

Aislamiento de microorganismos quitinolíticos del estado de Nuevo León y evaluación de la producción de quitinasas por fermentación sumergida empleando quitina de camarón y quitina fúngica

Israel Rodríguez-Miranda, Edgar Allan Blanco-Gómez, Leonardo Chávez-Guerrero^b, Ernestina Castro-Longoria^c, Julio Silva-Mendoza^{a*}

Israel Rodríguez-Miranda (<https://orcid.org/0009-0004-9336-2170>)

Edgar Allan Blanco-Gómez (<https://orcid.org/0000-0003-4638-150X>)

Leonardo Chávez-Guerrero (<https://orcid.org/0000-0002-6186-2240>)^b

Ernestina Castro-Longoria (<https://orcid.org/0000-0002-7464-8964>)^c

Julio Silva-Mendoza (<https://orcid.org/0000-0001-8236-0680>)^{a*}

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas. Av. Universidad s/n, Ciudad Universitaria C.P. 66455, San Nicolás de los Garza, México.

^bUniversidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica. Av. Universidad s/n, Ciudad Universitaria C.P. 66455, San Nicolás de los Garza, México.

^cCentro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada. Departamento de Microbiología, Carretera Ensenada -Tijuana 3918, Zona Playitas, C.P. 22860, Ensenada, México

*e-mail de autor responsable: jsilvamd@uanl.edu.mx

Recibido 30 de septiembre 2024, Aceptado 15 de octubre 2024

Resumen

Las quitinasas que actúan hidrolizando la quitina tienen diversas aplicaciones como control de hongos e insectos, producción de fármacos, aditivos alimentarios, entre otras. En este trabajo se aislaron microorganismos productores de quitinasas a partir de muestras de suelo e insectos en descomposición mediante la técnica de dilución y siembra empleando un medio con quitina. Para la selección de los microorganismos se midió el índice de potencia en placa y se determinó actividad enzimática in vitro donde destacaron dos actinobacterias con índices de potencia mayores a 1.5 y con actividad enzimática prometedora. Además, se evidenció una alternativa más simple para emplear medios de cultivo con quitina fúngica en lugar de quitina animal y aumentar la actividad enzimática de los microorganismos aislados.

Palabras clave: quitina, actividad enzimática, champiñones, actinobacteria

Abstract

Chitinases, which hydrolyze chitin, have a wide range of applications, including fungal and insect control, pharmaceutical production, and food additives, among others. In this study, microorganisms capable of producing chitinases were isolated from soil samples and decomposing insects using the dilution and plating technique, employing a chitin-containing medium. To select the microorganisms, the plate potency index was measured, and in vitro enzymatic activity was determined. Two actinobacteria stood out, showing potency indices greater than 1.5 and promising enzymatic activity. Additionally, a simpler alternative was demonstrated by using culture media with fungal chitin instead of animal chitin to enhance the enzymatic activity of the isolated microorganisms.

Keywords: chitin, enzymatic activity, mushrooms, actinobacteria

1. Introducción

Las quitinasas (EC 3.2.1.14) hidrolizan los enlaces glicosídicos β -(1,4) de los monómeros N-acetilglucosamina que componen la quitina, son proteínas monoméricas entre pesos moleculares de 21 kDa y 90 kDa [1]. Se encuentran en todos los reinos biológicos clasificadas dentro de las familias GH-18, GH-19 y GH-48 [2],[3] y [4], pero abundan en microorganismos quitinolíticos especializados en degradar la quitina presente en el medio y utilizarla como fuente de energía para su desarrollo, algunas bacterias quitinolíticas más conocidas son; *Aeromonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Streptomyces* y *Bacillus* [5], muchas de ellas se encuentran en el suelo con significativos papeles en la descomposición de la materia orgánica.

Las quitinasas tienen gran potencial para el control biológico de plagas como pueden ser los hongos y animales como los insectos [6], son utilizadas en la producción de materiales y compuestos como fármacos, aditivos alimentarios [7] y quitoligosacáridos [8], además tienen gran potencial para el reciclaje de compuestos quitinosos [9]. A pesar de su potencial y aplicaciones sostenibles las quitinas no son tan utilizadas, principalmente sus aplicaciones se ven limitadas por su baja producción y poca estabilidad. Uno de los aspectos que muchas veces pasa desapercibido son los elevados gastos en los medios de cultivo para su producción, llegando a representar el 40 % de los costos totales [10]. Es por lo que se buscan alternativas para aumentar la producción y actividad de las quitinasas como los medios de cultivo simplificados y la búsqueda de nuevos organismos que produzcan nuevas quitinasas con mayor potencial y mejor actividad, ya que, a nivel industrial, las quitinasas aun resultan deficientes para su financiera comercialización. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue aislar microorganismos quitinolíticos en áreas naturales conservadas no exploradas del estado de Nuevo León en México en medios de cultivo selectivos, comparar su producción de quitinasas por potencial de degradación y actividad enzimática y explorar su crecimiento en medios de cultivo complejos y definidos con quitina fúngica, destacando las quitinasas de los microorganismos más significativos con mayor potencial.

2. Materiales y Métodos

2.1 Aislamiento de microorganismos

Se tomaron tres muestras para el aislamiento: dos muestras de tierra superficial por debajo de la hojarasca del área natural protegida "Cerro de la Silla" en Monterrey Nuevo León y del "Cerro Aguajero" en Juárez Nuevo León, la tercera muestra fueron exoesqueletos de muda de insectos cicádidos (*Quesada sp.*) tomados de áreas naturales en Juárez Nuevo León. Se mezclaron 5 g de cada muestra en 100 mL de solución

salina, a partir de la cual se tomaron 200 μ L y se inocularon por dilución y siembra en placa para el aislamiento de microorganismos quitinolíticos en medio mínimo de quitina (MMQ) compuesto por (g/L); 10 de quitina coloidal; 5 de NaCl; 0.5 de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.3 de KH_2PO_4 ; 5 de $(NH_4)_2SO_4$ y 15 de agar, el medio se ajustó a un pH de 6.5 y se incubaron a 34°C durante 15 días.

2.2 Preparación de quitina coloidal

Se preparó según el método de Shimahara y Takiguchi 1998 con algunas modificaciones [11]. Para 10 g de quitina; en 100 mL de HCl concentrado se adicionó quitina de camarón comercial (Sigma-Aldrich. C7170) en agitación a temperatura ambiente a 34°C por 2 horas, la mezcla se vertió en 500 mL de agua destilada y se dejó en reposo hasta el día siguiente. La quitina precipitada se lavó por filtración con agua destilada hasta obtener un pH neutro. La pasta obtenida se esterilizó por autoclave y almacenó en refrigeración para su uso posterior.

2.3 Selección de microorganismos quitinolíticos

La actividad quitinolítica se confirmó por decoloración del medio debido a la degradación de la quitina y a partir de ello se seleccionaron los microorganismos con mayor potencial. Se realizó una primera selección a partir de los medios MMQ de aislamiento; se tomaron por asada aquellos microorganismos con mayor degradación visible en el medio y se sembraron por estría cruzada en nuevas placas con medio de quitina MMQ, se caracterizó su morfología colonial y bajo el microscopio a través de técnicas microbiológicas. Para la segunda selección; de forma individual a los aislados se les determinó el índice de potencia de degradación de quitina coloidal (IP) de acuerdo con

$$IP = \frac{\text{diámetro halo de hidrólisis (mm)}}{\text{diámetro de la colonia (mm)}} \quad (1)$$

y con base a ello se seleccionaron los de mayor potencial.

2.4 Cinética Enzimática

A partir de los microorganismos quitinolíticos seleccionados, se realizó una cinética enzimática evaluando la producción de enzimas a diferentes días. Para la estandarización de inóculos bacterianos, se sembraron en matraces con 75 mL de caldo nutritivo durante 3 días en agitación a 170 rpm, se lavaron las bacterias mediante centrifugación y se resuspendieron en 30 mL de agua destilada estéril y tween 80 al 0.05 %, la absorbancia se ajustó a un valor de 0.25 a una longitud de onda de 650 nm (equivalente a 3×10^8 UFC/mL). Se tomaron 10 mL de cada inóculo preparado y se sembraron por triplicado en matraces de 250 mL con 110 mL de medio de cultivo MMQ adicionado con 0.5 % de extracto de levadura ajustado a un pH de 6, se incubaron a 30 °C y 150 rpm durante 7 días. Se tomaron muestras

de 1 mL por día desde el día cero hasta el séptimo para medir actividad enzimática.

2.4.1 Ensayo de actividad enzimática

Para la reacción se tomaron 300 μ L de enzima cruda en 800 μ L de buffer de acetatos (50 mM a pH 5) y 100 μ g de quitina coloidal, se incubó a 50 °C durante 40 min, posteriormente, los azúcares reductores liberados fueron determinados por el método de Miller [12]. Una unidad de actividad de quitinasa (U) se definió como la cantidad que produce 1 μ mol de azúcar reductor (GlcNAc) por minuto utilizando la cantidad de enzima descrita.

2.5 Evaluación de medio MMQ con quitina de champiñón para la producción de quitinasas

Como alternativa a la quitina de camarón, se evaluó el desarrollo y actividad enzimática de las bacterias quitinolíticas seleccionadas en medio sólido y líquido con quitina fúngica extraída de *Agaricus bisporus*.

2.5.1 Extracción de quitina de *Agaricus bisporus*

Producida según el método de Chávez-Guerrero 2024 [13], el cual describe que; por cada 10 g de hongo previamente triturado reaccionan en 100 mL H₂O₂ 30 % en agitación homogénea a temperatura constante de 90 °C durante una hora hasta observar su blanqueamiento, pasada la reacción se realizaron lavados por filtración al vacío con filtro Whatman 1° hasta obtener un pH neutro, la pasta de quitina obtenida se caracterizó por microscopía electrónica, difracción de rayos X y espectrometría de infrarrojo y se utilizó como fuente de carbono para los medios de cultivo.

2.5.2 Evaluación de crecimiento y actividad enzimática en medio con quitina fúngica.

Inicialmente se evaluó el crecimiento en placa en medio sólido MMQ y cambiando la fuente de carbono de camarón por quitina de champiñón (*A. bisporus*) ajustado a un pH de 6, se incubó a 30°C durante 3 a 4 días.

Posteriormente al aprovechamiento de la quitina en medio sólido, se realizó una cinética enzimática por fermentación sumergida en las mismas condiciones que en los medios con camarón descrita en la sección (2.4) pero cambiando la fuente de carbono por quitina de champiñón.

3. Resultados y Discusión

3.1 Aislamiento y selección de microorganismos quitinolíticos

Se observó el crecimiento de una gran variedad de colonias a partir de las diferentes muestras recolectadas, indicando la presencia de microorganismos capaces de usar la quitina como fuente de carbono (Figura 1). La

muestra obtenida del “Cerro de la silla” fue la que presentó una mayor cantidad y variabilidad de microorganismos como se muestra en la figura 1A.

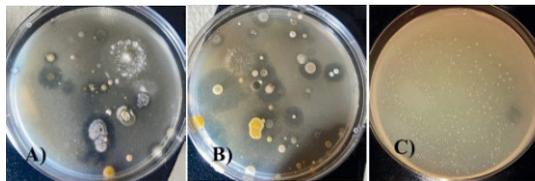


Figura 1. Aislamiento de microorganismos quitinolíticos en medio mínimo con quitina coloidal de las muestras de A) Cerro de la Silla, B) cerro agujerado y C) exoesqueleto de chicharra.

Por otro lado, del exoesqueleto del insecto *Quesada sp.* se observaron colonias bacterianas con un mismo morfotipo (Figura 1C), pero bajo microscopía se encontró una asociación de diversas bacterias, después de varios ensayos de aislamiento y resiembra por estría cruzada se lograron aislar colonias con morfología de cocos (Figura 2F).

Se seleccionaron 7 colonias de microorganismos que produjeron una zona de aclaramiento mayor en los medios de aislamiento con quitina coloidal después de 15 días de incubación. Entre las cepas bacterianas (Figura 2), tres presentaban morfologías filamentosas características de actinobacterias, y las restantes presentaron morfologías de cocos, diplococos y bacilos.

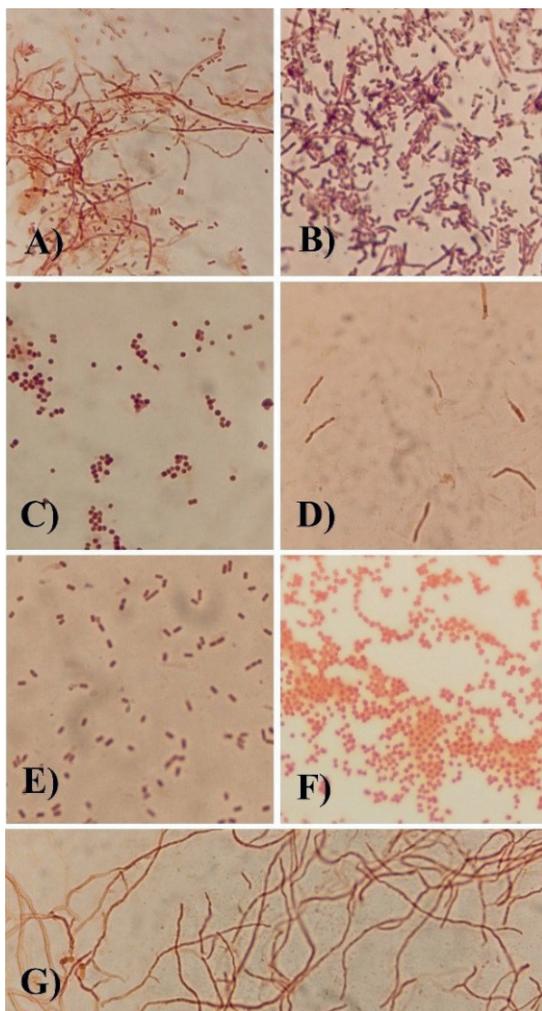


Figura 2. Tinción Gram de las bacterias seleccionadas, en orden Bac 1-7, bajo microscopía óptica, aumento de objetivo 100x. A), D) y G) aisladas del cerro de la silla, B), C) y E) del cerro agujerado, y F) aislada del exoesqueleto de insecto.

Las bacterias Bac 7 y Bac 3 fueron las que presentaron IP superiores a 1.6 (figura 3). Estos microorganismos pertenecen a bacterias del filo actinobacterias (*Actinomycetota*) confirmado por su característica morfología filamentososa y reconocidas por su amplio metabolismo secundario, así como la producción de enzimas para metabolizar compuestos orgánicos como la celulosa y quitina [13].

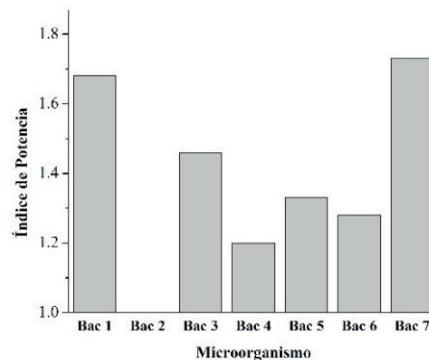


Figura 3. Gráfica del índice de potencia de degradación del medio mínimo con quitina coloidal de las 7 bacterias seleccionadas.

3.2 Actividad enzimática

La producción de enzimas se monitoreó durante 7 días de cultivo bajo fermentación sumergida empleando quitina de camarón como fuente de carbono. Las actinobacterias 1 y 7 alcanzaron máxima actividad enzimática de 0.04 y 0.042 U/mL, respectivamente al séptimo día (Figura 4). Las bacterias empezaron a proyectar actividad enzimática después del primer día, a partir del cual la actinobacteria 7 a diferencia de la 1, presentó una actividad exponencial hasta el cuarto día. Con base a esto se puede diferenciar con una pronta capacidad de producción de quitinas en aumento desde el primero día hasta el cuarto en fermentación.

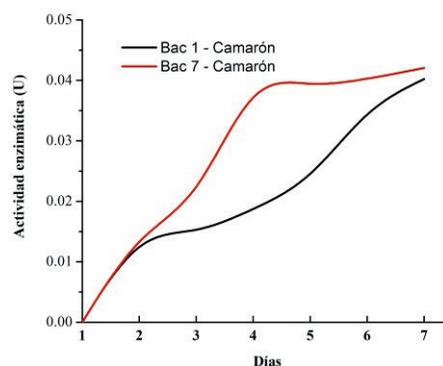


Figura 4. Gráfica de cinética enzimática, comparación en el aumento en la actividad enzimática (U) determinada por día en la bacteria 1 y 7.

Ya que ambas bacterias se cultivaron bajo las mismas condiciones, se puede definir que, si bien la actividad enzimática máxima no es tan variable entre ellas, el tiempo en la producción enzimática sí lo fue, podría

decirse que la actinobacteria 7 aislada del cerro de la silla en Monterrey esta más especializada en hidrolizar la quitina del medio y presentar mayor actividad enzimática a partir del tercer y cuarto día de cultivo en este medio líquido con quitina coloidal de camarón.

3.3 Efecto en la actividad enzimática en cultivo con quitina de fúngica

Previo a su uso, la quitina obtenida de *A. bisporus* se caracterizó por microscopía electrónica de barrido (Figura 5), donde se observó que está formada por microfibrillas entrelazadas con medidas entre 1 micra de largo y 10 nm de ancho.

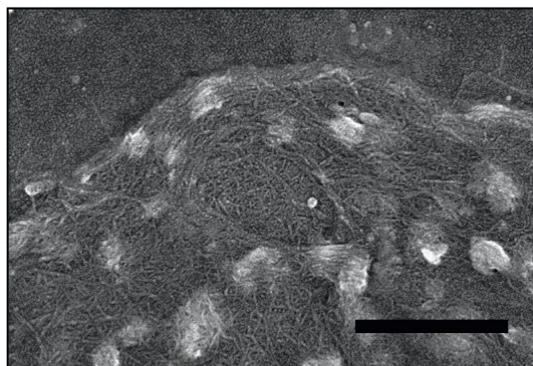


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido, observación de las microfibrillas de quitina de champiñón (*A. bisporus*). Escala de la barra de 1 μm

Por espectrometría de infrarrojo (Figura 6) se identificaron las bandas correspondientes a los grupos funcionales de alcoholes, amins, amidas I, amidas II y amidas III con longitudes de onda alrededor de 3400 cm^{-1} , 3200 y 3100 cm^{-1} , 1665 cm^{-1} y 1625 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} y 1320 cm^{-1} respectivamente, descritas en reportes de referencia para la quitina de *A. bisporus* y otros macromicetos comestibles [14], [15]. Las bandas 1540 cm^{-1} y $1700 - 1740\text{ cm}^{-1}$ asignadas a las vibraciones de estiramiento particular de las proteínas [16] no se observaron, lo que sugiere su remoción durante el procedimiento de extracción.

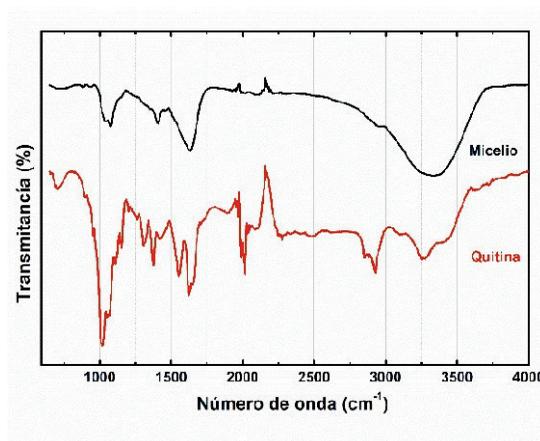


Figura 6. Espectros de infrarrojo del micelio del champiñón (*A. bisporus*) y la quitina posterior al tratamiento.

Mediante difracción de rayos X (Figura 7) se determinó la presencia de los planos cristalinos (020), (021), (110), (120) y (130) correspondientes a la conformación ortorrómbica de la α -quitina en los hongos [17].

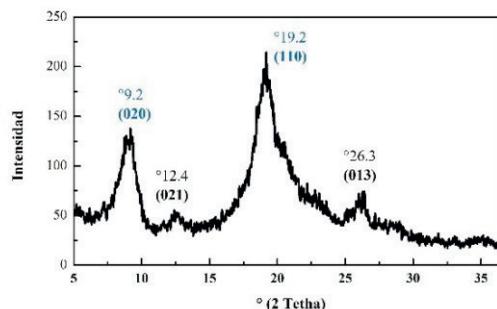


Figura 7. Difractograma de la quitina obtenida de *A. bisporus*, los planos cristalinos en azul son característicos de la conformación ortorrómbica de la α -quitina.

Una vez caracterizada la quitina fúngica se utilizó como fuente de carbono en los medios MMQ y se determinó que las bacterias aisladas tienen la capacidad de aprovecharla en medio sólido como se observa en la figura 8, sin embargo, se observó variabilidad en la proliferación de las colonias comparado con el medio con quitina de camarón, en el cual las colonias fueron de mayor tamaño.



Figura 8. Desarrollo de bacterias quitinolíticas en medios de cultivo con quitina de A) camarón y B) champiñón, después del tercer día de incubación.

En medio líquido la actividad enzimática a lo largo del tiempo también fue variable en comparación con los medios con quitina de camarón. Se observaron altas y bajas en las unidades de actividad enzimática a lo largo del tiempo en los medios de cultivo con quitina de champiñón (Figura 9), dicho comportamiento posiblemente se atribuye a las etapas de adaptación que pueden llegar a tener los microorganismos al medio de cultivo, influenciada en conjunto por la cantidad y complejidad de la quitina y en dado caso de los β -glucano presentes en el medio de cultivo [18].

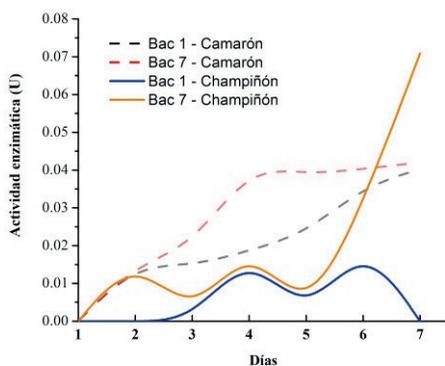


Figura 9. Grafica de cinética enzimática, comparación de actividad enzimática en medio con quitina de champiñón y quitina de camarón de las bacterias 1 y 7.

En la actividad de la actinobacteria 1 se observó ausencia de crecimiento exponencial durante los 7 días que duro la fermentación, pero en la actinobacteria 7 se observó un impulso hacia una actividad después del día 5 sobrepasando incluso las unidades de actividad enzimática máximas de las bacterias en medio con quitina de camarón.

El proyecto se engloba por trabajos completamente sostenibles y la base de ellos comienza con la extracción

de quitina distinta a las metodologías físicas y químicas convencionales. Comúnmente la quitina se obtiene de crustáceos como los camarones, sin embargo, son métodos químicos con altos costos, largas reacciones y generar extensos residuos tóxicos [19], [20]. Gracias a que la quitina que se utilizó se extrajo a partir de una metodología sencilla y de fuentes fúngicas se lograron minimizar los factores en el impacto ambiental. Para el desarrollo, crecimiento y más específicamente la producción de quitinasas en microorganismos como las actinobacterias, los medios de cultivo con quitina de hongos como es el caso de *A. bisporus* resulta ser una alternativa a los medios de cultivos definidos con quitina de camarón, ya que como se observa es posible obtener resultados similares, incluso mejores si se trata en una pronta producción enzimática.

4. Conclusiones

Se describieron bacterias quitinolíticas en el estado de Nuevo León, actinobacterias, bacilos y cocos presentes en diferentes ambientes, de las cuales destacaron tres bacterias en la producción enzimática de quitinasas con índices de potencial de degradación (IP) mayores a 1.5 después del quinto día de cultivo en medio mínimo con quitina coloidal y con unidades de actividad enzimática cercanas a 0.04 U/mL. La actividad enzimática en medio líquido de la actinobacteria Bac 7, aumentó de 0.042 U en medio con quitina de camarón comercial a 0.075 U en medio con quitina extraída de *Agaricus bisporus*.

Este trabajo abre pauta para proyectos posteriores en la aplicación de enzimas de microorganismos del estado y el uso de medios de cultivo con quitina de hongos como alternativa contra los medios de quitina animal, ya sea para el desarrollo de microorganismos quitinolíticos o la alta producción de quitinasas.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la UANL, así como al CICESE por su apoyo y colaboración para el uso de los equipos e infraestructura. Así mismo, agradecen a la UANL por su apoyo a través del programa ProACTI (claves de proyectos: 22-BQ-2023 y 6-BYQ-2024). IRM agradece al CONAHCYT por la beca otorgada (Número de CVU: 1267890).

5. Referencias

- [1] D. Bhattacharya, A. Nagpure, and R. K. Gupta, "Bacterial Chitinases: Properties and Potential," *Crit*

- Rev Biotechnol*, vol. 27, no. 1, pp. 21–28, Jan. 2007, doi: 10.1080/07388550601168223.
- [2] A. P. Bussink, D. Speijer, J. M. F. G. Aerts, and R. G. Boot, "Evolution of Mammalian Chitinase(-Like) Members of Family 18 Glycosyl Hydrolases," *Genetics*, vol. 177, no. 2, pp. 959–970, Oct. 2007, doi: 10.1534/genetics.107.075846.
- [3] M. Ueda *et al.*, "A novel type of family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24. Cloning, sequence, expression, and the enzymatic properties," *Eur J Biochem*, vol. 270, no. 11, pp. 2513–2520, Jun. 2003, doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03624.x.
- [4] B. Henrissat and A. Bairoch, "New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities," *Biochemical Journal*, vol. 293, no. 3, pp. 781–788, Aug. 1993, doi: 10.1042/bj2930781.
- [5] R. M. Cody, "Distribution of chitinase and chitobiase in bacillus," *Curr Microbiol*, vol. 19, no. 4, pp. 201–205, 1989, doi: 10.1007/BF01570162.
- [6] R. S. Patil, V. Ghormade, and M. V. Deshpande, "Chitinolytic enzymes: an exploration," *Enzyme Microb Technol*, vol. 26, no. 7, pp. 473–483, Apr. 2000, doi: 10.1016/S0141-0229(00)00134-4.
- [7] Ramírez M.V. and Calzadiaz L., "Industrial enzymes and metabolites from actinobacteria in food and medicine industry," in *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Application*, 2016, pp. 315–328.
- [8] S. Yang, X. Fu, Q. Yan, Y. Guo, Z. Liu, and Z. Jiang, "Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*," *Food Chem*, vol. 192, pp. 1041–1048, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.07.092.
- [9] M. Swiontek Brzezinska, U. Jankiewicz, A. Burkowska, and M. Walczak, "Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection.," *Curr Microbiol*, vol. 68, no. 1, pp. 71–81, Jan. 2014, doi: 10.1007/s00284-013-0440-4.
- [10] A. Gessesse, "The use of nug meal as a low-cost substrate for the production of alkaline protease by the alkaliphilic *Bacillus* sp. AR-009 and some properties of the enzyme," *Bioresour Technol*, vol. 62, no. 1–2, pp. 59–61, Oct. 1997, doi: 10.1016/S0960-8524(97)00059-X.
- [11] K. Shimahara and Y. Takiguchi, "Preparation of crustacean chitin," 1988, pp. 417–423. doi: 10.1016/0076-6879(88)61049-4.
- [12] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Anal Chem*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, Mar. 1959, doi: 10.1021/ac60147a030.
- [13] E. A. Barka *et al.*, "Correction for Barka *et al.*, Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 80, no. 4, Dec. 2016, doi: 10.1128/MMBR.00044-16.
- [14] N. Lin, S. Zhao, L. Gan, P. R. Chang, T. Xia, and J. Huang, "Preparation of fungus-derived chitin nanocrystals and their dispersion stability evaluation in aqueous media," *Carbohydr Polym*, vol. 173, pp. 610–618, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.06.016.
- [15] G. Cárdenas, G. Cabrera, E. Taboada, and S. P. Miranda, "Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and ¹³C cross polarization/mass angle spinning NMR," *J Appl Polym Sci*, vol. 93, no. 4, pp. 1876–1885, Aug. 2004, doi: 10.1002/app.20647.
- [16] J. Majtán, K. Bíliková, O. Markovič, J. Gróf, G. Kogan, and J. Šimúth, "Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*)," *Int J Biol Macromol*, vol. 40, no. 3, pp. 237–241, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.07.010.
- [17] S. Ifuku, R. Nomura, M. Morimoto, and H. Saimoto, "Preparation of Chitin Nanofibers from Mushrooms," *Materials*, vol. 4, no. 8, pp. 1417–1425, Aug. 2011, doi: 10.3390/ma4081417.
- [18] F. Blauth de Lima *et al.*, "Trichoderma harzianum T1A constitutively secretes proteins involved in the biological control of *Guignardia citricarpa*," *Biological Control*, vol. 106, pp. 99–109, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.biocontrol.2017.01.003.
- [19] M. Kozma, B. Acharya, and R. Bissessur, "Chitin, Chitosan, and Nanochitin: Extraction, Synthesis, and Applications," *Polymers (Basel)*, vol. 14, no. 19, p. 3989, Sep. 2022, doi: 10.3390/polym14193989.
- [20] M. A. Hossin, N. H. K. Al Shaqsi, S. S. J. Al Touby, and M. A. Al Sibani, "A review of polymeric chitin extraction, characterization, and applications," *Arabian Journal of Geosciences*, vol. 14, no. 18, p. 1870, Sep. 2021, doi: 10.1007/s12517-021-08239-0.