# การสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสของเชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง

# Chitinase and Protease production from indigenous insecticidal Actinomycetes varieties

**เบญจวรรณ ศิริกุล[1] และ นริศ ท้าวจันทร์[1,2*]**

**Banjawan Sirikun[1] and Narit Thaochan[1,2*]**

**บทคัดย่อ**: การศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้จากดินบริเวณรอบรากต้นพืชในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ซึ่งมีคุณสมบัติฆ่าแมลงจำนวน 8 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 8 ไอโซเลท มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส โดยที่ระยะเวลา 7 วัน เชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสสูงสุด 3 อันดับแรก คือ ไอโซเลท PSUAc015 PSUAc009 และ PSUAc032 มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 3.45 ± 0.11, 3.21 ± 0.20 และ 3.07 ± 0.04 ตามลำดับ แตกต่างจากเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลทอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการสร้างเอนไซม์โปรติเอส พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 8 ไอโซเลท มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าดัชนีการสร้างเอนไซม์อยู่ระหว่าง 2.06 - 3.42 ที่ระยะเวลา 7 วัน
**คำสำคัญ**: เชื้อแอคติโนมัยซีส, ไคติเนส, โปรติเอส

**ABSTRACT**: Eight isolates of indigenous insecticidal actinomycetes bacteria from rhizosphere soil at Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla was studied of enzymatic productions. All isolated actinomycetes bacteria were tested the enzymatic production of chitinase and protease. At day seven after incubation, three isolates of actinomycetes bacteria (PSUAc15, PSUAc9 and PSUAc32) were produced high chitinase with enzymatic index 3.45 ± 0.11, 3.21 ± 0.20 and 3.07 ± 0.04, respectively, and high significantly different from other isolates. For the protease production, all isolates of actinomycetes bacteria showed similar of protease production with enzymatic index value ranged 2.06 - 3.42 at day seven after incubation.
**Keywords**: Actinomycetes, Chitinase, Proteaes

[1] ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand 90112

[2] ศูนย์ควบคุมศัตรูพืช โดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
Natural Biological Control Research Center, Southern Region, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand 90112

* Corresponding author: narit.t@psu.ac.th

## บทนำ

เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีส (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อรา พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งบริเวณดิน น้ำ กองปุ๋ยหมัก และมูลสัตว์ (Servin et al., 2008) เป็นกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่น่าสนใจสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช มีคุณสมบัติในการผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลงหลายชนิด มีรายงานเชื้อแอคติโนมัยซีสสกุล *Streptomyces tendae* สามารถสร้างสาร macrolide ยับยั้งการลอกคราบของแมลง และสร้างสาร nikkomycin ซึ่งส่งผลต่อการสังเคราะห์ไคตินของแมลง (Muller et al., 1981) พบการสร้างสาร milbemectin และ doramectin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ lactone ของเชื้อแอคติโนมัยซีสสกุล *S. avermitilis* มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงและไรศัตรูพืช (Wang et al., 2011) นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีสสามารถสร้างเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ xylanase, cellulase, amylase และ chitinase เป็นต้น (Dahiya, 2006) เนื่องจากแมลงมีผนังลำตัวเพื่อช่วยในการปกป้องอวัยวะต่างๆ ที่อยู่ภายในลำตัว ช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำของร่างกาย และแมลงทุกชนิดมีการลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่าง(metamorphosis) อย่างสมบูรณ์ โดยผนังชั้นนอกของแมลงหรือโครงสร้างภายนอก (exoskeleton) ประกอบด้วย สารพวกไคติน โปรตีน และไขมัน เป็นต้น (Leger et al.,1986) มีรายงานการศึกษาเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ที่เข้าทำลายหนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* พบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสที่ระดับ 2.91 U/ml และ 2.49 U/ml ตามลำดับ ส่งผลให้เกิดอัตราการตายมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (Nahar, 2004) การทดสอบเชื้อราโรคแมลง *Beauveria bassiana* เพื่อใช้ควบคุมผีเสื้อหนอนกะหล่ำใหญ่ *Pieris brassicae* พบว่าเชื้อราโรคแมลง *B. bassiana* MTCC 4495 สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสที่ระดับ 0.51 U/ml และ 1.12 U/ml ตามลำดับ ส่งผลให้เกิดอัตราการตายในแมลงเท่ากับ 88.66 เปอร์เซ็นต์ (Dhawan and Joshi, 2017) การทำงานของเอนไซม์พบว่าช่วยย่อยผนังลำตัวแมลง จึงเป็นปัจจัยซึ่งช่วยส่งเสริมให้เชื้อจุลินทรีย์มีศักยภาพในการฆ่าแมลงเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคตินและโปรตีนได้ ซึ่งสามารถย่อยผนังลำตัวแมลงก่อนที่จะใช้สารอาหารในตัวแมลงเพื่อการเจริญเติบโต การนำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง ซึ่งได้รับการคัดเลือกจากงานวิจัยการคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง (เบญจวรรณ และนริศ, 2560) มาศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ สำหรับเป็นข้อมูลสนับสนุนและแสดงถึงคุณสมบัติในการฆ่าแมลงของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่ได้รับการคัดเลือก ว่ามีบทบาทของเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส ช่วยส่งเสริมกลไกการฆ่าแมลงร่วมด้วยหรือไม่ อีกทั้งเพื่อประโยชน์ในการนำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลงไปศึกษาเพิ่มเติมและประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูทางการเกษตรและเป็นแนวทางสำหรับลดการใช้สารเคมี

## วิธีการศึกษา

### การเตรียมเชื้อแอคติโนมัยซีส

นำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลงซึ่งได้รับการคัดเลือกจากงานวิจัยการคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง (เบญจวรรณ และนริศ, 2560) มาศึกษาคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์โปรติเอส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) กรรมวิธีทดสอบประกอบด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีสจำนวน 8 ไอโซเลท และชุดควบคุม เลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีสในอาหารเทียม Glucose Yeast Malt extract Agar (GYMA) แล้วนำไปบ่มไว้ที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดเป็นเวลา 10 วัน หรือจนกว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสสร้างสปอร์เพื่อเตรียมทดสอบ

**การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลงในสภาพห้องปฏิบัติการ**

**การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนส (Chitinase)**

เตรียมอาหารเทียม GYMA + colloidal chitin 1% และเติมสาร bromocresol purple 0.015% (Agrawal and Kotasthane, 2009) เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนส นำเชื้อแอคติโนมัยซีส ที่เลี้ยงในจานอาหาร GYMA อายุ 10 วัน เจาะด้วย cock borer ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร ย้ายลงตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหารสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนส โดยมีอาหาร GYMA เป็นชุดควบคุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด สำหรับการวัดการสร้างเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อแอคติโนมัยซีส หากเชื้อแอคติโนมัยซีสสามารถสร้างเอนไซม์ ไคติเนสเพื่อย่อยไคตินได้จะเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีม่วงรอบโคโลนี (Agrawal and Kotasthane, 2009) สังเกตและบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและวงสีม่วงรอบโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากการบ่มเชื้อที่ 3, 5 และ 7 วัน

**การทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส (Protease)**

เตรียมอาหารเทียม GYMA + skim milk 3% เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส เตรียมเชื้อแอคติโนมัยซีส ที่เลี้ยงบนจานอาหาร GYMA อายุ 10 วัน เจาะด้วย cock borer ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 มิลลิเมตร ย้ายลงตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหารสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส โดยมีอาหาร GYMA เป็นชุดควบคุม บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28.0 ± 2.0 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด สำหรับการวัดการสร้างเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อแอคติโนมัยซีส สามารถสังเกตวงใสจากการย่อยของ skim milk บนจานอาหาร (Nadeem et al., 2010) โดยนำจานอาหารที่มีการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีส ที่อายุ 3, 5 และ 7 วัน วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและวงใสรอบโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

**การวิเคราะห์ผลการทดลอง**

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ดัชนีเอนไซม์ (enzymatic index) (Florencio et al., 2012) นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์โดยวิธี Tukey's HSD test โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 17.0 (SPSS, 2007)

## ผลการศึกษา

**ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลงในสภาพห้องปฏิบัติการ**

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนส ที่ระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน (Table 1) เชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 8 ไอโซเลท ได้แก่ PSUAc001, PSUAc009, PSUAc014, PSUAc015, PSUAc016, PSUAc017, PSUAc032 และ PSUAc034 (Figure 1) มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนส ที่ระยะเวลา 7 วัน เชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลท PSUAc015 เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีม่วงรอบโคโลนีมากที่สุด โดยมีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 3.45 ± 0.11 รองลงมาคือ ไอโซเลท PSUAc009 PSUAc032 และPSUAc014 มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 3.21 ± 0.20, 3.07 ± 0.04 และ 2.93 ± 0.11 ตามลำดับ (Figure 2) ไอโซเลท PSUAc016 มีการสร้างเอนไซม์ได้ช้ากว่าไอโซเลทอื่นๆ พบกิจกรรมของเอนไซม์ในวันที่ 7 แตกต่างจากเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลทอื่นๆ และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F = 4.47$, $P < 0.01$)

การทดสอบเอนไซม์โปรติเอส ที่ระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน (Table 2) เชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 8 ไอโซเลท มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส โดยทั้ง 8 ไอโซเลท ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระยะเวลา 7 วัน เชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลท PSUAc034 สร้างวงใสมากที่สุด มีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 3.42 ± 0.15 รองลงมาคือ ไอโซเลท PSUAc001, PSUAc009, PSUAc014 และมีค่าดัชนีเอนไซม์เท่ากับ 2.96 ± 0.08, 2.91 ± 0.33 และ 2.66 ± 0.32 ตามลำดับ (**Figure 3**)

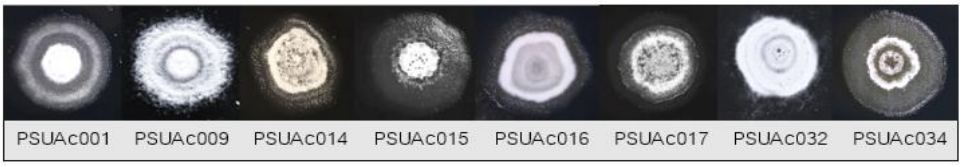


**Figure 1** Colonial morphology of eight Actinomycetes isolates on GYMA plate and incubated at 28ºC for 10 days, and these isolates were used for enzymatic production of chitinase and protease.

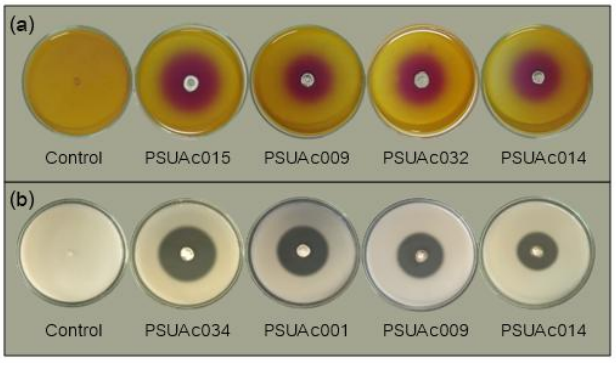


**Figure 2.** Chitinase (a) and protease (b) production by some Actinomycetes bacteria on GYMA + colloidal chitin 1% and GYMA + skim milk 3% shown by clear zone (halo) around the colony.

## วิจารณ์

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลงในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ได้มาจากการคัดเลือกคุณสมบัติในการฆ่าแมลงเบื้องต้น (เบญจวรรณ และนริศ, 2560) มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีส จากการทดสอบความสามารถในการผลิต เอนไซม์ไคติเนสของเชื้อ *S. exfoliatus* MT9 บน อาหารแข็งที่ผสม colloidal chitin พบว่า *S. exfoliatus* MT9 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส โดยใช้ไคตินเป็นแหล่งพลังงาน (Choudhary et al., 2015) จากการทดสอบเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อแอคติโนมัยซีส 38 ไอโซเลท พบ 3 ไอโซเลท ได้แก่ *Actinoplanes philippinensis, A. missouriensis* และ *S. clavuligerus* ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ในปริมาณสูง ส่งผลให้แมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* เกิดความผิดปกติในระยะดักแด้และมีอัตราการรอดชีวิตลดลง (Gadelhak et al., 2005) นอกเหนือจากเอนไซม์ไคติเนสแล้วเชื้อแอคติโนมัยซีสสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งส่งผลต่อการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวแมลง และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของแมลงหรือสิ่งมีชีวิตที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ โดยเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *S. griseolus* ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในระยะไข่ของพยาธิใบไม้ตับ (El-Gammal et al., 2014) อีกทั้งมีการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลง โดยมีการนำใช้ประโยชน์เป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่มีศักยภาพทดแทนการใช้สารเคมี ได้แก่ *S. griseus*, *S. rimosus* และ *S. thermovulgari* (Harrison and Bonning, 2010) จากการศึกษาคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์สามารถนำเชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงและสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสได้ไปประยุกต์และศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป

**Table 1** Enzymatic index of chitinase (mean ± SE) of eight Actinomycetes isolates

| Isolate | Enzymatic index (day)[1/] | | |
|---|---|---|---|
| | 3 | 5 | 7 |
| PSUAc001 | 1.30 ± 0.14b | 1.69 ± 0.10b | 2.80 ± 0.09abc |
| PSUAc009 | 1.61 ± 0.07ab | 2.04 ± 0.11ab | 3.21 ± 0.20ab |
| PSUAc014 | 1.34 ± 0.05ab | 1.97 ± 0.09ab | 2.93 ± 0.11abc |
| PSUAc015 | 1.27 ± 0.06b | 2.26 ± 0.12a | 3.45 ± 0.11a |
| PSUAc016 | 0.00 ± 0.00c | 0.00 ± 0.00c | 2.59 ± 0.26bc |
| PSUAc017 | 1.35 ± 0.04ab | 1.79 ± 0.11ab | 2.45 ± 0.16c |
| PSUAc032 | 1.71 ± 0.08a | 1.97 ± 0.10ab | 3.07 ± 0.04abc |
| PSUAc034 | 1.46 ± 0.11ab | 1.76 ± 0.17ab | 2.87 ± 0.14abc |
| *F* value | 43.78 | 41.40 | 4.47 |

[1/]There were three replicates per treatment mean within columns with different letter are significantly different according to the Tukey's HSD test ($P < 0.01$).

**Table 2** Enzymatic index of protease (mean ± SE) of eight Actinomycetes isolates

| Isolate | Enzymatic index (day)[1/] | | |
|---|---|---|---|
| | 3 | 5 | 7 |
| PSUAc001 | 1.89 ± 0.10a | 2.74 ± 0.05a | 2.96 ± 0.08a |
| PSUAc009 | 2.36 ± 0.36a | 2.82 ± 0.26a | 2.91 ± 0.33a |
| PSUAc014 | 1.39 ± 0.01a | 2.22 ± 0.02a | 2.66 ± 0.32a |
| PSUAc015 | 2.04 ± 0.46a | 2.56 ± 0.31a | 2.49 ± 0.29a |
| PSUAc016 | 1.62 ± 0.27a | 2.25 ± 0.55a | 2.18 ± 0.61a |
| PSUAc017 | 1.43 ± 0.03a | 2.07 ± 0.09a | 2.06 ± 0.32a |
| PSUAc032 | 1.79 ± 0.33a | 2.52 ± 0.29a | 2.49 ± 0.27a |
| PSUAc034 | 2.47 ± 0.29a | 3.16 ± 0.21a | 3.42 ± 0.15a |
| *F* value | 2.05 | 1.75 | 1.82 |

[1/]There were three replicates per treatment mean within columns with different letter are significantly different according to the Tukey's HSD test ($P < 0.01$).

## สรุป

เชื้อแอคติโนมัยซีสที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสได้ โดยเชื้อแอคติโนมัยซีสไอโซเลท PSUAc015 มีค่าดัชนีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสมากที่สุด ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีสทั้ง 8 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ใกล้เคียงกัน

## คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการจัดการศัตรูพืชและสรีรวิทยาของพืช, ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช, ศูนย์ควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้, สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 คณะทรัพยากรธรรมชาติ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัย อุปกรณ์ และสถานที่สำหรับการดำเนินงานวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

เบญจวรรณ ศิริกุล และ นริศ ท้าวจันทร์. 2560. การคัดกรองเชื้อแอคติโนมัยซีสสายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง. แก่นเกษตร. 45 (ฉบับพิเศษ 1): 1366-1371.

Agrawal, T. and A.S. Kotasthane. 2009. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. SpringerPlus. 1: 73.

Choudhary, B., A. Nagpure, and R.K. Gupta. 2015. Antagonist *Streptomyces exfoliatus* MT9 as biocontrol agent against fruit-rotting fungi. J. Biotechnol. Biomater. 5: 2.

Dahiya, N., R. Tawari, and G.H. Sigh. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71: 773-782.

Dhawan, M., and N., Joshi. 2017. Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae* LINN. Braz J Microbiol. 48(3): 522-529.

El-Gammal, E. W., H.A. Shalaby, H. M. Ashry, and A.I. El-Diwany. 2014. In vitro action of *Streptomyces griseolus* proteases as bio-control on *Fasciola gigantic* eggs. J. Bacteriol. Parasitol. 5: 1000192. doi:10.4172/2155-9597.1000192.

Florencio, G., S. Couri and C.S. Farinas, 2012. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by Trichoderma strains. Enz. Res. 10.1155/2012/793708, pp: 7.

Gadelhak, G.G., K.A. El-tarabily, and F.K. Al-kaabi. 2005. Insect control using chitinolytic soil Actinomycetes as bio- control agents. Int. J. Agri. Biol. 627-633.

Harrison, R.L., and B.C. Bonning. 2010. Proteases as insecticidal agents. Toxins (Basel). 2: 935-953.

Leger, R.J. St., A.K. Charnley, and R.M., Cooper. 1986. Enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. J. Invert. Pathol. 47: 295-302.

Muller, H., R. Further, H. Zahner, and D.M. Rast. 1981. Effect of nikkomycin Z, nikkomycin X and polyoxin A on chitosomal chitin synthetase. Arch. Microbiol. 13: 195-197.

Nadeem, M., J.I. Qazi, and S. Baig. 2010. Enhanced production of alkaline protease by a mutant of *Bacillus licheniformis* N-2 for dehairing. Braz. Arch. Biol. Technol. v.53 n. 5: pp. 1015-1025.

Nahar, P.B. 2004. Development of biocontrol agents for the control of pests in agriculture using chitin metabolism as target. Ph.D. Thesis. Pune University. India.

Servin, J.A., C.W. Herbold, R.G. Skophammer, and J.A. Lake. 2008. Evidence excluding the root of the tree of life from the actinobacteria. Mol. Biol. Evol. 25 (1): 1-4.

SPSS. 2007. SPSS for Windows 16. SPSS Inc., Chicago, IL, USA. Available: http://www.spss.com. Accessed Aug. 19, 2017.

Wang, X.J., J. Zhang, J.D. Wang, S.X. Huang, Y.H. Chen, C.X. Liu, and W.S. Xiang. 2011. Four new doramectin congeners with acaricidal and insecticidal activity from *Streptomyces avermitilis* NEAU1069. Chem. Biodiver. 8(11): 2117-2125.