مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1390، دوره سوم، شماره دهم، صفحه 6-1

بررسی اثر ضد قارچی و فعالیت آنزیم کیتیناز 19 در یک سویه از باکتری *Streptomyces griseus* بومی ایران

سید محمد امین موسوی[1]، علیرضا دهناد[2]، شبنم کمالی[1]، محسن پورسلطان[3]

1- دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه علوم جانوری
2- پژوهشکده بیوتکنولوژی شمالغرب و غرب کشور
3- مرکز آموزش کشاورزی استان آذربایجان شرقی

نویسنده مسؤول: سید محمد امین موسوی، دانشگاه تبریز، دانشکده علوم طبیعی، گروه علوم جانوری. moosav_m@tabrizu.ac.ir

دریافت: 90/7/13 پذیرش: 90/9/26

چکیده

زمینه و هدف: در طول کشت گیاهان زراعی، کاهش محصول ناشی از حمله قارچ‌های بیماریزا به عنوان مهمترین عامل زیان‌های اقتصادی محسوب می‌شود. باکتری‌های جنس ***Strptomyces***، به دلیل ترشح انواع متابولیت‌های ثانویه از اهمیت زیادی در صنعت برخوردار هستند. برخی از این متابولیتها از جمله آنزیم‌های کیتیناز قابلیت کاربرد در کنترل زیستی قارچ‌های بیماریزای گیاهی را دارند. کیتینازهای خانواده **19** دارای فعالیت ضد قارچی قوی تری نسبت به دیگر کیتینازها هستند. این کیتینازها خاصیت هیدرولیز کنندگی قوی در برابر کیتین دارند. این مطالعه به منظور بررسی پتانسیل ضد قارچی باکتری بومی تولید کننده آنزیم کیتیناز**19** و اثرات مدت زمان انکوباسیون باکتری و پارامترهای **pH** و دما بر روی تولید و فعالیت آنزیم برای به دست آوردن شرایط بهینه انجام گرفت.

روش بررسی: آزمایشات بر روی نمونه‌ای از باکتری ***Streptomyces*** جدا شده از خاک‌های مناطقی از کردستان انجام گرفت که با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن کیتیناز **19**، وجود ژن مربوط به این آنزیم در این باکتری اثبات شد. برای تعیین اثرات ضد قارچی، باکتری در برابر قارچهای بیماریزای گیاهی کشت داده شد. عصاره آنزیمی از محیط کشت باکتری گرفته و اثر آن بر روی کیتین کلوئیدی در شرایط مختلف دما و **pH** سنجیده گردید.

یافته ها: تولید کیتیناز بعد از یک روز انکوباسیون آغاز شد و بعد از **5** روز به سطح بهینه خود رسید. **pH** و دمای مناسب برای فعالیت آنزیم به ترتیب **6** و **37** درجه سانتی تعیین گردید. باکتری اثرات ضد قارچی در برابر قارچهای پاتوژن گیاهی ***phytophthora*** و ***Fusarium*** نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج فوق این باکتری دارای پتانسیل بالقوه در جهت معرفی و استفاده به عنوان کود بیولوژیک می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استرپتومیسس، فعالیت ضد قارچی، کنترل بیولوژیک، کیتیناز، متابولیت ثانویه.

www.SID.ir

مقدمه

در سر تا سر جهان قارچ‌های بیماریزای گیاهی در کشت گیاهانی که از لحاظ اقتصادی اهمیت دارند مشکلات جدی ایجاد کرده‌اند، از جمله‌ی این مشکلات می‌توان به آسیب سیستم آوندی و بافت‌های گیاهی اشاره کرد که به کاهش قابل توجه بسیاری از محصولات کشاورزی منجر می شود(1و2). حمله قارچ های بیماریزا به گیاهان کشاورزی گاه به حدی است که رشد گیاه را غیر ممکن می‌سازد. یکی از راههای کنترل بیماری‌های قارچی استفاده از قارچ کش‌ها به مقدار زیاد است. استفاده از این روش علاوه بر هزینه‌های سنگینی که به بار می‌آورد باعث به خطر افتادن سلامتی انسان، آلودگی محیط، توسعه مقاومت پاتوژن‌ها نسبت به قارچ‌کش‌ها و تخریب اکوسیستم‌ها و جمعیت در سطوح مختلف زنجیره غذایی می‌شود(1،3-5). یکی از راههای مناسب جهت کنترل بیماری های ناشی از قارچ های بیماریزا که تأثیرات نامطلوب فوق را نیز نداشته باشد، استفاده از روشهای کنترل بیولوژیک است(6). بر خلاف عوامل سنتتیک، موادی که به صورت میکروبیولوژیکی از گونه‌های موثر گرفته شده‌اند سمیت کمتر داشته، به راحتی قابل تجزیه بوده و آلرژی‌زایی کمی دارند. بعلاوه این مواد در محصولات غذایی انباشته نمی‌شوند و نیز ارزان و مناسب برای مصرف در مقیاس صنعتی می‌باشند. بسیاری از *اکتینومیست‌ها*، به ویژه گونه‌های *استرپتومایسس* که باکتری‌های گرم مثبت خاکزی هستند، عوامل کنترل بیولوژیک وسیع الطیف مانند آنتی بیوتیک‌ها، آنزیم‌های هیدرولیتیک از قبیل کیتینازها و بازدارنده‌های آنزیمی در برابر پاتوژن‌های قارچی گیاهان تولید و ترشح می‌کنند(7). فعالیت آنتاگونیستی *استرپتومایسس‌ها* در برابر قارچ‌های پاتوژن به طور معمول مربوط به تولید ترکیبات ضد قارچی و آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشد. به نظر می‌رسد که کیتیناز تولیدی باکتری‌های *استرپتومایسس*، آنزیم هیدرولیتیک مهمی در لیز دیواره سلولی قارچی می‌باشد(1). یک مکانیسم عمده در کنترل بیولوژیک قارچ های بیماریزا، از طریق تجزیه دیواره‌ی سلولی آنهاست(8). کیتین که یک پلیمر زیستی از واحدهای N-acetyl-D-glucosamine است، یک ترکیب ساختاری عمده در دیواره‌ی اکثر قارچ هاست. کیتینازها از طریق تجزیه کیتین در دیواره‌ی سلولی قارچهای پاتوژن، نقش مهمی در کنترل بیولوژیک بسیاری از بیماریهای قارچی ایفا می‌کنند(9). کیتینازهای استرپتومیسس‌ها در برابر دامنه‌ی وسیعی از پاتوژن‌های قارچی گیاهی به کار برده شده‌اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی پتانسیل ضد قارچی یک نمونه از باکتری استرپتومیسس گریزئوس بومی تولید کننده‌ی آنزیم کیتیناز 19 در برابر قارچ‌های بیماریزای گیاهی می‌باشد.

روش بررسی

سویه باکتریائی مورد نیاز: *استرپتومیسس گریزئوس کیتینولیتیک* با توجه به شکل ظاهری کلنی(خشک و گچی و چسبیده به محیط) و همچنین بر اساس آزمایشات ژنتیکی از جمله استخراج DNA و انجام PCR توسط پرایمرهایی که بر اساس تکثیر یه قطعه 885bp از ژن کد کننده آنزیم کیتیناز C باکتری *S.griseus* طراحی شده است، در طی مطالعات قبلی از خاکهای مناطق کردستان جدا و به صورت استوک در محیط کشت ISP2 نگه داشته شد. این محیط شامل ترکیبات زیر می باشد: مواد لازم برای یک لیتر محیط کشت با pH 7/3: عصاره مالت 10 گرم، عصاره مخمر 4 گرم، گلوکز 4 گرم، $2CaCO_3$ گرم، آب مقطر یک لیتر(10). استرینهای *Fusarium solani* و *phytophthora* sp. 44D از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران در کرج تهیه شدند.

تست کشت دوگانه *S.griseus* و قارچ‌های بیماریزای گیاهی: در تست‌های Invitro بر همکنش‌های بین استرپتومیسس گریزئوس و قارچ‌های بیماریزای گیاهی مانند *Fusarium solani* و *phytophthora* sp.44D بر روی محیط PDA مطالعه شد. سویه‌ی تست شده متابولیت‌هائی تولید کردند که باعث بازدارندگی رشد پاتوژنهای قارچی بر روی محیط کشت PDA شدند(11). برای فعال شدن ژن کیتیناز و اطمینان از اینکه بیشترین اثر ضد قارچی در اثر آنزیم کیتیناز است باکتری قبل از تلقیح به محیط PDA در محیط CYS محتوی کیتین کلوئیدی به عنوان تنها ماده‌ی غذایی کشت داده شد. سپس باکتری رشد داده شده، در یک سمت از پلیت محتوی PDA کشت داده شد و پلیت به مدت 4 روز در دمای 28 $^{\circ}C$ انکوبه گردید. پس از رشد باکتری در پلیت، یک بلوک مربعی میسلیوم قارچی چهار روزه به سمت دیگر این پلیت انتقال داده شد. به طور همزمان یک بلوک از میسلیوم قارچی نیز به عنوان شاهد، در یک سمت از پلیت PDA دیگری کشت داده شد. برای بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه مورد نظر، پس از 3-9 روز

www.SID.ir
Archive of SID

انکوباسیون، شعاع رشد قارچی در هر کدام از پلیت‌های کشت متقابل و شاهد بررسی و با هم مقایسه گردید.

بیان ژن کیتیناز در *S.griseus*: باکتری در محیط CYS حاوی کیتین کلوئیدی کشت داده شد. کیتین کلوئیدی به صورت القا کننده سنتز و فعالیت آنزیم کیتیناز و به صورت سوبسترا برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. کیتین کلوئیدی با اندکی تغییر طبق روش احمدنیا و همکارانش(12) تهیه گردید. مقدار 10 گرم از پودر کیتین در 175 میلی لیتر HCL غلیظ و سرد حل شد و مخلوط حاصل به مدت 24 ساعت در داخل شیکر با دمای $4^{o}C$ قرار داده شد. مخلوط به داخل 1 لیتر اتانول اضافه شد و به مدت 48 ساعت بر روی همزن در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از این مدت چندین بار با آب مقطر شسته شد تا اسید آن کامل شسته شده و pH آن خنثی گردد. کیتین شسته شده در دمای $90^{o}C$ خشک و در داخل هاون چینی خرد گردید. برای القای آنزیم کیتیناز سوسپانسیونی از باکتری در محیط ISP_2 را در محیط کشت CYS محتوی کیتین کلوئیدی تلقیح کرده و در دمای $28^{\circ}C$ بر روی شیکر انکوباتور به مدت 7 روز کشت داده شد، حضور کیتین به عنوان تنها ماده‌ی غذایی در محیط باعث فعال شدن ژن آنزیم کیتیناز در باکتری و آزاد شدن آنزیم در محیط کشت می‌شود. برای تهیه عصاره آنزیمی، در طول مدت 7 روز بصورت روزانه مقداری از سوسپانسیون کشت باکتری را برداشته و با دور 15000 و به مدت 10 دقیقه در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفیوژ کرده و محلول روئی از فیلترهای0/22 میکرون عبور داده شد و مایع حاصل به عنوان عصاره‌ی آنزیمی استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز: مخلوط واکنش آنزیمی شامل 200µl عصاره‌ی آنزیمی و200µl محلول 0/5% سوبسترای کیتین کلوئیدی در بافر استات بوده است. پس از گذشت یک ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$، با افزودن 1ml، NaOH 1% و سانتریفیوژ کردن محلول حاصل در 6000rpm به مدت 5 دقیقه، واکنش آنزیمی متوقف شد. برای سنجش میزان N-acetylglucosamine آزاد شده در طول واکنش، پس از افزودن 100µl بافر پتاسیم تترا بورات، مخلوط حاصل، به مدت 3 دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از این مرحله با افزودن 3ml واکنش گر DMAB، محلول حاصل به مدت20 دقیقه در دمای $36\text{-}38^{\circ}C$ قرار گرفته و سپس جذب نوری محلول، بلافاصله در طول موج 544 nm خوانده شد.

هر واحد فعالیت آنزیمی (U)، عبارت از مقدار آنزیمی است که می تواند در طول یک ساعت واکنش، در دما و pH مشخص، یک میکرومول N-acetylglucosamine یا الیگومرهایی از آن را آزاد کند(13).

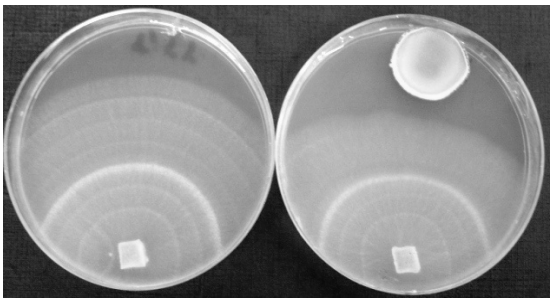
سنجش اثر pH بر روی فعالیت آنزیم کیتیناز: برای تعیین بهترین pH از بافرهای مختلفی استفاده شد. بافر سدیم استات (CH_3COONa) برای pH های 6-4، بافر سدیم فسفات (NaH_2PO_4- $NaHPO_4$) برای pH های 8-7 و بافر گلیسین- NaOH برای pH های 10-9 استفاده شدند(13).

سنجش اثر دما بر روی فعالیت آنزیم کیتیناز: دمای بهینه برای فعالیت آنزیم با انجام دادن سنجش در دامنه دمایی $^{\circ}C$ 80-20 تعیین شد(13). این آزمایشات همچنین بر روی یک نمونه از باکتری استرپتومیسس خریداری شده از مرکز پژوهشی کلکسیون میکروبی دانشگاه تهران نیز به عنوان کنترل انجام گرفت و نتایج نزدیک به سویه انتخاب شده نشان داد.

یافته‌ها

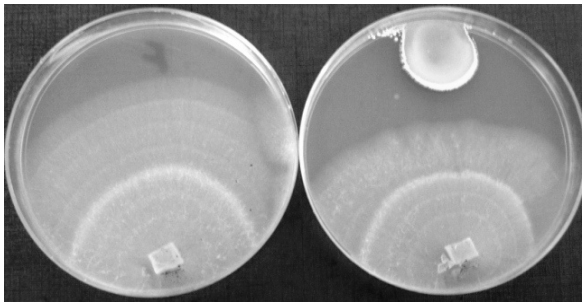
بازدارندگی رشد قارچ به وسیله باکتری *S.griseus* بومی فعالیت ضد قارچی باکتری استرپتومیسس تولید کننده‌ی کیتیناز در برابر قارچهای بیماریزای گیاهی *phytophthora* sp.44D و *Fusarium solani* آزمایش شد. باکتری استرپتومیسس مانع رشد کامل قارچ بر روی محیط PDA شد، بازدارندگی رشد قارچ *Fusarium* بیشتر از *phytophthora* بود(شکل 1). در جدول 1 نتایج حاصل از اندازه گیری شعاع رشد قارچ در پلیت شاهد و تست آورده شده است.

الف



Archive of SID
www.SID.ir

ب

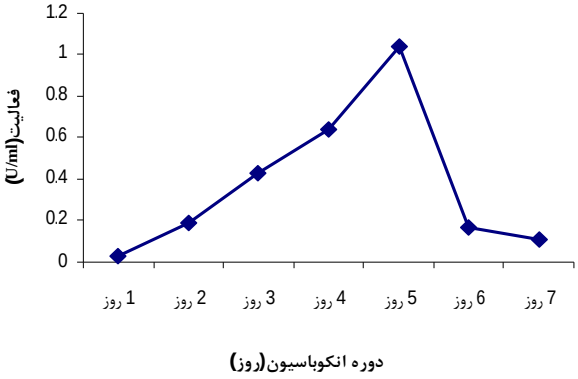


شکل1. نمایش اثر آنتاگونیستی جدایه مولد کیتیناز خانواده 19 بر علیه قارچ بیماری‌زای گیاهی: الف) *Phytophthora*sp.44D، ب) *Fusarium solani*.

جدول1. نتایج حاصل از اندازه گیری شعاع رشد قارچی در پلیت های شاهد و پلیت تست

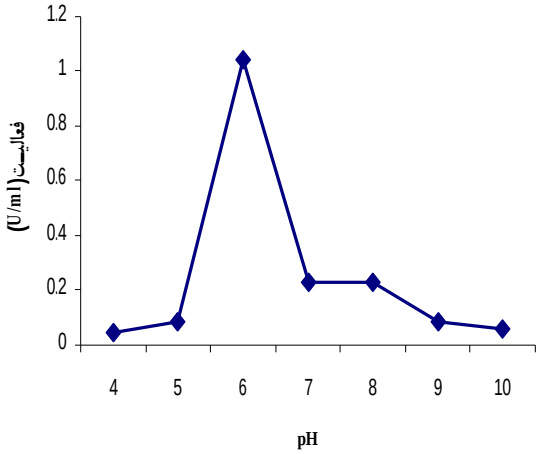
نام قارچ	اندازه شعاع رشد قارچی در پلیت شاهد(cm)	اندازه شعاع رشد قارچی در پلیت تست(cm)
phytophthora sp.44D	4/9	4
Fusarium solani	4/9	3/7

اثرات دوره انکوباسیون بر روی تولید کیتیناز: اثرات دوره زمانی بر تولید کیتیناز با سنجش فعالیت عصاره آنزیمی گرفته شده از محیط کشت باکتری انتخابی در زمانهای مختلف به دست آمد که در شکل 2 نشان داده شده است. تولید کیتیناز بعد از 1 روز از انکوباسیون باکتری آغاز شد و بعد از 5 روز به مقدار بیشینه خود رسید. با انکوباسیون بیشتر باکتری تولید کیتیناز و فعالیت آن کاهش یافت.



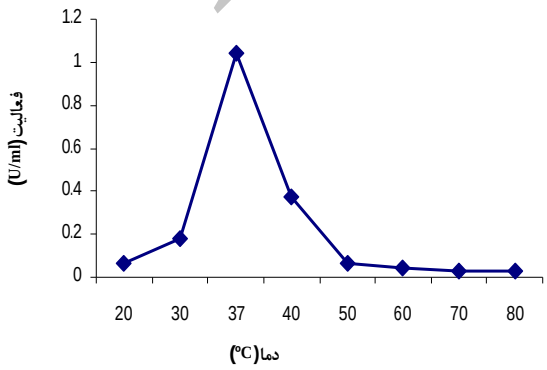
شکل2. اثرات دوره انکوباسیون بر روی تولید آنزیم کیتیناز 19 باکتری Streptomyces griseus بومی ایران

اثرات pH و دما بر روی فعالیت آنزیم: اثرات pH بر روی فعالیت کیتیناز جدا شده با استفاده از کیتین کلوئیدی به عنوان سوبسترا مطالعه شد. فعالیت عصاره‌ی آنزیمی بین pH 4 تا 10 مشاهده گردید. همانطور که در شکل 3 نشان داده شده است کیتیناز بالاترین فعالیت خود را در pH 6 نشان داد.



شکل3. بررسی اثر pHهای مختلف بر روی فعالیت آنزیم کیتیناز19 در یک سویه از باکتری Streptomyces griseus بومی ایران.

اثرات دما بر روی فعالیت آنزیم در pH 6 سنجیده شد. عصاره ی آنزیمی کیتیناز جدا شده بیشترین فعالیت خود را در دمای 37 ˚C نشان داد، گرچه در دمای بالای 50 ˚C فعالیت آنزیم به شدت کاهش یافت و در دمای 80 ˚C آنزیم هیچ فعالیتی از خود نشان نداد(شکل 4).



Archive of SID

www.SID.ir

شکل4. بررسی اثرات دما بر روی فعالیت آنزیم کیتیناز19 باکتری Streptomyces griseus بومی ایران

بحث

گیاهان زراعی اغلب از بیماری‌های مختلف ایجاد شده توسط قارچهای بیماریزای گیاهی رنج می‌برند، در نتیجه مقدار و کیفیت محصولات کاهش می‌یابد(9). فعالیت مستقیم ضد قارچی گونه‌های استرپتومیسس قبلا گزارش شده است(11). فعالیت لیتیک این باکتریها به طور عمده در نتیجه‌ی آنزیم‌های هیدرولازی مانند کیتیناز و گلوکاناز است(14). کیتین که ترکیب عمده‌ی دیواره‌ی سلولی قارچهاست سوبسترای آنزیم کیتیناز است(15). این آنزیمها بازدارنده‌های قوی بسیاری از قارچهای بیماریزای مهم گیاهی هستند و این آنزیم‌ها توانایی لیز دیواره‌ی سلولی سخت، هیف‌های بالغ، کونیدی‌ها و کلامیدوسپورها را دارند(9). کیتینازهای باکتریهای استرپتومیسس گریزئوس نسبت به اکثر کیتینازهای دیگر با منبع گیاهی یا میکروبی دارای فعالیت ضد قارچی بیشتری هستند(16) و بر روی دامنه‌ی وسیعی از پاتوژنها مؤثر هستند و همچنین در غلظت بالا برای گیاه غیر سمی هستند. بنابراین به عنوان کاندیداهای خوبی برای کنترل بیولوژیک بیماری‌های قارچی گیاه و تقویت دفاع گیاهان در برابر قارچها به شمار می‌روند. در این مطالعه پتانسیل ضد قارچی یک ایزوله ایرانی *Streptomyces griseus* مورد بررسی قرار گرفت، فعالیت ضد قارچی به طور مستقیم بر روی پلیت‌های PDA با تلقیح باکتری کشت داده شده در محیط مایع CYS حاوی کیتین کلوئیدی به عنوان تنها منبع کربن برای تحریک تولید و آزاد سازی آنزیم کیتیناز انجام گرفت و اثر بازدارندگی رشد قارچ مشاهده شد. بازدارندگی بالای رشد قارچ به وسیله‌ی *S.griseus* در نتیجه‌ی حضور بعضی از مواد بازدارنده، آنتی بیوتیک‌ها و دیگر آنزیم‌ها مانند گلوکاناز و پروتئاز و کیتیناز است. تولید آنزیم لیتیک توسط سویه مورد آزمایش به وسیله‌ی حضور کیتین کلوئیدی، حدس زده شده که این سوبسترا می‌تواند همچنین به صورت القا کننده‌ی سنتز آنزیم لیتیک عمل کند. بررسی فعالیت کیتیناز جدا شده از این ایزوله نشان داد که تولید کیتیناز به طور اولیه بعد از 1 روز از انکوباسیون دیده شد و در 5 روز به سطح ماگزیمم خود رسید. فعالیت آنزیم بعد از یک روز کشت باکتری در سویه انتخابی برابر U/ml 0/027 و بعد از 5 روز کشت U/ml 1/04 بود. مشاهده شد که تولید کیتیناز در دوره‌های انکوباسیون بیشتر کاهش می‌یابد. فعالیت بهینه آنزیم کیتیناز در باکتری *Streptomyces griseus* 6037 بعد از گذشت 5 روز از کشت باکتری مشاهده شد(17). Narayana و همکارانش(10) در سال 2009 تولید بیشینه کیتیناز را در باکتری *Streptomyces* sp. ANU 6277 بعد از 60 ساعت انکوباسیون گزارش کردند، تولید آنزیم در این باکتری بعد از 24 ساعت آغاز شد و در 60 ساعت به مقدار بیشینه خود رسید با انکوباسیون بیشتر از 60 ساعت تولید آنزیم در باکتری کاهش یافت. Anitha و همکارانش(18)، عصاره‌ی آنزیمی را بعد از 7 روز از محیط کشت باکتری *Streptomyces griseus* جدا کردند و فعالیت آن را اندازه گرفتند. سطح فعالیت آنزیم در نمونه انتخاب شده بین pH=4-10 متغیر بود. همانطور که در شکل نشان داده شده بیشترین فعالیت آنزیم در pH=6 بوده است. این نتایج با تحقیقات Naryana و همکارانش(10) مطابقت داشت. کیتیناز تولیدی توسط باکتری *Streptomyces sp.* ANU 6277 بهترین فعالیت را در pH=6 نشان داد و در باکتری *Streptomyces* sp. M- 20، pH بهینه بین 5 و 6 بود(19). نتایج نشان داد که آنزیم کیتیناز جدا شده از ایزوله‌ی انتخابی بیشترین فعالیت را در دمای C˚ 37 داشته است. با افزایش دما فعالیت آنزیم کاهش یافته و در دمای C˚ 80 آنزیم به طور کامل غیر فعال شد. کیتینازهای زیادی گزارش شده‌اند که بهترین فعالیت خود در دمای نزدیک به C˚ 37 دارند. Naryana و همکارانش(10) دمای بهینه را برای فعالیت آنزیم کیتیناز باکتری *Streptomyces sp.* ANU 6277، دمای C˚35 گزارش کردند. Taechowisan و همکارانش این دما را برای *Streptomyces aureofaciens*، C˚ 30-40 گزارش کردند(10). کیتیناز تخلیص شده از باکتری *Streptomyces* sp. M- 20 در دمای C˚ 30 بهترین فعالیت خود را نشان داد(19).

نتیجه گیری

به طور کلی آنزیم کیتیناز C در ایزوله بومی بیشترین فعالیت را در دمای C˚ 37 و pH=6 نشان داد. در نتیجه با توجه به این نتایج و توان جدایه بومی *Streptomyces griseus* برای تولید آنزیمهای کیتینازی انتظار می رود که بتوان از این جدایه در مطالعات مربوط به کنترل بیولوژیک قارچهای بیماریزای گیاهی استفاده نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

تشکر و قدردانی

این پژوهش با پشتیبانی دانشگاه تبریز و پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور انجام شده است. بدین وسیله از مسئولین محترم معاونت پژوهشی مراکز مربوطه به خاطر حمایت‌های مالی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Prapagdee B, Kuekulvong Ch, Mongkolsuk S. *Antifungal potential of extracellular metabolites produced by Streptomyces hyroscopicus against phytopathogenic fungi*, International Journal of Biological Sciences. 2008; 4(5): 330-337.
2. Khamna S, Yokota A, Peberdy J. F, Lumyong S. *Antifungal activity of streptomyces spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants*. International Journal of Integrative Biology. 2009; 6: 143-147.
3. Zakalyukina Y. V, Zenova G. M. *Antagonistic activity of soil acidophilic Actinomycetes*. Biology Bulletin. 2007; 34: 329-332.
4. Sandhya Ch, Binod P, Nampoothiri K. M, Szakacs G, Pandey A. *Microbial synthesis of chitinase in solid cultures and its potential as a biocontrol agent against phytopathogenic fungus Colletotrichum gloeosporioides.* Applied Biochemistry and Biotechnology. 2005; 127:.1-15.
5. Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar H. S. *bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms*. African Journal Of Biotechnology. 2006; 5: 54- 72.
6. Seyed asli N, Zamani M. R, Motallebi M, Harighi M. J. *Study of chitinase enzyme production in the Trichoderma fungus*. Iranian journal of biology. 2005; 17: 227-233.
7. Joo G. J. *Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent Streptomyces halstedii*. Biotechnology Letters. 2005; 27: 1483-1486.
8. Kezuk Y, Ohishi M, Itoh Y,Watanabe J,et al. *Structural studies of a two-domain chitinase from Streptomyces griseus HUT6037*. Journal of molecular biology. 2006; 358: 472–484.
9. Harighi M. J, Motallebi M, Zamani M. R. *Antifungal activity of heterologous expressed chitinase (Chit42) from Trichoderma atroviride PTCC5220*. Iranian journal of biotechnology. 2006; 4: 95-103.
10. Narayana K. J. P, Vijalakshmi M. *Chitinase production by Streptomyces sp. ANU 6277*. Brazilian Journal of Microbiology. 2009; 40: 725-733.
11. Anitha A, Rabeeth M. *Degradation of fungal cell walls of phytopathogenic fungi by lytic enzyme of streptomyces griseus*. African Journal of Plant Science. 2010; 4(3): 61- 66.
12. Ahmadian G, Degrassi G,et al. *Bacillus pumilus SG2 isolated from saline condition produces and secretes two chitinases*. Journal of Applied Microbiology. 2007; 103: 1081-1089.
13. Ghasemi S. H, Ahmadian G. R, Babaeian Jelodar N. A, et al. *Antifungal chitinases from Bacillus pumilus SG2*. World journal microbial biotechnol. 2010; 26:1437–1443.
14. Matsumoto K. Sh. *Fungal chitinases*. Advances in Agricultural and Food Biotechnology. 2006; p: 289-304.
15. Hoell I. A, Dalhus B, Heggset E. B, Aspmo S. I , Eijsink V. G. H. *Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes*. Federation of European Biochemical Societies Journal. 2006; 273: 4889-4900.
16. Watanabe T, Kanai R,et al. *Family 19 chitinases of Streptomyces species: characterization and distribution*. Microbiology. 1999; 145: 3353- 3363.
17. Jung H. S, Son J. W,et al. *Effective Production of Chitinase and Chitosanase by Streptomyces griseus HUT 6037 Using Colloidal Chitin and Various Degrees of Deacetylation of Chitosan*. biotechnology bioprocess engineering journal. 1999; 4: 26-31.
18. Anitha A, Rebeeth M. *In vitro Antifungal Activity of Streptomyces griseus against phytopathogenic fungi of tomato field*. Academic Journal of Plant Sciences. 2009; 2: 119-123.
19. Kim K. J, Yang Y. J, Kim J. G. *Purification and characterization of chitinase from Streptomyces sp. M-20*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2003; 36: 185-189.

Archive of SID

www.SID.ir