferi dove il trattamento in etanolo è preceduto da un trammento alcalino. Gutiérrez et al., 1996 riportano che le analisi NMR C-13 evidenziano similarità tra gli EPS prodotti da alcune specie appartenenti al genere *Pleurotus* con quelli prodotti da altri basidiomiceti, come quelli ottenuti ad esempio attraverso una estrazione alcalina da carpofori di *Grifola frondosa* ed *Amanita muscaria*. E' stato riportato dagli stessi Autori che gli EPS estratti da *P. cryosporium*, implicati nella degradazione della lignina, presentano la stessa composizione, struttura e grado di ramificazione degli EPS estratti da differenti specie di *P. ostreatus*. La resa di EPS estratti da *P. ostreatus* era del 4,5% circa.

1.3.1. Applicazioni degli esopolisaccaridi

Gli esopolisaccaridi, dopo il recupero e la caratterizzazione possono essere impiegati per diverse applicazioni (Burns et al., 1994).

La possibilità di utilizzare tali biopolimeri per applicazioni industriali, soprattutto in ambito alimentare, rappresenta una grande opportunità per migliorare ed approfondire lo studio di alcune specie fungine ancora non ben investigate.

Esopolisaccaridi estratti da lattobacilli, lattococchi, streptococchi e bifido batteri, vengono impiegati nell'industria casearia per la produzione di yogurt, kefir, formaggi e dessert a base di latte. Gli EPS possono agire sia come agenti compattanti che come

stabilizzanti, aumentando la viscosità del prodotto finale e stabilendo dei legami di idratazione che interagiscono con la parte acquosa e gli altri costituenti del latte, come proteine e micelle, per fortificare la rigidità della struttura della caseina (Duboc & Mollet, 2001).

Esopolisaccaridi estratti da *Antrodia cinnamonea* esibiscono attività di antiossidanti e scavengers di radicali liberi (Song & Yen, 2002), stimolando l'attività dei macrofagi e l'attività dei virus anti-epatite B (Lee et al., 2002).

L'attività dipende non soltanto dalla produzione della biomassa ma anche dalle proprietà del polimero prodotto come messo in evidenza per diversi ceppi di *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus* e *Trametes villosa* (Maziero et al., 1999)

La presenza di composti con attività antiossidante, come mannitolo e tioprolina (Kurashima et al., 1990) è stata trovata nel micelio e nei carpofori di *Dictyophora indusiata*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Tricholoma giganteum* (Mau et al., 2001) e *Kleissleriella* spp. (Sun et al., 2004).

Un aspetto di particolare interesse è la biosintesi di esopolisaccaridi capaci di inibire alcune micotossine e/o gli organismi che le producono quali *Aspergillus parasiticus* ed *A. flavus*, funghi ampiamente diffusi ed in grado di contaminare gli alimenti ed i mangimi attraverso la liberazione di aflatossine. Tali alimenti, quando consumati, inducono problemi di salute acuti e tossicità cronica. Tra i loro più seri effetti sulla salute umana e degli animali si annoverano l'induzione del cancro a livello epatico e la soppressione del sistema immunitario (Jackson & Groopman, 1999). Le aflatossine sono strettamente correlate con la perossidazione della membrana cellulare sia in vitro (mezzo sintetico) che in vivo (semi oleosi e amidacei).

Alcuni studi riportano l'effetto inibente di esopolisaccaridi prodotti da un isolato di *Lentinula edodes* sulla produzione di aflatossine (Fanelli et al., 2000), effetto analogo a quello di alcuni antiossidanti come l'idrossitoluene butilato (BHT), l'idrossianisolo butilato (BHA) o la cisteamina (Fanelli et al., 1985). In uno studio condotto da Jayashree & Subramanyam (2000) viene riportata l'importanza dell'effetto dello stress ossidativo sulla parete fungina durante la biosintesi delle aflatossine.

Nel modello seme/fungo, alcuni Autori (Tsitsigiannis et al., 2001) hanno messo in evidenza l'importanza degli idroperossidi in posizione 9 e 13 dell'acido linoleico nella modulazione della produzione di aflatossine da parte di *Aspergillus* spp. ed è stato

sottolineato che i lipoperossidi influenzano l'espressione dei geni coinvolti nella sintesi delle micotossine.

Non è ancora chiaro però se gli antiossidanti lavorino attraverso un'interazione diretta con le specie reattive o attraverso la stimolazione del sistema antiossidante presente nella parete cellulare fungina (Reverberi et al., 2005). Studi sugli antiossidanti in cellule animali hanno rivelato che molti di loro agiscono attraverso la stimolazione dei fattori di trascrizione, come l'AP-1, che regola l'espressione dei geni coinvolti nell'espulsione delle specie reattive con l'ossigeno (ROS) come ad esempio superossido dismutasi, catalasi e glutatione perossidasi (Harschman et al., 1988).

Nei lieviti, il fattore di trascrizione omologo ad AP-1, Yap-1, è coinvolto nello stesso meccanismo di regolazione.

1.4. Polisaccaridi della parete cellulare

La parete cellulare dei basidiomiceti è sostanzialmente costituita da glucani, chitina e chitosano, anche se in piccole quantità.

1.4.1. Glucani

I β -glucani costituiscono un gruppo eterogeneo di polimeri costituiti da uno scheletro formato da unità di glucosio in catena lineare unite da legame glucosidico $\beta(1,3)$ o $\beta(1,4)$ e ramificazioni laterali di unità glicopiranosiliche unite da legami $\beta(1,6)$ di distribuzione e lunghezza variabile (Yadomae, 1992) (Fig.2).

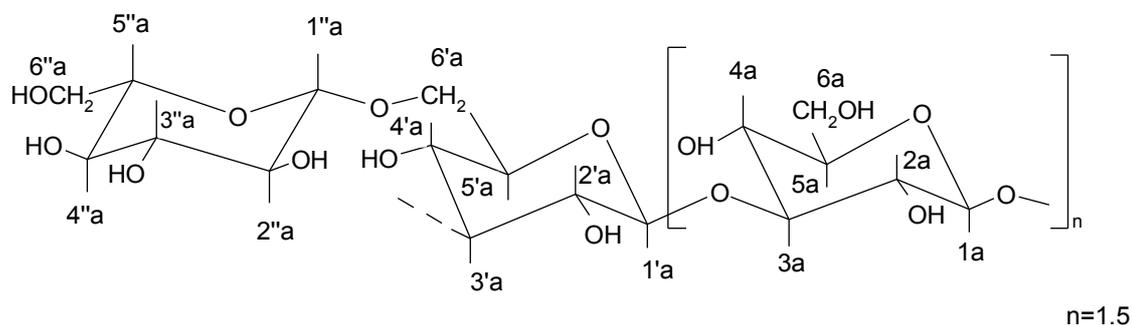


Fig. 2.-. Struttura del lentinano isolato da *Lentinula edodes*

La variabilità strutturale è elevatissima sia per le possibilità combinatorie sia per i molteplici tipi di ramificazione, dalle quali dipendono le proprietà biologiche.

I glucani, molto diffusi nel mondo vegetale, sono presenti in notevole quantità nei basidiomiceti. Alcuni esempi sono il lentinano estratto da *Lentinula edodes* (Fig. 2) e lo schizofillano, estratto da *Schizophyllum commune* (Yadomae & Ohno, 1996; Wasser & Weiss, 1999b; Tomati et al., 2004). I glucani, insieme alla chitina, rappresentano la maggiore componente polisaccaridica della parete cellulare dei funghi (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 1991).

I β -glucani sono localizzati sulla superficie cellulare e sembrano avere differenti funzioni fisiologiche rispetto ad altri polisaccaridi secreti fuori della parete cellulare (Reshentikov et al., 2001). L'interesse per questi polimeri è nato nei primi anni del 1900, quando, per la prima volta, è stata descritta la capacità dei lieviti di inattivare il complemento serico, un gruppo di proteine che mediano le risposte immunologiche ed antinfiammatorie.

Studi più approfonditi su questa classe di composti iniziarono sul finire degli anni '80 quando si comprese la loro capacità di stimolare l'apparato immunitario e la correlazione tra tale attività e la struttura del composto.

La biosintesi dei β -1,3-glucani è stata studiata in *Phyptora cinnamoni*, *Cochibolus miyabeanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Achlya ambisexualis*, *Filobasidiella neoformans* e *Candida albicans* (Zevenhuizen & Bartnicki-Garcia, 1968; Reiskind & Mullins, 1981; Kopecka & Kreger, 1986; Surarit et al., 1988; Sanchez Hernandez et al., 1990).

La biosintesi viene catalizzata da un complesso di proteine di membrana, la β -glucan-sintasi (UDP-glucose:1,3- β -D-glucan 3- β -D-glucosyl transferase, EC 2.4.1.34), a partire da UDP glucosio. Il complesso enzimatico viene stimolato da fattori di stress esterni capaci di alterare la composizione della parete cellulare, mediante un complesso enzimatico capace di rispondere prontamente a stimoli esterni perturbanti la composizione della parete. (Ruiz-Herrera 1991; Bickle et al. 1998).

1.4.1.1. Proprietà e applicazioni dei glucani

Lo studio delle proprietà medicinali di questi polisaccaridi, oggetto di numerosi studi (Furue, 1986; Yadomae, 1992; Bohn & Bemiller, 1995) ha evidenziato una significativa attività immunomodulante, riscontrabile in vitro con l'aumento del numero e della funzionalità dei macrofagi, delle cellule Natural Killer (NK) e di alcune

sottopopolazioni di cellule T, nonché dalla modulazione dell'espressione di specifiche citochine e fattori di crescita.

La capacità di immunomodulazione è molto variabile e sembra influenzata sia dalla solubilità in acqua, dalla dimensione delle molecole e dalle tipologie di legame, sia dalla frequenza, collocazione e lunghezza delle ramificazioni.

Studi in vitro dimostrano che i β -glucani ad alto peso molecolare possono attivare direttamente i leucociti stimolando il processo di fagocitosi, la citotossicità e l'attività antimicrobica, inclusa la produzione di radicali liberi di ossigeno e la produzione di citochine.

Secondo Fadok et al. (2000) i β -glucani ad alto peso molecolare aumenterebbero anche le capacità di riconoscimento ed eliminazione delle cellule apoptotiche da parte dei macrofagi.

Anche i β -glucani a intermedio e basso peso molecolare hanno evidenziato attività biologica in vivo, ma i loro effetti a livello cellulare sono meno chiari.

I β -glucani a più basso peso molecolare (5000-10000 Dalton) sono invece considerati inattivi.

Per la loro capacità di interagire con il sistema immunitario per aumentare o diminuire specifici aspetti della risposta dell'ospite, i β -glucani sono classificati come Modificatori di Risposta Biologica (BRM) (Vetvicka & Yvin, 2004; Bohn & BeMiller, 1995), cioè sostanze ad attività non specifica delle quali non sono conosciuti nel dettaglio i meccanismi di azione.

I primi studi sui β -glucani hanno dimostrato che il loro utilizzo stimolava i macrofagi (Di Luzio et al., 1976), i neutrofili (Morikawa et al., 1985) e le cellule Natural Killer (NK) (Scaringi et al., 1988) ad attaccare e uccidere le cellule tumorali sensibili. Altri studi suggeriscono che i β -glucani possono promuovere una risposta specifica T cellulo-mediata (Suzuki et al., 1993).

Si ipotizza che le molecole polisaccaridiche dei funghi medicinali si leghino, con un classico meccanismo "lock and key" a recettori specifici situati sulla membrana dei macrofagi.

Il legame del β -glucano con il recettore stimola la cellula macrofagica ma è fondamentale la specificità strutturale del ligando.

I recettori che medierebbero la risposta dei β -glucani fino ad ora identificati sono 3:

- il dominio lectinico del recettore del complemento di tipo 3, (CR3), altamente espresso in neutrofili, monociti e cellule NK, ma meno espresso nei macrofagi (Xia et al., 1999).
- il recettore dectina-1 preferenzialmente espresso nei macrofagi e assente nelle cellule NK (Brown & Gordon 2001; Ross, et al., 1999)
- una classe di recettori chiamata “scavenger della classe A” (SR-A) (Brown & Gordon, 2003).

Recettori per i β -glucani sono stati identificati anche al di fuori delle cellule del sistema immunitario tra cui le cellule endoteliali (Ahren, et al., 2001), le cellule dell'endotelio vascolare (Lowe, et al., 2002), i fibroblasti (Kougias, et al., 2001) e cellule dell'ipofisi anteriore (Breuel et al., 2004) per cui sembrerebbero distribuiti ampiamente nell'organismo.

I β -glucani non si ritrovano negli animali, ma sono riconosciuti, sebbene in modo significativamente diverso, sia dal sistema immunitario innato dei vertebrati che degli invertebrati. Nei vertebrati il riconoscimento avviene attraverso recettori di membrana. Negli invertebrati il riconoscimento avviene invece nell'emolinfa grazie ad una serie di proteine solubili e ad un recettore di membrana identificato in *Drosophila*.

La somministrazione in vivo dei β -glucani sia per via orale che endovenosa ha dimostrato effetti di potenziamento delle risposte dell'ospite a condizioni patologiche quali la trasformazione neoplastica e lo sviluppo di patologie infettive virali, batteriche, fungine e protozoarie.

Sulla base delle sperimentazioni effettuate, in alcuni Paesi, specialmente dell'Estremo Oriente, queste molecole sono routinariamente utilizzate in molte patologie (Zhang et al., 1994; Gunde-Cimmerman, 1999) e sindromi antifiammatorie (Li et al., 1994).

1.4.2. Chitina e chitosano

La chitina, scoperta dal chimico e farmacista francese Henri Braconnot nel 1811, è il componente principale della parete cellulare dei funghi (basidiomiceti, ascomiceti, e ficomiceti) e dei batteri, dell'esoscheletro degli artropodi, come i crostacei (granchi, aragoste, gamberi e gamberetti) e gli insetti (formiche, scarafaggi, farfalle), della radula dei molluschi e della penna dei cefalopodi (seppie e polpi) (Ruiz-Herrera, 1992).

Nella parete cellulare dei funghi, la chitina è spesso associata a β -glucani legati a proteine per formare una matrice polisaccaridica a volte stratificata. Anche se in piccole quantità è presente, la forma deacetilata della chitina, il chitosano. Molti organismi posseggono chitina deacetilasi (CDA: E.C. 3.5.1.41), enzima che catalizza la conversione della chitina a chitosano per deacetilazione dei gruppi N-acetilglucosamina (Araki & Ito, 1975; Tsigos & Bouriotis, 1995). Dopo la [cellulosa](#), la chitina è il più abbondante [biopolimero](#) presente in natura.

In tab. 3 vengono riportate le stime globali annuali dei materiali chitinosi accessibili come fonte di chitina.

Tab.3 – Stime globali annuali dei materiali chitinosi accessibili come fonti di chitina

Fonte di chitina	Quantità ottenuta (10³ ton)	Scarti contenenti chitina (10³ ton)	Chitina potenziale (10³ ton)
Crostacei	1.700	154	39
Krill	18.200	801	56
Vongole/Ostriche	1.390	483	22
Seppie	660	21	1
Funghi	790	182	32
Totale	22.740	1.640	150

Dal punto di vista chimico si tratta di un polisaccaride costituito da più unità di acetilglucosammina (più specificamente, N-acetil-D-glucos-2-ammina) legate tra di loro con un legame di tipo β -1,4, lo stesso delle unità di glucosio che formano la cellulosa (Fig. 3). Pertanto la chitina può essere considerata come una cellulosa nella quale al gruppo idrossile su ogni monomero è stato sostituito un gruppo ammidico.

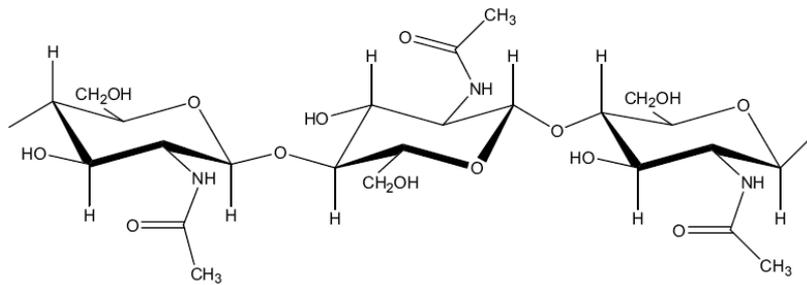


Fig. 3 - Struttura chimica della chitina

La chitina è insolubile in soluzioni acquose e solventi organici a causa del suo alto grado di cristallinità (Hirano, 1996). Per essere utilizzata convenientemente, dopo estrazione, deve essere trasformata nella sua forma deacetilata, il chitosano (Fig. 4) che viene ottenuto per trattamento con sodio idrossido concentrato (No & Mayers, 1997).

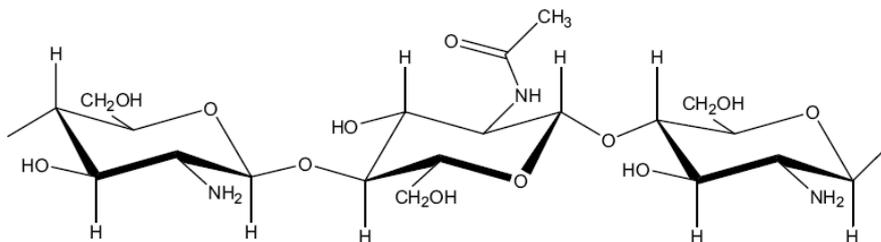


Fig. 4 – Struttura chimica del chitosano

La deacetilazione della chitina ha una grande importanza industriale in quanto le proprietà del chitosano ne rendono possibile l'applicazione in molti campi industriali come cosmetica, farmaceutica, alimentare, agricoltura, trattamento di reflui industriali contaminati da metalli. Allo stato attuale, la fonte più conveniente per l'ottenimento della chitina sono gli scarti dei crostacei (Shahidi and Synowieski, 1991). Negli ultimi anni, si è considerata la possibilità di ottenere, in termini economicamente validi, chitina da biomasse fungine (Muzzarelli, 1977; Knorr et al., 1989 Wu et al., 2004). In

questo caso, il chitosano può essere ottenuto con trattamenti deacetilanti meno drastici, con conseguente minore contaminazione ambientale (Chang et al., 1997).

1.4.2.1. Proprietà ed applicazioni della chitina e del chitosano

La più importante e vantaggiosa caratteristica della chitina è la sua buona reattività chimica. Essa possiede infatti un grande numero di gruppi reattivi presenti in posizione 2, 3 e 6 della molecola di glucosio. Tali gruppi permettono reazioni di sostituzione diretta (esterificazioni e eterificazioni) o modificazioni chimiche (idrolisi, ossidazione, degradazione enzimatica) per ottenere diversi polisaccaridi usati per specifiche applicazioni.

Numerosi studi sulla struttura e proprietà della chitina e dei suoi derivati hanno aperto numerose prospettive per l'utilizzo di tali prodotti. In particolare chitina, chitosano e loro derivati hanno riscosso un grande interesse per applicazioni in agricoltura, medicina e biotecnologie dovute alla loro biocompatibilità, biodegradabilità e bioattività (Kurita, 1998; Felse & Panda, 1999; Kumar, 2000; Synowiecki & Al Khateeb, 1997).

1.4.2.1.1. Applicazioni in agricoltura

La chitina ed il chitosano inducono meccanismi di difesa contro patogeni di diverse specie vegetali. Riduzioni significative delle lesioni causate da *Botrytis cinerea* e *P. expansum* sono state riportate da Wu et al. (2005) su alberi di mele e da Glaouth et al., (1997); Agrawal et al., (2002); Ben-Shalom et al. (2003) su piante orticole; una generale protezione contro patogeni è stata riportata da Pospieszny et al., (1991) e da Struszczyk & Pospieszny (1997).

L'impiego del chitosano nel trattamento di semi, foglie, frutta e verdura riduce la perdita di peso durante lo stoccaggio e ne previene la senescenza (Devlieghere et al., 2004). L'impiego in aggiunta a fertilizzanti per controllarne il rilascio è stato sperimentato da Sukwattanasinitt, et al. (2001). Un aumento nella resa di alcune colture è stata evidenziata da Wanichpongpan et al. (2001); Chandkrachang, (2002) e Nwe et al. (2004). Sono stati inoltre accertati effetti stimolanti sulla crescita delle piante (Bautista-Ban̄os et al., 2003), sulla differenziazione e sulla crescita delle radici e di varie piante (Chibu & Shibayama, 2001; Lay Nge et al., 2006).

1.4.2.1.2. Applicazioni biomediche

Il chitosano è un materiale biodegradabile e biocompatibile (Mattioli-Belmonte et al., 1997; Shigemasa & Minami, 1995; Muzzarelli & Biagini, 1993). Le sue caratteristiche, unite alle proprietà antisettiche (Choi et al., 2001), lo rendono efficace per applicazioni biomediche. Il panorama delle possibili applicazioni della chitina e dei suoi derivati in campo medico, in questa sede solo brevemente accennate, è stato esaustivamente considerato da Felse & Panda (1999) e Rinaudo et al., (2006).

Tra le applicazioni più importanti sono da ricordare:

- Applicazioni nella terapia anticancro

In questo campo sono stati impiegati chitina e chitosano coniugati con 5-fluoro uracile: sono stati ottenuti risultati molto più efficaci, selettivi e meno tossici del 5-fluoro uracile normalmente usato (Ouchi, 1990; Ouchi, et al., 1990).

-Applicazioni nel controllo del rilascio di farmaci

Composti della chitina, quali la carbossimetilchitina, sono stati usati come carrier di medicinali iniettabili. La biodegradabilità e solubilità della chitina carbossimetilata può essere impiegata per ottenere una migliore tolleranza e un lento rilascio del farmaco (Tokura et al, 1990). In questo campo è stato approfondito la cinetica del rilascio di principi attivi da parte di membrane di chitosano (Bonvin & De Bertorello, 1994). Buoni risultati sono stati riscontrati con un idrogel ottenuto per crosslinking del chitosano con glutaraldeide (Kang De et al., 1994).

Nell'ambito del rilascio dei farmaci, numerosi altri derivati sono stati sperimentati, tra questi la di-idrossipropil chitina (Yoshihiro et al., 1993) e l'idrossi propil chitosano acetato (Thomas, et al., 1994).

- Cicatrizzazione di tessuti

La possibilità di usare chitosano e chitina nel trattamento delle ferite deriva dall'alta biodegradabilità di tali sostanze e biocompatibilità con i meccanismi di cicatrizzazione (Yimin, 1994).

Il positivo effetto sulla rigenerazione dei tessuti danneggiati, per la cicatrizzazione delle ferite e per la rigenerazione delle ossa viene riportato da Seiichi et al. (1994); Tokura et

al. (1990) e può essere correlato ad una incrementata proliferazione dei fibroblasti F 1000 che forniscono un'ottima matrice per la coagulazione (Lip Yong et al., 1994).

- Chitina e derivati come sostituti del sangue, di tessuti e negli impianti

Data la sua alta biocompatibilità, il chitosano e la chitina sono usati nella preparazione di lenti a contatto e nelle medicazioni dell'occhio. Tali prodotti hanno un più basso contenuto di acqua e minori effetti secondari rispetto a quelli convenzionali (Felse & Panda, 1999).

Come sostitutivi del sangue sono stati studiati due derivati polionici della chitina, carbossimetil chitina e un complesso ottenuto facendo adsorbire carbossimetil chitina sulla superficie di liposomi (Mobed & Chang, 1994).

In alcune osteopatie possono essere impiegati preparati ottenuti incorporando idrossiapatite nelle soluzioni di chitina. E' stato inoltre preparato un sostitutivo della pelle dai carpofori di *Ganoderma tsugae*. Si tratta di un copolimero formato da 1,3 β -glucano e N-acetilglucosammina con altissime proprietà cicatrizzanti (Ching-Hua et al., 1997; Okamoto et al., 1997).

I derivati della chitina trovano impieghi in odontoiatria come innesti e protesi.

- Applicazioni biotecnologiche della chitina e dei suoi derivati

La chitina ed i suoi derivati, in particolare il chitosano, hanno trovato numerose applicazioni tecnologiche. Tra queste, sono da ricordare il loro impiego nella bioseparazione delle agglutinine del germe di grano. In questo caso le agglutinine vengono separate quasi al 100% con una resa del 70% (Senstad & Mattiason, 1989). La chitina è stata impiegata per incrementare la produzione di alcool da melasse di canna da zucchero. L'aggiunta di chitina riduce il tempo di fermentazione da 72 a 30 ore, incrementando la resa del 6% (Patil & Patil, 1989). La chitina ed i suoi derivati mostrano una particolare efficienza nell'immobilizzazione di biomolecole. Ad esempio, la glucoamilasi viene immobilizzata covalentemente dalle particelle di chitina con una efficienza superiore a quella di altre molecole comunemente usate (Denise & Geraldo, 1990). L'alta efficienza del chitosano per l'immobilizzazione di biomolecole è stato evidenziato per lipasi (Jei-Fu et al., 1990), per xilanasi e proteasi (Dumitriu et al., 1994). Alcuni studi fanno ipotizzare che il chitosano possa avere buone applicazioni come materiale strutturante per assemblare tessuti ingegnerizzati (Peluso et al., 1994).

1.4.2.1.3. Applicazioni ambientali

Sono tra le più interessanti prospettive per l'uso di chitina e derivati. Il chitosano e i suoi derivati hanno gruppi idrofobici molto efficienti per la rimozione di coloranti da diversi reflui. In particolare se ne è prospettato l'impiego per l'eliminazione di coloranti dagli effluenti della lavorazione delle fibre tessili (Kim et al., 1997). Chitina e derivati hanno una efficienza 2,5 volte superiore a quella dei materiali usualmente impiegati (Baoshan et al., 1994); particolarmente efficienti risultano nella rimozione di coloranti acidi (Joseph, 1994) ed azo-coloranti (Shimizu e al., 1995).

Un aspetto particolarmente importante è quello che riguarda l'adsorbimento di metalli pesanti. Numerosi studi hanno messo in evidenza la capacità dei derivati della chitina nell'adsorbimento di cadmio e piombo (Kim et al., 1997), del rame (Muraleedham & Venkobacher, 1990) e di numerosi ioni metallici presenti nei reflui galvanotecnici come argento, zinco, piombo, rame, nickel, cobalto, cadmio, ferro e cromo (Udyabhaskar et al., 1990). In alcuni casi l'adsorbimento supera il 90%. Resine a base di chitosano presentano un'alta efficienza dell'adsorbimento di metalli nobili e vengono utilizzate nel recupero di tali metalli. Nel caso dell'oro si è raggiunto una efficienza di 7,11 mmoli di metallo per grammo di resina (Caihua & Yuwu, 1996). Una buona efficienza è stata riscontrata anche per il mercurio (Yoshihada & Takeshi, 1997).

Promettenti risultati sono stati ottenuti anche per l'adsorbimento di ioni uranio che vengono adsorbiti e scambiati tramite i gruppi carbossilici e amminici del chitosano (Jansson-Charrier et al., 1995). E' stata messa a punto una tecnica per rimuovere l'uranio presente nelle acque di falda. Si è riscontrata una capacità di adsorbimento di 3,9g /L per chilogrammo di chitina (Lenhart et al., 1997).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Le specie di funghi conosciute variano tra 14000 e 22000. Il numero di specie presenti sulla Terra è stimato essere 14000, ma solo il 10% di essi è conosciuto. Assumendo che la proporzione tra i funghi considerati tra quelli sconosciuti e non esaminati è solo del 5%, questo implica 7000 specie non ancora conosciute potrebbero portare effetti benefici per l'umanità. (Hawksworth, 2001).

Anche tra le specie conosciute la proporzione di funghi ben investigati è molto bassa. Questo fatto, insieme alla conoscenza sulle grandi potenzialità dei funghi microscopici per la produzione di metaboliti bioattivi [e.g. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Tolyptocladium inflatum*, *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.], l'esperienza nell'uso dei funghi etnomedicinali, il bisogno di funghi per produrre metaboliti secondari bioattivi, e le crescenti possibilità per la genetica, analisi chimica e farmacologica, ci fanno presupporre che i funghi abbiano una grande potenzialità come materiale di partenza per l'estrazione di molecole di alto interesse e come organismi impiegabili per biotecnologie di successo.

I basidiomiceti presentano una vasta gamma di reazioni chimiche, biochimiche e di biosintesi in quanto sono in grado di sintetizzare un vasto spettro di metaboliti secondari. Molti di questi, specialmente quelli con azione farmacologica sono attualmente oggetto di interessanti studi e ricerche. Le caratteristiche metaboliche dei basidiomiceti li rende inoltre suscettibili di applicazioni ambientali. Infatti, per la loro capacità di crescere su qualsiasi tipo di spoglie vegetali con matrice lignino-cellulosica, sono un potenziale strumento per eliminare, o meglio riciclare, una vasta tipologia di reflui e sottoprodotti dell'agricoltura e dell'industria agroalimentare. Senza alcun dubbio, la più importante applicazione industriale è la produzione dei carpofori ad uso alimentare. Comunque, considerare i basidiomiceti solo come fonte di alimento significa sottovalutarne considerevolmente la loro potenzialità. Il loro impiego per il disinquinamento ambientale come ad esempio la depurazione di reflui, il biorimedio di aree contaminate, il bioadsorbimento di metalli pesanti e radionuclidi presenti negli effluenti industriali, destano un sempre maggiore interesse. I benefici effetti dell'applicazione ambientale dei basidiomiceti sono strettamente legati al loro corredo enzimatico, specialmente fenolossidasi, ed alla presenza di polisaccaridi, in particolare chitina e chitosano, presenti nelle pareti cellulari. Negli ultimi tempi, grande interesse

hanno destato una serie di composti farmacologicamente attivi, specialmente β -glucani, per i quali si prospettano applicazioni per molte patologie.

Scopo principale della presente tesi è stato quello di considerare i Basidiomiceti come fonte di composti naturali, di valutare la possibilità di estrarre da essi, in particolare da *Pleurotus* spp., una serie di composti biologicamente attivi e di prospettarne il possibile utilizzo. La ricerca ha preso principalmente in considerazione :

- polisaccaridi, noti per la loro capacità antiossidante;
- i β -glucani , per il loro interesse farmacologico;
- chitina e chitosano, polisaccaridi presenti nella parete cellulare, di grande interesse farmacologico ed ambientale. Quest'ultimo aspetto è stato particolarmente investigato, tenuto conto dell'alta capacità di adsorbimento di tali polimeri nei confronti di metalli pesanti.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Organismi

I funghi utilizzati nell'ambito di questa tesi sono stati forniti dall' International Bank of Edible Saprophytic Mushrooms (IBESM), situata presso l'Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale del CNR, Area della Ricerca di Roma 1. In tale struttura sono conservati circa 800 ceppi fungini appartenenti a diversi generi di funghi eduli, provenienti da diverse parti del mondo e catalogati con sigla SMR seguita da numeri in progressione.

Essi vengono conservati in frigo ad una temperatura di + 4°C in provette contenenti estratto di malto al 3% ed agar all' 1,5%.

Per le varie analisi sono stati utilizzati i seguenti ceppi:

Agaricus bisporus (SMR 13), *Auricularia auricula-judae* (SMR54), *Lentinula edodes* (SMR 90), *Trametes versicolor* (SMR 117), *Armillaria mellea* (SMR 439), *Pleurotus ostreatus* (SMR 684), *Pleurotus eryngii* (SMR 755).

3.2. Crescita dei miceli

Gli inoculi sono stati preparati facendo crescere ogni organismo in tre beute contenenti 50 ml di MEP (3% estratto di malto, 0,5% peptone) a 25°C con una agitazione di 150 rpm per 10 giorni.

I miceli sono stati poi omogeneizzati sterilmente in un Omni-mixer (Omni International mod 17106) per 3 s.

50 ml di sospensione miceliale (equivalenti a 400 mg di peso secco) sono stati inoculati in beute contenenti 1000 ml di MEP.

La crescita della biomassa è stata monitorata come peso fresco e secco su 25 ml di coltura dopo 7, 14, 21, 28 e 35 giorni.

Il resto della biomassa ottenuta è stata filtrata su garza, lavata con acqua distillata e liofilizzata.

3.3. Crescita dei carpofori

Micelio di *Pleurotus ostreatus* (SMR 684) è stato fornito alla ditta ITALMIKO srl che ha provveduto al suo inoculo all'interno di sacchi sterili contenenti paglia di grano.

I sacchi incubati a 25°C per 25-30 giorni al buio sono stati successivamente trasferiti in una serra parzialmente climatizzata con temperatura di 15-20°C ed una umidità dell' 80-90% per la fruttificazione. Dopo circa 15-20 giorni i carpofori ottenuti sono stati raccolti, liofilizzati ed utilizzati per analisi successive.

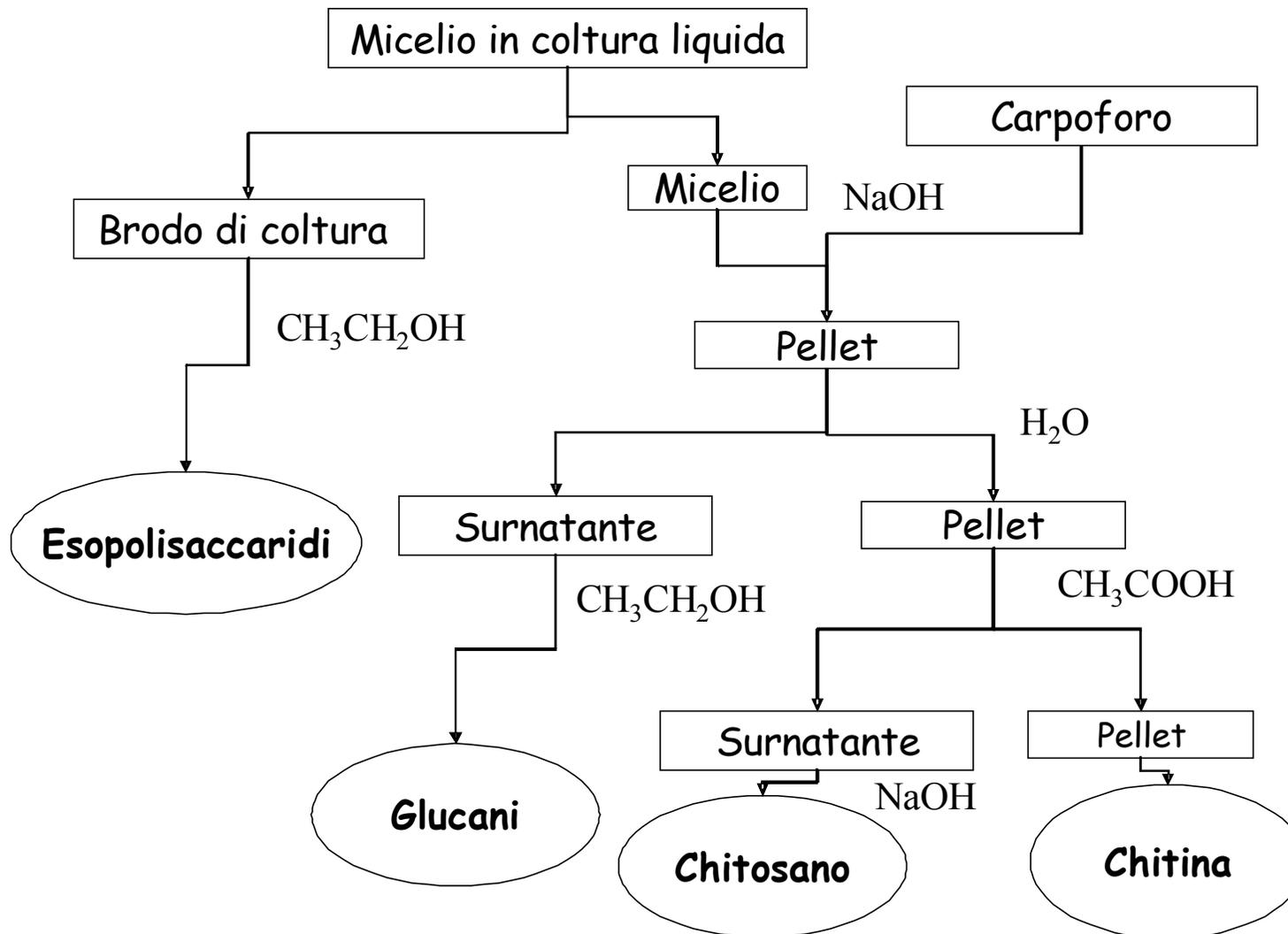


Fig.5 – Estrazione delle diverse frazioni polisaccaridiche

3.4. Estrazione delle frazioni polisaccaridiche

Il processo di estrazione è stato condotto separatamente sulla coltura miceliale e/o sui carpofori. La coltura miceliale permette l'estrazione degli esopolisaccaridi che vengono rilasciati nel brodo di coltura.

La schema di estrazione è riportato in Fig. 5.

3.4.1. Estrazione da micelio

Il micelio di 21 giorni di età è stato separato dal brodo colturale per filtrazione su garza sterile. Sul brodo di coltura è stata condotta l'estrazione degli esopolisaccaridi (EPS).

3.4.2. Estrazione esopolisaccaridi

Tale processo permette di far precipitare i polisaccaridi e concentrarli in un piccolo volume.

Il filtrato, raffreddato a 4°C è stato addizionato con etanolo in rapporto 1:1 v/v.

Dopo 3 ore il campione è stato centrifugato a 5000 g per 30 min.

Il supernatante è stato scartato mentre il pellet è stato sottoposto al trattamento in etanolo per altre due volte e poi sospeso nel minimo volume di acqua, dializzato contro acqua e liofilizzato.

3.4.2.1. Effetto dei diversi esopolisaccaridi sulla produzione di aflatossine

Gli esopolisaccaridi (EPS) estratti dal terreno colturale di *Lentinula edodes* (SMR 90), *Trametes versicolor* (SMR 117), *Pleurotus ostreatus* (SMR 684) e *Auricularia auricula-judae* (SMR 054), sono stati utilizzati per valutare l'inibizione della produzione di aflatossine e della crescita di *Aspergillus parasiticus*.

Aspergillus parasiticus (Speare) (NRRL 2999), produttore di aflatossine del tipo B₁, B₂, G₁ e G₂ è stato fatto crescere su un terreno di coltura Potato Dextrose Agar (PDA) (27 g l⁻¹ PDB + 1,5% agar) ed incubato per 7 giorni a 30°C.

Le frazioni liofilizzate di EPS (0,7% p/v) sono state aggiunte a 25 ml di Potato Dextrose Broth (PDB) (27 g l⁻¹ PDB).

Le beute sono state inoculate con i conidi ($1 \times 10^6 \times 0,2 \text{ ml}^{-1}$ di acqua distillata) di *A. parasiticus* ed incubate a 30°C.

La crescita fungina e la produzione delle aflatossine sono state determinate dopo 3, 6 e 9 giorni di incubazione e comparate con quelle presenti in un controllo non trattato.

La crescita di *A. parasiticus* è stata determinata separando per filtrazione (filtro Millipore, 0.45µm) il micelio dal brodo di coltura.

Dopo essere stato lavato con soluzione fisiologica salina (NaCl 0.9 % p/v) per tre volte ed una volta con acqua distillata il micelio è stato seccato a 80°C per 48 ore e poi pesato.

Le aflatossine ($B_1+B_2+G_1+G_2$) sono state determinate secondo il metodo di Fanelli et al., (2000) estraendole dai miceli e dai filtrati con cloroformio:metanolo (2:1 v/v) per tre volte. Gli estratti sono stati raccolti dopo filtrazione su Na_2SO_4 anidro, concentrati sotto flusso di azoto e quantificati tramite cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) usando un cromatografo Perkin Elmer PL 75.

E' stata utilizzata una colonna Supelco LC-18 usando metanolo/acqua 50/50 v/v come fase eluente e flusso pari a 0.5 ml min^{-1} . Queste condizioni sperimentali permettono di rilevare una quantità di aflatossine con un limite di 10 ng ed un loro recupero dal substrato del 95%.

3.4.3. Estrazione dei polisaccaridi della parete cellulare

β - glucani, chitina e chitosano sono stati isolati a partire dalla componente solida separata per filtrazione dal brodo di coltura e dai carpofori:

2 g di campione liofilizzato sono stati sospesi in 100 ml di NaOH 1 N in beute da 250 ml. Le beute sono state lasciate in agitazione per una notte a 150 rpm ad una temperatura di 40°C.

La sospensione è stata centrifugata a 5000 g per 30 minuti.

Il trattamento è stato ripetuto per tre volte.

La centrifugazione origina due frazioni: un supernatante che viene scartato ed un precipitato costituito dai polisaccaridi costituenti la parete cellulare dei funghi.

Il precipitato ottenuto dalla coltura miceliale e/o dal carpoforo è stato sospeso in acqua a 100°C e tenuto in agitazione per una notte e successivamente centrifugato a 5000 g per 30 minuti.

La centrifugazione origina due frazioni: un supernatante, contenente la frazione glucanica, ed un pellet contenente chitina e chitosano.

3.4.3.1. Estrazione dei glucani

L'estrazione dei glucani è stata effettuata trattando il supernatante con etanolo a 4°C in rapporto 1:1 v/v.

Dopo 3 ore di agitazione il campione è stato centrifugato a 5000 g per 30 min e il pellet sospeso nel minimo di volume di acqua.

Il trattamento è stato ripetuto per altre due volte.

Il pellet è stato sospeso nel minimo volume di acqua, dializzato contro acqua e liofilizzato.

3.4.3.2. Estrazione della chitina e del chitosano

Il pellet, lavato tre volte con acqua a 100°C è stato trattato con 50-100 ml di CH₃COOH 5%, lasciato in agitazione a 90°C per 3 h e successivamente centrifugato.

Sono state ottenute due frazioni: il supernatante contenente chitosano ed il pellet contenente la chitina.

Il pellet, costituito da chitina, è stato lavato per tre volte con acqua distillata e liofilizzato.

Il supernatante, portato a pH 12 con NaOH 1 N, è stato centrifugato a 5000 g per 20 min.

Il precipitato (chitosano) è stato lavato due volte con acqua distillata fino a raggiungere la neutralità e poi liofilizzato.

3.5. Spettroscopia FT-IR

La spettroscopia infrarossa è stata effettuata sulle diverse frazioni polisaccaridiche usando come standard di riferimento: chitina (Sigma), chitosano (Pharmitalia) e glucano (Sigma).

Gli spettri IR sono stati registrati da 4000 a 700 cm^{-1} con un Nicolet Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometer Perkin-Elmer mod. 16 F PC.

La pasticca per l'analisi del campione è stata preparata miscelando 1 mg di campione con 100 mg di KBr.

3.6. Grado di acetilazione della chitina e del chitosano

Il grado di acetilazione (DA) è stato determinato utilizzando il metodo di Neugebauer et al. (1989) che sfrutta la reazione colorimetrica che si sviluppa nel contatto acido picrico-aminogruppi.

5 mg di campione liofilizzato e finemente tritato sono stati posti in una colonnina da 2,5 ml tappata con lana di vetro silanizzata e collegata ad una pompa peristaltica avente un flusso di 0,5 ml min^{-1} .

Sono stati aggiunti 1,5 ml di N,N-Diisopropylethylammina (DIPEA) 0,1 M (in metanolo) per rimuovere gli eventuali residui salini. La colonna è stata poi lavata facendo passare 10 ml di metanolo assoluto.

Per far avvenire il legame tra acido picrico ed aminogruppi è stato aggiunto 1 ml di acido picrico 0,1 M (in metanolo).

Dopo 6 h, nella siringa sono stati fatti passare 30 ml di metanolo per rimuovere l'acido picrico in eccesso.

L'aggiunta di 1 ml di DIPEA 0,1 M permette la formazione di un complesso DIPEA-picrato che viene eluito tramite 10 ml di metanolo e letto allo spettrofotometro a 358 nm.

I risultati ottenuti sono stati quantificati attraverso una retta di taratura determinata utilizzando una soluzione di DIPEA in concentrazioni note.

3.7. Cristallinità della chitina

La cristallinità è stata determinata in accordo con il metodo descritto da Focher et al. (1990) determinando il rapporto tra le intensità delle bande a 1379 e 2900 cm^{-1} dello spettro FT-IR dei campioni.

3.8. Glucosamina

La quantità di glucosamina è stata determinata secondo il metodo di Plassard (1997).

20 mg di chitina liofilizzata e finemente tritata è stata posta in un tubo di vetro. Ai campioni sono stati aggiunti 5 ml di HCl 6 N, lasciati per 3 ore a temperatura ambiente e poi incubati per 16 ore a 80°C.

I tubi sono stati raffreddati in acqua e successivamente sono stati aggiunti 5 ml di acetato di sodio (CH_3COONa) 1,25 N.

I campioni sono stati diluiti con acqua distillata in rapporto 1:5.

La concentrazione della glucosamina è stata determinata colorimetricamente a 653 nm per differenza tra l'assorbanza totale e l'assorbanza legata ai gruppi aldeidici.

L'assorbanza totale (aldeidi + aminosuccheri) è stata determinata aggiungendo a 1 ml di soluzione idrolizzata 1 ml di idrogenosolfato di potassio (KHSO_2) 5 % (p/v) e 1 ml di nitrito di sodio (NaNO_2) 5% (p/v).

L'assorbanza dovuta ai gruppi aldeidici è stata determinata aggiungendo ad 1 ml di soluzione idrolizzata 1 ml di KHSO_2 5 % (p/v) e 1 ml di acqua distillata.

Dopo aver agitato, le miscele sono state lasciate riposare per 15 minuti (tempo di deaminazione).

La colorazione è stata sviluppata aggiungendo in ogni tubo 1 ml di ammonio amidosulfonato ($\text{H}_2\text{NSO}_3\text{NH}_4$) 12 %, 1 ml di MBTH 0,5% e successivamente 1 ml di cloruro di ferro (FeCl_3) 0,5 %.

I risultati ottenuti sono stati quantificati attraverso una retta di taratura determinata utilizzando concentrazioni note di glucosamina-HCl dissolta in HCl 6 N e CH_3COONa 1,25 N.

3.9. Proteine

Per determinare la quantità di proteine i vari campioni sono stati sciolti in 50 µl di acqua e sono stati aggiunti 1950 µl di Bradford Coomassie brilliant blue G-250 (CBBG).

Dopo 10 min i campioni sono stati letti allo spettrofotometro a 595 nm (Bradford, 1976).

I risultati ottenuti sono stati quantificati tramite una retta di taratura determinata utilizzando albumina in quantità note come proteina di riferimento.

3.10. Deacetilazione della chitina

La chitina standard (Sigma) e le chitine estratte dai funghi sono state trattate per 2 h con una soluzione di NaOH 47 % a 60°C sotto flusso di azoto.

I campioni sono stati centrifugati a 5000 g per 20 min.

Il precipitato è stato lavato con acqua distillata a 80°C fino alla neutralità (pH 7) e poi liofilizzato.

Tale trattamento alcalino è stato eseguito per due volte (Mima et al., 1983).

3.11. Peso molecolare del β-glucano

E' stato determinato il peso molecolare del glucano seguendo le tecniche proposte da Determann (1968) ed i metodi suggeriti dalla ditta Pharmacia (1993).

5 mg di glucano, sciolti in un 1 ml di acqua, sono stati sottoposti a gel filtrazione attraverso una colonna (48 x 1,5 cm) riempita con Sephadex G-100 (Pharmacia) ed eluiti con tampone Tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl 10 mM pH 7,2 con un flusso di 27 ml h⁻¹.

Sono state raccolte frazioni di un ml e le loro assorbanze lette a 280 nm con uno spettrofotometro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 3 B.

I pesi molecolari sono stati determinati per confronto con una curva di taratura ottenuta utilizzando sostanze a peso molecolare noto: Albumina P.M. = 67.000, Ovalbumina P.M. = 45.000, Chimotripsinogeno A P.M. = 25.000, Lattoalbumina P.M. = 14.200.

Il volume morto della colonna è stato determinato tramite Blu Destrano con P.M. = 2.000.000.

3.12. Adsorbimento dei metalli pesanti sulle diverse frazioni polisaccaridiche

Le prove di adsorbimento sono state effettuate su:

- micelio e carpoforo di *Pleurotus ostreatus* (SMR 684) liofilizzati
- diverse frazioni polisaccaridiche da essi ottenute (glucano, chitina, e chitosano)
- chitosano ottenuto per deacetilazione della chitina

Come standard di riferimento sono state usate soluzioni di Cadmio (II) (1002 mg l⁻¹), Rame (II) (1004 mg l⁻¹), Zinco (II) (1000 mg l⁻¹), Nickel (II) (1003 mg l⁻¹), Piombo (II) (1005 mg l⁻¹) e Cromo (III) (1003 mg l⁻¹) in 2% HNO₃ (Exaxol, Italia) preventivamente diluite e portate a pH 3 e 5 con NaOH 1 N.

La capacità di adsorbimento delle diverse frazioni è stata valutata impiegando quantità crescenti di micelio, carpoforo, glucani e chitina e chitosano di *Pleurotus ostreatus* in presenza di quantità costanti di metallo.

Le prove sono state effettuate a pH 3 e 5 e la capacità di adsorbimento valutata a tempi diversi (1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minuti)

Le prove di adsorbimento sono state effettuate sui singoli metalli o sui metalli in miscela.

Le prove sono state effettuate in 25 ml di soluzione di metallo a differenti concentrazioni (10, 100, 300, 500, 700 mg l⁻¹) con agitazione a 100 rpm e 25°C.

La biomassa è stata rimossa per filtrazione ed i filtrati analizzati con uno spettrofotometro per assorbimento atomico Perkin Elmer mod. 1100 B.

Le concentrazioni del metallo sono state quantificate con una retta di taratura a concentrazioni note di metallo (2,5; 5; 7,5 e 10 mg l⁻¹).

La quantità di metallo adsorbito è stata ottenuta per differenza tra la quantità di metallo iniziale e la quantità rimasta nel filtrato.

3.12.1. Rigenerazione del chitosano

La rigenerazione del chitosano è stata valutata nel seguente modo:

una colonna è stata realizzata utilizzando una siringa privata di ago e tappata con lana di vetro silanizzata. Alla base della colonna è stato collegato un piccolo tubo per regolare il flusso di eluizione della soluzione. Sono stati aggiunti 100 mg di chitosano e 25 ml di soluzione di Cu (II) 500 mg l⁻¹. La soluzione è stata a contatto con il chitosano per 30

minuti e poi eluita e raccolta per le letture. La colonna è stata lavata con HNO₃ 0,1 N per staccare il metallo adsorbito sul chitosano e poi con acqua distillata. Il procedimento appena descritto è stato effettuato per altre due volte.

Le soluzioni recuperate sono state diluite 1:100 con acqua e lette ad uno spettrofotometro per assorbimento atomico Perkin Elmer mod. 1100 B.

3.13. Analisi statistica

Tutti i dati vengono presentati come media \pm deviazione standard (SD) di tre repliche. I valori medi sono stati comparati usando il test t di Student.

4. RISULTATI

4.1. Crescita dei miceli

La crescita del micelio su substrato liquido è stata monitorata per 5 settimane. I miceli sono stati fatti crescere sul terreno di coltura fino al raggiungimento della fase stazionaria. Molti autori (Crestini et al., 1996; Tan et al., 1996) riportano che la massima resa della chitina e del chitosano si ha quando il fungo raggiunge la fine della fase esponenziale della curva di crescita. Nelle nostre condizioni sperimentali, la fase stazionaria è stata generalmente raggiunta dopo circa tre settimane dall'inoculo e l'estrazione delle varie frazioni polisaccaridiche è avvenuta dopo 21 giorni di crescita dei vari miceli.

Il tasso di crescita delle differenti specie fungine è risultato variabile. La maggior biomassa è stata ottenuta per *A. auricula-judae* mentre il minor tasso di crescita è stato ottenuto per *L. edodes* (tab. 4).

L'andamento della crescita anche se qualitativamente simile varia quindi in termini quantitativi probabilmente perchè le specie fungine hanno differenti bisogni nutrizionali.

Tab. 4 – Crescita delle diverse specie fungine dopo 7, 14, 21, 28 e 35 giorni dall'inoculo. I dati vengono riportati in g di p.s. in 25 ml di terreno di coltura (in ogni colonna, lettere uguali indicano differenza non significativa per $p < 0,05$).

giorni	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Auricularia auricula-judae</i>	<i>Lentinula edodes</i>	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Pleurotus eryngii</i>
7	1,8 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,2 ^a	2,9 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	3,4 ± 0,2 ^a	2,5 ± 0,2 ^a
14	2,6 ± 0,4 ^b	2,6 ± 0,2 ^b	1,7 ± 0,3 ^b	3,4 ± 0,1 ^b	4,4 ± 0,2 ^b	4,1 ± 0,3 ^b	3,2 ± 0,2 ^b
21	3,5 ± 0,2 ^c	6,8 ± 0,5 ^c	3,2 ± 0,2 ^c	4,2 ± 0,3 ^c	6,4 ± 0,4 ^c	4,9 ± 0,5 ^{b,c}	4,6 ± 0,4 ^c
28	3,6 ± 0,3 ^c	7,1 ± 0,3 ^c	3,4 ± 0,3 ^c	4,4 ± 0,3 ^c	6,7 ± 0,5 ^c	5,1 ± 0,4 ^c	4,7 ± 0,5 ^c
35	3,8 ± 0,2 ^c	7,2 ± 0,3 ^c	3,3 ± 0,1 ^c	4,5 ± 0,4 ^c	6,8 ± 0,4 ^c	5,3 ± 0,4 ^c	5,0 ± 0,5 ^c

4.2. Estrazione dei polisaccaridi

Le frazioni polisaccaridiche sono state estratte sia dai miceli sia dai carpofori. Il processo di estrazione, applicato ai miceli, ha permesso di isolare gli esopolisaccaridi rilasciati nel substrato di coltura. I polisaccaridi che costituiscono le principali componenti della parete cellulare, glucani, chitina e chitosano, sono stati estratti dalla biomassa miceliale e dai carpofori.

Lo schema di estrazione adottato (vedi materiali e metodi) è derivato da metodiche utilizzate da diversi Autori modificate per ottenere un processo più semplice, rapido e che permette l'estrazione contemporanea di diverse frazioni polisaccaridiche. (Wu, 2004; Yap & Ng, 2001; Chiara, 1992 .)

4.2.1. Esopolisaccaridi (EPS)

La quantità di EPS estratti dal brodo di coltura dei vari isolati fungini è mostrata in tab. 5. La resa maggiore è stata ottenuta da *Lentinula edodes*. Non si sono riscontrate differenze significative per gli altri isolati presi in considerazione.

Tab. 5 - Resa degli EPS ottenuti dalle diverse specie fungine dopo 21 giorni di crescita

Specie	Resa (% biomassa p.s.)
<i>Lentinula edodes</i> (SMR 90)	11.0 ± 1.8 ^a
<i>Trametes versicolor</i> (SMR 117)	5.4 ± 0.8 ^b
<i>Pleurotus ostreatus</i> (SMR 684)	4.6 ± 0.5 ^b
<i>Auricularia auricula-judae</i> (SMR 054)	5.2 ± 0.6 ^b

E' stata testata la capacità degli EPS di inibire la crescita di *Aspergillus parasiticus* e la sua produzione di aflatossine.

La tab. 6 mostra l'effetto degli EPS sulla crescita di *Aspergillus parasiticus* in coltura liquida dopo 3, 6 e 9 giorni dall'inoculo. La presenza degli EPS estratti da *L. edodes*, *P.ostreatus* e *A. auricula-judae* non influenza in maniera significativa la crescita di *A. parasiticus*. L'aggiunta di EPS da *Trametes versicolor* provoca invece la completa inibizione della sua crescita.

Tab. 6 - Effetto degli EPS liofilizzati ottenuti da diversi isolati fungini sulla crescita di *Aspergillus parasiticus* in coltura liquida. I prelievi sono stati effettuati dopo 3, 6 e 9 giorni dall'inoculo.

(lettere uguali indicano differenza non significativa per $p < 0,01$.)

Specie	Crescita <i>A. parasiticus</i>		
	mg/25 ml		
	3 giorni	6 giorni	9 giorni
controllo	52.3 ± 5.2 ^a	90.4 ± 10.7 ^b	98.7 ± 11.0 ^b
<i>L. edodes</i> (SMR 090)	48.1 ± 8.7 ^a	83.4 ± 6.5 ^b	86.6 ± 8.4 ^b
<i>T. versicolor</i> (SMR117)	0 ^c	0 ^c	0 ^c
<i>P. ostreatus</i> (SMR 684)	46.4 ± 4.6 ^a	86.6 ± 5.7 ^b	93.5 ± 9.2 ^b
<i>A. auricola-judae</i> (SMR 054)	50.9 ± 6.7 ^a	77.3 ± 6.1 ^b	89.7 ± 7.3 ^b

Tab. 7 - Effetto degli EPS ottenuti da diverse specie fungine sulla produzione di aflatossine da parte di *A. parasiticus* cresciuto in coltura liquida a 3, 6 e 9 giorni (tr: < 0.05 µg/25ml)

(lettere uguali indicano differenza non significativa per $p < 0,01$).

Specie	Aflatossine µg/25 ml		
	3 giorni	6 giorni	9 giorni
controllo	163,0 ± 20,5 ^a	300,6 ± 40,1 ^b	321,1 ± 37,8 ^b
<i>L. edodes</i> (SMR 090)	21,6 ± 10,0 ^c	32,0 ± 8,7 ^c	57,2 ± 11,4 ^{cd}
<i>T. versicolor</i> (SMR117)	--	--	--
<i>P. ostreatus</i> (SMR 684)	58,2 ± 10,4 ^{cd}	71,7 ± 12,4 ^d	86,5 ± 11,8 ^d
<i>A. auricola-judae</i> (SMR 054)	tr	tr	tr

L'analisi delle aflatossine prodotte durante la crescita di *A. parasiticus* è mostrata nella tab. 7. Anche se la crescita di *A. parasiticus* non risulta inibita, la produzione di aflatossine viene notevolmente ridotta dalla presenza degli EPS ottenuti dai relativi brodi colturali. Un'inibizione totale è stata evidenziata per EPS da *A. auricula-judae* e *Trametes versicolor*. Una forte inibizione è stata ottenuta da EPS di *Lentinula edodes* (85-90 %) e *P. ostreatus* (65-80 %).

4.2.2. β -glucani

Il processo di estrazione, applicato a miceli e carpofori, ha permesso di isolare una frazione solubile in alcali, contenente i β -glucani. La resa dei glucani ottenuti dalle diverse specie studiate si aggira intorno al 6.0 ± 0.5 % di peso secco.

Il campione ottenuto a partire da carpoforo di *P. ostreatus* è stato analizzato tramite spettroscopia IR.

La Fig. 6 mostra lo spettro FT-IR del glucano ottenuto da *P. ostreatus* comparato con uno spettro di β -glucano standard (Sigma).

Le bande caratteristiche a 2928 cm^{-1} (stretching del C-H nei carboidrati), a 1070 cm^{-1} (C-O-C; OH nei piranosio) e a 894 cm^{-1} (caratteristica della conformazione β del glucano) (Mathlouthi & Koeng, 1986) sono presenti in entrambi gli spettri.

L'analisi del peso molecolare attraverso gel-filtrazione ha messo in evidenza due frazioni glucaniche di peso molecolare 59.8 KDa e 37.5 KDa (Fig. 7).

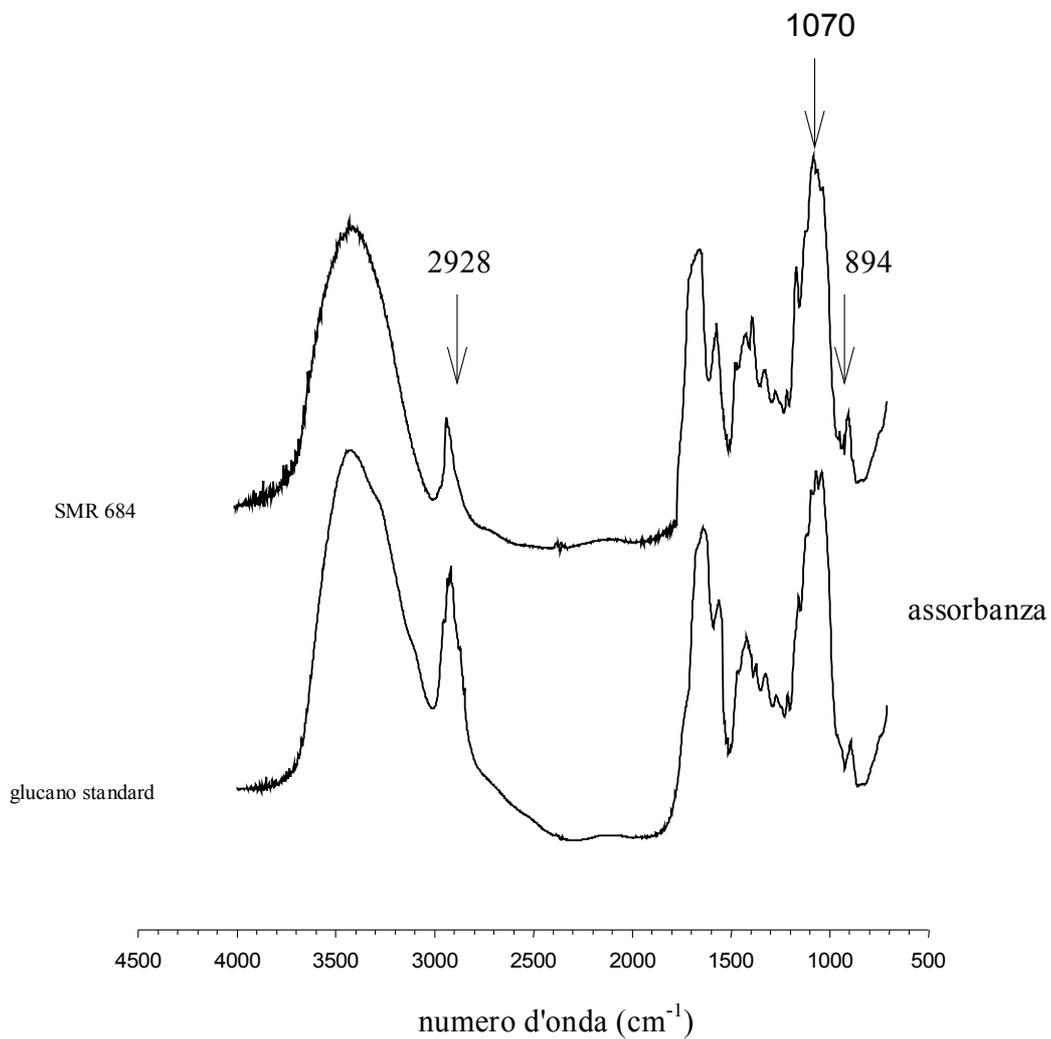


Fig. 6 - Spettro FT-IR di β – glucano ottenuto da carpoforo di *P. ostreatus* (SMR 684) comparato con uno spettro ottenuto da un β -glucano standard.

Fig. 7 - Profilo di eluizione di β – glucano ottenuto per gel filtrazione su colonna Sephadex G-100 (48 x 1.5 cm, flusso: 27 ml h⁻¹).

4.2.3. Chitina e chitosano

La tabella 8 riporta la resa delle chitine estratte dalle diverse specie fungine insieme a grado di acetilazione, cristallinità e contenuto in glucosamina.

Come termine di paragone vengono riportate le caratteristiche della chitina standard (Sigma) estratta dai gusci dei gamberetti.

La quantità totale di chitina isolata dai vari miceli fungini varia tra l'8.5% ed il 19.6% di peso secco e la migliore resa è stata ottenuta da *Auricularia auricula-judae* e *Pleurotus ostreatus* (tab. 8).

Il grado di acetilazione varia tra 91 e 99% ed è comparabile con il valore ottenuto per la chitina standard (97%).

Il grado di cristallinità delle chitine estratte dalle diverse specie fungine è significativamente minore rispetto a quello della chitina standard (1.54).

Il contenuto di glucosammina, anche se varia in modo significativo per alcune specie fungine, è comunque spesso comparabile con quello dello standard. Le chitine estratte dai funghi non risultano contaminate da proteine.

Tab. 8 - Resa, grado di acetilazione, cristallinità e contenuto in glucosammina di chitina estratta da differenti miceli, comparata con chitina standard.
(in ogni colonna, lettere uguali indicano differenza non significativa per $p < 0,05$).

Campioni	Resa chitina (% peso secco di micelio)	D.A. %	Cristallinità	Glucosammina (% di chitina)
Chitina standard (Sigma)	--	97.0 ± 1.5^{de}	1.54 ± 0.3^c	47.1 ± 0.9^e
<i>A. bisporus</i> (SMR 13)	8.5 ± 1.4^a	91.0 ± 1.4^a	0.80 ± 0.03^a	51.1 ± 0.7^f
<i>A. auricula-judae</i> (SMR 54)	19.6 ± 1.1^d	95.1 ± 1.3^{cd}	0.91 ± 0.02^b	64.5 ± 1.3^g
<i>L. edodes</i> (SMR 90)	10.1 ± 1.0^{ab}	92.0 ± 1.2^{ab}	0.80 ± 0.04^a	46.3 ± 0.5^e
<i>T. versicolor</i> (SMR 117)	13.1 ± 0.7^c	97.0 ± 1.6^{de}	0.80 ± 0.03^a	26.4 ± 0.4^a
<i>A. mellea</i> (SMR 439)	11.1 ± 1.3^b	92.7 ± 1.7^{abc}	0.80 ± 0.02^a	38.1 ± 0.6^c
<i>P. ostreatus</i> (SMR 684)	15.3 ± 2.2^c	98.7 ± 0.3^e	0.91 ± 0.04^b	30.7 ± 0.8^b
<i>P. eryngii</i> (SMR 755)	8.7 ± 1.1^a	94.2 ± 1.3^{bc}	0.80 ± 0.02^a	44.8 ± 0.6^d
<i>P. ostreatus carpofofo</i>	11.5 ± 0.8^b	94.0 ± 1.2^{bc}	1.15 ± 0.9^{abc}	31.1 ± 0.6^b

La fig. 8 mostra gli spettri FT-IR delle chitine dei funghi comparate con lo spettro della chitina standard. Tutti gli spettri IR delle chitine sono caratterizzati da bande di assorbimento a 1655 cm^{-1} (vibrazione amide I) e 1555 cm^{-1} (vibrazione amide II).

Gli spettri ottenuti sono molto simili tra loro ma, in accordo con quanto riportato in letteratura (Synowiecki & Al-Khateeb, 1997; Brugnerotto et al., 2001), lo spettro IR della chitina standard mostra due bande evidenti a 3265 e 3100 cm^{-1} (stretching del legame amide NH) che non sono presenti negli spettri della chitina da fungo.

I risultati relativi alle rese di chitosano nelle varie specie fungine confermano la bassa quantità di composto presente nelle pareti cellulari (circa $1.0 \pm 0.12\%$ di peso secco).

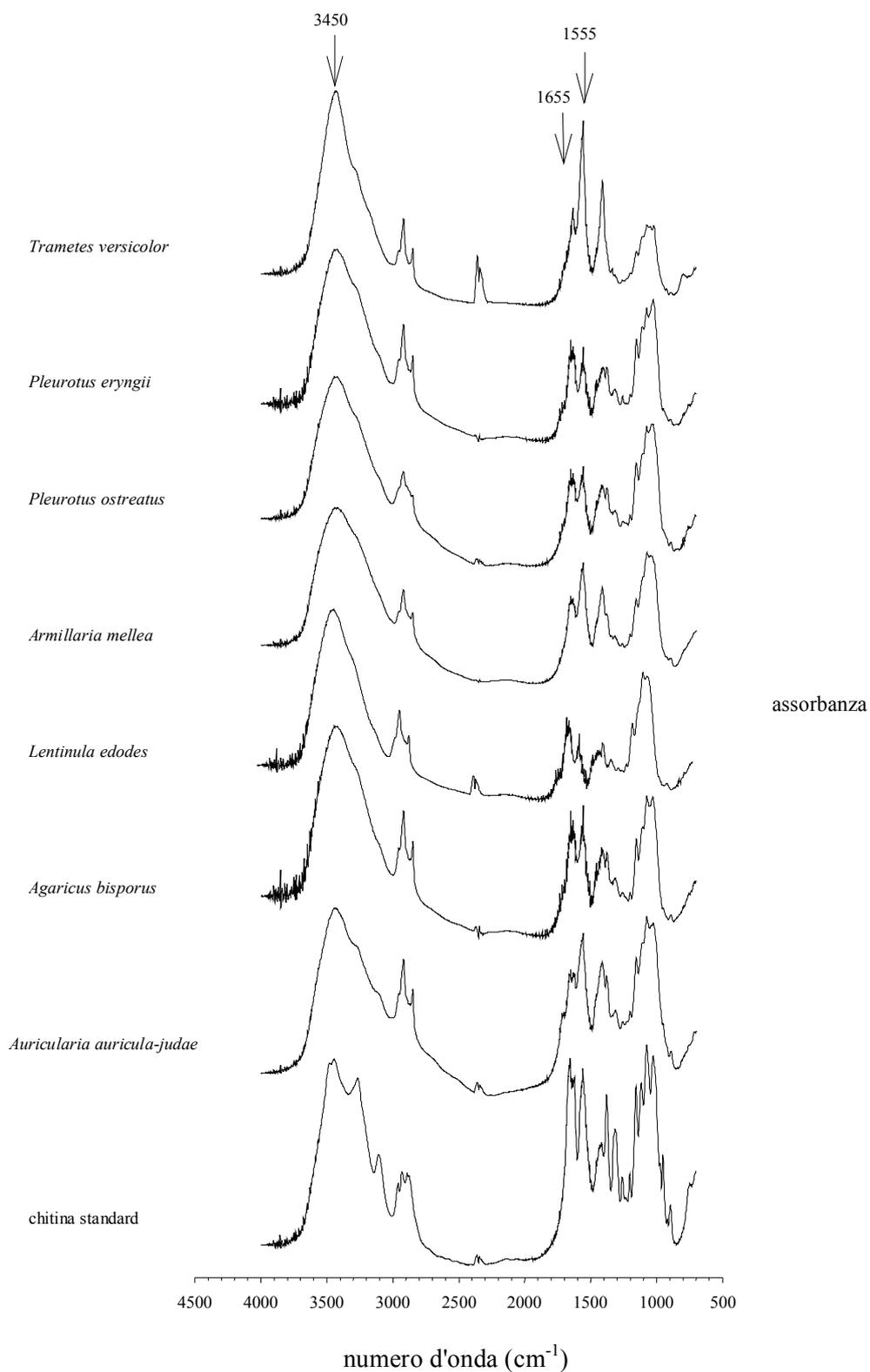


Fig. 8 - Spettri FT-IR di chitine estratte da differenti specie di basidiomiceti e della chitina standard (Sigma).

4.3. Deacetilazione della chitina

Attraverso un trattamento alcalino la chitina estratta dai vari funghi è stata deacetilata a chitosano (Mima et al., 1983). La tab. 9 riporta il grado di acetilazione delle differenti chitine dopo due successive deacetilazioni. La prima deacetilazione con NaOH 47% abbatte notevolmente il grado di acetilazione, in modo particolare per la chitina standard (80%) e per quella ottenuta da *P. ostreatus* (76.4%). La seconda deacetilazione produce un ulteriore decremento del DA. Nel caso della chitina standard e delle chitine di *A. auricula-judae*, *P. ostreatus*, *A. bisporus* e *T. versicolor* sono stati ottenuti valori molto bassi di DA, simili a quello ottenuto per il chitosano standard (DA = 7.5%) e a quello del chitosano estratto direttamente dal carpoforo di *P. ostreatus* (3.4% ± 0.3).

La resa del chitosano ottenuto dopo la deacetilazione è in media del 70–75% circa.

Tab. 9 - Effetto della deacetilazione alcalina sul grado di acetilazione (DA) della chitina standard e della chitina estratta da vari isolati fungini.
(in ogni colonna, lettere uguali indicano differenza non significativa per $p < 0,01$)

Campioni	DA % chitina iniziale	DA % dopo la prima deacetilazione	DA % dopo la seconda deacetilazione
Chitina standard	97.0 ± 1.5 ^{ad}	19.3 ± 0.2 ^d	5.0 ± 0.1 ⁱ
<i>A. bisporus</i> (SMR 13)	91.0 ± 1.4 ^b	41.5 ± 0.3 ^e	3.9 ± 0.1 ^l
<i>A. auricula-judae</i> (SMR 54)	95.1 ± 1.3 ^{ac}	41.5 ± 0.5 ^e	3.2 ± 0.1 ^m
<i>L. edodes</i> (SMR 90)	92.0 ± 1.2 ^b	70.5 ± 0.7 ^f	40.3 ± 0.6 ^e
<i>T. versicolor</i> (SMR 117)	97.0 ± 1.6 ^{ad}	70.6 ± 0.8 ^f	7.4 ± 0.2 ⁿ
<i>A. mellea</i> (SMR 439)	92.7 ± 1.7 ^{bc}	70.6 ± 0.2 ^f	32.0 ± 0.4 ^h
<i>P. ostreatus</i> (SMR 684)	98.7 ± 0.3 ^d	23.3 ± 0.5 ^g	3.7 ± 0.1 ^o
<i>P. eryngii</i> (SMR 755)	94.2 ± 1.3 ^{abc}	30.4 ± 0.8 ^h	18.7 ± 0.6 ^d

Un confronto tra gli spettri FT-IR di diversi campioni di chitosano ottenuti per deacetilazione della chitina estratta da alcuni miceli, del chitosano estratto direttamente dal carpoforo di *P. ostreatus* e del chitosano standard sono riportati in Fig. 9.

Gli spettri infrarosso dei campioni di chitosano sono molto simili tra loro e con lo spettro del chitosano standard. La N-deacetilazione delle chitine è associata con la scomparsa della banda a 1550 cm⁻¹ (vibrazione amide II).

In base ai risultati ottenuti, la chitina di fungo può essere facilmente deacetilata ed utilizzata per la produzione di chitosano.

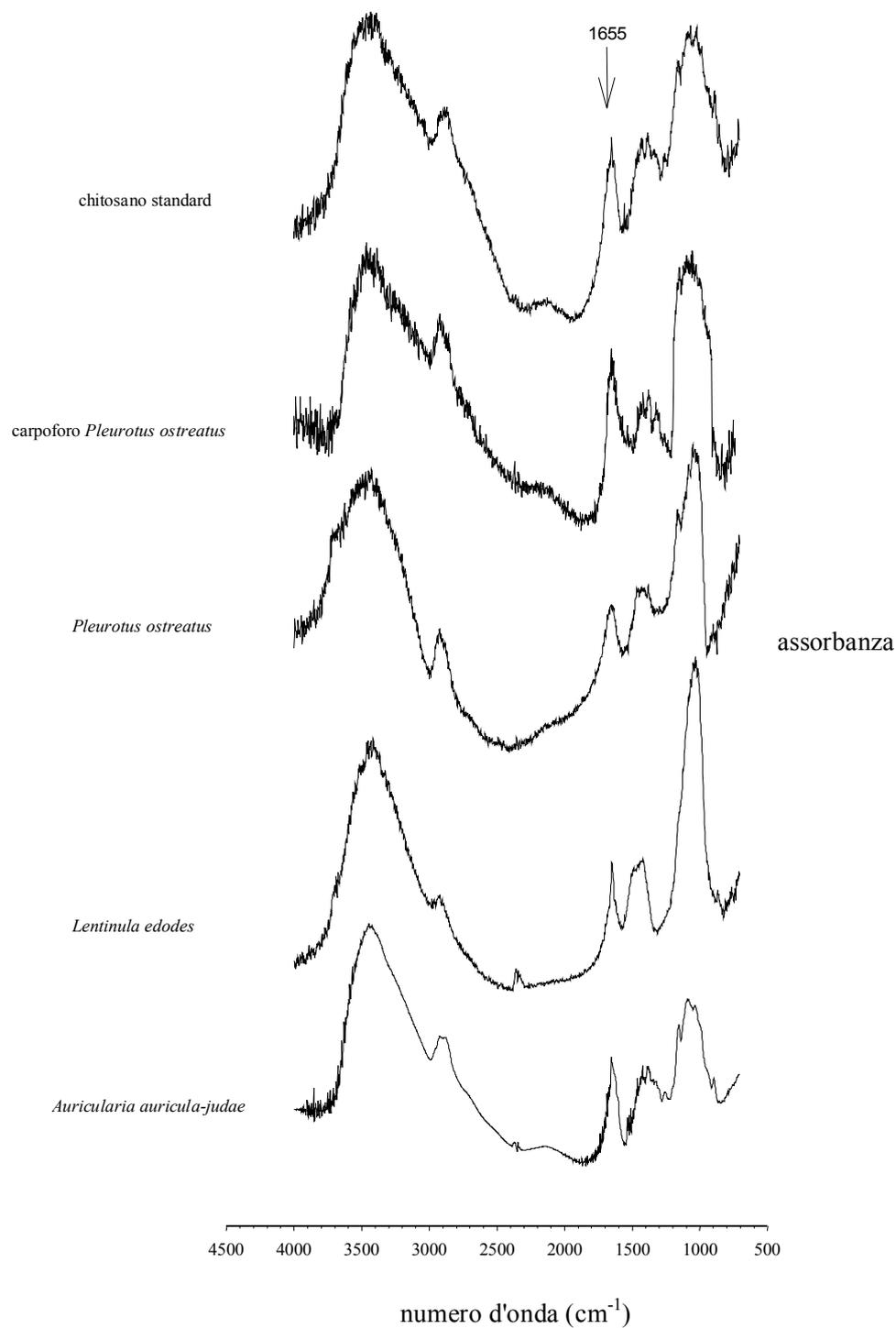


Fig. 9 – Spettri FT-IR di alcuni campioni di chitosano ottenuti dalla deacetilazione chimica di chitina estratta da alcuni miceli e dal carpoforo di *P. ostreatus*. Per confronto si riporta lo spettro del chitosano standard (Pharmitalia).

4.4. Adsorbimento dei metalli pesanti sulle diverse frazioni polisaccaridiche

Il tempo ottimale di incubazione è stato determinato tramite una prova sperimentale effettuata utilizzando una quantità nota di chitosano (40 mg), sospesa in 25 ml di una soluzione contenente 10 mg L⁻¹ di Cd (II) a pH 5, incubata per tempi crescenti: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 min.

La Fig. 10 mostra che l'adsorbimento aumenta col tempo di incubazione raggiungendo il massimo intorno ai 20 min.

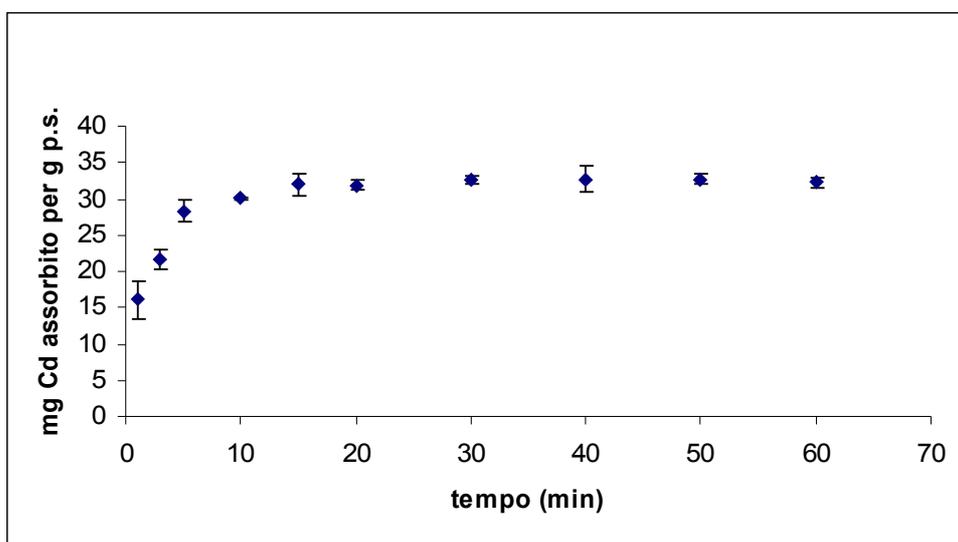


Fig. 10 – Adsorbimento di Cd (II) 10 mg L⁻¹ su chitosano in funzione del tempo.

La capacità di adsorbimento dei metalli pesanti da parte del *Pleurotus ostreatus* è stata studiata sul carpoforo, il micelio e le varie frazioni polisaccaridiche estratte da essi.

La fig.11 mostra la capacità di adsorbimento del Cd (II) da parte del micelio e del carpoforo di *P. ostreatus* all'aumentare della loro concentrazione e a due differenti pH (3 e 5).

L'adsorbimento da parte del carpoforo aumenta con l'aumentare della biomassa presente, raggiungendo il plateau intorno ai 300 mg di campione in 25 ml di soluzione.

Non si notano differenze nell'adsorbimento ai due diversi pH.

L'adsorbimento del Cd da parte dei miceli varia ai due differenti pH. L'adsorbimento è maggiore a pH 5 (87%) raggiungendo il plateau a quantità di micelio pari a 200 mg in

25 ml. A pH 3 si ha un adsorbimento minore raggiungendo un valore di 82% con 500 mg di micelio in 25 ml.

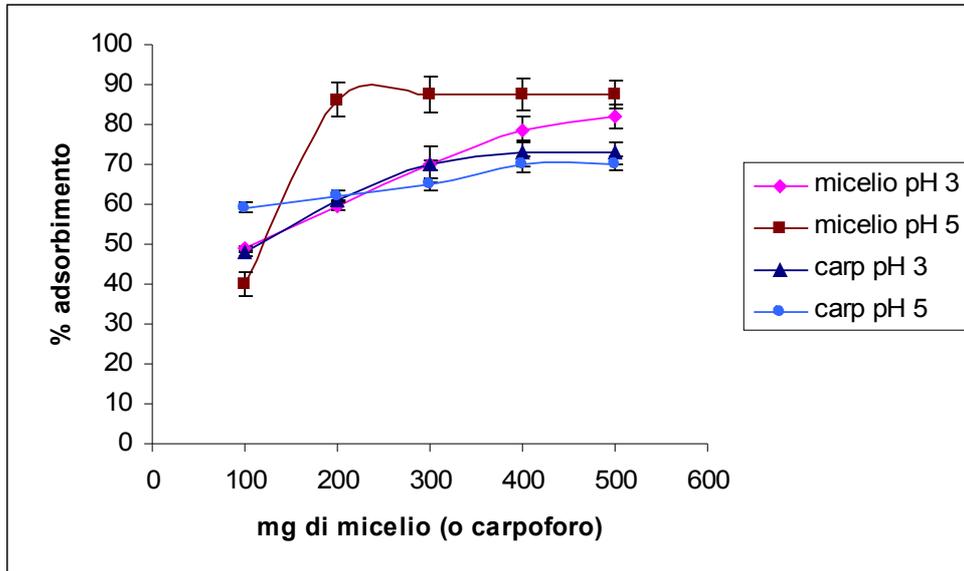


Fig.11 - Adsorbimento di Cd (II) 10 mg L⁻¹ all'aumentare delle quantità di micelio e carpoforo di *Pleurotus ostreatus* a pH 3 e 5

I risultati relativi all'adsorbimento delle diverse frazioni polisaccaridiche estratte dal micelio e dal carpoforo mostrano che nel caso dei glucani e del chitosano il pH non influenza la capacità adsorbente (Fig. 12) mentre nel caso della chitina si ha un maggiore adsorbimento a pH 5 (Fig. 13).

La frazione contenente i glucani mostra una capacità adsorbente diversa se estratti da micelio o da carpoforo. Quest'ultima frazione mostra una capacità di adsorbimento alta, raggiungendo il 98% a concentrazioni di 300 mg in 25 ml (Fig. 12).

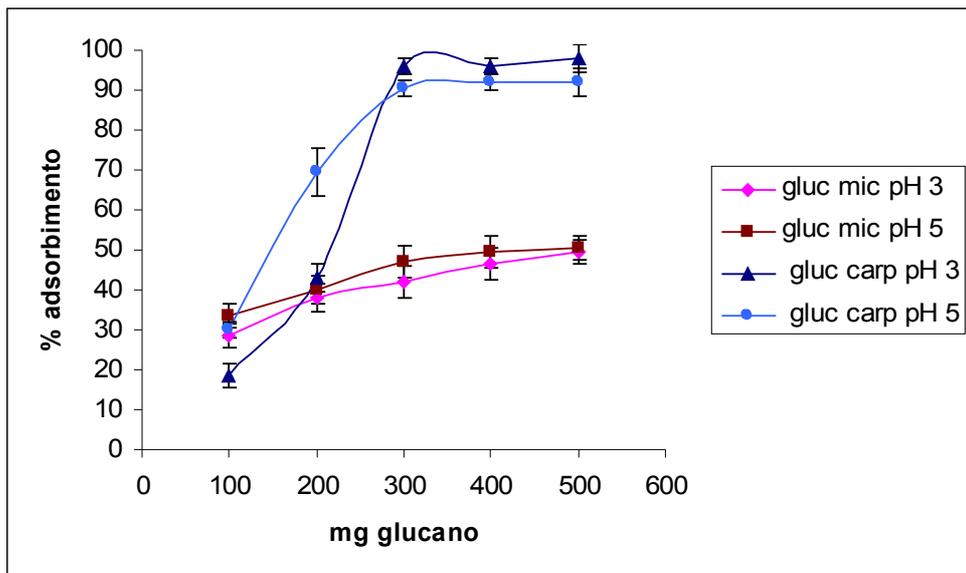


Fig. 12 - Adsorbimento di Cd (II) 10 mg L⁻¹ su quantità crescenti di glucani estratti da micelio e da carpoforo di *P. ostreatus* a due diversi pH.

La Fig. 13 mostra che la chitina estratta da micelio adsorbe il Cd (II) in modo maggiore rispetto alla chitina estratta da carpoforo, giustificando i risultati mostrati nella fig. 11.

Nelle nostre condizioni sperimentali la chitina estratta da micelio mostra un adsorbimento crescente all'aumentare della quantità di chitina presente, con un massimo di adsorbimento del 57% a pH 5.

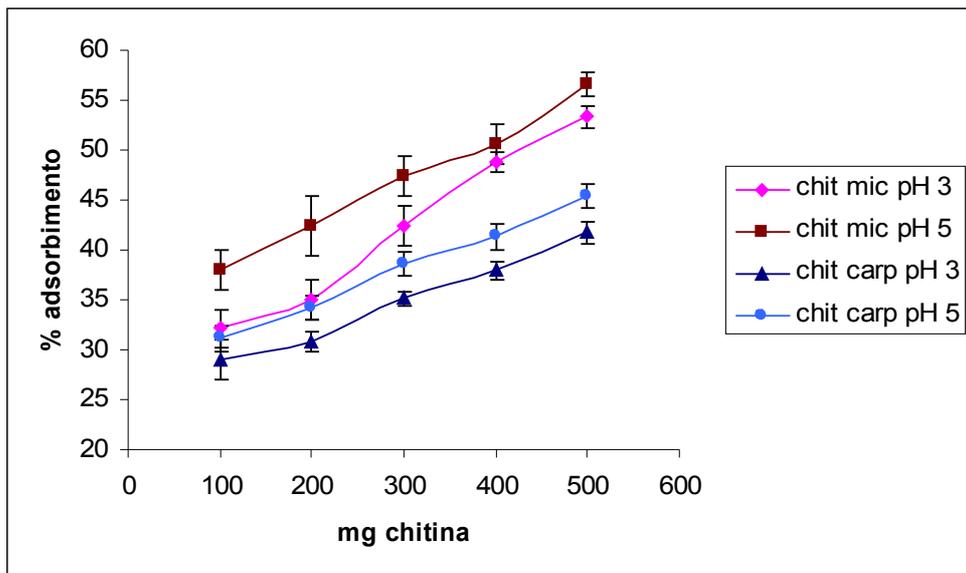


Fig. 13 - Adsorbimento di Cd(II) 10 mg L⁻¹ su quantità crescenti di chitina estratta da micelio e carpoforo di *P. ostreatus* a due diversi pH.

La sperimentazione effettuata con il chitosano ha messo in evidenza la sua alta capacità adsorbente. Pertanto si è deciso di effettuare le prove con il chitosano utilizzando concentrazioni di Cd (II) pari a 100 mg L⁻¹.

I risultati ottenuti (Fig. 14) mostrano che, a differenza delle altre frazioni, il chitosano possiede un' alta capacità di adsorbimento per i metalli e tale adsorbimento non è influenzato dal pH.

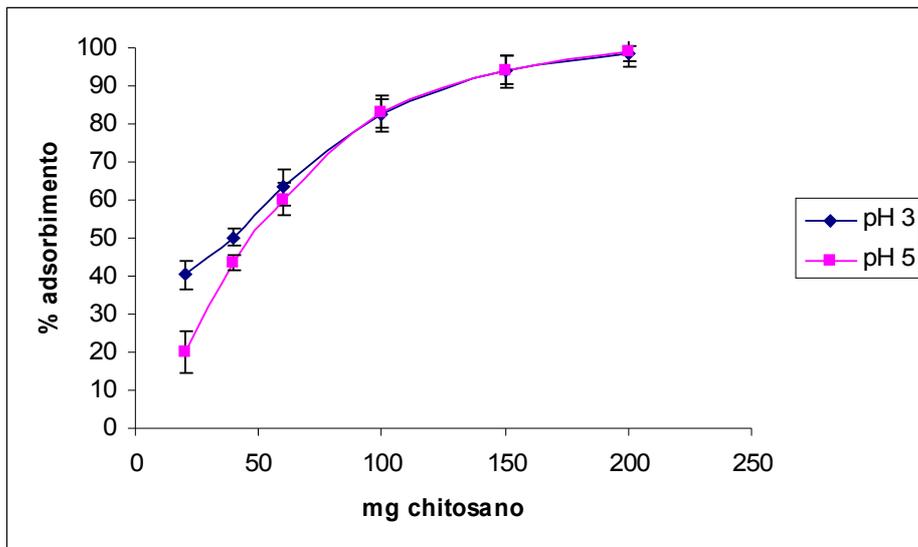


Fig.14 – Adsorbimento di Cd (II) 100 mg L⁻¹ a diversi pH su quantità crescenti di chitosano ottenuto per deacetilazione della chitina estratta da *P. ostreatus*.

Sulla base dei risultati ottenuti, si è deciso di proseguire gli studi di adsorbimento dei metalli utilizzando solo il chitosano. Gli esperimenti sono stati effettuati a pH 5 perchè a tale pH il polisaccaride rimane insolubile ed è più facile operare.

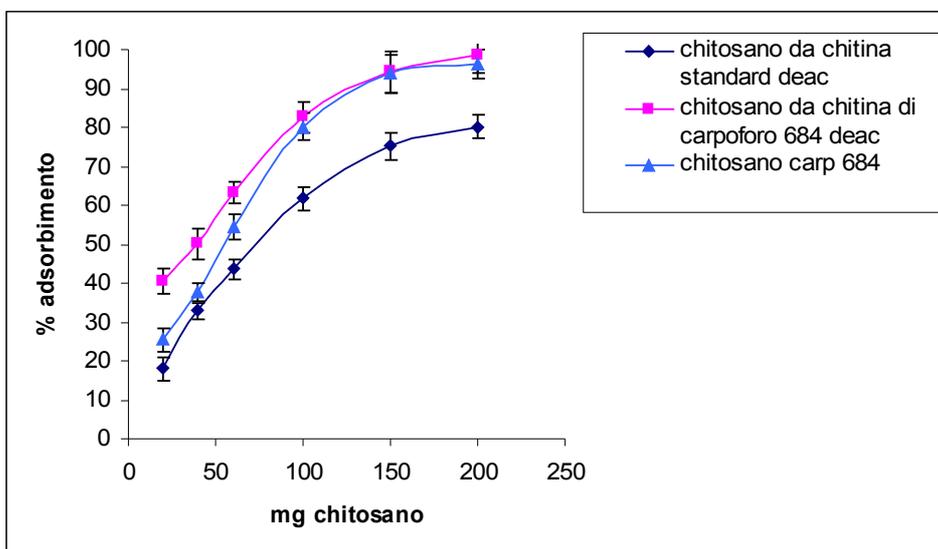


Fig. 15 - Adsorbimento di Cd (II) 100 mg L⁻¹ su quantità crescenti di chitosano estratto direttamente da carpoforo di *P. ostreatus*, chitosano ottenuto per deacetilazione della chitina di carpoforo di *P. ostreatus* e chitosano ottenuto per deacetilazione della chitina standard.

La fig. 15 mostra i risultati ottenuti utilizzando chitosano estratto:

- direttamente da carpofo,ro,
- ottenuto per deacetilazione della chitina estratta da carpofo,ro di *P. ostreatus*
- deacetilazione della chitina standard

Il chitosano ottenuto dal fungo mostra una capacità adsorbente superiore rispetto a quello ottenuto da chitina standard, raggiungendo il 100% di adsorbimento ad una concentrazione di 200 mg in 25 ml.

Al fine di valutare la capacità di adsorbimento su diversi metalli sono stati presi in considerazione Ni, Zn, Pb, Cd, e Cu come metalli bivalenti ed il Cr come metallo trivalente.

L'adsorbimento è stato valutato testando sia i singoli metalli che la loro miscela.

I risultati mostrano che tutti i metalli possono essere adsorbiti dal chitosano anche se con affinità diversa (Fig 16). In particolare il Ni (II) viene adsorbito con una efficienza pari al 90% già a basse quantità di chitosano. Minore è l'adsorbimento dello Zn (II) che comunque in presenza di concentrazioni di chitosano pari a 200 mg in 25 ml viene adsorbito all'87%. Tutti gli altri metalli vengono adsorbiti al 100%. Con l'ottica di utilizzare il chitosano per la rimozione di metalli da reflui contaminati, i vari metalli sono stati utilizzati in miscela con una concentrazione pari a 100 mg L⁻¹ per ogni singolo metallo ed in presenza di una quantità di chitosano pari a 100 mg in 25 ml di soluzione.



Fig 16 – Adsorbimento di singoli metalli in concentrazione di 100 mg L⁻¹ su quantità crescenti di chitosano ottenuto per deacetilazione di chitina estratta da *P. ostreatus*.



Fig. 17 – Adsorbimento di vari metalli presenti singolarmente o in miscela ad una concentrazione di 100 mg L⁻¹.

La Fig. 17 mostra l'adsorbimento dei vari metalli in miscela confrontato con quello del singolo metallo riportato in Fig.16.

Quando presente in miscela, il singolo metallo viene adsorbito in quantità minore anche se la capacità di adsorbimento da parte del chitosano resta invariata e pari alla somma dei singoli adsorbimenti.

La capacità di adsorbimento del chitosano è stata ulteriormente studiata prendendo in considerazione il rame. Sono state effettuate prove di adsorbimento con concentrazioni pari a 100, 300, 500 e 700 mg L⁻¹ di Cu (II) in beutine contenenti 100 mg di chitosano in 25 ml di soluzione. (tab.10).

Tab.10 – Adsorbimento del chitosano (100 mg) all'aumentare della concentrazione di Cu (II) nei 25 ml utilizzati per il test.

Cu (II) iniziale (mg L⁻¹)	adsorbimento (mg L⁻¹)	adsorbimento (%)
100	100	100
300	300	100
500	484.45	96.9
700	669.12	95.6

I risultati mostrano l'alta capacità chelante del chitosano nei confronti del catione bivalente: 100 mg di chitosano sono in grado di adsorbire 16,73 mg di Cu (II) in 30 minuti.

4.4.1. Rigenerazione del chitosano

La possibilità di ripristinare la capacità di adsorbimento del chitosano per il catione metallico è stata studiata eluendo il catione adsorbito con acido nitrico diluito (0.1 N).

La tab. 11 mette in evidenza come sia possibile riutilizzare il chitosano per successivi adsorbimenti dopo adeguata rigenerazione con acido nitrico. I risultati mostrano che il processo di rigenerazione dopo tre lavaggi ha prodotto un trascurabile calo di adsorbimento.

Tab.11 - Capacità di rigenerazione di una colonna di chitosano utilizzata per tre volte per l'adsorbimento di 25 ml di una soluzione contenente Cu(II) 500 mg L⁻¹. La prima colonna mostra la concentrazione di Cu(II) nella soluzione eluita, la seconda colonna mostra la concentrazione di Cu(II) nella soluzione di lavaggio.

	Soluzione eluita dalla colonna mg Cu(II) L⁻¹	Soluzione di lavaggio mg Cu(II) L⁻¹
I	0.62 ± 0,09	491.38 ± 5.3
II	7.46 ± 2,7	485.88 ± 6.4
III	25.16 ± 9,4	461.39 ± 8.8

4.4.2. Isoterme di adsorbimento

L'indagine del rendimento è fondamentale per l'applicazione industriale dei meccanismi di bioadsorbimento poiché fornisce informazioni sull'equilibrio del processo.

I dati sperimentali sull'adsorbimento dei metalli sono in genere descritti dalle isoterme di Langmuir e Freundlich, le quali mettono in relazione la quantità di metallo adsorbito per unità di massa adsorbente q_e (mg g^{-1}) con la concentrazione dell'adsorbato all'equilibrio della fase fluida, C_e (mg L^{-1}):

$$C_e/q_e = (1/q_{\max})b + C_e/q_{\max} \quad (\text{Equazione di Langmuir})$$

$$q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (\text{Equazione di Freundlich})$$

Le costanti dell'equazione di Langmuir sono: q_{\max} che esprime la massima quantità possibile di ione metallico adsorbito per unità di peso di adsorbente (mg g^{-1}) e b (L mg^{-1}) che è una costante relativa all'affinità dei siti di legame per il metallo.

Le costanti caratteristiche dell'equazione di Freundlich sono K_f ed n che esprimono rispettivamente la capacità e l'intensità dell'adsorbimento. Il modello di Langmuir viene in genere utilizzato per stimare il massimo adsorbimento teorico del metallo non raggiunto nell'esperimento.

L'adsorbimento non può procedere oltre la saturazione di un monostato e la superficie è assunta come uniforme e avente un numero limitato di siti identici (Aksu & Tezer, 2000).

L'espressione di Freundlich è una equazione empirica basata sull'adsorbimento su una superficie eterogenea (Såg et al., 1998).

Le isoterme di adsorbimento sono state ottenute sperimentalmente usando concentrazioni di Cu (II) pari a 100, 300, 500 e 700 mg L^{-1} .

Per ottenere l'isoterma di Langmuir, è stato realizzato un grafico di C_e/q_e vs C_e (Fig. 18).

Il valore della costante q_{\max} risulta essere pari a $184,64 \pm 19,3 \text{ mg Cu(II) g}^{-1}$ di chitosano mentre b è pari a $0,026 \pm 0,0099 \text{ L mg}^{-1}$ ($r^2 = 0,997$).

Fig.18 - Isotherma di Langmuir per l'adsorbimento di quantità crescenti di Cu(II) su 100 mg di chitosano in 25 ml di soluzione (T = 25°C, agitazione 100 rpm per 30 min)

L'equazione di Freundlich è stata usata per valutare l'intensità dell'adsorbimento del Cu(II) sul chitosano. Il grafico del \ln di q_e vs C_e (Fig. 19) è lineare e le costanti di K_f e n sono rispettivamente $0,4373 \pm 0,0232 \text{ L g}^{-1}$ e $0,363 \pm 0,0297 \text{ mg g}^{-1}$ ($r^2 = 0,989$).

La distribuzione dei punti C_e calcolati dal modello in funzione dei valori sperimentali di q_e rappresentati nelle fig.19 mostrano una relazione lineare tra i valori osservati ed i valori teorici. I risultati ottenuti mostrano che i dati relativi all'adsorbimento del Cu (II) su chitosano da carpofoforo di *Pleurotus ostreatus* sono ben adattabili ai modelli di Langmuir e Freundlich.

Fig.19 – Isoterma di Freundlich per l'adsorbimento di quantità crescenti di Cu(II) su 100 mg di chitosano in 25 ml di soluzione ($T = 25^\circ\text{C}$, agitazione 100 rpm per 30 min)

5. DISCUSSIONE

5.1. Crescita dei miceli

Lo sviluppo del micelio in ambiente controllato viene descritto da una curva di accrescimento che pone in rapporto l'incremento del peso secco ed il tempo di crescita. Tale curva si può dividere in alcune parti corrispondenti a specifici ritmi di accrescimento. Vi è una prima fase di avvio dello sviluppo (fase latente) seguita da una di massimo sviluppo (fase con accrescimento esponenziale) a cui segue un rallentamento e una condizione stazionaria di crescita. Ogni fungo possiede una sua propria curva di accrescimento che risulta influenzata dal ceppo fungino e dalle condizioni di allevamento (temperatura, composizione del mezzo, aerazione, ecc). L'andamento dello sviluppo rilevabile dalla curva di accrescimento è dovuto al graduale consumo dei principi nutritivi ed all'accumulo nel mezzo di crescita e nell'aria dei prodotti del metabolismo; questi due fattori portano ad una stasi e poi gradatamente alla morte della biomassa (Raven, et al., 1990).

Nell'ambito di questa tesi è stato utilizzato un substrato standardizzato capace di soddisfare le esigenze nutritive dell'organismo in crescita sufficiente per supportare la crescita per il tempo previsto per l'esperimento. Seppure con piccole variazioni l'andamento di crescita è qualitativamente simile anche se in fase stazionaria si raggiungono differenze quantitative tra i vari ceppi. La diversa crescita ottenuta per le diverse specie fungine può essere senz'altro attribuita alla natura dei ceppi ed alle diverse esigenze nutrizionali degli stessi.

Secondo quanto riportato in letteratura (Crestini et al., 1996; Tan et al., 1996) la massima resa della chitina e del chitosano e probabilmente di altri classi di polisaccaridi viene raggiunta alla fine della fase esponenziale.

5.2. Esopolisaccaridi (EPS)

Durante la crescita in coltura liquida il micelio libera nel mezzo colturale una classe eterogenea di polisaccaridi, oligosaccaridi e glicoproteine chiamati esopolisaccaridi (EPS).

Molti basidiomiceti sono capaci di accumulare e rilasciare nel mezzo di coltura EPS.

I risultati riportati soprattutto per il genere *Lentinula* sono congruenti con i risultati da noi ottenuti. Il nostro studio ha preso in considerazione anche il *Trametes versicolor*, la cui letteratura in proposito è carente (Zjalic et al., 2006). Tale specie si è dimostrata molto efficiente nel ridurre sia la crescita che l'inibizione delle aflatoxine di *Aspergillus parasiticus*.

L'inibizione della crescita di aflatoxine è probabilmente dovuto ad un effetto sinergico tra EPS e β -glucani come riportato da Wasser & Weiss (1999b). In accordo con la letteratura i risultati ottenuti mostrano che non c'è una relazione diretta tra biomassa miceliale e produzione di esopolisaccaridi (Maziero et al., 1999). La *Lentinula edodes* pur avendo una minore resa di biomassa ha mostrato una più alta resa di EPS rispetto agli altri ceppi fungini che hanno esibito una maggiore biomassa.

Una consistente letteratura sottolinea la capacità di alcune classi esopolisaccaridiche di inibire la produzione di micotossine o la crescita di microrganismi produttori delle stesse. Come riportato da Krcmar et al. (1999) le glicoproteine ed i polisaccaridi sono i principali componenti di queste frazioni e l'effetto inibente dovrebbe essere dovuto alla loro presenza. Il potere antiossidante degli esopolisaccaridi liofilizzati è stato studiato da Fanelli et al. (2000). La formazione e la liberazione delle aflatoxine è strettamente correlata al fenomeno della lipoperossidazione ed alla formazione di lipoperossidi (LOOH) all'interno della parete cellulare dell'*A. parasiticus* e nell'ambiente extracellulare (Fabbri et al., 1983, Passi et al., 1984) ma ancora è sconosciuta in quale fase del metabolismo delle tossine tali fenomeni intervengano (Passi et al., 1985, Passi et al. 1986).

Il nostro studio ha preso in considerazione EPS estratti da *Lentinula edodes*, *Trametes versicolor*, *Auricularia auricula-judae* e *Pleurotus ostreatus* che sono stati utilizzati come inibitori della produzione di aflatoxine da parte di *A. parasiticus*. I risultati ottenuti confermano che il *Trametes versicolor* inibisce la crescita dell'*A. parasiticus* mentre una notevole inibizione è stata ottenuta in presenza di EPS da *L. edodes* (85-90 %) e *P. ostreatus* (65-80 %).

L'effetto degli EPS estratti da *Trametes versicolor* sull'inibizione della crescita di *A. parasiticus* è probabilmente dovuta alla presenza di alcuni composti con attività antifungina. La presenza di una glicoproteina antibatterica in questo fungo è stata

riportata da Hobbs (1996) ma non si hanno ancora informazioni circa la sua struttura e la sua purificazione.

I risultati ottenuti hanno mostrato un alto potere inibente sulla produzione di aflatossine e/o sulla crescita di funghi produttori di micotossine, seppure in modo diverso. Ciò è dovuto al fatto che nelle stesse condizioni colturali si può avere un diverso livello di inibizione legato a composti diversi per qualità e/o quantità che, escreti nel mezzo, possono influenzare la produzione di aflatossine (Reverberi et al. 2005, Zjalic et al 2006).

5.3. Glucano da *P. ostreatus*

I glucani, componenti della parete cellulare dei funghi, vengono estratti e separati attraverso l'indebolimento o la distruzione di legami idrogeno con acqua calda (Nakai & Kurumuya, 2005). Tale trattamento è talvolta preceduto o seguito da un trattamento in alcali come riportato per il basidiomicete *Aphylophorales* (Miyachi & Mukai, 2005).

La frazione contenente i glucani è stata caratterizzata tramite spettroscopia FT-IR che evidenzia, negli estratti dei diversi funghi, le bande caratteristiche dei glucani. In particolare la banda a 894 cm^{-1} è caratteristica della conformazione β (Mathlouthi & Koeng, 1986). Analoghi profili degli spettri IR sono stati trovati in letteratura per glucani estratti da *Lentinus edodes* e *Aureobasidium pullulans* (Madi et al., 1997; Surenjav et al., 2006).

Un importante parametro per valutare i β -glucani è il loro peso molecolare. I pesi molecolari dei glucani riportati in letteratura mostrano una grande variabilità legata al grado di ramificazione del glucano e al tipo di legame. Glucani estratti da diverse fonti fungine mostrano grande varietà di pesi molecolari, come nel caso del *Pleurotus citrinopileatus* e della *Lentinus edodes* riportati da Zhang et al. (1994a) e Borchers et al. (1999) rispettivamente.

La componente contenente glucani estratta nel corso del dottorato, valutabile in circa il 6% del peso secco della biomassa del carpoforo di *P. ostreatus*, presenta due frazioni con peso molecolare di 59.8 e 37.5 KDa, con una preponderanza della frazione a più alto peso molecolare, in rapporto di circa 3:1. Risultati simili sono stati ottenuti da Kim

et al. (2005) in glucani estratti da carpoforo di *Agaricus blazeii*. Questi autori hanno osservato due frazioni con peso molecolare di 50 e 30 KDa. Come già riportato, il peso molecolare è un importante parametro legato all'attività biologica del composto. In particolare, glucani con peso molecolare paragonabile a quelli da noi ottenuti presentano una notevole attività farmacologica. Farrugia et al. (1998) ha estratto un glucano con attività antineoplastica (PS1A1) dal vaccino contro il *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) con un peso molecolare simile a quello della prima frazione da noi ottenuta.

Kim et al. (2005) hanno testato le frazioni glucaniche con pesi molecolari simili ai nostri su ratti diabetici, fornendole come bevanda per sei settimane. I livelli di glucosio nel sangue diminuivano rispetto al controllo mostrando un positivo effetto sulla vitalità e sulla proliferazione delle cellule pancreatiche (isole di Langherans) e portando così ad un miglioramento del metabolismo del glucosio. Tale miglioramento provocava la soppressione della sintesi dei trigliceridi nel fegato e la riduzione dei livelli di colesterolo e trigliceridi nel sangue, dimostrando l'utilità dei glucani nel rimedio dell'iperlipidemia e dell'arteriosclerosi.

Al contrario delle altre frazioni estratte nell'ambito di questa tesi, sui glucani estratti non è stato effettuato alcuno studio relativo alle loro applicazioni in quanto l'Istituto in cui è stata svolta la tesi non ha competenze idonee per studi di tipo farmacologico.

5.4. Chitina e chitosano

La chitina è il più importante componente della parete cellulare dei funghi dove è presente in quantità variabili. Il contenuto di chitina delle specie coltivate è una caratteristica delle specie e sembra essere indipendente dalla cultivar (Vetter, 2007). I risultati ottenuti nella presente tesi, variabili tra l'8.5 e il 19.6%, sono congruenti con i dati di letteratura e confermano la grande variabilità fra le varie specie. Le rese di chitosano degli isolati fungini studiati (circa l'1%) sono inferiori a quelle ottenute da alcune specie di funghi filamentosi come *Absidia* spp., *Actinomyces* spp., *Rhizopus* spp. (Shimahara et al., 1989) ma comparabili con quelli ottenuti per la *L. edodes* da Crestini et al. (1996). Questo conferma che il materiale chitinoso presente nelle pareti cellulari dei basidiomiceti è principalmente presente in forma acetilata (Mol and Wessels, 1990).

Le proprietà della chitina, come quelle del chitosano, dipendono dal grado di acetilazione, che è il più importante fattore che caratterizza questi composti.

La chitina è caratterizzata da un alto valore del grado di acetilazione (DA) in genere superiore all'80%. Il grado di acetilazione del chitosano, la forma deacetilata della chitina, è in genere inferiore al 20%.

La determinazione accurata del grado di acetilazione ha posto numerosi interrogativi al mondo scientifico. Il problema è stato esaurientemente discusso da Brugnerotto et al. (2001) che hanno ampiamente valutato pregi e difetti delle varie metodiche proposte che si basano principalmente sull'analisi elementare, degradazioni enzimatiche, titolazione di aminogruppi liberi, spettroscopia IR, UV ed NMR (Davies & Hayes, 1988; Muzzarelli, 1977; Roberts, 1997; Sannan et al., 1978).

La spettroscopia IR è stata proposta come un metodo conveniente per comparare rapidamente le proprietà di chitine provenienti da differenti fonti, incluso il grado di acetilazione. Esso viene determinato dal rapporto delle assorbanze tra la banda a 1655 cm^{-1} (legame amidico) e quella a 3450 cm^{-1} (gruppo ossidrile), usata generalmente come standard interno. Purtroppo non è facile costruire una corretta linea di calibrazione e questo spiega i diversi valori di DA, talvolta anche fortemente differenti, ottenuti per chitine derivanti dalla stessa fonte. Valori differenti sono stati registrati anche per le metodiche enzimatiche, dipendenti dalla fonte di enzima e dalle condizioni di reazione. Il metodo più affidabile è l'NMR che richiede però apparecchiature costose e prodotti ad alta purezza. Le difficoltà incontrate nel valutare il grado di acetilazione tramite gli spettri IR e la grande variabilità dei risultati ottenuti ci hanno indotto ad applicare il metodo di Neugebauer et al. (1989), metodica sufficientemente affidabile e rapida che misura il grado di acetilazione sulla base della reazione dell'acido picrico con gli aminogruppi della chitina e del chitosano.

Le chitine estratte dalle varie specie fungine e una chitina standard sono state analizzate con spettroscopia FT-IR al fine di avere una prima comparazione tra le caratteristiche delle chitine estratte e con la chitina standard. Come appare dalla Fig. 8 gli spettri presentano le bande caratteristiche della chitina e risultano comparabili tra loro.

La purezza dei campioni di chitina estratta dai funghi è stata determinata tramite la quantità di glucosamina presente dopo l'idrolisi acida del polimero che scinde la catena polimerica nelle sue unità monomeriche e trasforma l'N-acetilglucosamina in

glucosamina (tab. 8). La percentuale di glucosamina ottenuta dai campioni di chitina da fungo varia tra il 30 ed il 65 %. La resa è simile ai valori ottenuti da altri Autori (Synowiecki & Al-Khateeb, 1997; Zivanovic et al., 2005; Wu et al., 2005) e comparabile con il contenuto di glucosamina ottenuto per idrolisi dalla chitina standard anche se, in questo caso, è minore rispetto alla percentuale attesa di una molecola di chitina pura completamente idrolizzata (circa 80%). La più bassa resa in glucosamina ottenuta dai campioni di chitina fungina può anche essere legata alla perdita di oligomeri solubili di (acetil)glucosamina durante l'estrazione (Zivanovic et al., 2005). Normalmente, le migliori condizioni per l'idrolisi della chitina sono 18 h in HCl 6N a 80°C (No & Meyers, 1997). Comunque, la resa della glucosamina è influenzata dal substrato, dal tipo di acido usato e dalla sua concentrazione, dalla temperatura e dal tempo di idrolisi (Wu et al., 2005). La durata del tempo di idrolisi dipende anche dalla cristallinità della chitina che può essere assunta come un indice di resistenza della chitina all'idrolisi. Un alto grado di cristallinità riduce l'accessibilità delle molecole di chitina all'HCl; in questo modo si può ottenere un'incompleta idrolisi del campione (Kurita et al., 2001).

Tenuto conto delle trascurabili quantità di chitosano estraibili direttamente da micelio e carpofori (<1%), la chitina estraibile assume una grande importanza come "materia prima" per ottenere chitosano per deacetilazione. Per ottenere una efficiente deacetilazione è opportuno sottoporre i campioni di chitina a successive deacetilazioni. E' possibile così ottenere campioni di chitosano con un grado di acetilazione comparabile con quello del chitosano standard con una resa del 70-75%. Le caratteristiche del chitosano ottenuto per deacetilazione sono state valutate tramite spettroscopia FT-IR. Gli spettri IR mostrano la scomparsa della banda a 1550 cm⁻¹ (vibrazione amide II), confermando la qualità del chitosano ottenuto in tutto paragonabile al chitosano standard.

La deacetilazione della chitina fungina appare particolarmente interessante anche da un punto di vista economico in quanto facilmente ottenibile e per il suo costo di mercato che varia da 4,5 a 15 \$/Kg (Bailey et al., 1999; Babel et al., 2003) a seconda del grado di purificazione, della fonte di estrazione e dell'ambito di applicazione.

5.5. Adsorbimento dei metalli pesanti

Un aspetto importante dell'applicazione dei funghi e delle diverse frazioni polisaccaridiche è la loro applicazione per la decontaminazione ambientale. I funghi, infatti, sono ben noti per la loro capacità di assorbimento di molte sostanze xenobiotiche presenti nel terreno quali metalli pesanti, isotopi radioattivi, idrocarburi aromatici, polifenoli ed altro. Per tale caratteristica vengono considerati "indicatori ambientali" in grado di segnalare la contaminazione del loro habitat. Per la loro capacità di metabolizzare idrocarburi, sono stati anche proposti nel biorimediazione di terreni e materiali contaminati. La capacità di bioadsorbimento è principalmente dovuta alla presenza dei polisaccaridi di membrana. Questa constatazione ci ha indotto a valutare la capacità adsorbente del carpoforo, del micelio e delle varie frazioni polisaccaridiche estratte da essi. Lo studio è stato effettuato in ambiente acido a due differenti pH, 3 e 5, normalmente usati nelle esperienze di biosorption.

L'adsorbimento legato a glucani e chitina è risultato trascurabile rispetto all'alto adsorbimento del chitosano come riportato per *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* e *Mucor rouxii* (Baik et al., 2002). Tale risultato era prevedibile in quanto questo biopolimero ha destato particolare interesse, oltre che per il suo basso costo, per il suo alto valore complessante, superiore a quello degli altri agenti normalmente impiegati. Tali proprietà sono dovute al suo grande contenuto di gruppi funzionali amminici ed idrossilici che permette grandi potenzialità per l'adsorbimento di una vasta gamma di molecole come composti fenolici, coloranti e ioni metallici (Crini, 2005). La capacità chelante del chitosano rispetto a quella di altri adsorbenti naturali utilizzati dalle industrie viene presentata nella tabella (tab. 12) che sintetizza i risultati riportati da vari autori in letteratura.

La complessazione dei metalli da parte del chitosano e dei suoi derivati è stata descritta da Varma et al. (2004). I chitosani possiedono le caratteristiche di scambiatore ionico che permette di avere la più alta capacità chelante rispetto agli altri polimeri di origine naturale e mostra eccezionali capacità di legame, maggiori di una mmol g⁻¹ per la maggior parte dei metalli. Wan Ngah et al. (2002) hanno mostrato che le capacità di adsorbimento sono significativamente maggiori per il chitosano nel recupero del rame rispetto alle resine sintetiche commerciali. Il chitosano è superiore alla chitina nella rimozione di metalli pesanti da soluzioni acquose perchè è caratterizzato da un'alta

percentuale di azoto, presente come gruppi amminici, che sono responsabili per il legame con gli ioni metallici attraverso meccanismi di chelazione (Guibal et al., 1995). Contribuiscono all'adsorbimento anche i gruppi idrossilici, soprattutto nella posizione C-3 (Ravi-Kumar, 2000; Varma et al., 2004).

La cinetica dell'adsorbimento è molto rapida durante i primi minuti e raggiunge il massimo dopo i 5-10 minuti a 25°C come già riportato da Salehizadeh et al., (2003) e Galli et al. (2003). L'interazione del chitosano con le specie metalliche è fortemente dipendente dal pH (Ravi-Kumar, 2000; Varma et al., 2004; Ruiz et al., 2000). A pH 3 e 5 tutti i metalli testati nell'ambito di questa tesi erano presenti come ioni bivalenti e, nel caso del Cr (III), in forma trivalente. A pH superiori la maggior parte dei metalli precipitano risultando indisponibili per i gruppi chelanti (Galli et al., 2003). A pH inferiori a 5 il chitosano diventa solubile e si hanno problemi operativi.

La sperimentazione è stata effettuata anche sul chitosano ottenuto per deacetilazione della chitina. Non sono state riscontrate differenze significative sulle percentuali di adsorbimento tra il chitosano estratto direttamente da carpofofo e il chitosano ottenuto per deacetilazione della chitina. Differenze significative sono state riscontrate invece nell'adsorbimento con chitosano proveniente dalla deacetilazione della chitina di gamberetto. E' probabile che il più alto valore di DA% influenzi la capacità adsorbente del composto in quanto sono presenti un minor numero di siti amminici disponibili per il legame. L'aumento della capacità chelante aumenta con la quantità di campione utilizzato poiché quando aumenta la biomassa è disponibile una maggiore superficie di contatto, come riportato per la chitina da Benguella & Benaissa (2002).

Il processo di rimozione di un metallo è ridotto in presenza di altri ioni per un meccanismo di interazione ed interferenza (Salehizadeh et al., 2003). I risultati relativi all'adsorbimento di una miscela di metalli (Fig. 17) conferma quanto riportato in letteratura. E' comunque da notare che la capacità adsorbente del chitosano non cambia sia in presenza di una sola specie metallica sia in presenza di metalli in miscela.

Tab.12 - Capacità di adsorbimento dei metalli su diversi adsorbenti naturali.

Materiale	Riferimento bibliografico	mg metallo adsorbito g ⁻¹ adsorbente					
		Cd(II)	Pb(II)	Ni(II)	Zn(II)	Cu(II)	Cr(III)
Chitosano	Jha et al., 1988 Masri et al., 1974 McKay et al., 1989	558	796	164	75	222	92
Zeoliti	Leppert, 1990	137	175	4,5	5,5	5,10	26
Argilla	Naseem & Thair, 2001	11,4	20	--	4,5	1,2	--
Torba	Mc Lelland & Rock, 1988 Chen et al., 1990	22,5	40	11,8	13,1	19,6	29
Carboni attivi	Ranger-Mendez, 2002 Reed & Arunachalam, 1994	146	30	10	18	30	30
Lignina	Srivastava et al., 1994	--	1865	--	95	--	--
Biomasse microbiche	Roy et al., 1993 Say et al., 2001	21,4	11,4	--	--	--	--

5.5.1. Rigenerazione del chitosano

La rigenerazione dell'adsorbente è un fattore molto importante per abbattere i costi del processo e per recuperare l'inquinante estratto dalla soluzione. Per questo scopo è opportuno adsorbire e desorbire gli inquinanti e rigenerare il materiale per altri cicli di applicazione. La fase di desorbimento del processo permette di recuperare il metallo in forma concentrata e di restituire al materiale le sue originali capacità adsorbenti. Nel chitosano, il doppietto elettronico dell'azoto sul gruppo amminico è responsabile dell'adsorbimento dei cationi metallici ed avviene normalmente a pH 5 mentre il desorbimento può essere effettuato facendo passare sull'adsorbente una soluzione acida. In questo studio è stato usato HNO_3 0.1 N come eluente per il desorbimento ed acqua per ripristinare il pH. Yan & Viraraghavan (2003) riportano che l' HNO_3 è un eluente più efficiente rispetto a CaCl_2 ed NaCl . Dopo tre successivi adsorbimenti/desorbimenti la capacità di recupero del metallo era ancora di circa il 90%.

Il chitosano presenta i requisiti generalmente richiesti ai materiali adsorbenti. Ha infatti una buona efficienza per la rimozione di una vasta varietà di inquinanti, un'alta capacità e tasso di adsorbimento per metalli e contaminanti. Comparato con i convenzionali adsorbenti, l'impiego di chitosano offre alcuni vantaggi anche da un punto di vista economico in quanto facilmente ottenibile per deacetilazione della chitina estraibile da biomasse fungine cresciute su materiali di scarto facilmente reperibili. Non è infine da trascurare la possibilità di rigenerazione che rende il chitosano riusabile con alta efficienza nei processi industriali.

Nell'uso e nella scelta dei polisaccaridi quali decontaminanti occorre comunque tener presenti alcune considerazioni che riguardano le proprietà dell'adsorbimento che dipendono dalle differenti fonti di materia prima. La capacità di adsorbimento della chitina e del chitosano dipende dall'origine del polisaccaride, dal grado di N-acetilazione, dal peso molecolare, dalla cristallinità e dalla quantità di amminogruppi (Kurita, 2001) oltre che dalle caratteristiche fisico-chimiche come la porosità, la superficie d'area specifica e la dimensione delle particelle di adsorbente. La produzione commerciale di chitosano attraverso la deacetilazione con alcali forti della chitina proveniente dai crostacei sembra avere dei limiti per un'applicazione di tipo industriale a causa delle difficoltà del processo ed in particolare per la grande quantità di rifiuti di soluzioni alcaline concentrate che causano inquinamento ambientale.

La chitina, presente in buona percentuale nella parete cellulare dei funghi, potrebbe essere un buon materiale di partenza per ottenere chitosano.

Tab. 13 - Vantaggi e svantaggi di materiali a base di polisaccaridi usati come adsorbenti per la rimozione di inquinanti dalle soluzioni.

Vantaggi	Svantaggi
Polimeri naturali economici	Adsorbente non poroso
Non inquinante	Capacità di adsorbimento dipendente dall'origine del polisaccaride e dal grado di N-acetilazione
Economico	pH-dipendente
Alta efficienza e selettività nella detossificazione di soluzioni diluite e concentrate	Modificazioni chimiche per aumentare il rendimento
Capacità di legame notevole per metalli pesanti e coloranti	Bassa affinità per coloranti basici
Ottenimento di un effluente trattato di alta qualità	Variabilità delle particelle

5.5.2. Isoterme di adsorbimento

L'analisi dei dati all'equilibrio è importante per sviluppare un'equazione che può essere utilizzata per comparare differenti tipi di adsorbenti in diverse condizioni sperimentali e per studiare ed ottimizzare metodi di preconcentrazione di soluzioni contenenti metalli (Özer & Özer, 2003).

L'indagine del rendimento è fondamentale per l'applicazione industriale dei meccanismi di bioadsorbimento poiché fornisce informazioni sull'equilibrio del processo.

La comparazione tra le capacità di adsorbimento del chitosano usato in questo studio con quelli riportati in letteratura (tab.14) mostrano che questo polisaccaride può essere utilizzato per la riduzione dei metalli pesanti presenti nelle soluzioni.

La diversa quantità di ione metallico adsorbito può essere attribuita alla densità di carica, all'attrazione interattiva ed al tipo di conformazione del polimero adsorbente (Salehizadeh, 2003). Il basso valore di b (0.026) ottenuto nell'equazione di Langmuir

indica un forte legame tra il chitosano e gli ioni metallici, come riportato da Say et al. (2001) per biomasse fungine non viventi.

Tab.14. Valori di q_{max} ottenuti dall'adsorbimento del Cu(II) su diversi tipi di adsorbenti.

Fonte	q_{max} (mg g⁻¹)	pH	T (°C)	C (mg l⁻¹)	Riferimento
Chitosano	184,6	5	25	0-700	Presente tesi
Batteri fanghi attivi	50	5		15-200	Fourest & Roux, 1992
<i>Zoogloea ramigera</i>	270	5,5	25	0-500	Fourest & Roux, 1992
<i>Zoogloea ramigera</i>	29	4	25	25-125	Fourest & Roux, 1992
<i>Rhizopus arrhizus</i>	9,5	5,5	25	0,6-25	Fourest & Roux, 1992
<i>Bacillus firmus</i>	860	4	25	0-2000	Salehizadeh, 2003
<i>Bacillus firmus</i>	381	4	25	0-500	Salehizadeh, 2003

6. CONCLUSIONI

La potenzialità dei basidiomiceti come possibili organismi dai quali estrarre composti biologicamente attivi è stata oggetto di notevole attenzione da parte della comunità scientifica che ha individuato in alcune classi di polisaccaridi presenti nella parete cellulare una serie di composti di indubbio interesse. L'impiego di tali prodotti ha grandemente stimolato il mercato dei funghi medicinali e dei loro derivati, con un fatturato passato dai circa 1,2 bilioni di dollari nel 1991 agli oltre 6 bilioni attuali.

Una notevole letteratura conferma le proprietà farmacologiche e medicinali dei basidiomiceti. Tali proprietà rappresentano un importante campo di ricerca in vista di biotecnologie mirate alla produzione di composti biologicamente attivi. L'estrazione di tali composti è in genere influenzata dalla specie, dal tempo di raccolta e da una serie di parametri ambientali spesso di difficile controllo. L'impiego di ceppi fungini selezionati, caratterizzati geneticamente e allevati in condizioni standardizzate è un requisito indispensabile in vista della riproducibilità del prodotto ottenuto.

Su questa base durante il dottorato di ricerca sono state estratte alcune classi di polisaccaridi di notevole interesse utilizzando ceppi fungini appartenenti alla collezione dell'Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale del CNR:

- glucani, composti con attività farmacologica e nutrizionale il cui impiego richiede comunque un preventivo esame farmacologico, con una resa di circa il 6% p.s.
- esopolisaccaridi, composti di cui è stata sperimentata l'azione inibente per micotossine ed organismi implicati nella loro produzione, con una resa variabile tra 4,6 e 11,0 % a seconda della specie fungina
- chitina, composto di grande interesse per le sue applicazioni in campo nutrizionale, farmacologico ed ambientale. La resa della chitina varia tra 8,5 e 19,6 % a seconda della specie fungina.
- chitosano, presente in piccole quantità negli estratti, ma facilmente ottenibile per deacetilazione della chitina con una resa del 70-75%.

L'attività di ricerca si è particolarmente focalizzata sulla capacità del chitosano quale chelante per metalli pesanti, normalmente presenti in molti reflui industriali. I risultati ottenuti indicano una capacità di adsorbimento di circa 170 mg di Cu(II) per g di chitosano, totalmente recuperabile per desorbimento con soluzioni acide. Ciò conferma l'idoneità del chitosano nella decontaminazione dei reflui.

La produzione commerciale di chitosano per deacetilazione della chitina estratta dai crostacei con alcali forti presenta inconvenienti per le difficoltà legate al processo e particolarmente per le grandi quantità di reflui con alta concentrazione di alcali che causano inquinamento ambientale. I funghi possono essere considerate come una biomassa di partenza per ottenere chitina e chitosano in maniera ecocompatibile per la loro produzione in quanto possono essere facilmente coltivati su mezzi sintetici o su reflui agroindustriali.

7. BIBLIOGRAFIA

- Agrawal, K.G., Rakwal, R., Tamogami, S., Yonekura, M., Kubo, A., Saji, H.** (2002). Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 1061-1069.
- Ahren, I.L., Williams, D.L., Rice, P.J., Forsgren, A., Riesbeck K.** (2001). The importance of a β -glucan receptor in the nonopsonic entry of nontypeable *Haemophilus influenzae* into human monocytic and epithelial cells. *Journal of Infectious Disease*, 184, 150-158.
- Aksu, Z. & Tezer, S.** (2000). Equilibrium and kinetic modelling of biosorption of Remazol Black B by *Rhizopus arrhizus* in a batch system: effect of temperature. *Process Biochemistry*, 36, 431-439.
- Alberts, A.W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J., Springer, J.** (1980). Mevilonin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 77, 3957-3961
- Aoki, T.** (1984). Lentinan. In: *Immune Modulation Agents and their Mechanism*, R.L. Fenichel and M.A. Chirgis (eds.) *Immunology Studies*, pp. 62-77.
- Arakawa, N., Mukohyama, H., Nakai, M., Nakajima, K., Tanabe, O., Inagaki, C.** (1977). Separation of hypocholesterolemic factors in *Flammulina velutipes*. *Eyko to shokuryo*, 30, 35-38.
- Araki, Y. & Ito, E.** (1975). A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: enzymatic deacetylation of chitin. *European Journal of Biochemistry*, 189, 249-253.
- Archibald, F., Piace, M.G., Jurasek, L.** (1990). Decolorization of kraft bleachery effluent chromophores by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 12, 846-853.
- Babel, S. & Kurniawan, T.A.** (2003). Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 97, 239-243.

- Bae, J.T., Sinha, J., Park, J.P., Song, C.H., Yun, J.W.** (2000). Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 482–487.
- Baik, W.Y., Bae, J.H., Cho, K.M., Hartmeier, W.** (2002). Biosorption of heavy metals using whole mold mycelia and parts thereof. *Bioresource Technology*, 81, 167-170.
- Bailey, S.E., Trudy, J.O., Marck Bricka, R., Dean Adrian, D.** (1999). A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Research*, 33, 2469-2479
- Baoshan, X., McGill, W.B., Dujas, M.J., Maham, Y., Hepler, L.** (1994). Sorption of phenol by selected biopolymers. Isotherms, energetics and polarity. *Environmental Science and Technology*, 28, 466-473.
- Bautista-Ban̄os, S., Hernandez-Lopez, M., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L.** (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit, *Crop Protection*, 22, 1087–1092.
- Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R.** (Eds.)(1997). *Ecologia, individui, popolazioni, comunità*. In: Nicola Zanichelli Editore S.p.A., Bologna, 447.
- Benguella, B. & Benaissa, H.** (2002). Cadmium removal from aqueous solutions by chitin: kinetic and equilibrium studies. *Water Research*, 36, 2463-2474.
- Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C., Fallik, E.** (2003). Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*, 22, 285-290.
- Bhat, K.M. & Maheswari, R.** (1987). *Sporotrichum thermophile* growth, cellulose degradation and cellulase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2175-2182.
- Bickle, M., Delley, P.A., Schmidt A., Hall, M.N.** (1998). Cell wall integrity modulates RHO1 activity via exchange factor ROM2. *EMBO Journal*, 17, 2235-2245.
- Bobek, P., Ozdin, L., Galbavy, S.** (1998). Dose and time dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. *Nutrition*, 14, 282-286.

- Bobek, P., Ozdin, L., Kuniak, L.** (1994). Mechanism of hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats: reduction of cholesterol absorption and increase of plasma cholesterol removal. *Z Ernährungswiss*, 33, 44-50.
- Bohn, J.A. & Bemiller, J.H.** (1995). (1→3)-β-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure- functional activity relationship. *Carbohydrate Polymers*, 28, 3-14.
- Bonvin, M.M. & De Bertorello, M.M** (1994). In vitro drug release from chitosan membranes. Study of mechanism of permeation. *Polymer Bulletin*, 32, 69-75.
- Borchers, A.T., Stern, J.S., Hackman, R.M., Keen, C.L., Gershwin, M.E.** (1999). Minireview: Mushrooms, tumors and immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 221, 281-293.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Breene, W.** (1990). Nutritional and Medicinal value of Specially Mushrooms. *Journal Food Processes*, 53, 883-894.
- Breuel, K.F., Kougias, P., Rice, P.J., Wei, D., De Ponti, K., Wang, J., Laffan, J.J., Li, C., Kalbfleisch, J., Williams, D.L.** (2004). Anterior pituitary cells express pattern recognition receptors for fungal glucans: implication for neuroendocrine immune involvement in response to fungal infections. *Neuroimmunomodulations*, 11, 1-9.
- Brown, G.D. & Gordon S.** (2001). Immune recognition: a new receptor for β-glucans. *Nature*, 413, 36-37.
- Brown, G.D. & Gordon, S.** (2003). Fungal, glucans and mammalian immunity. *Immunity*, 19, 311-315.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Arguelles-Monal, W., Desbrières, J., Rinaudo, M.** (2001). An Infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3569-3580.
- Burns, P.J., Yeo, P., Keshavarz, T., Roller, S., Evans, C.S.** (1994). Physiological studies of exopolysaccharide production from the basidiomycete *Pleurotus sp. florida*. *Enzyme Microbiology and Technology*, 16, 566–572.

- Buswell, J.A. & Chang S.T.** (1993). Edible Mushrooms: Attributes and Applications. In: Genetics and Breeding of Edible Mushrooms. Chang S.T., Buswell J.A., and Miles P.G. (eds.) Philadelphia: Gordon and Breach Scientific Publication, 297-927.
- Caihua, N. & Yuwu, X.** (1996). Studies on synthesis and properties of chelating resins based on chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 59, 499-504.
- Cameron, M.D., Timofeevski, S., Aust, S.D.** (2000). Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 751-758.
- Canevascini, G. & Glatten, C.** (1981). A comparative investigation of various cellulase assay procedures. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1573-1590.
- Chandrkrachang, S.** (2002). The applications of chitin and chitosan in agriculture in Thailand. In: *Advances in Chitin Science*. K. Suchiva, S. Chandrkrachang, P. Methacanon, M.G. Peter (eds.), vol. 5, Bangkok, pp. 458-462. ISBN 974-229-412-7.
- Chang, S.T.** (1993). Mushroom biology: the impact on mushroom production and mushroom products. First International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Chang, S.T. (ed.). The Chinese University Press, Hong Kong, pp.10-19.
- Chang S.T.** (1996). Mushroom research and development – equality and mutual benefit. In: *Mushroom biology and mushroom products. Proceeding of the Second International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*. Royse D.J. (ed.), Pennsylvania State University, PA, pp. 1-10.
- Chang, S.T. & Buswell J.A.** (1996). Mushrooms nutraceuticals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 473-476.
- Chang, S.T. & Miles, P.G.** (Eds.)(1989). *Edible mushrooms and their cultivation*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 28-31.
- Chang S.T. & Mshigeni K.E.** (2000). *Ganoderma lucidum* – paramount among medicinal mushrooms. *Discovery and Innovation*, 12, 97-101.
- Chang, K.L.B., Tsai, G., Lee, J., Fu, W.R.** (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*, 303, 327-332.
- Chao, E.E. & Gruen, H.E.** (1987). Intracellular activity of mycelial proteinases during fruit body development in *Flammulina velutipes*. *Canadian Journal of Botany*, 65, 518-525.

- Chen X.H., Gosset, T., Thévenot, D.R.** (1990). Batch copper ion binding and exchange properties of peat. *Water Research*, 24, 1463-1471.
- Chibu, H. & Shibayama, H.** (2001). Effects of chitosan applications on the growth of several crops. In: *Chitin and Chitosan in Life Science*. T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (eds.), pp. 235–239, ISBN 4-906464-43-0.
- Ching-Hua, S., Chi-Shu, S., Shan-Wei, J., Chung-Hong, H., Wenting, K., Ming-Thau, S.** (1997). Fungal mycelia as a source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes. *Biomaterial*, 18, 1169-1174.
- Chobot, V., Kremenak, J., Opletal, L.** (1995). Phytoterapeutic aspects of disease of the circulatory system. 4. Chitin and chitosan. *Ceska Slovenska Farmacie*, 44, 190-195.
- Choi, B.K., Kim, K.Y., Yoo, Y.J., Oh, S.J., Choi, J.H., Kim, C.Y.** (2001). In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, 553-557.
- Chihara, G.** (1992) Immunopharmacology of lentinan, a polysaccharide isolated from *Lentinus edodes*: its application as a host defence potentiator. *International Journal of Oriental Medicine*, 17, 57-77.
- Clutterbuck, A.J.** (1972). Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 70, 423-435.
- Cossar, D. & Canevascini, G.** (1986). Cellulase enzyme production during continuous culture growth of *Sporotrichum (Chrysosporium)*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24, 306-310.
- Compere, A.L., Griffith, W.L., Greene, S.V.** (1980). Polymer production by *Pleurotus*. *Development in Industrial Microbiology*, 21, 461–469.
- Crestini, C., Kovac, B., Giovannozzi-Sermanni, G.** (1996). Production and isolation of chitosan by submerged and solid-state fermentation from *Lentinus edodes*. *Biotechnology Bioengineering*, 50, 207-210.
- Crini, G.** (2005). Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. *Progress in Polymer Science*, 30, 38–70.
- Crisan, E.V. & Sands, A.** (1978). Nutritional value. In: *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Chang, S.T. and Hayes, W.A., (eds.), Academic Press, New York, pp. 137–165.

- Cui, Q.Y., Van der Lans, R.G.J.M., Luyben, K.C.A.M.** (1997). Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 55, 715–726.
- Danilyak, N.I. & Katsan, V.A.** (1987). Effect of pH on the activity and stability of extracellular cellulases in *Coriolus hirsutus*. *Mikrobiol Zh (Kiev)*, 49, 40-44.
- Danilyak, N.I., Bagalai, V.A., Yarovenkio, V.L.** (1989). Kinetic and thermodynamic specificity of endoglucanase from higher basidiomycetes, *Pishch Proms. (Moscow)*, 3, 69-71.
- Davies, D.H. & Hayes, E.R.** (1988). Determination of the Degree of Acetylation of chitin and chitosan. In: W.A.Wood, S.T. Kellogg (eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 161, 442–446.
- Denise, G.F. & Geraldo, L.S.** (1990). Characterisation of glucoamylase immobilised on chitin. *Biomass*, 23, 71-78.
- Determann H.** (Ed.) (1968). *Gel Chromatography*. Springer-Verlag, New York, Inc.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J.** (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 703–714.
- Di Luzio, N.R., McNameer, R., Jones, E., Cook, J.A., Hoffman, E.O.** (1976). The employment of glucan and glucan-activated macrophages in the enhancement of host resistance to malignancies in experimental animals. In: *The macrophage in neoplasia* M.A.Fink (ed.), Academic Press, New York, pp. 181-195.
- Dosoretz, C.G., Dass, S.B., Reddy, G.A., Grethlein, H.E.** (1990). Protease-mediated degradation of lignin peroxidase in liquid cultures of *Phanerochaete chysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3429-3434.
- Duboc, P. & Mollet, B.** (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11, 759-768.
- Dumitriu, S., Magny, P., Montane, D., Vidal, P.F., Chornet, E.** (1994). Polyionic hydrogels obtained by complexation between xanthan and chitosan: Their properties as supports for enzyme immobilisation. *Journal of Bioactive Polymers*, 9, 184-290.
- Ellis, W.O., Smith, J.P., Simson, B.K.** (1991). Aflatoxin in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 30, 403– 439.

- Endo, A.** (1998). Chemistry, biochemistry and pharmacology of HMG Co A reductase inhibitors. *Klin Wochenschr*, 66, 421-427.
- Eriksson, K.E., Blanchette R.A., Ander P.** (Eds.)(1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, New York, London, Paris.
- Fabbri, A.A., Fanelli, C., Panfili, G., Passi, S., Fasella, P.** (1983) Lipoperoxidation and aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus* and *A. flavus*. *Journal of General Microbiology*, 129, 3447-3452.
- Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., Henson, P.M.** (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 405, 85-90.
- Fanelli, C., Fabbri, A.A., Finotti, E., Fasella, P., Passi, S.** (1984). Free radicals and aflatoxin biosynthesis. *Experientia*, 40, 191– 193.
- Fanelli, C., Fabbri, A.A., Pieretti, S., Finotti, E., Passi S.** (1985). Effect of different antioxidants and free radical scavengers on aflatoxin production. *Mycological Research*, 1, 65–69.
- Fanelli, C., Tasca, V., Ricelli, A., Reverberi, M., Zjalic, S., Finotti, E., Fabbri, A.A.** (2000). Inhibiting effect of medicinal mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing (Agaricomycetidae) on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* Speare. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2, 229–236.
- Fang, Q.H. & Zhong, J.J.** (2002). Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, 10, 61–65.
- FAO/WHO** (1973). Energy and Protein Requirements. Rept. Jt. FAO/WHO Ad Hoc Expert Comm., Food Nutrition. Meet Rep. Ser. No.52. Food Agric. Organ., World Health Organ. Geneve.
- Farrugia, I.V., Dadey, E.J., Ashline, K., Groves, M.J.** (1998). Comparative measurement of the molecular weight of an antineoplastic glucan from BCG vaccine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50, 1205-11.
- False, P.A. & Panda, T.** (1999). Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*, 20, 505-512.

- Focher, B., Beltrame, L.P., Naggi, A., Torri, G.** (1990). Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. Reaction kinetics and structure modifications. *Carbohydrate Polymers*, 12, 405-418.
- Fourest, E. & Roux, C.J.** (1992). Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanism and influence of pH. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 399-403.
- Furue, H.** (1986). Biological characteristic of schizophyllan (SPG) and its clinical effect. *Medical Immunology*, 12, 65-77.
- Galli, E., Di Mario, F., Rapanà, P., Lorenzoni, P., Angelini, R.** (2003). Copper biosorption by *Auricularia polytricha*. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 133-137.
- Garcha, H.S.** (1993). Nutritional Importance of Mushrooms. In: *Mushrooms Biology and Mushroom Products*. S.T. Chang (ed.) Shatin, Hong Kong: The Chinese University Press, pp. 227-236.
- Gavrilova, V.P., Goncharova, N.A., Shamolina, I.I., Vol'f, L.A.** (1980). Immobilization of proteolytic enzymes from cultural filtrates of *Flammulina velutipes* (Fr.) Karst. by fibrous ionites (title translated from russian). *Mikologiya i Fitopatologiya*, 14, 328-331.
- Geiger, J.P., Micole, M., Nandris, D., Rio, B.** (1986). Root rot disease of *Hevea brasiliensis*. Physiological and biochemical aspects of host aggression. *European Journal of Pathology*, 16, 22-37.
- Ginterova, A., Janotkova, O., Zemek, J., Augustin, J., Kuniak, L.** (1980a). Cellulase activity of higher fungi. *Folia Microbiologica (Prague)*, 25, 318-323.
- Ginterova, A., Polster, M., Janotkova, O.** (1980b) The relationship between *Pleurotus ostreatus* and *Aspergillus flavus* and the production of aflatoxin. *Folia Microbiologica (Prague)*, 25, 332-336.
- Glaouth, E.A., Arul, J., Wilson, C., Benhamor, N.** (1997). Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in black pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 12, 183-194.
- Guibal, E., Roulph, C., Le Cloirec, P.** (1995). Infrared spectroscopic study of uranyl biosorption by fungal biomass and materials of biological origin. *Environmental Science and Technology*, 29, 2496-2503.

- Gunde-Cimerman, N.** (1999). Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (Agaricales s.l., Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 69-80.
- Gunde-Cimerman, N., Friedrich, J., Cimerman, A., Benicki N.** (1993a). Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: production of mevilonin by the fungi of the genus *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 111, 203-206.
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A., Cimerman A.** (1993b). *Pleurotus* fungi produce mevilonin, an inhibitor of HMG CoA reductase. *FEMS Microbiology Letters*, 113, 333-338.
- Gutiérrez, A., Prieto, A., Martínez, A.T.** (1996). Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydrate Research*, 281, 143-154.
- Guzmán, G.** (2000). Genus *Pleurotus* (Jacq.:Fr) P. Kumm. (Agaricomycetidae): diversity, taxonomic problems, and cultural and traditional medicinal uses. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2, 95-123.
- Harschman, K.D., Moye-Rowley, W.S., Parker, C.S.** (1988) Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to Ap-1 that is distinct from GCN4. *Cell*, 53, 321–330.
- Hawksworth, D.L.** (2001). Mushrooms: the extent of the unexplored potential. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3, 333-337.
- Hirano, S.** (1996). Chitin biotechnology applications. *Biotechnology Annual Review*, 2, 237–258.
- Hirano, S., Matura, Y., Kusunoki, M., Kitigawa, Y.** (1987). Two crystalline forms of a lectin from *Flammulina velutipes*. *Journal of Biochemistry*, 102, 445-446.
- Hobbs, C.** (1995). *Medicinal Mushrooms: an exploration of Tradition, Healing and Culture*. Hobbs, C. (ed.) Botanica Press, Santa Cruz, Ca, USA.
- Hobbs, C.** (1996). *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pil. In: *Medicinal Mushroom, an Exploration of Tradition, Healing and Culture*. Miovic, M. (Ed.), Interweave Press Inc., Loveland, pp., 161– 167.

- Hong, J.S.** (1976). Studies on physico-chemical properties and the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). Journal of Korean Agriculture Chemical Society, 21, 150-184.
- Ikeda, R., Uyama, H., Kobayashi, S.** (1996). Novel synthetic pathway to a poly(phenylene oxide): laccase catalysed oxidative polymerisation of syringic acid. Macromolecules, 29, 3053-3054.
- Iwai, K., Iwata, M., Fujino, S.** (1977). Nutritional requirements for folate compounds and some enzyme activities involved in the folate biosynthesis. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 23, 95-100.
- Jackson, P.E. & Groopman J.D.** (1999). Aflatoxin and liver cancer. Baillière's Best Practice Research Clinical Gastroenterology, 13, 545-555.
- Jafelice, L.R.S., Wiseman, A., Goldfarb, P.** (1988). Sequential appearance of β -glucosidase and lignin peroxidase in the exocellular fluid of a stationary phase culture of *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemical Society Transaction, 16, 369-370.
- Jafelice, L.R.S., Wiseman, A., Goldfarb, P.** (1990). Exocellular and intracellular β -glucosidase produced in ligninolytic culture of *Phanerochaete chrysosporium*. Biochemical Society Transaction, 18, 644-645.
- Jansson-Charrier, M., Saucedo, I., Guibal, E., Le Cloirec, P.** (1995). Approach on uranium sorption mechanisms on chitosan and glutamate glucan by IR and ^{13}C -NMR analysis. Reactive and Functional Polymers, 27, 209-221.
- Jayashree, T. & Subramanyam, C.** (2000). Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Free Radicals Biological Medicine, 29, 981-985.
- Jei-Fu, S., Rey-Chang, C., Wang, F.F., Wang, J.Y.** (1990). Lipolytic activities of lipase immobilised on six selected supporting materials. Biotechnology and Bioengineering, 35, 132-137.
- Jha, I.N., Iyengar, L., Prabhakara Rao, A.V.S.** (1988). Removal of cadmium using chitosan. Journal of Environmental Engineering, 114, 962-974.
- Jonathan, S.G. & Fasidi, I.O.** (2001a). Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* and *Schizophyllum commune* from Nigeria. Food Chemistry, 75, 303-307.

- Jonathan, S.G. & Fasidi, I.O.** (2001b). Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom. *Food Chemistry*, 72, 479–483.
- Jong, S.C. & Donovich, R.** (1989). Antitumor and antiviral substances from fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 34, 183-261.
- Joseph, A.L.** (1994). Removing acid dyes from textile waste water using biomass for decolourisation. *American Dyestuff Reporter*, 83, 5-13.
- Kabir, Y. & Kimura, S.** (1989). Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) and maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 33, 341-346.
- Kanda, T., Noda, I., Wakabayashi, K., Nisizawa, K.** (1983). Transglycosylation activities of exo- and endo-type cellulases from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *Journal of Biochemistry*, 93, 787-794.
- Kaneda, T. & Tokuda, S.** (1996). Effect of various mushrooms preparation on cholesterol levels in rats. *Journal of Nutrition*, 90, 371-376.
- Kang De, Y., Tao, P., Mei-Xuan, X., Chen, Y., Mattheus, G.F.A., Qi-quiring, Z., Lei, R.** (1994). pH dependent hydrolysis and drug release of chitosan/polyether interpenetrating polymer network hydrogel. *Polymer International*, 34, 213-219.
- Karácsonyi, S. & Kuniak, L.** (1994). Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: isolation and structure of pleuran, an alkali insoluble β -D-glucan. *Carbohydrate Polymers*, 24, 107-111.
- Kashiwagi, Y., Magae, Y., Sasaki, T.** (1985). Effect of cellobiose octacetate on the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile aphinis*. *Shokuhin Sogo Ken Kyusho Kenkyu Hokoku*, 46, 145-147.
- Kim, J.H., Hosobuhi, M., Koshimoto, M., Seki, T., Yoshida, T., Taguchi, H., Ryu, D.D.Y.** (1985). Cellulase production by a solid state culture system. *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 1445-1450.
- Kim, C.Y., Choi, H.M., Cho, H.T.** (1997). Effect of acetylation on sorption of dyes from chromium on chitin. *Journal of Applied Polymer Science*, 63, 725-736.
- Kim, D.H., Yang, B.K., Jeong, S.C., Park, J.B., Cho, S.P., Das, S., Yun, J.W., Song, C.H.** (2001). Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the

submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. Biotechnology Letters, 23, 513–517.

Kim, S.W., Hwang, H.J., Xu, C.P., Na, Y.S., Song, S.K., Yun, J.W. (2002). Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. Letters in Applied Microbiology, 34, 389–393.

Kim, Y., Kim, K., Choi, H., Lee, D. (2005). Anti-diabetic activity of β - glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. Biotechnology Letters, 27, 483-487.

Klesov, A.A., Bolobova, A.V., Ostrovskaya, M.V., Pogazlov, B.F. (1985). The activation of cellulase from different sources by actin. FEBS Letters, 187, 101-104.

Knorr, D., Beaumont, M.D., Pandya, Y. (1989). Potential of acid soluble and water soluble chitosan in biotechnology. In: Chitin and Chitosan, Skjak-Braek, G., Anthonsen, T., Sanford, P., (Eds.), Elsevier Applied Science, London, New York, pp. 101-118.

Kopecka, M. & Kreger, D.R. (1986). Assembly of microfibrils in vivo and in vitro from (1→3)- β -D-glucan synthesised by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Microbiology, 143, 387-395.

Kosaka, A., Imaizumi, A., Attori Y., Yamashima, A. (1986). Nature of antitumor action of lentinan-endocrine therapy on the mammary tumor. Excepta Medica-738, 208-220.

Kougias, P., Wei, D., Rice, P.J., Ensley, H.E., Kalbfleisch, J., Williams, D.L., Browder, I.W. (2001). Normal human fibroblast express pattern recognition receptors for fungal (1→3)- β -D-glucans. Infection and Immunity, 69, 3933-3938.

Krcmar, P., Novotny, C., Marais, M.F., Joseleau, J.P. (1999) Structure of extracellular polysaccharide produced by lignin degrading fungus *Phlebia radiata* in liquid culture. International Journal of Biological Macromolecules, 64, 61–64.

Kubo, K. & Nishizawa, K. (1983). Purification and properties of two endo-type cellulases from *Irpex lacteus* (*Polyporus Tulipiferae*). Journal Fermentation Technology, 61, 383-389.

Kuhad, R.C., Singh, A., Eriksson, K.E.L. (1997) Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. Advances in Biochemical Engineering, 57, 47–125.

- Kumar, N.V.R.M.** (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Kurashima, Y., Mitsuhiro, T., Takashi, S.** (1990). Marked formation of Thiazolidine-4-carboxylic acid, an effective nitrite trapping agent in vivo, on boiling of dried shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 38, 1945–1949.
- Kurita, K.** (1998). Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 117-120.
- Kurita, K.** (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*, 26, 1921-1971.
- Kvachadze, L.L., Chkhartishvili, D.K., Milkhlina, E.D., Kvestiadze, G.I.** (1985). Effect of the nutrient medium composition on the synthesis of extracellular cellulases by *Sporotrichum thermophile aphinis*. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya.*, 21, 624-630.
- Lay Nge, K., New, N., Chandkrachang, S., Willem F., Stevens, W.F.** (2006). Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Science*, 170, 1185–1190.
- Leatham, G. & Staham, M.A.** (1981). Studies on the laccases of *Lentinula edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *Journal of General Microbiology*, 125, 147-157.
- Lee, I.H., Huang, R.L., Chen, C.T., Chen, H.C., Hsu, W.C., Lu, M.K.** (2002). *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit antihepatitis B virus effects. *FEMS Microbiology Letters*, 209, 63–67.
- Lenhart, J., Figueroa, L.A., Honeyman B.D., Kaneko D.** (1997). Modelling the adsorption of U(VI) onto animal chitin using coupled mass transfer and surface complexation. *Colloids and Surfaces*, 120, 243-254.
- Leppert, D.** (1990). Heavy metal sorption with clinoptilolite zeolite: alternatives for treating contaminated soil and water. *Mining Engineering*, 42, 604-608.
- Li, H., Zhang, L., Dong, L., Cao, J.** (1994). Preparation and immunologic competence of glycopeptides components from *Pleurotus ostreatus* fungi. *Shandong Yike Daxue Xuebao*, 32, 343-346.
- Lin, Z. & Huang, H.** (1987). Protective action of Lentinan against experimental liver injuries. *Journal of Beijing Medical University*, 19, 93-95.

- Lindequist, U.** (1990). New active substances from basidiomycetes. *Zeitschrift fur Phyto-Therapy*, 11, 139-149.
- Lip Yong, C., Richard, J.S., Paul, F.H., Brian, S.F., Andrea, M.A., Terence, D.** (1994). Biocompatibility of potential wound management products: Fungal mycelia as source of chitin/ chitosan and their effect on the proliferation of human fibroblasts in culture. *Journal of Biomedical Materials Research*, 28, 463-469.
- Liu, B. & Yun-Sun, B.** (Eds.)(1980). *Fungi Pharmacopoeia (Sinica)*., Kinoka Co. Oakland, California.
- Liu, G.T.** (1999). Recent advances in research of pharmacology and clinical applications of *Ganoderma* P. Karst. Species in China. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 63-67.
- Liu, Z.** (1988). Effect of lentinan on lymphocyte transformation in mice. *Journal Lanzhou Medicinal Collection*, 2, 54-55.
- Lowe, E.P., Wei, D., Rice, P.J., Li, C., Kalbfleisch, J., Browder, I.W., Williams, D.L.** (2002). Human vascular endothelial cells express pattern recognition receptors for fungal glucans which stimulate nuclear factor k, activation and interleukin 8 production. *American Surgeon*, 68, 508-517.
- Madan, M., & Bisaria, R.** (1983). Cellulolytic enzymes from an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Biotechnology Letters*, 5, 601-604.
- Madi, N.S., Harvey, L.M., Mehlert, A., McNeil, B.** (1997). Synthesis of two distinct exopolisaccharide fractions by cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers*, 32, 307-314.
- Manzi, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L.** (2001). Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, 73, 321-325.
- Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L.** (2004). Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, 84, 201-206.
- Manzoni, M. & Rollini, M.** (2001). Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Daedalea quercina*. *Biotechnology Letters*, 23, 1491–1497.
- Marbach, I., Harel, E., Mayer, A.M.** (1985). Pectin, a second inducer for laccase production by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 24, 2559-2561.

- Márquez-Rocha, F.J., Guillén, G.K.N., Sánchez, J.E.V., Vázquez-Duhalt, R.** (1999) Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. *Biotechnology and Technology*, 13, 29–32.
- Masri, M.S., Reuter, F.W., Friedman M.** (1974). Binding of metal cations by natural substance. *Journal of Applied Polymer Science*, 18, 675-681.
- Mathlouthi, M. & Koeng J.** (1986). Vibrational spectra of carbohydrates. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 44, 7-13.
- Mattioli-Belmonte, M., Muzzarelli, B., Muzzarelli, R.A.A.** (1997). Chitin and chitosan in wound healing and other biomedical applications. *Carbohydrates*, 19, 30-36.
- Mau, J.L., Lin, H.C., Ma, J.T., Song, S.F.** (2001). Non-volatile taste components of several specialty mushrooms. *Food Chemistry*, 73, 461–466.
- Mauseth, J.D.**, (Ed.) (2000). *Botanica: fondamenti di biologia delle piante*. In: Nuova Editoriale Grasso, Bologna.
- Maziero, R., Cavazzoni, V., Bononi, V.L.R.** (1999). Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Microbiological Review*, 30, 77-84.
- Mc Lelland, J.K. & Rock, C.A.** (1988). Pretreating landfill leachate with peat to remove metals. *Water, Air and Soil Pollution*, 37, 203-215.
- McKay, G., Blair, H.S., Findon, A.** (1989). Equilibrium studies for the biosorption of metal ions onto chitosan. *Industrial Journal of Chemistry*, 28, 356-360.
- Mel'nychuk, G.G. & Danyliac, M.I.** (1981). Dinamics of the activity of exocellular hydrolases of some species of Agaricales mushrooms. *Ukrayins'kyi Botanichnyi Zhurnal*, 38, 51-56.
- Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R., Yoshikawa, S.** (1983). Highly deacetylated chitosan and its properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 28, 1909-1917.
- Misaki, A. & Kakuta, M.** (1995). Kikurage (tree-ear) and shirokikurage (white jelly leaf) *Auricularia auricula-judae* and *Tremella fuciformis*. *Food Reviews International*, 11, 211-218.
- Miyauchi, S. & Mukai, K.**(2005). Japanese Patent 2005133069
- Mizoguchi. Y.** (1987). Protection on liver cells against experimental damage by extract of cultured *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Gastroenterology Japan*, 22, 459-464.

- Mizuno, T.** (Ed.) (1997). Breeding and cultivation. Marcel Dekker, New York, Barcelone, Hong Kong. Food Reviews International, 13, 327-518.
- Mizuno, T., Sakai T., & Chihara G.** (1995). Health foods and medicinal usage of mushrooms. Food Reviews International, 11, 69-81.
- Mobed, M. & Chang, T.M.S.** (1994). In vitro and in vivo performances of carboxymethyl chitin and carboxymethyl/glyco chitin liposomes encapsulating hemoglobin as potential blood substitutes. Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology, 22, 136-140.
- Mol, P. & Wessels, J.G.H.** (1990). Differences in wall structure between substrate hyphae and hyphae of fruit body stripes in *Agaricus bisporus*. Mycological Research, 94, 472-479.
- Morikawa, K., Tareda, R., Yamazaki, M., Mizuno D.** (1985). Introduction of tumoricidal activity of polymorphonuclear leukocytes by a linear α -(1,3)-D-glucan and other immunomodulators in murine cells. Cancer Research, 45, 1496-1499.
- Muraleedham, T.R. & Venkobacher, C.** (1990). Mechanism of biosorption of copper(II) by *Ganoderma lucidum*. Biotechnology and Bioengineering, 35, 320-325.
- Muzzarelli, R.A.** (Ed.) (1977). Chitin. Pergamon Press: Oxford, U.K.
- Muzzarelli, R.A.A. & Biagini, G.**(1993). Role and fate of exogenous chitosans in human wound tissues. In: Chitin Enzymology, Muzzarelli, R.A.A. (ed.) European Chitin Society, Lyon and Ancona, pp. 187-196.
- Nakai, T. & Kurumiya, H.**(2005): Japanese Patent 2005162708 .
- Naseem, R. & Thair, S.S.** (2001). Removal of Pb(II) from aqueous/acidic solutions by using bentonite as an adsorbent. Water Research, 35, 3982-3986.
- Neugebauer, W.A., Neugebauer, E., Brzezinski, R.,** (1989). Determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan with picric acid. Carbohydrate Research, 189, 363-367.
- Nigam, P. & Prabhu, K.A.** (1988). Thermal activation and stability of cellulases derived from two basidiomycetes. Biotechnology Letters, 10, 919-920.
- No, H.K. & Mayers, S.P.** (1997). Preparation of chitin and chitosan. In: Chitin Handbook, Muzzarelli, R.A.A. & Peter, M.G., (eds.), European Chitin Society, Lyon, Ancona, pp. 475-489.

- Nwe, N., Chandkrachang, S., Stevens, W.F.** (2004). Application of chitosan in Myanmar's agriculture sector. In: Proceedings of the Sixth Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium, May 23–26, The National University of Singapore, pp. 27-32.
- Okamoto, Y., Southwood, L., Satashak, T.S., Norridn, R.W., Nelson A.W., Minami, S., Matsushashi, A., Kato, K., Shigemasa, Y.** (1997). Effect of chitin on nonwoven fabric implant in tendon healing. *Carbohydrate Polymers*, 33, 33-38.
- Ouchi, T.** (1990). Design of biodegradable polymer-5-fluoro uracil conjugate exhibiting antitumour activities. *Polymer Material Science Engineering*, 62, 412-415.
- Ouchi, T., Banba, T., Huang, T.Z., Ohya, Y.** (1990). Design of polysaccharide-5-fluoro uracil conjugates exhibiting antitumour activities. *Polymer Reprints*, 31, 202-203.
- Özer, A. & Özer, D.** (2003). Comparative study of the biosorption of Pb(II), Ni(II) and Cr(VI) ions onto *S. cerevisiae*: Determination of biosorption heats. *Journal of Hazardous Material*, 100, 219-229.
- Park, J.P., Kim, S.W., Hwang, H.J., Yun, J.W.** (2001). Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. *Letters in Applied Microbiology*. 33, 76–81.
- Passi, S., Nazzaro-Porro, M., Fanelli, C., Fabbri, A.A., Fasella, P.** (1984). Role of lipoperoxidation in aflatoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19, 186-190.
- Passi, S., Fanelli, C., Fabbri, A.A., Finotti, E., Panfili, G., Nazzaro-Porro, M.** (1985). Effect of halomethanes on aflatoxin induction in cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of General Microbiology*, 131, 687-691.
- Passi, S., Nazzaro-Porro, M., Picardo, M., Finotti, E., Fabbri, A.A., Fanelli, C.** (1986). Microsomal and mitochondrial involvement in production of aflatoxins induced by carbon tetrachloride and hydroperoxide in cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 87, 451-456.
- Patil, S.G. & Patil, B.G.** (1989). Chitin supplement speeds up ethanol production in cane molasses fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 38-43.
- Peluso, G., Petillo, O., Ranieri, M., Santin., M., Ambrosio, L., Calabresi, D., Avallone, B., Balsamo, G.** (1994). Chitosan mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials*, 15, 1215-1220.
- Pharmacia** (Ed.) (1993) Gel filtration. Principles and Methods. Rahms i Lund.

- Plassard, C.** (1997). Assay of fungal chitin and estimation of mycelial biomass. In: Chitin Handbook, Muzzarelli, R.A.A. & Peter M.G. (eds.). European Chitin Society, Lyon and Ancona, pp. 27-32.
- Pospieszny, H., Chirkov, S., Atabekov, J.** (1991). Induction of antiviral resistance in plants by chitosan, *Plant Science*, 79, 63–68.
- Rajarithnam, S., Shashireka, M.N., Bano, Z.** (1992). Biopotentiality of the Basidiomycetes. *Advances in Applied Microbiology*, 37, 233-261.
- Rajarithnam, S., Wankhede, D.B., Bano, Z.** (1987). Degradation of rice straw by *Pleurotus flabellatus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 37, 203-214.
- Ranger-Mendez, J.R. & Streat, M.** (2002). Adsorption of cadmium by activated carbon cloth: influence of surface oxidation and solution pH *Water Research*, 36, 1244-1252.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E.,** (Eds.)(1990). *Biologia delle piante*. In : Nicola Zanichelli Editore S.p.A., Bologna.
- Ravi Kumar, M.N.V.** (2000). A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers* 46, 1–27.
- Reed, B.E. & Arunachalam, S.** (1994). Adsorption of cadmium by activated carbon cloth: influence of surface oxidation and solution pH. *Journal of Environmental Engineering*, 120, 416-436.
- Reiskind, J.B. & Mullin, J.T.** (1981). Molecular architecture of the hyphal wall of *Achlya ambisexualis*. *Chemical Analysis. Canadian Journal of Microbiology*, 27, 1092-1099.
- Reshentikov, S.V., Wasser, S.P., Nevo, E., Duckman, I., Tsukor, K.** (2001). Medicinal value of the genus *Tremella* Pers. (Heterobasidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2, 169-193.
- Reverberi, M., Fabbri, A.A., Zjalic S., Ricelli A., Punelli, F., Fanelli, C.** (2005). Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 207–215.
- Rinaudo, M.** (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603–632.

- Roberts, G.A.F.** (1997). Determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan. In: R.A.A. Muzzarelli, M.G. Peter (eds.), *Chitin Handbook*, European Chitin Society, pp. 127–132.
- Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J.L.** (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases. *Biotechnology Advances*, 24, 500–513.
- Ross, G.D., Vetvicka, V., Yan, J., Xia, Y., Vetvickova, J.** (1999) Therapeutic intervention with complement, β -glucan in cancer. *Immunopharmacology*, 42, 61-74.
- Roy, D., Greenlaw, P.N., Shane, B.S.** (1993). Adsorption of heavy metals by green algae and ground rice hulls. *Journal of Environmental Science and Health*, 28, 37-50.
- Ruiz, M., Sastre, M.A., Maria, A., Guibal, E.** (2000). Palladium sorption on glutaraldehyde-crosslinked chitosan. *Reactive and Functional Polymers*, 45, 155-173.
- Ruiz-Herrera, J.** (1991) Biosynthesis of β -glucans in fungi. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 60, 73-81.
- Ruiz-Herrera, J.** (Ed.) (1992). *Fungal cell walls, structure, synthesis, and assembly*, CRC Press Inc., Boca Raton.
- Ruiz-Herrera, J. & Sentandreu, R.** (1991). Fungal cell wall synthesis and assembly. In: *Current topics in medical mycology*. McGinnis, M.R. & Borgers, M. (eds.), vol. 3. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 169-217.
- Rodríguez Couto, S., & Toca Herrera, J.L.** (2006). Industrial applications of laccase. A review. *Biotechnology Advances*, 24, 500-513.
- Säg, Y., Kaya, A., Kutsal, Y.** (1998). The simultaneous biosorption of Cu(II) and Zn on *Rhizopus arrhizus*: application of the adsorption models. *Hydrometallurgy*, 50, 297-314.
- Salehizadeh, H. & Shojaosadati, S.A.** (2003). Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. *Water Research*, 37, 4231-4235.
- Sanchez Hernandez, E., Garcia-Mendoza, C., Novaes-Ledieu, M.** (1990). Chemical characterization of the hyphal walls of the basidiomycete *Armillaria mellea*. *Experimental Mycology*, 14, 178-183.
- Sannan, T., Kurita K., Ogura, K., Iwakura, Y.** (1978). Studies on chitin: 7. Infrared Spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer*, 19, 458–459.

- Say R., Denizli, A., Yarup Arica, M.** (2001). Biosorption of cadmium(II), lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*, 76, 67-70.
- Scaringi, L., Marconi, P., Boccanera, M., Tissi, L., Bistoni, F., Cassone A.** (1988). Cell wall components of *Candida albicans* as immunomodulators: induction of NK and macrophage-mediated peritoneal cell toxicity in mice by mannoprotein and glucan fractions. *Journal of General Microbiology*, 134, 1265-1271.
- Seichi, T., Koki, I., Noria, N., Shin-Ichiro, N., Ikuo, S., Ichiro, A.** (1994). Selective sulphation of chitin derivatives for biomedical functions. *Journal of Macromolecules Science - Pure and Applied Chemistry*, 31, 1701-1718.
- Semichaevskii, V.D.** (1988). Higher basidial fungi as producers of cellulases. *Itogi Nauki Tekhnologic Bioteknologic*, 10, 97-132.
- Semichaevskii, V.D., Dudchenko, L.G., Mel'nichuck, G.G.** (1985). Effect of pH on the formation of extracellular enzyme by *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm., a wood-rotting basidiomycete. *Mikrobiol. Zh* 47, 72-78.
- Sengupta, S. & Sengupta, S.** (1990) Regulation by aminoacids of α -amylase and endo- β (1 \rightarrow 4)-gluconase induction in mycelial culture of mushroom *Termitomyces clypeatus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 12, 309-314.
- Senstad, C. & Mattiason, B.** (1989). Purification of wheat germ agglutinin using affinity flocculation and a subsequent centrifugation or rotation step. *Biotechnology and Bioengineering*, 34, 387-393.
- Shahidi, F. & Synowiecki, J.** (1991). Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoectes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discard. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 39, 1527-1532.
- Sharma, H.S.S.** (1987). Comparative study of the degradation of flax shive by strains of *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25, 542-546.
- Shigemasa, Y. & Minami, S.** (1995). Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnological General Engineering Review*, 13, 383-420.
- Shimahara, K., Takiguchi, Y., Kobayashi, T., Uda, K., Sannan, T.** (1989). Screening of Mucoraceae strains for chitosan production. In: *Chitin and Chitosan*. G. Skjak- Break, Anthonsen, T., Sandford, P. (Eds.), Elsevier, Applied Science, London, pp. 171-178.

- Shimizu, Y., Kono, K., Kim, I.S., Takagishi, T.** (1995). Effects of added metal ions on the interaction of chitin and partially deacetylated chitin with an azo dye carrying hydroxyl groups. *Journal of Applied Biomaterials*, 5, 245-254.
- Sinha, J., Bae, J.T., Park, J.P., Kim, K.H., Song, C.H., Yun, J.W.** (2001). Changes in morphology of *Paecilomyces japonica* and their effect on broth rheology during production of exo-biopolymers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 88–92.
- Smith, J.F., Claydon, N., Love, M.E., Allen, M., Wood, D.A.** (1989). Effect of substrate depth on extracellular endocellulase and laccase production of *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 93, 292-296.
- Song, T.Y. & Yen, G.C.** (2002). Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3322–3327.
- Srivastava, S.K., Singh, A.K., Sharma, A.** (1994). Studies on the uptake of lead and zinc by lignin obtained from black liquor-a paper industry waste material. *Environmental Technology*, 15, 353-361.
- Struszczyk, H. & Pospieszny, H.** (1997). New applications of chitosan and its derivatives in plant protection. In: M.F.A. Applications of Chitin and Chitosan, Goosen (ed.), Technomic Publishing Co., Inc., USA, pp. 171–184.
- Sukwattanasinitt, M., Klaikherd, A., Skulnee, K., Aiba, S.** (2001). Chitosan as a releasing device for 2,4-D herbicide. In: Chitin and Chitosan in Life Science, T. Uragami, K. Kurita, T. Fukamizo (Eds.), Yamaguchi, pp. 142–143.
- Sun, C., Wang, J.W., Fang L., Gao, X.D., Tan R.X.** (2004). Free radical scavenging and antioxidant activities of EPS2, an exopolysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Keissleriella* sp. YS 4108. *Life Sciences*, 75, 1063–1073.
- Surarit, R., Gopal, P.K., Shepherd, M.G.** (1988). Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology*, 134, 1723-1730.
- Surenjav, U., Zhang, L., Xu, X., Zhang, X., Zeng, F.** (2006). Effects of molecular structure on antitumor activities of (1→3)-β-D-glucans from different *Lentinus edodes*. *Carbohydrate Polymers*, 63, 97-104.
- Suzuki, M., Kikuchi, T., Takatsuki, F., Hamuro, J.** (1993). The role of tumor antigen specific delayed-type hypersensitivity responses in eradicating tumors by lentinan. *Biotherapy*, 7, 345-352.

- Synowiecki, J. & Al-Khateeb, N.A.A.Q.** (2003). Mycelia of *Mucor rouxi* as a source of chitin and chitosan. *Food Chemistry*, 60, 605-610.
- Tam, S.C.** (1986). Hypotensive and renal effects of an extract of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Life Sciences*, 38, 1155-1161.
- Tamada, M., Kasai, N., Kumamura, M., Kaetsu, I.** (1986). Studies on immobilization of biofunctional components by radiation polymerization and their application. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 1227-1232.
- Tan, S.C., Tan, T.K., Wong, S.M., Khor, E.** (1996). The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. [Carbohydrate Polymers](#), 30, 239-242.
- Tapia, G., Curotto, E., O' Reilly, S., Gonzales, G.** (1981). Isolation and partial characterization of extracellular protease from *Sporotrichum dimorphosporum*. *FEBS Letters*, 130, 205-207.
- Thomas, C., Ajith Kumar, B., Chandra, P. S.** (1994). Inhibition of in vitro calcium phosphate precipitation in presence of polyurethane via surface modification and drug delivery. *Journal of Applied Biomaterials*, 5, 245-254.
- Thurston, C.F.** (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19-26.
- Tien, M. & Kirk, T.K.** (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burd. *Science*, 221, 661-663.
- Tochikura, T. S.** (1987). A biological response modifier, PSK, inhibits human immunodeficiency virus infection *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 148, 726-733.
- Tokura, S., Babu, S., Uraki, Y., Miura, Y., Nishi, N., Hasegawa, O.** (1990). Carboxymethyl chitin as a drug carrier for sustained release. *Carbohydrate Polymers*, 13, 273-281.
- Tomati, U., Belardinelli, M., Galli, E., Iori, V., Capitani, D., Mannina, L., Viel, S., Segre, A.** (2004). NMR characterization of the polysaccharidic fraction from *Lentinula edodes* grown on olive mill wastewaters. *Carbohydrate Research*, 339, 1129-1134.
- Tsigos, I. & Bouriotis, V.** (1995). Purification and characterization of chitin deacetylase from *Collectotrichum lindemuthianum*. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 26286-26291.

- Tsitsigiannis, D., Wilson, R.A., Keller, N.** (2001). Lipid mediated signalling in the *Aspergillus* seed interaction. Proceeding of the 10th International Congress on Molecular Plant Microbe Interaction, pp. 186–191.
- Udyabhaskar, P., Leda, I., Prabhakara, A.V.S.** (1990). Hexavalent chromium interaction with chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 39, 739-747.
- Varma, A.J., Desphande, S.V., Kennedy, J.F.** (2004). Metal complexation by chitosan and its derivative. A review. *Carbohydrate Polymers*, 55, 77-93.
- Vetter, J.** (2007). Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food Chemistry*, 102, 6-9.
- Vetvicka, V. & Yvin, J.C.** (2004). Effect of marine β -(1-3) –glucan on immune reactions. *International Immunopharmacology*, 4, 721-730.
- Wan Ngah, W.S., Endud, C.S., Mayanar, R.** (2002). Removal of copper(II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. *Reactive and Functional Polymers*, 50, 181-190.
- Wanichpongpan, P., Suriyachan, K., Chandkrachang, S.** (2001). Effects of chitosan on the growth of Gerbera flower plant (*Gerbera jamesonii*), In: *Chitin and Chitosan in Life Science*, T. Urugami, K. Kurita, T. Fukamizo (eds.), Yamaguchi, pp. 198–201.
- Wasser, S.P. & Weiss, A.L.** (1999a). Therapeutic effects of substances occurring in the higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Review in Immunology*, 19, 65-96.
- Wasser, S.P. & Weiss, A.L.** (1999b). Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 31- 62.
- Wasser, S.P., Nevo E., Sokolov D., Reshetnikov S., Timor-Tismenetsky M.** (2000). Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2, 1-19.
- Wood, W.A. & Kellogg, S.T.** (Eds.) (1988). Biomass. In: *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc. San Diego, CA, vol.161 part B.
- Wu, T., Zivanovic, S., Draugon, F.A., Conway, W., Sams, C.E.** (2005). Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 3888-3894.

- Wu, T., Zivanovic, S., Draugon, F.A., Sams, C.E.** (2004). Chitin and Chitosan – Value Added Products from Mushroom Waste. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 7905-7910.
- Xia, E.** (1987). Effect of polysaccharides from *Auricularia auricula-judae* e *Tremella fuciformis* spores on DNA and RNA biosynthesis by limphocytes. *Zhonguo Yaoke Daxue Xuebao*, 18, 141-143.
- Xia, Y., Vetvicka, V., Yan J., Hanikyrova, M., Mayadas, T.N., Ross, G.D.** (1999) The -glucan binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *Journal of Immunology*, 162, 2281-2290.
- Yadomae, T.** (1992). Immunopharmacological activity of β -glucan: structure-activity relationship in relation to various conformations. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 33, 267-277.
- Yadomae, T. & Ohno, N.** (1996). Structure-activity relationship of immunomodulating (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan. *Recent Result Development of Chemical and Pharmacological Science*, 1, 23-33.
- Yan G. & Viraraghavan. T.** (2003). Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Research*, 37, 4486-4496.
- Yang, F.C. & Liau, C.B.** (1998). The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Processes Biochemistry*, 33, 547–553.
- Yap, A.T. & Ng, M.L.M.** (2001). An improved method for the isolation of lentinan from the edible and medicinal shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 3, 6-19.
- Yimin, Q.** (1994): Chitin and chitosan as wound dressing materials. *Textile Horizons*, 14 19-21.
- Yoshihada, H. & Takeshi, T.** (1997). Adsorption of direct dye on crosslinked fibre: Breakthrough curve. *Water Science and Technology*, 35, 29-37.
- Yoshihiro, S., Hitoshi, S., Hiroyuki, S.** (1993). Sustained release of oxytetracyclin from chitosan tablet. *Polymer Journal*, 25, 993-995.

- Yoshioka, Y., Ikekawa, T., Nida, M., Fukuoka, F.** (1972). Studies on antitumor activity of some fractions from Basidiomycetes. I An antitumor acidic polysaccharide fraction of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel. *Chemical Pharmacia Bulletin*, 20, 1175-1180.
- Zadrazil, F. & Reiniger, P.** (Eds.) (1988). *Treatment of lignocellulosics with white rot fungi*. Elsevier Applied Science. London.
- Zevenhuizen, L.P.T.M., & Bartnicki-Garcia, S.** (1968). Chemical structure of the insoluble hyphal wall glucan of *Phytophthora cinnamoni*. *Biochemistry*, 8, 1496-1502.
- Zhang, J., Wang, G., Li, H., Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., Suzuki, C., Okamoto, H., Li, J.** (1994a). Antitumor polysaccharides from a Chinese mushroom, "yuhuangmo", the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 1195-1201.
- Zhang, L., Sun, F., Zhang, Y.** (1994b). The influence of chemical modification on antiviral (CB5) activity of polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus*. *Shengwu Huaxue Zazhi*, 10, 150-154.
- Zivanovic, S., Chi, S., Draughon, F.A.** (2005). Antimicrobial activity of essential oils incorporated in chitosan films. *Journal of Food Science*, 70, 45-51.
- Zjalic, S., Reverberi, M., Ricelli, A., Granito, V.M., Fanelli, C., Fabbri, A.A.** (2006). *Trametes versicolor*: A possible tool for aflatoxin control. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 243-249.