งานวิจัยนี้อธิบายเกี่ยวกับการโคลนยีนไคติเนส เอ ของแบคทีเรีย *Vibrio carchariae* ขนาด 1.7 กิโลเบส เข้าไปในพลาสมิด pQE60 แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pQE60-mChiA เข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ M15 พบว่าแบคทีเรียเจ้าบ้านสามารถผลิตโปรตีนขนาด 63 กิโลดาลตัน ปริมาณมากเมื่อทำการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนด้วย 0.5 mM IPTG ที่อุณหภูมิ 25^{o} ซ เป็นเวลา 5-8 ชั่วโมง หลังจากการทำบริสุทธิ์โดยวิธี Ni^{2+} NTA agarose chromatography เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS/PAGE พบแถบโปรตีนเดียวมีขนาด 63 กิโลดาลตันตามที่คาดไว้ ผลการวิเคราะห์มวลของเพปไทด์ที่ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินด้วย MALDI-TOF MS และ ESI MS แสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้คือไคติเนส เอ การศึกษาการสลายสับสเตรทโดยเทคนิค HPLC MS พบว่าไคติเนส เอ มีลักษณะเป็นเอนโดไคติเนสที่สลายสายไคตินให้ผลิตผลเป็นไคโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์สายสั้น ๆ และผลิตผลสุดท้ายคือไคโตไบโอส ($GlcNAc_2$) เมื่อทำปฏิกิริยาการสลายที่เวลาสั้น ๆ พบว่าอะโนเมอร์หลักของน้ำตาลผลิตผลมีลักษณะเป็นบีต้าอะโนเมอร์ซึ่งบ่งบอกว่าไคติเนสสลายสับสเตรทโดยกลไกแบบ 'retaining mechanism' การศึกษาทางจลนพลศาสตร์พบว่าเอนไซม์มีความชอบสูงสุดกับน้ำตาลหกหน่วย ดังนั้นบริเวณจับกับสับสเตรทของเอนไซม์น่าจะประกอบด้วยหกบริเวณย่อย ผลของการกลายพันธุ์ให้ข้อมูลว่า Glu315 มีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา และการเปลี่ยน Asp392 ให้เป็น Asn ทำให้ไคติเนสสามารถเร่งปฏิกิริยา transglycosylation ได้ดีขึ้น การศึกษาการตกผลึกโดยวิธี hanging drop vapor diffusion พบผลึกไคติเนสในสภาวะที่มี 10%(v/v) PEG4000 ใน 0.1 M sodium acetate, pH 4.6 และ 0.125 M $CaCl_2$ การวิเคราะห์ข้อมูลทาง crystallography เบื้องต้นพบว่าผลึกไคติเนสมี space group เป็นแบบ tetragonal *P*422 ประกอบด้วยสองโมเลกุลต่อ asymmetric unit และให้ค่า resolution สูงสุดเป็น 2.14 Å

This research describes cloning of a 1.7-kB chitinase A from *Vibrio carchariae* into the plasmid pQE60. When the recombinant plasmid pQE-mchiA was transformed into bacterial host cells *E. coli* strain M15, chitinase A of 63 kDa was highly expressed under the protein-induced condition containing 0.5 mM IPTG at 25^{O}C for 5- 8 hours. After protein purification using Ni^{2+} NTA affinity chromatography, the protein was subjected of SDS/PAGE analysis, in which a single band of expected size of 63 kDa was detected. Tryptic peptide mass analysis by MALDI-TOF and ESI MS demonstrated that the obtained recombinant protein was chitinase A. A study of substrate hydrolysis using HPLC-MS suggested that the enzyme acts as an endochitinase by cleaving a chitin chain into small chitooligosaccharide fragments and produced chitobiose ($GlcNAc_2$) as the end product. When hydrolytic reactions were carried out at initial time, the beta anomer was found to be the major product, indicating that *V. carchairae* chitinase catalyzes the reaction through 'the retaining mechanism'. A kinetic study showed that chitinase A has highest affinity towards hexaNAG, which implied that the substrate binding site of the enzyme may comprise six binding subsites. Data obtained from point mutations revealed that the residue Glu315 is essential for catalysis and a substitution of Asp392 to Asn resulted in improve in the transglycosylation activity of the enzyme. Protein crystallization using the hanging drop vapor diffusion method was tried and a single crystal of chitinase was observed under the condition containing 10% (v/v) PEG4000 in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.6 and 0.125 M $CaCl_2$. Initial crystallographic data analysis suggested that the chitinase crystal has a tetragonal space group *P*422, contained two molecules per asymmetric unit and gave highest resolution of 2.4 Å.