

# vy com a com y m a way a a bis yaa

ARTÍCULO DE REVISIÓN

# Quitinasas heterólogas: avances y perspectivas

María Guadalupe Guinea-Roblero, Didiana Gálvez-López, Alfredo Vázquez-Ovando, Raymundo Rosas-Quijano\*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

### Resumen

En la agricultura, la alimentación y la industria farmacéutica se están desarrollando herramientas tecnológicas que permitan combatir plagas y enfermedades de manera sustentable y amigables con el ambiente, así como la generación de productos y alimentos sanos para la salud humana; por lo que la tecnología del ADN recombinante ha ayudado en el desarrollo de cepas microbianas modificadas genéticamente con características deseables en la producción de enzimas. Las quitinasas recombinantes son un ejemplo de biotecnología aplicada a la agricultura; estas son enzimas glicosil-hidrolasas con tamaños que oscilan entre 20 y 90 kDa, los cuales están presentes en una amplia gama de organismos como bacterias, hongos, levaduras, plantas, actinomicetos, artrópodos y humanos. Su importancia radica en la amplitud de usos en distintas industrias como la agrícola en el control de plagas, en la industria ambiental en la gestión de residuos, y en la industria farmacéutica por el uso de sus derivados. Debido a esto, las quitinasas recombinantes de diferentes fuentes exhiben potencial biotecnológico. En la presente revisión se discuten los sistemas heterólogos donde se han expresado estas enzimas, así como algunas aplicaciones en distintas industrias. La utilización de estas enzimas representa el futuro en la producción sustentable de alimentos y en la salud.

# Palabras clave:

Expresión heteróloga Industria Producción sustentable Quitinasas Sistemas eucarióticos

## **Keywords:**

Heterologous expression Industry Bioproduction Chitinases Eukaryotic systems

# \* Autor para

Instituto de Biociencias,
Universidad Autónoma de
Chiapas.
Boulevard Príncipe Akishino
sin número, Colonia
Solidaridad 2000, C.P.
30798.
Tapachula, Chiapas, México.
Teléfono: + 52 9626427972.
Correo-electrónico:
raymundo.rosas@unach.mx

# Heterologous chitinases: advances and perspectives

# Abstract

In the agriculture, food, and pharmaceutical industries, technological tools are being developed to combat pests and diseases in a sustainable and environmentally friendly manner, as well as to generate healthy products and foods for human health. Therefore, recombinant DNA technology has aided in the development of genetically modified microbial strains with desirable characteristics in enzyme production. Recombinant chitinases are an example of biotechnology applied to agriculture; these are glycosyl hydrolase enzymes with sizes ranging from 20 to 90 kDa, which are present in a wide range of organisms such as bacteria, fungi, yeasts, plants, actinomycetes, arthropods, and humans. Their importance lies in their broad uses in different industries, such as agriculture in pest control, the environmental industry in waste management, and the pharmaceutical industry for the use of their derivatives. Because of this, recombinant chitinases from different sources exhibit biotechnological potential. This review discusses the heterologous systems in which these enzymes have been expressed, as well as some applications in different industries. The use of these enzymes represents the future of sustainable food production and health.

#### 1. Introducción

Diversos organismos tienen como componente principal a la quitina (Mathew et al., 2021). Desde los crustáceos, invertebrados marinos, moluscos, algas, hongos, insectos y algunos parásitos como nematodos. La quitina se caracteriza por ser la segunda macromolécula más abundante de la naturaleza (Ren et al., 2021). La mayor parte de las extracciones de quitina provienen de los residuos de caparazones de camarón y cangrejos (Thakur et al., 2023a). La quitina es un biopolímero lineal, insoluble en agua, de baja reactividad. La quitina se extrae de los desechos marinos mediante tratamiento ácido para disolver el carbonato de calcio, seguido de extracción alcalina para solubilizar las proteínas (Tsurkan et al., 2021); sin embargo, este método supone un alto gasto de energía, esto representa un riesgo para la salud humana y al ambiente por los compuestos químicos que se emplean.

Además, los derivados de la quitina actualmente tienen alta demanda en las industrias alimentaria, agrícola y farmacéutica, por lo que la producción de estos derivados requiere de tecnologías más amigables con el ambiente.

El uso de quitinasas es un proceso biotecnológico que permite la obtención de derivados de forma sustentable y sin riesgo de contaminación ambiental; por lo que resuelve los problemas que puedan suponer los métodos anteriormente mencionados (Kou et al., 2021). Sin embargo, se requieren procesos para producir grandes cantidades de quitinasas. La ingeniería genética y biología molecular facilitan la sobreproducción de enzimas en microorganismos, lo que puede ser utilizado en los procesos de fermentación industrial para producir grandes cantidades de una enzima particular (Yahaya et al., 2021). Por lo anterior, el objetivo de la presente revisión fue discutir los sistemas heterólogos donde se han expresado las enzimas quitinasas, así como algunas aplicaciones en las distintas industrias existentes, con miras a una industria sustentable.

# 2. Quitina: aspectos generales

La palabra quitina, en la etimología griega, significa "cota de malla" (Akter et al., 2025; Hayes, 2012) aunque algunos autores mencionan que el significado es "quitón" o "túnica". [poli(β-1,4-N-acetil-D-glucosamina)] La quitina encuentra en el segundo lugar, solo detrás de la celulosa como el polímero natural más abundante que se encuentra en la tierra. Henri Braconnot aisló la quitina en 1811 y, en 1829, Albert Hofmann determinó su estructura química (Chakravarty y Edwards, 2022). En la naturaleza, esta biomolécula se presenta como microfibrillas cristalinas ordenadas que forman componentes estructurales en el exoesqueleto de artrópodos o en las paredes celulares de hongos, así como organismos vivos del reino animal y vegetal en funciones donde el reforzamiento y la fuerza son requeridas (Joseph et al., 2021).

La quitina presenta distintas conformaciones, la más común es la conformación  $\alpha$ , en donde cada cadena está en direcciones antiparalelas; así, sus cadenas adyacentes se

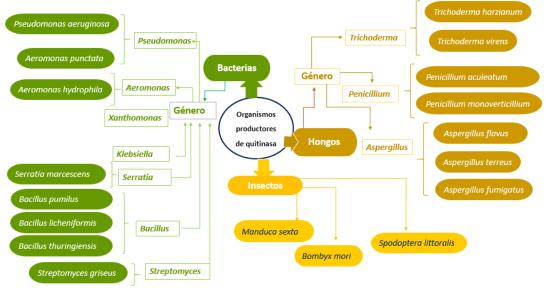
encuentran en direcciones opuestas. La  $\alpha$ -quitina se encuentra en las paredes celulares de hongos, levaduras, tendones y caparazones de langostas y cangrejos, en los caparazones de camarones, así como en la cutícula de los insectos. Dentro de la  $\beta$ -quitina las cadenas de polímero se encuentran alineadas de manera paralela, en donde sus interacciones intramoleculares son más débiles y, por lo tanto, proyectando mayor accesibilidad para las enzimas. Estructuralmente, la  $\gamma$ -quitina se diferencia a través de una mezcla de alineación paralela y antiparalela de cadenas de polímeros intercaladas, dando lugar a fracciones con niveles de cristalinidad más altos o bajos (Arnold et al., 2020; Singh et al., 2021).

# 2.1. Quitinasas

La degradación de la quitina se da por acción de las enzimas quitinasas. Este proceso se realiza en dos pasos: el primero implica la escisión inicial del polímero de quitina por quitinasas en oligosacáridos de quitina, y una escisión posterior a N-acetilglucosamina (GlcNAc) y monosacáridos por quitobiasas (Goughenour et al., 2021). Las quitinasas (E.C. 3.2.2.14) son glicosil hidrolasas cuyo tamaño varía desde los 20 kDa hasta los 90 kDa (Nayak et al., 2021). Las quitinasas se dividen principalmente en dos grupos: endoquitinasas (E.C. 3.3.1.14) y exoquitinasas. El primer grupo divide aleatoriamente la quitina en sitios internos, en donde se forma el dímero di-cetilquitobiosa y multímeros solubles de bajo peso molecular de GlcNAc (Singh et al, 2021). Por otro lado, las exo-quitinasas se dividen a su vez en dos categorías: quitobiosidasas (E.C. 3.2.1.29) (Nayak et al., 2021), las cuales participan en la liberación progresiva de diacetilquitobiosa, que comienza por el extremo no reductor de la microfibrilla de quitina; la segunda categoría la constituyen las β-1-4-glucosaminidasas (E.C. 3.2.1.30), que escinden los productos oligoméricos de las endoquitinasas y quitobiosidasas, resultando en monómeros de GlcNAc (Nayak et al., 2021). Dentro de las familias glicosil hidrolasas (GH), existen cuatro principales clasificaciones de enzimas quitinasas, las cuales son: GH18, GH19, GH23 y GH48 según la base de datos de enzimas activas en carbohidratos (CAZy) (Liu et al., 2024). En las familias GH18 y GH19, se encuentran principalmente las quitinasas de tipo Endo, mientras que las quitinasas de tipo Exo se encuentran en GH18 y GH20 (Qu et al., 2021). Las quitinasas que se encuentran dentro de la familia GH18 se encuentran en casi todos los organismos; dentro de esta familia participan en muchos procesos fisiológicos, desde la degradación de tejidos, regulación de tejidos, regulación del desarrollo, patogenicidad y la defensa inmune; dentro de este grupo de quitinasas, se utiliza la catálisis asistida por sustrato para mantener la conformación anomérica del producto (Thakur et al., 2023b). En la familia GH19 se encuentran las enzimas de plantas, bacterias y virus, en donde desempeñan distintas funciones. En las plantas, se regulan de manera positiva como resultado de ataques patógenos, relacionado a condiciones de estrés como sequía, salinidad, heridas,

presencia de metales pesados en su entorno, etc. (Bordoloi, 021; Ubhayasekera, 2011) (Figura 1). Las quitinasas de la familia 19 utilizan un mecanismo general ácido-base para invertir la configuración anomérica del residuo de GlcNAc

hidrolizado. Por otra parte, los enlaces glucosídicos escindidos por las quitinasas GH48 utilizan un método de configuración inversor.



**Figura 1.** Organismos que producen la quitinasas de manera natural.

# 2.2. Quitinasas heterólogas

Las quitinasas han ganado interés en diversas aplicaciones biotecnológicas, debido a la capacidad para degradar quitina ya sea en la pared celular de los hongos y en el exoesqueleto de los insectos. Llevando su uso como agentes microbianos o insecticidas para el biocontrol de patógenos vegetales. Otra aplicación es la bioconversión de quitina en productos farmacológicamente activos, como GlcNAc y quitooligosacáricos, siendo útiles como antimicrobianos, inmunopotenciadores en la activación de los sistemas de defensa de huésped, como transportadores de fármacos, antioxidantes, etc. (Sharma et al., 2024) (Cuadro 1, Figura 2).

Las quitinasas microbianas se han producido mediante fermentación líquida por lotes, fermentación continua y fermentación por lotes alimentados. Además de estos, también se han utilizados sistemas de fermentación en estado sólido y de células bifásicas para la producción de la enzima quitinasa. La fuente de carbono, fuente de nitrógeno, y residuos agrícolas como salvado de arroz, salvado de trigo son algunos de los componentes del medio de los cuales está influenciado. (Dahiya et al., 2005; Gomaa, 2021). Otros factores físicos como la aireación, pH, y temperatura de incubación, también afectan la producción de quitinasas.

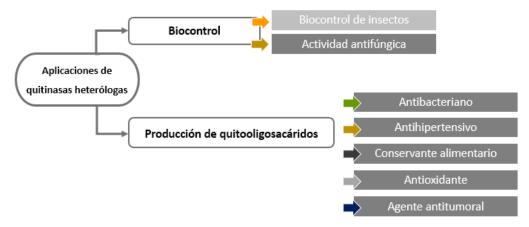


Figura 2. Usos y aplicaciones de las quitinasas heterólogas.

Cuadro 1. Organismos que expresan de forma heteróloga alguna quitinasa.			
Organismo	Gen que expresa	Actividad de la quitinasa	Referencia
		Procariotas	
Bacillus sphaericus	chiAC	Biocontrol de mosquito (Culex quinquefasciatus)	Cai et al., 2007
Escherichia coli	ChiB	Biocontrol	El-Sayed et al., 2024
Agrobacterium tumefaciens	SmchiC	Tolerancia a hongos e insectos	Navarro-González et al.,
		(Sobrexpresión de quitinasa)	2019
Escherichia coli	MaChi1	Producción de oligosacáridos bioactivos	Guo et al., 2024
Escherichia coli	CcCti1	Quitinasa con actividad antifúngica	Li et al., 2019
Escherichia coli	ChiA y ChiB	Quitinasa con actividad antifúngica	Liu et al., 2024
Escherichia coli	SachiB	Quitinasa con actividad antifúngica	Lv et al., 2021
Bacillus sp.	Chisb	Producción de quitooligosacáridos	Pan et al., 2019
Agrobacterium tumefaciens	СрСНІ4	Caracterización y actividad insecticida	Rathinam et al., 2021
Bacillus subtilis	BcChiA1	Producción de quitooligosacáridos	Wang et al., 2020
Agrobacterium tumefaciens	CmCH1	Biocontrol	Yang et al., 2020
Escherichia coli	chiZJ408	Caracterización	Yu et al., 2022
Escherichia coli	PxChi52	Quitinasa con actividad antifúngica	Zhang et al., 2021
		Eucariotas	
Pichia pastoris	Chit46	Quitinasa con actividad antifúngica	Deng et al., 2019
Saccharomyces cerevisiae	chi1	Caracterización para control biológico	Draborg et al.,1996
Pichia pastoris	LinChi78 y LinChi35	Producción de N'-diacetilquitobiosa	Du et al., 2021
Pichia pastoris	Chit33	Producción de quitooligosacáridos	Kidibule et al., 2020
Pichia pastoris	Chi21702	Caracterización y producción de GlcNAc	Lee et al., 2010
Pichia pastoris	chi46	Quitinasa con actividad antifúngica	Liu et al., 2008
Yarrowia lipolytica	YlCTS1	Caracterización	Park et al., 2015

# 3. Aplicaciones de las quitinasas heterólogas

#### 3.1. Biocontrol de insectos

Debido a que la población se encuentra en constante expansión, además de factores como condiciones ambientales que cambian constantemente, y la reducción de tierras agrícolas, el desafío de poder producir alimentos suficientes se ve afectado negativamente; por esta razón se busca maximizar la productividad mediante prácticas agrícolas, aplicando nuevas tecnologías agronómicas, desarrollo de plantas avanzadas, uso de fertilizantes y uso de pesticidas y herbicidas para minimizar pérdidas provocados por patógenos de plantas y malezas (Ahmed, 2022).

Okongo et al. (2019), produjeron quitinasas a partir de varias cepas bacterianas y cepas de levadura recombinantes de Pichia pastoris que albergan genes de quitinasa del hongo filamentoso termófilo Thermomyces lanuginosus. Las enzimas fueron caracterizadas y se compararon sus eficiencias de biocontrol con tres plagas de insectos. Chit1' (quitinasa recombinante del hongo **Thermomyces** lanuginosus en Pichia pastoris) y Chit lic (quitinasa recombinante en Bacillus licheniformis), fueron las quitinasas más efectivas contra las larvas de segundo estadio de Eldana saccharina, mientras que Chit Strpt y Chit 1489 pudieron retrasar la pupación en 26% y 24%, respectivamente.

En el caso las quitinasas recombinantes producidas *en P. pastoris* con *Chit1*, su producción máxima fue de 91 mU mL<sup>-1</sup> a las 42 h, mientras que en *Chit2* fue de 88 mU mL<sup>-1</sup> y en Chit1' de 33 mU/mL de en un tiempo de 48 y 54 h, respectivamente. Después de la producción óptima de quitinasas recombinantes, esta disminuye de forma gradual

en todas las cepas, mostrando una similitud con las quitinasas bacterianas.

Por otro lado, el desarrollo de variedades que resistan a plagas fitopatógenas se ha convertido en un objetivo prioritario, debido a que son métodos ecológicos y eficaces. Uno de los cultivos más afectados por fitopatógenos es el algodón, el cual cada vez es más grave debido a la resistencia de pulgones a pesticidas químicos. En algodón, los estudios de los genes de la quitinasa se centran en otras funciones, como lo mencionan Zhong et al. (2021), en donde los estudios se han centrado en las funciones en la resistencia a patógenos fúngicos, sin embargo, funciones en la resistencia a plagas de insecto se han analizado con escasa frecuencia. Se clonó el gen de quitinasa de algodón GhChi6 y se analizó su papel en la resistencia a los pulgones en Arabidopsis transgénica, además de enzimas que son importantes en situaciones de defensa contra plaga de insectos: polifenol oxidasa (PPO), fenilalanina amonio liasa (PAL) y superóxido dismutasa (SOD). La actividad de SOD en transgénicos de línea 1 de Arabidopsis fue mayor que en la planta de tipo silvestre, mientras que la actividad PAL no fue significativamente diferente entre dos de las plantas transgénicas de Arabidopsis (línea 1 y 4), respecto a las de tipo silvestre. En cuanto a la actividad de la SOD en Arabidopsis, la línea 4 transgénica fue significativamente menor que en las plantas de tipo silvestre, se evaluó la deposición de calosa en donde dos de las plantas transgénicas se depositó más calosa, lo cual se sugiere puede mejorar la resistencia de Arabidopsis a pulgones.

Otro estudio utilizó quitinasas provenientes de *Cajanus* platycarpus como biocontrol contra *Helicoverpa armigera*.

Se evaluaron similitudes y diferencias moleculares entre CHI4 en dos especies de Cajanus, C. cajan (CcCHI4) y C. platycarpus (CpCHI4) utilizando diversas herramientas moleculares. Las larvas alimentadas de hojas transgénicas provenientes de CpCHI4 exhibieron una reducción del crecimiento, a diferencia de las que se alimentaron de hojas de control. Mediante bioensayo se confirmó la actividad insecticida de CpCHI4 contra H. armígera (Rathinam et al., 2021). El-Sayed et al. (2024) mediante la secuencia de nucleótidos, determinaron que el gen que corresponde a ChiB, el cual fue clonado en pJET1.2, el vector resultante se denominó pJET1.2-ChiB. La quitinasa B recombinante (una de las quitinasas perteneciente a la familia de las glicósidohidrolasa perteneciente a la familia 18) fue evaluada por su eficacia como bioagente insecticida contra larvas de S. frugiperda, lo que indujo alteraciones significativas en etapas de desarrollo posteriores y malformaciones visibles. Mediante análisis in silico de la proteína anticipada codificada por el gen de la quitinasa (ChiB) ofrecieron predicciones mejoradas para la unión de la enzima y la actividad catalítica.

## 3.2. Actividad antifúngica de las quitinasas

En la supervivencia de los hongos, la pared celular juega un papel fundamental, esta estructura dinámica actúa como una barrera para resistir los cambios de presión osmótica y para interactuar con el ambiente (Free, 2013; Pasin et al., 2021). La pared celular se compone principalmente de quitina, β-(1,3):β(1,6) glucanos y manoproteínas, sin embargo, la composición exacta de la pared celular varía entre las distintas especies (Free, 2013; Gow et al., 2017; Mejía et al., 2021). Está bien establecido que los microorganismos pueden atacar la pared celular de los hongos mediante la secreción de quitinasas. Aunque todas las quitinasas poseen la misma actividad fundamental (degradación de los polímeros de quitina) existe una evidente selectividad de enzimas específicas hacia ciertos hongos (Berini et al., 2018; Mir et al., 2021). El gen de quitinasa SmchiC amplificado del genoma de S. marcescens se clonó en el vector de transformación p2X35SChiC y se utilizó para transformar tabaco (Nicotiana tabacum L. cv Petit Havana SR1). Se evaluó la resistencia de estas plantas transgénicas al hongo necrotrófico Botrytis cinerea y a la plaga Spodoptera frugiperda. Se encontró que tanto la actividad de la quitinasa como la resistencia contra B. cinerea y S. frugiperda fue significativamente mayor en las plantas transgénicas en comparación con las de tipo silvestre; las líneas transgénicas mostraron una mortalidad de insectos del 90% al día 7. Otros estudios han demostrado que la sobreexpresión de una quitinasa de S. littoralis indujo mortalidad de larvas de S. cretica del 63-70% (Navarro-González et al., 2019). Por otro lado, una quitinasa proveniente del microorganismo Paenibacillus xylanexedens, expresado en E. coli resultó en la enzima recombinante PxChi52. Esta quitinasa fue evaluada mediante el ensayo de actividad antifúngica de Alternaria alstroemeriae, Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Penicillium expansum, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum y Valsa mali. La quitinasa recombinante mostró actividad antifúngica contra los hongos B. cinerea, S. sclerotiorum y V. mali, al administrarse una dosis de enzima de 0.5 U. En cantidades mayores de 1.5 U y 4.5 U se mostró inhibición del crecimiento micelial en A. alstroemeriae y R. solani. Caso contrario en los organismos A. niger y P. expansum en donde el efecto inhibitorio sobre el crecimiento no se observó. Los autores mencionan que pudo deberse a la composición especifica de la pared celular de los hongos (Zhang et al., 2021).

Lv et al. (2021) realizaron la caracterización bioquímica del gen SaChiB, de Streptomyces alfalfae, una rizobacteria beneficiosa para las plantas el cual se utiliza ampliamente como fertilizante microbiano en el suelo. Se evaluó uno de los 7 genes codificantes de quitinasa en la secuencia del genoma de S. alfalae, el cual fue el gen SaChiB. Este gen corresponde a la familia de las glicosil hidrolasas GH19. Las actividades antifúngicas del SaChiB purificado fueron evaluados en seis hongos fitopatógenos: Botrytis cinerea, Fusarium graminearum, Trichoderma longibranchiaum, Rhizoctonia cerealis, Sclerotinia sclerrotiorum Rhizoctonia solani. La enzima inhibió fuertemente el crecimiento de los fitopatógenos debido a su actividad antifúngica. Se sugiere que esta quitinasa recombinante tiene mayor potencial como agente de biocontrol de amplio espectro contra estos organismos.

## 3.4. Producción de oligosacáridos

La mezcla de quito-oligosacáridos es producida a partir de la degradación de quitina. Estas mezclas son de diferente tamaño que pueden obtenerse a través de distintos tratamientos, ya sean químicos, físicos o enzimáticos (Castañeda et al., 2011). Estos compuestos tienen algunas características como: biodegradables y no tóxicos y debido a su mayor solubilidad en agua, baja viscosidad, bajo peso molecular, los quitooligosacáridos han sido de atención debido a su función en los sectores farmacéutico, alimentario y agrícola (Thakur et al., 2023b).

Nour et al. (2024) produjeron quitinasa A derivada de *Serratia marcescens*, NRC 408, mediante dos enfoques diferentes; optimizando el medio con el uso de métodos estadísticos y mediante expresión heteróloga utilizando el gen *SmChiA*. El sistema heterólogo presentó actividad de 228.085 U mL<sup>-1</sup>, el cual fue 2.9 mayor que la actividad obtenida mediante la técnica de optimización, el cual fue de 78.56 U mL<sup>-1</sup>. Los quitooligosacáridos obtenidos a partir de esta exoquitinasa fueron probados en cuanto a emulsificación y estabilidad en diferentes condiciones (temperatura, salinidad, pH) así como el efecto en la eliminación de hidrocarburos.

# 4. Perspectivas y conclusiones

El desarrollo de herramientas derivadas de la biotecnología en áreas como la agricultura, la alimentación, farmacia, etc., representa una oportunidad para enfrentar los desafíos

actuales relacionados con alimentos, plagas y enfermedades, entre otras. El empleo del ADN recombinante es fundamental para lograr una sostenibilidad en la producción de alimentos que sea respetuosa con el medio ambiente. Las quitinasas recombinantes, en particular, muestran un potencial significativo en diversas aplicaciones industriales, desde el control biológico de plagas hasta la producción de enzimas específicas para la industria farmacéutica.

A medida que se continúe investigando y se desarrollen cepas microbianas modificadas genéticamente, se espera que surjan nuevas aplicaciones y mejoras en la eficiencia de estas. Una de las principales desventajas del proceso para aprovechar los desechos de quitina, es el uso de métodos químicos, los cuales son ambientalmente nocivos. Mediante el uso de enzimas quitinasas se podría aprovechar el uso menos perjudicial para el ambiente. En la agricultura, la integración de quitinasas podría no solo reducir el uso de plaguicidas químicos, sino también fomentar prácticas agrícolas de forma sostenible que promuevan la salud del suelo y la biodiversidad. Además, la expresión de quitinasas heterólogas abre la posibilidad a innovación en el tratamiento de residuos y en la producción de productos de valor agregado, como oligosacáridos con propiedades funcionales. En conclusión, las quitinasas recombinantes representan una herramienta valiosa en la búsqueda de soluciones por medio de la biotecnología para la agricultura, alimentos, farmacia y la salud. Su capacidad para hidrolizar quitina es clave en la degradación de las paredes celulares de algunos patógenos, esto, las convierte en herramienta valiosa para control biológico y para las distintas industrias abordadas.

## **Conflicto de intereses**

Los autores declaran no tener algún conflicto de interés.

#### Referencias

- Ahmed M, Javeed A, Sajid AR, Ullah S, Saleem RQ, Ahmad Z, Mingshan J. 2022. Biopesticides: a healthy alternative of hazardous chemical pesticides, current development and status in China. Biomedical Letters, 8(2), 98-108.
- Akter R, Islam MM, Islam MW, Akter T, Paul T, Rahman MM, Georghiou PE. 2025. Extraction procedure and theoretical studies of chitin from black soldier fly. Journal of Polymer Research, 32(2), 48.
- Arnold ND, Brück WM, Garbe D, Brück TB. 2020. Enzymatic modification of native chitin and conversion to specialty chemical products. Marine Drugs, 18(2), 93.
- Berini F, Katz C, Gruzdev N, Casartelli M, Tettamanti G, Marinelli F. 2018. Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. Biotechnology Advances, 36(3), 818-838.
- Bordoloi KS, Krishnatreya DB, Baruah PM, Borah AK, Mondal TK, Agarwala N. 2021. Genome-wide identification and expression profiling of chitinase genes in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) under biotic stress conditions. Physiology and Molecular Biology of Plants, 27, 369-385.

Cai Y, Yan J, Hu X, Han B, Yuan Z. 2007. Improving the insecticidal activity against resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes by expression of chitinase gene chiAC in *Bacillus sphaericus*. Applied and Environmental Microbiology, 73(23), 7744-7746.

- Castañeda RC, De la Fuente SNM, Pacheco CRD, Ortiz-Rodríguez T, Barboza CJE. 2011. Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana. Acta Universitaria, 21(3), 14-23.
- Chakravarty J, Edwards TA. 2022. Innovation from waste with biomass-derived chitin and chitosan as green and sustainable polymer: A review. Energy Nexus, 8, 100149.
- Dahiya N, Tewari R, Tiwari RP, Hoondal GS. 2005. Chitinase production in solid-state fermentation by *Enterobacter* sp. NRG4 using statistical experimental design. Current Microbiology, 51, 222-228.
- Deng JJ, Shi D, Mao HH, Li ZW, Liang S, Ke Y, Luo XC. 2019. Heterologous expression and characterization of an antifungal chitinase (Chit46) from *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 and its application in colloidal chitin conversion. International Journal of Biological Macromolecules, 134, 113-121.
- Draborg H, Christgau S, Halkier T, Rasmussen G, Dalbøge H, Kauminen S. 1996. Secretion of an enzymatically active *Trichoderma harzianum* endochitinase by *Saccharomyces cerevisiae*. Current Genetics, 29, 404-409.
- Du C, Zhao X, Song W, He N, Jiang S, Zhou Y, Zhang G. 2021. Combined strategies to improve the expression of acidic mammalian chitinase in *Pichia pastoris* for the production of N, N'-diacetylchitobiose. Biochemical Engineering Journal, 167, 107907.
- El-Sayed GM, Emam MT, Hammad MA, Mahmoud SH. 2024. Gene cloning, heterologous expression, and *in silico* analysis of chitinase b from *Serratia marcescens* for biocontrol of *Spodoptera frugiperda* larvae infesting maize crops. Molecules, 29(7), 1466.
- Free SJ. 2013. Fungal cell wall organization and biosynthesis. Advances in Genetics, 81, 33-82.
- Gomaa EZ. 2021. Microbial chitinases: properties, enhancement and potential applications. Protoplasma, 258(4), 695-710.
- Gow NA, Latge JP, Munro CA. 2017. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. Microbiology Spectrum 5(3), FUNK-0035-2016.
- Goughenour KD, Whalin J, Slot JC, Rappleye CA. 2021. Diversification of fungal chitinases and their functional differentiation in *Histoplasma capsulatum*. Molecular Biology and Evolution 38(4), 1339-1355.
- Guo HZ, Wang D, Yang HT, Wu YL, Li YC, Xia GH, Zhang XY. 2024. Heterologous expression and characterization of a pH-stable chitinase from *Micromonospora aurantiaca* with a potential application in chitin degradation. Marine Drugs, 22(6), 287.
- Hayes M. 2012. Chitin, chitosan and their derivatives from marine rest raw materials: Potential food and pharmaceutical Applications. En: Hayes M. (ed). Marine bioactive compounds. Springer. Boston EE. UU. Pp. 115-128.
- Joseph SM, Krishnamoorthy S, Paranthaman R, Moses JA, Anandharamakrishnan C. 2021. A review on source-specific chemistry, functionality, and applications of chitin and chitosan. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications, 2, 100036.

Kou SG, Peters LM, Mucalo MR. 2021. Chitosan: A review of sources and preparation methods. International Journal of Biological Macromolecules, 169, 85-94.

- Lee SG, Koh HY, Han SJ, Park H, Na DC, Kim IC, Yim JH. 2010. Expression of recombinant endochitinase from the Antarctic bacterium, *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702 in *Pichia pastoris* by codon optimization. Protein Expression and Purification, 71(1), 108-114.
- Li Z, Xia C, Wang Y, Li X, Qiao Y, Li C, Zhou J, Zhang L, Ye X, Huang Y, Cui Z. 2019. Identification of an endo-chitinase from *Corallococcus* sp. EGB and evaluation of its antifungal properties. International Journal of Biological Macromolecules, 132, 1235-1243.
- Liu F, Chen S, Chen X, Yong B, He B. 2024. Identification of chitinase from *Bacillus velezensis* strain S161 and its antifungal activity against *Penicillium digitatum*. Protein Expression and Purification, 223, 106562.
- Liu ZH, Yang Q, Hu S, Zhang JD, Ma J. 2008. Cloning and characterization of a novel chitinase gene (chi46) from *Chaetomium globosum* and identification of its biological activity. Applied Microbiology and Biotechnology, 80, 241-252.
- Lv C, Gu T, Ma R, Yao W, Huang Y, Gu J, Zhao G. 2021. Biochemical characterization of a GH19 chitinase from Streptomyces alfalfae and its applications in crystalline chitin conversion and biocontrol. International Journal of Biological Macromolecules, 167, 193-201.
- Mathew GM, Madhavan A, Arun, KB, Sindhu R., Binod P, Singhania RR, Pandey A. 2021. Thermophilic chitinases: Structural, functional and engineering attributes for industrial applications. Applied Biochemistry and Biotechnology, 193, 142-164.
- Mejía C, Ardila HD, Espinel C, Brandão PF, Villamizar L. 2021. Use of *Trichoderma koningiopsis* chitinase to enhance the insecticidal activity of *Beauveria bassiana* against *Diatraea* saccharalis. Journal of Basic Microbiology, 61(9), 814-824.
- Mir ZA, Ali S, Singh A, Yadav P, Tyagi A, Chaturani GDG, Grover A. 2021. *In silico* analysis and overexpression of chitinase class IV gene in *Brassica juncea* improves resistance against *Alternaria brassicae*. Industrial Crops and Products, 169, 113555.
- Navarro-González SS, Ramírez-Trujillo JA, Peña-Chora G, Gaytán P, Roldán-Salgado A, Corzo, G, Suárez-Rodríguez R. 2019. Enhanced tolerance against a fungal pathogen and insect resistance in transgenic tobacco plants overexpressing an endochitinase gene from *Serratia marcescens*. International Journal of Molecular Sciences, 20(14), 3482.
- Nayak SK, Nayak S, Mohanty S, Sundaray JK, Mishra BB. 2021. Microbial chitinases and their applications: An overview. En: Mishra BB, Nayak SK, Mohapatra S, Samantaray D. (eds). Environmental and agricultural microbiology: applications for sustainability. Wiley. Pp. 313-340.
- Nour SA, Emam MT, El-Sayed GM, Sakr EA. 2024. Utilizing chitooligosaccharides from shrimp waste biodegradation via recombinant chitinase A: a promising approach for emulsifying hydrocarbon and bioremediation. Microbial Cell Factories, 23(1), 126.
- Okongo RN, Puri AK, Wang Z, Singh S, Permaul K. 2019. Comparative biocontrol ability of chitinases from bacteria and recombinant chitinases from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 127(6), 663-671.

Pan M, Li J, Lv X, Du G, Liu L. 2019. Molecular engineering of chitinase from *Bacillus* sp. DAU101 for enzymatic production of chitooligosaccharides. Enzyme and Microbial Technology, 124, 54-62.

- Park JP, Koh MY, Sung PS, Kim K, Kim MS, Lee MS, Lee H. 2015. Inactivation efficiency of DNA and RNA viruses during chitin-to-chitosan conversion. Macromolecular Research, 23, 505-508.
- Pasin TM, de Oliveira TB, Scarcella DA, Polizeli. DM, Guazzaroni ME. 2021. Perspectives on expanding the repertoire of novel microbial chitinases for biological control. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 69(11), 3284-3288.
- Qu MB, Sun SP, Liu YS, Deng XR, Yang J, Yang Q. 2021. Insect group II chitinase OfChtII promotes chitin degradation during larva—pupa molting. Insect Science, 28(3), 692-704.
- Rathinam M, Marimuthu SK, Tyagi S, Kesiraju K, Alagiamanavalan, LP, Rao U, Sreevathsa R 2021. Characterization and in planta validation of a CHI4 chitinase from *Cajanus platycarpus* (Benth.) Maesen for its efficacy against pod borer, *Helicoverpa armigera* (Hübner). Pest Management Science, 77(5), 2337-2349.
- Ren XB, Dang YR, Liu SS, Huang KX, Qin QL, Chen XL, Li PY. 2022. Identification and characterization of three chitinases with potential in direct conversion of crystalline chitin into N, N'-diacetylchitobiose. Marine Drugs, 20(3), 165.
- Sharma A, Arya SK, Singh J, Kapoor B, Bhatti JS, Suttee A, Singh G. 2024. Prospects of chitinase in sustainable farming and modern biotechnology: An update on recent progress and challenges. Biotechnology and Genetic Engineering Review, 40(1), 310-340.
- Singh RV, Sambyal K, Negi A, Sonwani S, Mahajan, R. 2021. Chitinases production: A robust enzyme and its industrial applications. Biocatalysis and Biotransformation, 39(3), 161-189.
- Thakur D, Bairwa A, Dipta B, Jhilta P, Chauhan A. 2023a. An overview of fungal chitinases and their potential applications. Protoplasma, 260(4), 1031-1046.
- Thakur D, Chauhan A, Jhilta P, Kaushal R, Dipta B. 2023b. Microbial chitinases and their relevance in various industries. Folia Microbiologica, 68(1), 29-53.
- Tsurkan MV, Voronkina A, Khrunyk Y, Wysokowski M, Petrenko I, Ehrlich H. 2021. Progress in chitin analytics. Carbohydrate Polymers, 252, 117204.
- Ubhayasekera W. 2011. Structure and function of chitinases from glycoside hydrolase family 19. Polymer International, 60(6), 890-896.
- Wang S, Fu G, Li J, Wei X, Fang H, Huang D, Zhang D. 2020. High-efficiency secretion and directed evolution of chitinase bechia1 in *Bacillus subtilis* for the conversion of chitinaceous wastes into chitooligosaccharides. Frontiers In Bioengineering and Biotechnology, 8, 432.
- Yahaya SR, Normi YM, Phang LY, Ahmad SA, Abdullah JO, Sabri S. 2021. Molecular strategies to increase keratinase production in heterologous expression systems for industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 105, 3955-3969.
- Yang X, Yang J, Li H, Niu L, Xing G, Zhang Y, Dong Y. 2020. Overexpression of the chitinase gene CmCH1 from Coniothyrium minitans renders enhanced resistance to Sclerotinia sclerotiorum in soybean. Transgenic Research, 29, 187-198.

Yu P, Wang X, Ma J, Zhang Q, Chen Q. 2022. Chaperone-assisted soluble expression and characterization of chitinase chiZJ408 in *Escherichia coli* BL21 and the chitin degradation by recombinant enzyme. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 52(3), 273-282.

- Zhang W, Ma J, Yan Q, Jiang Z, Yang S. 2021. Biochemical characterization of a novel acidic chitinase with antifungal activity from *Paenibacillus xylanexedens* Z2–4. International Journal of Biological Macromolecules, 182, 1528-1536.
- Zhong X, Feng P, Ma Q, Zhang Y, Yang Y, Zhang J. 2021. Cotton chitinase gene GhChi6 improves the *Arabidopsis* defense response to aphid attack. Plant Molecular Biology Reporter, 39(1), 251-261.