



Original Article

Purification and Characterization of Chitinase from the Nematode – Fungus *Paecilomyces* sp. P1

Chu Thanh Binh¹, Nguyen Phuong Nhue², Ho Tuyen², Bui Thi Viet Ha^{3,*}

¹Vietnam - Russian Tropical Center, 63 Nguyen Van Huyen, Hanoi, Vietnam

²Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam

³Center for Life Science Research, Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

Received 26 December 2018

Revised 27 February 2019; Accepted 08 March 2019

Abstract: The nematophagous – fungi *Paecilomyces* sp. are currently developed as a biocontrol agent against plant parasitic nematodes (Khan et al., 2003; Yang et al., 2007). Biological control agents can infiltrate certain nematode sites and destroy them by producing some enzymes including chitinase (Khadijeh et al., 2017). This paper discusses the purification and determination of the chitinase activity from *Paecilomyces* sp. P1. With Lugol reagent, chitinase of this strain was characterized by diffusion on agar plate. Chitinase specific activity was determined by measuring the release of reducing saccharides from colloidal chitin by the N-acetyl-glucosamine-dinitrosalicylate method at 540 nm. By using the saturated (NH₄)₂SO₄ precipitation at 65% concentration, DEAE A-50 ion exchanges chromatography and SDS - PAGE concentration of 12.5%; chitinase molecules weigh nearly 50kDa, having a specific activity of 133.3 U/mg, 2.1-fold higher than that of supernatant. Furthermore, tested with the nematode *Meloidogyne* sp., the ability to kill nematodes of *Paecilomyces* sp. P1 reached 58% efficiency in 96h. These results are a scientific basis for the application of *Paecilomyces* sp. P1 in the production of nematode insecticides.

Keywords: *Paecilomyces* sp. P1, chitinase, purify, biocontrol, *Meloidogyne* sp.

*Corresponding author.

Email address: buithivietha@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4851>.



Tinh sạch và xác định hoạt tính chitinase từ nấm diệt tuyến trùng *Paecilomyces* sp. P1

Chu Thanh Bình¹, Nguyễn Phương Huệ², Hồ Tuyên², Bùi Thị Việt Hà^{3,*}

¹Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga, 63 Nguyễn Văn Huyền, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học, Viện HLKH&CNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam

³Trung tâm Nghiên cứu Khoa học sự sống, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 26 tháng 12 năm 2018

Chỉnh sửa ngày 27 tháng 02 năm 2019; Chấp nhận đăng ngày 08 tháng 03 năm 2019

Tóm tắt: Nấm sợi *Paecilomyces* sp. hiện đang được nghiên cứu như là một tác nhân kiểm soát sinh học chống lại tuyến trùng gây hại thực vật [1]. Tác nhân sinh học có thể xâm nhập vào một số vị trí của tuyến trùng và tiêu diệt chúng bằng việc sản xuất ra một số enzyme trong đó có chitinase [2]. Mục đích của nghiên cứu này là tinh sạch, xác định hoạt tính chitinase ngoại bào của *Paecilomyces* sp. P1. Chitinase ngoại bào được định tính bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch với thuốc thử Lugol. Hoạt tính chitinase được xác định bằng phản ứng tạo ra *N*-acetyl glucosamine và đo tại bước sóng 540 nm. Bằng việc sử dụng phương pháp tủa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa ở nồng độ 65%, sắc khí trao đổi ion DEAE A-50 và điện di SDS-PAGE nồng độ 12,5%; phân tử chitinase ngoại bào có trọng lượng gần 50kDa, hoạt độ riêng 133,3 U/mg, độ tinh sạch gấp 2,1 lần so với ban đầu. Bằng phương pháp thử nghiệm với tuyến trùng *Meloidogyne* sp., khả năng tiêu diệt tuyến trùng của *Paecilomyces* sp. P1 đạt hiệu suất 58% trong vòng 96 giờ. Các kết quả trên là cơ sở khoa học nhằm ứng dụng *Paecilomyces* sp. P1 trong sản xuất chế phẩm sinh học diệt tuyến trùng.

Từ khóa: *Paecilomyces* sp.; chitinase, tinh sạch, kiểm soát sinh học, *Meloidogyne* sp.,

1. Mở đầu

Nấm sợi *Paecilomyces* sp., một loại nấm trong đất, được biết đến như là một loài có khả

năng diệt tuyến trùng hiệu quả gây bệnh cho cây. *Paecilomyces* cho thấy tiềm năng như là một tác nhân kiểm soát sinh học của tuyến trùng ký sinh thực vật và hiện đang được áp dụng trong các lĩnh vực trên thế giới [3]. Các công bố của Khan và cộng sự, Perveen Z. và cs., về cơ chế diệt tuyến trùng, *Paecilomyces* sp. thuộc loài nấm ký sinh trứng tuyến trùng,

*Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: buihithietha@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4851>.

Bào tử của chúng có khả năng nhận biết và bám dính vào trứng của tuyến trùng, bào tử nảy mầm và sản sinh ra một số loại enzyme trong đó có chitinase, protease, collagenase... [1, 4]; Một số các nghiên cứu chỉ ra rằng chitinase từ *Paecilomyces* làm giảm lớp dày nhất của vỏ trứng tuyến trùng [5, 6], chitinase ngoại bào là một trong enzyme liên quan đến quá trình diệt tuyến trùng.

Hiện nay có khoảng 700 loài nấm diệt tuyến trùng được nghiên cứu. Về cơ chế phân tử diệt tuyến trùng: Một số nấm hình thành bẫy, vòng thắt để bắt và diệt tuyến trùng từ bên ngoài (ví dụ các chi *Arthrobotrys*, *Drechslerella*, *Orbilina*...); Một số nấm ký sinh bên trong tuyến trùng sử dụng một số loại enzyme như protease, chitinase, collagenase... (ví dụ các chi *Paecilomyces*, *Pochonia*, *Lecanicillium*, *Cordyceps*...; Một số nấm tiết ra độc tố để tiêu diệt tuyến trùng (ví dụ các chi *Pleurotus*, *Coprinus*...) [7-9].

Chitin, polymer N-acetylglucosamine liên kết β -1,4, là polyme có nhiều thứ hai trong tự nhiên và cũng là thành phần cấu tạo phổ biến (40% w/w) của vỏ trứng tuyến trùng. Chitinase còn được sử dụng để diệt các loài nấm và côn trùng hại thực vật khác; Ở một số loài *Serratia* spp., *Baeuveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, chitinase có thể gây độc đối với côn trùng và nấm bệnh. Chitinase từ *Trichoderma atroviridae* được sử dụng để kiểm soát sinh học bệnh sâu hại khoai tây [2, 10]. Ngoài ra, chitinase còn ức chế quá trình nảy mầm của bào tử nấm bệnh, sự kéo dài của sợi nấm [11].

Chitinase từ *Trichoderma* đã được xác định hoạt tính, nhân dòng và biểu hiện, đồng thời được thử nghiệm tiêu diệt tuyến trùng khác [3, 12]. Các vỏ trứng của tuyến trùng có bản chất là protein và biểu bì đóng vai trò là lớp bảo vệ hiệu quả chống lại sự xâm nhập của vi sinh vật trong đất. Các tác nhân sinh học ngoại lai có thể tấn công vào một vài vị trí trên tuyến trùng, chúng có khả năng tiết một số enzyme như chitinase, protease... Một số phân tử chitinase có trọng lượng 33, 43,5, 45 và 60 kDa từ *Metarhizium anisopliae*; chitinase 45,0 kDa từ *Beauveria bassiana* đã được tinh sạch [13, 14];

chitinase có kích thước 52 kDa từ *Paecilomyces lilacinus*; 43 kDa từ *Pochonia chlamydosporium* (*Verticillium chlamydosporium*) và *P. suchlasporium* được tinh sạch và nghiên cứu để làm rõ vai trò của chúng trong tiêu diệt tuyến trùng.

Trong bài báo này, chúng tôi đưa ra kết quả về tinh sạch, xác định hoạt tính, trọng lượng phân tử chitinase từ *Paecilomyces* sp. P1. Kết quả của bài báo cũng đưa ra khả năng diệt tuyến trùng của P1 và tiềm năng ứng dụng chúng trong sản xuất chế phẩm diệt tuyến trùng.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. *Vật liệu: Paecilomyces* sp. P1 từ bộ sưu tập chủng của phòng Công nghệ lên men – Viện Công nghệ sinh học

Tuyến trùng bướu rễ *Meloidogyne* sp.: Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật /Viện HL KH&CN Việt Nam cung cấp.

2.2. Phương pháp

Phương pháp nuôi cấy và lưu giữ chủng nấm sợi: P1 được lưu giữ trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) thạch nghiêng, bảo quản ở nhiệt độ 4°C (theo Nguyễn Lâm Dũng và cs., 1994)

Nuôi cấy thu dịch enzyme thô: *Paecilomyces* P1 được nuôi cấy trên môi trường PDB (Potato Dextrose Broth) ở 30°C – 32°C; thời gian nuôi cấy 3-5 ngày, tốc độ lắc 250 v/phút. Ly tâm 10000 v/p bỏ tủa.

Định tính khả năng sinh chitinase được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Cơ chất là chitosan đã thủy phân 0,5%; độ dày thạch khoảng 0,5 cm, đục lỗ với đường kính 0,5 cm. Dịch enzyme thủy phân được đưa vào giếng và được nhuộm bằng thuốc thử Lugol 1,0%. Nguyên tắc: Khi tác dụng với thuốc thử Lugol, phần môi trường trong suốt (vòng phân giải) phản ánh hoạt tính chitinase của chủng.

Xác định hoạt tính chitinase: được xác định bằng phản ứng màu với DNSA (3, 5 - dinitrosalicylic acid) theo Miller G.L., 1959.

Tinh sạch chitinase: dịch nuôi cấy được ly tâm 10000 v/phút loại bỏ sinh khối tế bào; được tủa với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa ở nồng độ 65%; sau ly tâm, tủa được hòa với đệm Natri phot phat 50mM pH 7,0 thẩm tích loại muối ở 4°C. Sau thẩm tích được đưa qua cột sắc ký trao đổi ion DEAE-Sephadex A-50 (2,6 x 60cm) đã được cân bằng với 150ml đệm Tris HCl 50mM; pH 7,0; tốc độ chảy là 30 ml/giờ. Thể tích mỗi phân đoạn là 1,5 ml. Hàm lượng protein và hoạt tính enzyme được xác định tại mỗi phân đoạn, sau đó điện di trên gel polyacrylamide 12,5% để kiểm tra độ tinh sạch.

Xác định hàm lượng protein tổng số: Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Bradford.

Điện di trên gel polyacrylamide (SDS - PAGE): được sử dụng theo phương pháp của Laemmli, 1970.

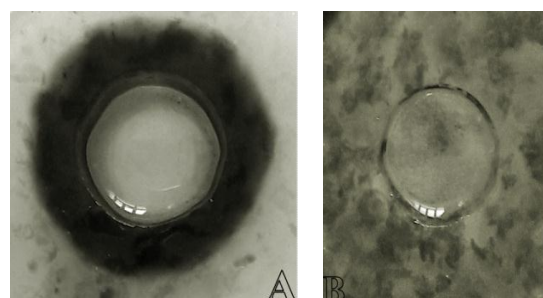
Phương pháp lây nhiễm nấm lên tuyến trùng (Alamgir, 2006): Nuôi nấm trên môi trường PDA, lắc trong 7 ngày ở 30°C, 200 vòng/phút. Thu dịch nuôi cấy, bổ sung 300 con tuyến trùng/5 ml dịch trong hộp chuyên dụng, giữ trong 96 giờ ở 30°C, kiểm tra số lượng tuyến trùng sau mỗi 24 giờ, mẫu đối chứng được thay dịch nuôi cấy nấm bằng nước cất. Làm tiêu bản nhuộm với Phloxin B và soi dưới kính hiển vi để xác định số lượng tuyến trùng chết bắt màu tím với thuốc nhuộm.

Phương pháp thu và đếm tuyến trùng [15]: Tuyến trùng được đếm và tính số lượng bằng đĩa đếm tuyến trùng (counting dish) và đồng hồ đếm (counting machine) dưới kính hiển vi soi nổi. Trong trường hợp mẫu có ít tuyến trùng (<1000) có thể đổ cả tuyến trùng vào đĩa để đếm. Sau khi lắc nhẹ cho dung dịch tuyến trùng dàn đều, có thể đếm toàn bộ tuyến trùng theo các dãy ô cho toàn bộ đĩa đếm hoặc có thể đếm đại diện một số ô hoặc dãy, sau đó tính trung bình 1 ô và nhân với tổng số ô trong đĩa. Trong trường hợp mẫu có quá nhiều tuyến trùng thì ta có thể pha loãng dung dịch tuyến trùng thành 50 ml, sau đó lấy 10 ml để đếm, lặp lại lần 2 như vậy, tính trung bình số lượng tuyến trùng trên 10 ml và nhân với 5.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khả năng sinh chitinase của *Paecilomyces sp. P1*

Nhằm định tính chitinase, chúng tôi nuôi cấy lắc P1 trên môi trường PDB (mục 2.1) có bổ sung chitin huyền phù 0,5%. Sau 96 h, dịch nuôi cấy được nhỏ trên đĩa thạch được nhuộm bằng Lugol 0,1%. Kết quả được trình bày ở hình 3.1.



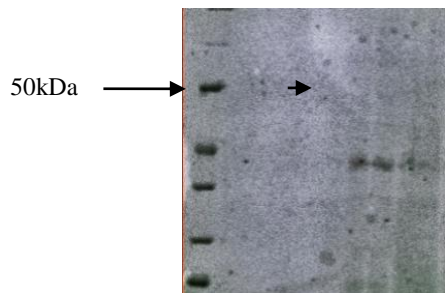
Hình 3.1. Khả năng sinh chitinase của *Paecilomyces sp. P1*.
(A: Thí nghiệm; B: Đối chứng)

Trên hình 3.1 cho thấy, P1 có khả năng sinh chitinase với vòng phân giải 12 mm trên môi trường có bổ sung chitinase 0,5% làm cơ chất cảm ứng, do vậy chitinase từ P1 là chitinase ngoại bào. Theo công bố của Perveen và Shahzad, 2013; Khan Alamgir và cs., 2003; Kopparapu và cs., 2012 [1, 4, 16], nghiên cứu hoạt tính chitinase từ các loài thuộc *Paecilomyces* và thử nghiệm tuyến trùng gây hại cây cà phê, cà chua ... cho thấy chúng có khả năng tiêu diệt tuyến trùng. Từ những kết quả này, *Paecilomyces* được ứng dụng trong kiểm soát sinh học bệnh thực vật. Với khả năng sinh chitinase ngoại bào của P1, chúng tôi tiếp tục tiến hành những nghiên cứu tiếp theo như tinh sạch chitinase, thử nghiệm khả năng diệt tuyến trùng...

3.2. Tinh sạch chitinase từ *Paecilomyces sp. P1*

Nuôi cấy thu nhận chitinase: Từ những kết quả nghiên cứu, tham khảo và lựa chọn môi

trường nuôi cấy, chúng tôi sử dụng môi trường PDA pH 7, thu nhận enzyme sau 96 h. Chitinase sinh ra từ *Paecilomyces* cũng như các chủng nấm sợi khác thường có độ tinh khiết không cao do tạp lẫn nhiều protein khác. Vì vậy, quá trình tinh sạch để thu được chitinase tinh khiết là cần thiết. Kết quả này phục vụ cho quá trình đánh giá các yếu tố ảnh hưởng tới hoạt tính enzyme và sử dụng chúng cho những ứng dụng trong thực tế.



Hình 3.2. Điện di SDS-PAGE của chitinase tinh sạch từ *Paecilomyces* P1.

Bảng 3.2. Kết quả tinh sạch chitinase từ chủng *Paecilomyces* sp. P1

Bước tinh sạch	Hàm lượng protein TS (mg)	Hoạt tính tổng số (U)	Hoạt độ riêng (U/mg)	Độ sạch (lần)	Hiệu suất (%)
Enzyme thô	0,76	47,6	62,63	1,0	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,065	5,53	85,08	1,35	11,6
DEAE-Sephadex A-50	0,006	0,8	133,3	2,1	1,68

Chitinase từ *Trichodesma harizanum* [14, 17] đã được tinh sạch bằng tủa muối (NH₄)₂SO₄ bão hòa, DEAE-Sephadex A-50, cho hoạt tính tương đương chitinase của nghiên cứu này (133,3 U/mg); nhưng lại thấp hơn *Lecanicillium lecanii* 43H 0,35 lần [18]; thấp hơn so với *Metarhizium anisopliae* gần 5 lần. Hiệu suất tinh sạch của nghiên cứu này là thấp nhất và thấp hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Hữu Quân và cộng sự là 0,3 lần. Đây cũng là bước đầu thành công bởi quá trình tinh sạch này còn chưa được nghiên cứu tối ưu các điều kiện.

Trên Hình 3.2 cho thấy: chitinase điện di cho băng có kích thước khoảng 46 kDa. Nghiên cứu của Chen, 2005, chitinase được tinh sạch có trọng lượng phân tử khoảng 23 kDa; theo nghiên cứu của Li, 2015, *P. lilacinus* có trọng

Sau khi khảo sát quá trình tinh sạch chitinase từ *Paecilomyces* sp. P1, tiến hành tinh sạch chitinase bằng (NH₄)₂SO₄ bão hòa 65%. Hoạt tính chitinase sau tinh sạch thu được 85,08 U/mg, độ sạch 1,35 lần và hiệu suất thu hồi đạt 11,6%. Chitinase sau thẩm tích loại muối được đưa qua cột DEAE – Sephadex A-50 và cuối cùng cho độ sạch 2,1 lần và hiệu suất thu hồi đạt 1,68 %. Enzyme tinh sạch này có hoạt tính 133,3 U/mg (Bảng 3.2), sản phẩm sau tinh sạch được xác định khối lượng phân tử bằng SDS-PAGE 12,5%. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.2.

lượng phân tử 45,8 kDa còn *Paecilomyces* sp. P1 được đưa vào nghiên cứu, chitinase có trọng lượng là khoảng 46 kDa. Theo nghiên cứu của Van Nam Nguyen, 2009 [19], *Paecilomyces* có trọng lượng là 32 kDa (Chi32) và 46 kDa (Chi46) và được xác định Chi32 là chitinase nội bào và Chi46 là chitinase ngoại bào. Từ các kết quả trên, chitinase từ *Paecilomyces* sp. P1 là chitinase ngoại bào và P1 cần được thử nghiệm khả năng diệt tuyến trùng.

3.3. Thử nghiệm khả năng diệt tuyến trùng của P1

Với mục đích thử nghiệm khả năng diệt tuyến trùng của *Paecilomyces* sp. P1, chúng tôi tiến hành theo phương pháp như mục 2.

Bảng 3.3. Kết quả khảo sát khả năng diệt tuyến trùng của dịch nuôi cấy *Paecilomyces* P1

STT	Tên chủng	Tỉ lệ tuyến trùng chết (%)				
		24 giờ	48 giờ	72 giờ	96 giờ	120 giờ
1	Đối chứng (không có nấm)	-	-	-	-	-
2	<i>Paecilomyces</i> sp. P1	-	10,81	30,7	58,5	58,5

Ghi chú: (-) Không tiêu diệt.

Kết quả bảng 3.3 cho thấy, chủng nấm P1 sau 72 h – 96 h thử nghiệm lượng tuyến trùng bấu rễ *Meloidogyne* sp. bị tiêu diệt là 58,5%.; thời gian từ 96 h đến 120 h do hoạt tính enzyme của dịch thử nghiệm giảm do vậy tỷ lệ tuyến trùng chết không tăng lên. Đối với *Paecilomyces* sp. là loại nấm ký sinh do đó hiệu quả thử nghiệm cho kết quả sau 72-96 h [4, 20], kết quả này cũng trùng với các công bố của Ajrami và cs., 2016 khi thử nghiệm *Paecilomyces lilacinus* với tuyến trùng *Meloidogyne javanica* gây bấu rễ cây Cà chua; ở 72 - 96 h diệt được 57% [21]. *Paecilomyces lilacinus* YES-2 và *P. chlamydosporia* HDZ-9 được chọn từ các thử nghiệm in vitro được bào chế trong các viên alginate và được đánh giá để kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne incognita* trên Cà chua trong nhà kính; Các viên *P. lilacinus* với tỷ lệ cao nhất (1,6%) làm giảm mật độ rễ 66,7%. Các viên *P. chlamydosporia* đã làm giảm 90% mật độ tuyến trùng cuối cùng; Chúng tỏ rằng, *P. lilacinus* và *P. chlamydosporia* dưới dạng bào chế có thể kiểm soát hiệu quả tuyến trùng *Meloidogyne* sp.

Ngoài ra, nghiên cứu của Perveen và Shahzad, sử dụng dịch thể nuôi cấy *P. lilacinus*; *P. variotii*; *P. fumosoroseus* ủ với ấu trùng của tuyến trùng *M. incognita*; sau 24, 48, 72 giờ đếm số lượng ấu trùng; Kết quả cho thấy sau 72 giờ khả năng diệt tuyến trùng với hiệu quả 75% [4].

Kết quả thử nghiệm tuyến trùng của P1 cho thấy: có thể sử dụng chủng nấm trên cho ứng dụng kiểm soát tuyến trùng bấu rễ hại cây trồng. Tuy nhiên, cần có nghiên cứu sâu hơn nhằm nâng cao hoạt tính và điều kiện nuôi cấy thích hợp.

4. Kết luận

Paecilomyces sp. P1 có khả năng sinh chitinase ngoại bào; Hoạt tính chitinase được xác định bằng phương pháp DNS và đo tại bước sóng 540 nm. Bằng việc sử dụng phương pháp tủa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa ở nồng độ 65%, sắc khí trao đổi ion DEAE A-50 và điện di SDS-PAGE nồng độ 12,5%; phân tử chitinase có trọng lượng gần 50 kDa, hoạt độ riêng 133,3 U/mg, độ tinh sạch gấp 2,1 lần so với ban đầu.

Bằng phương pháp thử nghiệm lây nhiễm tuyến trùng *Meloidogyne* sp. với dịch thể *Paecilomyces* sp. P1, hiệu suất đạt 58% trong vòng 96 giờ. Đây là kết quả nghiên cứu ban đầu, là cơ sở cho nghiên cứu chế phẩm diệt tuyến trùng sau này.

Tài liệu tham khảo

- [1] Khan Alamgir, Williams Keith, Mark P. Molloy, and Nevalainen Henlena, Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *Paecilomyces lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels, Protein Expression and Purification. 32 (2003) 210.
- [2] Khadijeh Abbasi, Doustmorad ZAFARI, Robert WICK., Evaluation of chitinase enzyme in fungal isolates obtained from golden potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* Zemdirbyste-Agriculture. 2 (2017) 179.
- [3] F. A. Zaki, D. S. Bhatti, Effect of castor (*Ricinus communis*) and the biocontrol fungus *Paecilomyces lilacinus* on *Meloidogyne javanica*, Nematologica. 36 (1980) 114.
- [4] Z. Perveen, S. Shahzad, A comparative study of the efficacy of *Paecilomyces* species against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Pakistan Journal of Nematology. 31 (2013) 125.

- [5] P.J.M. Bonants, P.F.L. Fitters, H. Thijs, E. den Belder, C. Waalwijk, J.W.D.M. Henfling. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne* hapla eggs, *Microbiology*. 141 (1995) 75.
- [6] D. Wharton., Nematode eggshells, *Parasitology*. 81 (1980) 447.
- [7] C.M Baratto, V. Dutra, J.T. Boldo, L.B. Leiria, MH Vainstein, A. Schrank Isolation, characterization and transcriptional analysis of the chitinase chi2 gene (DQ011663) from the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*., *Curr Microbiol*. 53 (2006) 217.
- [8] Van Nam Nguyen, Y.J Kim, K.T Oh, W.J. Jung, R. D Park , The antifungal activity of chitinases from *Trichoderma aureoviride* DY-59 and *Rhizopus microsporus* VS-9. *Curr. Microbiol*. 56 (2008) 28.
- [9] V. E Tikhonov, L.V Lopez-Llorca, J Salinas, H. B. Jansson . Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*, *Fungal Genet Biol*, 2002, 67.
- [10] R.J. Leger St , R.M. Cooper, A.K. Charnley, Characterization of chitinase and chitobiase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol*. 58 (1991) 415.
- [11] R.S. Patil, V. Ghormade, M.V. Desphande, Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb. Technol*. 26 (2002) 473.
- [12] J.L.D. Marco, M.C. Valadares-Inglis . Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis perniciosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 64 (2003) 70.
- [13] S. Leger, R.J. Joshi, R.J. Bidochka, D.W. Roberts. Characterization and ultrastructural localization of *Metarhizium anisopliae*, *M. xavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (Manduca sexta) cuticle. *Appl Environ Microbiol* 62 (1996) 907.
- [14] S.C Kang, S. Park, D.G Lee, Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhiziumanisopliae*. *J Invertebr Pathol*. 73 (1999) 276.
- [15] Nguyễn Ngọc Châu, Tuyển trùng thực vật và cơ sở phòng trừ, NXB Khoa học Kỹ thuật, Hà Nội, 2003.
- [16] Kopparapu Narasimha Kumar, Peng Zhou, Shuping Zhang, Qiaojuan Yan, Zhuqing Liu, Zhengqiang Jiang, Purification and characterization of a novel chitinase gene from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Escherichia coli*. *Carbohydrate Reseach*. 347 (2012) 155.
- [17] J. De la Cruz, A. Hidalgo-Gallego, J.M. Lora, T. Benitez, J.A. Pintor-Toro, A. Llobell , Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*., *Eur. J. Biochem*. 206 (1992) 859.
- [18] Nguyễn Hữu Quân, Vũ Văn Hạnh, Quyền Đình Thi, Phạm Thị Huyền, Tinh sạch và đánh giá tính chất lý hóa của chitinase từ nấm *Lecanicillium lecanii*, *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*. 1 (2013) 426.
- [19] Van Nam Nguyen, In-Jae Oh, Young-Ju Kim, Kil-Yong Kim, Young-Cheol Kim, Ro-Dong Par J Ind., Purification and characterization of chitinases from *Paecilomyces variotii* DG-3 parasitizing on *Meloidogyne incognita* eggs. (2009) 195
- [20] Methanee Homthong, Anchane Kubera, Matana Srihuttatagum, Vipa Hongtrakul, Isolation and characterization of chitinase from soil fungi, *Paecilomyces* sp. *Agriculture and Natural Resources*. 1 (2016) 50.
- [21] H. M. Hussein Al Ajrami., Evaluation the Effect of *Paecilomyces lilacinus* as a Biocontrol Agent of *Meloidogyne javanica* on Tomato in Gaza Strip, Faculty of science Master of Biological Sciences Microbiology, 2016.