

과량 생산된 대장균 chitin 분해효소의 정제 및 특성 조사

황희영 · 김우연*

중앙대학교 산업과학대학 생명공학과

(2003년 6월 3일 접수, 2003년 7월 4일 수리)

실험실 배양 조건에서는 발현되지 않는 대장균 K-12의 endochitinase 유전자(*yheB*)를 PCR로 증폭하여 pET28c와 pQE9 벡터에 각각 클로닝 하였다. *yheB* 유전자를 가진 pET28c와 pQE9 벡터를 함유한 대장균에서 생산된 endochitinase는 성장배지 내로 일부 분비되었다. 과량 생산된 endochitinase를 His-affinity 크로마토그래피와 DE-52 크로마토그래피로 부분 정제하였으며 SDS-PAGE에 의한 단백질의 분자량은 약 97,000 이었다. 정제된 효소의 최적 pH는 6이었으며 최적 온도는 40°C이었다.

Key words: 대장균 chitin 분해효소, 발현, 정제, 특성

서 론

자연계에 존재하는 생체고분자물질 중 cellulose 다음으로 많이 존재하는 chitin은 β-1,4 결합으로 연결된 N-acetylglucosamine의 중합체이다. Chitin은 곰팡이, 갑각류와 곤충의 외골격 주요 구성성분이지만 고등진핵생물에서는 발견되지 않는다.¹⁾ 많은 미생물들이 이 고분자물질을 탄소원으로서 사용한다.²⁾ Chitin을 분해하는 chitinase(EC 3.2.1.14)는 식물, 곰팡이, 척추동물, 박테리아 등과 같이 여러 생물에서 발견되며, 자연계에서의 이 효소 역할은 다양하다.³⁾ *Streptomyces*⁴⁾나 *Bacillus*⁵⁾와 같은 그람양성 박테리아의 chitinase는 토양 생태계에서 chitin을 순환시키는 중요한 역할을 하는 세포표면 단백질이다. *Serratia*,⁶⁾ *Aeromonas*⁷⁾와 *Vibrio*⁸⁾ 같은 그람음성 박테리아의 endochitinase는 불용성 생체고분자물질을 탄소원으로 이용하기 위해 분비된다. 한편 식물은 곰팡이의 감염으로부터 자신을 보호하기 위해 이 효소를 생산하는 것으로 밝혀졌다.⁹⁾

Chitinase의 분비는 *Vibrio cholerae*에서 잘 연구되었는데, *Vibrio*의 endochitinase는 Sec translocase와 Eps secretion 시스템을 지닌 general secretory pathway(GSP)를 통하여 분비되는 것으로 알려졌다.²⁾ 대장균에는 다른 박테리아들의 분비시스템들을 암호화하는 유전자들과 유사성이 있는 유전자군(*gsp*)이 존재하지만, 통상적인 실험실 배양 조건에서는 대장균 *gsp* 유전자들은 발현되지 않으며 생성 단백질이 분비되지 못한다.¹⁰⁻¹²⁾ 하지만 Francetic 등의 연구에 의하면 type II 분비에 관련된 *gsp* 유전자들이 클로닝된 플라스미드로 형질전환 시킨 *hms* mutant(히스톤 유사 단백질 H-NS 유전자가 mutation된 균주)를, endochitinase 유전자(*yheB*)가 함유된 플라스미드로 다시 형질전환 시키면, 생성된 endochitinase 단백질이 분비되는 것이 관찰되었다.^{13,14)} *Escherichia coli* K-12의 경우 비록 chitin이 풍부한 환경에서의 생장이나 chitin 대사에 대해서는 알려져 있지

않지만, 상기의 결과는 대장균이 chitin 및 chitin 유사물질 분해 과정에 관여할 가능성을 제시하고 있다.

대장균에서 endochitinase 활성을 지닌 단백질의 발현이 보고되었지만,^{13,14)} 이 효소의 특성은 아직 연구되어있지 않아, 본 실험에서는 *E. coli* K-12 endochitinase를 암호화하는 유전자를 클로닝하고 발현한 후, 정제하여 그 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

대장균 균주와 플라스미드. Endochitinase 유전자(*yheB*)의 클로닝과 발현을 위해 사용된 대장균 균주는 K-12인 MG1655, BL21(DE3)(Novagen, Madison, USA)와 XL1-BlueMRF(Stratagene, La Jolla, USA)이었고, Novagen과 Qiagen(Valencia, USA)에서 각각 구입한 pET28c와 pQE9 플라스미드가 사용되었다. Endochitinase 유전자를 가지는 플라스미드로 형질 전환된 대장균의 선별을 위해서 pET28c와 pQE9 경우에, 각각 kanamycin(50 µg/ml)과 ampicillin(100 µg/ml)을 사용하였다.

Endochitinase 유전자 클로닝. 대장균 endochitinase 유전자(*yheB*)는 대장균 MG1655의 염색체 DNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 증폭하였다. *yheB* 유전자 증폭에 사용된 primer들은 아래와 같다.

yheB1-1: 5'-GCCGGATCCTTTTACGTCACAAGGGATT-3'
yheB2: 5'-CCGAAGCTTTTATTGCTTAGTAAACGGCG-3'
yheB-pQE: 5'-GCCGGATCCGTTTACGTCACAAGGGAT-3'

pET28c에 클로닝하기 위해서는 primer로 yheB1-1과 yheB2를, pQE9의 경우는 yheB-pQE와 yheB2를 사용하였다. 증폭된 두 PCR 산물들을 제한효소 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단한 후 동일 효소들로 절단한 pET28c와 pQE9 벡터와 봉합반응하여 클로닝 하였으며 재조합 벡터를 각각 pET-yheB, pQE-yheB로 명명하였다.

Ethylene glycol chitin agar plate의 제조. Ethylene glycol chitin(EGC)이 포함된 LB agar 배지는 EGC 용액(10 mg/ml) 600 µl, 1% Trypan Blue 용액 160 µl, 액상(56°C) LB agar

*연락처

Phone: 82-31-675-3063; Fax: 82-31-675-0405
E-mail: wykim@cau.ac.kr

16 ml를 각각 혼합하여 제조하였다.¹⁵⁾ Endochitinase를 생산하는 균주와 정제하는 과정 중에 나오는 endochitinase 시료들의 효소활성을 EGC agar plate에서 확인하였다.

Endochitinase의 발현 및 전기영동 gel에서의 확인. pQE-yheB 플라스미드로 XL1-BlueMRF⁺ 균주를 형질전환 시켰고, 1 mM IPTG가 포함된 EGC agar plate에서 37°C에서 배양하여 chitin분해 활성을 지닌 콜로니를 확인하였다. 얻어진 재조합 플라스미드 중 pET-yheB의 경우는 XL1-BlueMRF⁺ 균주에서 다시 BL21(DE3) 균주에 형질전환 시킨 후, EGC agar plate에서 역가를 확인하였다. 두 균주에서 생성된 단백질들은 SDS-PAGE¹⁶⁾를 수행하여 확인하였다.

과량 생산된 E. coli endochitinase의 정제. pET-yheB 플라스미드를 지니는 BL21(DE3)을 kanamycin 50 µg/ml를 함유하는 LB배지 100 ml에 접종하여 600 nm에서 흡광도 0.6에 도달할 때까지 키운 다음, isopropyl-β-D-thiogalactoside(IPTG)를 최종 농도가 1 mM이 되게 첨가하고 추가로 4시간 더 배양하였다. 배양액을 Beckman J2-MC 원심분리기(Palo Alto, USA)에서 JA-14 rotor를 이용하여 4°C에서 5,000×g로 5분간 원심분리하였다. 이렇게 얻은 균체를 His-affinity column용 1× lysis buffer(50 mM sodium phosphate, 300 mM sodium chloride, 10 mM imidazole, 1 mM PMSF, pH 8.0) 4 ml에 다시 녹인 후 Qiagen 회사에서 제시하는 방법에 의해 단백질을 정제하였다. 100 ml TN buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM β-mercaptoethanol)를 미리 통과시킨 25 ml의 DE-52 column(Whatman, Kent, UK)에, 염 및 imidazole 등을 투석으로 제거한 상기의 정제 peak 분획을 통과시키고 TN buffer로 세척한 후 0에서 1 M로 NaCl 농도를 증가시키면서 endochitinase를 정제하였다.

Endochitinase의 역가 측정. Endochitinase 역가는 Tronsmo (1993)의 방법에 의거하여 측정하였다.¹⁷⁾ 시료 10 µl에 6 µl의 기질용액(1 ml의 50 mM Britton-Robinson buffer)¹⁸⁾에 용해한 250 µg p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-N',N'',N'''-triacetylchitotriose)을 넣고 혼합한 후 5시간 반응하였으며 1 ml 0.4 M Na₂CO₃을 첨가하여 반응을 멈추었다. p-nitrophenol의 양을 나타내는 405 nm에서의 흡광도 증가를 기준으로 하여 효소 역가를 측정하였다.

결과 및 고찰

대장균 내에서 yheB 유전자의 과발현. 대장균의 yheB 유전자를 pET28c와 pQE9 플라스미드의 BamHI과 HindIII 자리에 클로닝하였다. 재조합 플라스미드를 BamHI과 HindIII로 절단한 후 1% agarose gel에서 전기영동하여 endochitinase가 클로닝 되었음을 확인하였다. 다른 박테리아 chitinase¹⁹⁾와 같이 대장균 endochitinase는 lysozyme 역가를 가지며 ethylene glycol chitin도 분해하는 것으로 알려졌다기 때문에,¹³⁾ 클로닝된 yheB 유전자를 가지는 플라스미드를 함유하는 대장균 균주의 yheB 유전자 발현을 EGC 고체배지 주위를 투명하게 녹이는 endochitinase의 역가에 기준하여 조사하였다. Fig. 1의 콜로니 1, 3과 비교하여 yheB 유전자가 삽입된 pET28c를 함유한

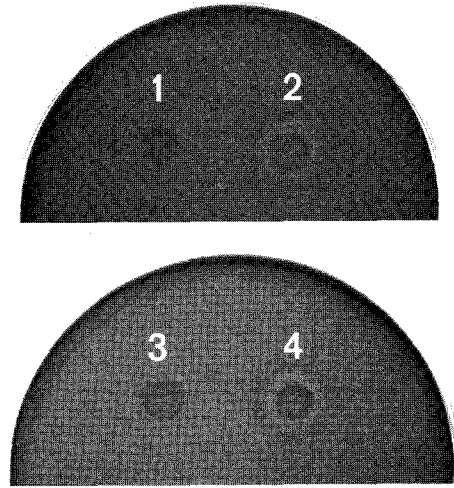


Fig. 1. Clear zone formation on the agar plate containing ethylene glycol chitin by cells harboring the plasmid containing the endochitinase gene. 1, BL21(DE3) harboring pET28c; 2, BL21(DE3) harboring pET28c containing the endochitinase gene (*yheB*); 3, XL1-BlueMRF⁺ harboring pQE9; 4, XL1-BlueMRF⁺ harboring pQE9 containing the endochitinase gene.

BL21(DE3)인 콜로니 2와 동일 유전자가 삽입된 pQE9을 함유한 XL1-BlueMRF⁺인 콜로니 4에서는 뚜렷한 투명환이 관찰되어 EGC를 용해하는 endochitinase가 발현됨을 알 수 있었다.

단백질 발현과 정제 시, pET28c는 His-affinity column chromatography를 사용할 수 있는 His-tag을 발현 단백질의 N-말단부위에 지니고 있고, T7 promoter로 단백질을 과량 생산하는 장점을 갖고 있다. 반면 pQE9 플라스미드는 T7 promoter보다는 약한 T5 promoter를 지니지만 대장균 RNA polymerase가 이용된다는 장점을 가진다. *yheB* 유전자를 발현하기 위해 재조합 플라스미드인 pET-yheB와 pQE-yheB로 각각 형질전환 시킨 BL21(DE3)와 XL1-BlueMRF⁺를 배양하였으며 각 세포와 상등액을 Laemmli buffer에서 변성시킨 후, 12% SDS-PAGE로 확인한 결과, 특히 pET-yheB 벡터를 가진 BL21(DE3)의 경우에 분자량 약 97,000에서 과량의 단백질이 확인되었다(Fig. 2, lane 4). 이는 pQE9 벡터 시스템에서보다 pET 벡터 시스템에서 endochitinase 발현 정도가 강함을 나타낸다. Fig. 3에서 보듯이 재조합 벡터가 들어있지 않는 대장균들의 배양액에서는 투명환이 보이지 않았지만(1, 3), *yheB*가 포함된 벡터가 들어있는 균주의 배양액에서는 뚜렷한 투명환이 관찰되었다(2, 4). 이는 균주 내에서 생산된 endochitinase가 밖으로 분비된다는 것을 의미한다. 그러나 Fig. 2의 전기영동 gel(lane 5, 9)을 보면 pET-yheB와 pQE-yheB 벡터를 가진 균주 배양 상등액의 Coomassie 염색 gel에서는 endochitinase 단백질 band가 거의 보이지 않아, 분비되는 단백질의 양이 매우 적음을 알 수 있었다. 특이한 점은 pET 발현 시스템에서 endochitinase가 훨씬 많이 발현됨에도 불구하고 분비되는 효소의 역가는 Fig. 3에서 보여주듯이 pET 벡터 시스템과 pQE 벡터 시스템에서 그 정도의 큰 차이를 나타내지 않았다.

과량 생산된 endochitinase의 정제 및 특성 조사. 과량생산된 endochitinase는 His-affinity 크로마토그래피와 음이온교환 크

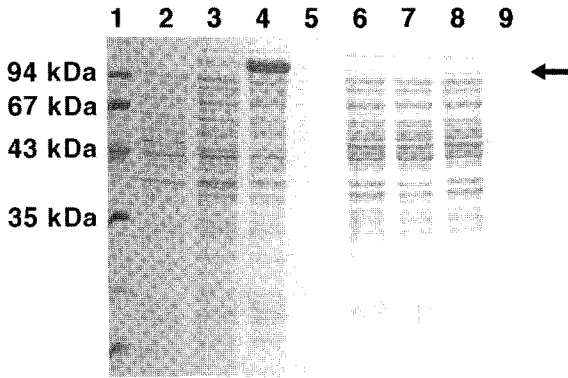


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the endochitinase produced in *E. coli*. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, crude extract of BL21(DE3) harboring pET28c; lanes 3 and 4, crude extracts of BL21(DE3) harboring pET28c containing endochitinase gene before and after induction with IPTG; lane 5, culture broth of BL21(DE3) harboring pET28c containing the endochitinase gene after induction; lane 6, crude extract of XL1-BlueMRF' harboring pQE9; lanes 7 and 8, crude extracts of XL1-BlueMRF' harboring pQE9 containing the endochitinase gene before and after induction with IPTG, lane 9, culture broth of XL1-BlueMRF' harboring pQE9 containing the endochitinase gene after induction.

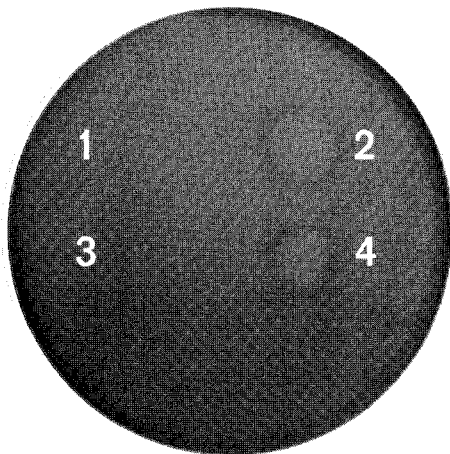


Fig. 3. Clear zone formation on the agar plate containing ethylene glycol chitin by culture broth of the cells harboring the plasmid containing the endochitinase gene. 1, Culture broth of BL21(DE3) harboring pET28c; 2, culture broth of BL21(DE3) harboring pET28c containing the endochitinase gene (*yeB*); 3, culture broth of XL1-BlueMRF' harboring pQE9; 4, culture broth of XL1-BlueMRF' harboring pQE9 containing the endochitinase gene.

로마토그래피 과정을 통해 정제되었다. His-tag 재조합 endochitinase 단백질은 Ni-NTA agarose에서 정제되었으며 endochitinase 단백질이 포함된 분획들은 SDS-PAGE로 확인하였다. 이어서 endochitinase 역가가 확인된 peak 분획들을 모아서 염을 제거한 후 DE-52 column을 이용하여 정제하였다. Fig. 4의 lane 5와 6에서 보여주듯이 분자량 약 97,000인 endochitinase가 부분적으로 정제되었으며 정제된 단백질 분획들은 EGC agar plate에서 효소 활성을 보였다.

부분 정제된 endochitinase의 특성을 조사하기 위하여 *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-*N*,*N'*,*N''*-triacetylchitotriose를 기질로

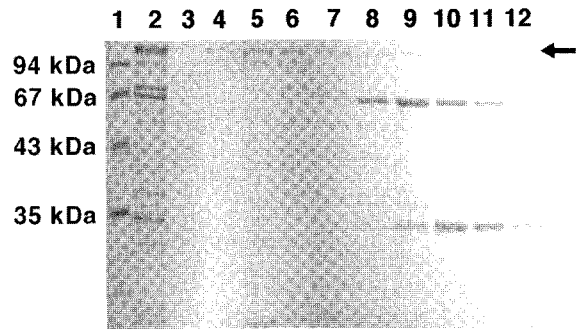


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the endochitinase resolved by chromatography on DE-52. 1, Molecular weight markers; 2, Ni-NTA agarose peak; 3, flow-through; 4-12, fractions from DE-52. Arrow indicates the partially purified endochitinase.

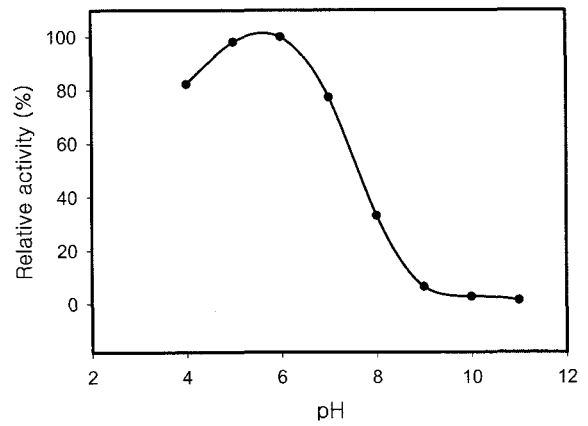


Fig. 5. Effect of pH on the activity of the purified endochitinase of *E. coli*. Endochitinase solution was incubated at 40°C for 5 hr in 50 mM Britton-Robinson buffer containing *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-*N*,*N'*,*N''*-triacetylchitotriose.

사용하여 최적 pH와 최적 온도를 결정하였다. Fig. 5와 6이 보여주듯이 endochitinase의 최적 pH는 6.0으로 조사되었고 최적 온도는 40°C로 밝혀졌다. *Pseudomonas*²⁰⁾와 *Clostridium paraputrificum*²¹⁾ 등은 pH 6에서 최적의 endochitinase 역가를 보이지만 *Streptomyces thermoviolaceus*²²⁾는 pH 4에서 최적활성을 보이고, *Bacillus circulans*²³⁾의 경우는 pH 8 부근인 약염기에서 최적 활성을 나타낸다. 또한 *Aeromonas* sp. No. 10S-24 처럼 여러 최적 pH를 가지는 것도 있다.²⁴⁾ 대장균의 경우 pH 4에서도 최고활성의 80% 이상을 유지하는 것으로 보아 내산성이 있음을 알 수 있었다(Fig. 5). 대장의 pH가 7 이상인데 반하여 대장균 endochitinase의 최적 pH가 6으로 나타난 결과는 앞으로 이 효소의 생리적 역할 규명에서 대장에서의 역할 이외에 다른 역할을 조사해야한다는 것을 시사한다. *Bacillus* strain MH-1의 경우 75°C에서 최적활성을 보이는 등 열에 안정한 endochitinase를 지닌 박테리아도 있지만,²⁵⁾ *Clostridium*²¹⁾과 *Pseudomonas*²⁰⁾의 경우는 대장균의 경우처럼 40°C 부근에서 최적온도를 가진다.

그람음성 박테리아의 많은 종들, 특히 chitin이 상대적으로 많이 발견되는 해수 또는 토양에서 자라는 박테리아 종들(*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*)은 유일한 탄소원으로서 chitin을 사

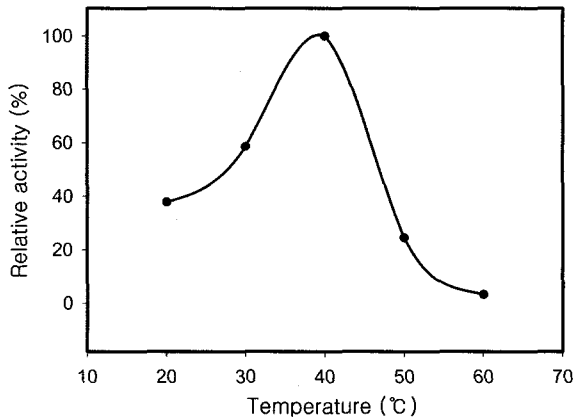


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of the purified endochitinase of *E. coli*. Endochitinase solution was incubated for 5 hr in 50 mM Britton-Robinson buffer (pH 6.0) containing *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl- β -D-N',N'',N'''-triacetylchitotriose.

용할 수 있고 chitin과 그것의 유도체들을 전달하고 대사하기 위한 기전을 갖는다. Endochitinase는 glucosamine 잔기들 사이의 β -1,4 결합들을 내부적으로 분해하여 수용성 고분자를 더 작은 중합체로 전환시키는 경로의 첫 번째 촉매 단계에서 필수적인 역할을 한다. 여러 기능성 효소들의 도움으로 영양분이 제한된 환경에서 박테리아가 특수 기질을 이용할 수 있게 적응되었으며, 내부적 분해 활성 뿐 아니라 효소의 분비는 세포 안으로 확산될 수 없는 기질의 접근을 허용하는 기능을 위해 필요하다고 제안되었다.¹⁹⁾ 대장균 K-12 경우 *yheB* 유전자는 실험실 배양 조건에서는 억제되어 발현되지 않는다. 하지만 히스톤 유사단백질인 대장균 H-NS 유전자의 mutation에 의해 일부 유전자의 억제가 풀리면 발현이 되며 이어서 일부 단백질이 분비가 된다고 보고되었다.^{13,14)} 또 본 실험의 결과처럼 endochitinase가 과량 생산되면 일부 분비되는 것으로 보아, 필요한 고분자 기질이 유일한 탄소원으로 존재하면 이를 분해하기 위하여 발현이 되고 분비가 된다는 이러한 모델의 타당성이 뒷받침된다고 생각된다.

특이 조건에서 H-NS에 의한 일부 유전자 발현 억제가 풀린다면 endochitinase가 발현되고 분비될 것이라는 것을 알 수 있으며 앞으로 H-NS 억제기전이 해제되는 조건이 조사된다면 H-NS가 존재해도 endochitinase가 발현되는 조건을 알 수 있으며 이로부터 endochitinase의 생리적 역할을 간접적으로 밝힐 수 있을 것이다. 또 실험실 배지를 사용한 대장균의 호기성 배양 조건이 아닌 산소가 거의 없는 혐기성 배양조건에 가까운 상태인 소장 또는 대장 내에서 장내 미생물과 세포와의 상호작용에 endochitinase가 관여할 가능성도 배제할 수 없다. 대장균 endochitinase가 특이 조건에서는 분비될 수 있으므로 앞으로 endochitinase의 특성연구와 유전자 발현 및 분비 조건들의 연구를 수행한다면 대장균 endochitinase의 생리적 역할이 규명될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 중앙대학교 연구기자재 구입 지원 프로

그램 연구비와 일부 중소기업청 산학연 컨소시엄사업과제 연구비에 의해 수행된 연구 결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Muzzarelli, R. A. A. (1977) Chitin. Pergamon Press, Inc., New York.
- Connell, T. D., Metzger, D. J., Lynch, J. and Folster, J. P. (1998) Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the *esp*-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **180**, 5591-5600.
- Cohen-Kupiec, R. and Chet, I. (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 270-277.
- Miyashita, K., Fujii, T., Watanabe, A. and Ueno, U. (1997) Nucleotide sequence and expression of a gene (*chiB*) for a chitinase from *Streptomyces lividans*. *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 26-31.
- Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K. and Tanaka, H. (1990) Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* **172**, 4017-4022.
- Jones, J. D. G., Grady, K. L., Suslow, T. V. and Bedbrook, J. R. (1986) Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. *EMBO J.* **5**, 467-473.
- Lin, C. S., Chen, H. C. and Lin, F. P. (1997) Expression and characterization of the recombinant gene encoding chitinase from *Aeromonas caviae*. *Enz. Microb. Technol.* **21**, 472-478.
- Wortman, A. T., Somerville, C. C. and Clowell, R. R. (1986) Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus*: Gene cloning and applications of a chitinase probe. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 142-145.
- Kirsch, C., Hahlbrock, K. and Kombrink, E. (1993) Purification and characterization of extracellular, acidic chitinase isoenzymes from elicitor-stimulated parsley cells. *Eur. J. Biochem.* **213**, 419-425.
- Whitechurch, C. B. and Mattick, J. S. (1994) *Escherichia coli* contains a set of genes homologous to those involved in protein secretion, DNA uptake and the assembly of type-4 fimbriae in other bacteria. *Gene* **150**, 9-15.
- Stojiljkovic, I., Schönher, R. and Kusters, J. G. (1995) Identification of the *hopG* gene, a component of *Escherichia coli* K-12 type II export system and its conservation among different pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates. *J. Bacteriol.* **177**, 1892-1895.
- Franctic, O. and Pugsley, A. P. (1996) The cryptic general secretory pathway (*gsp*) operon of *Escherichia coli* K-12 encodes functional proteins. *J. Bacteriol.* **178**, 3544-3549.
- Franctic, O., Badaut, C., Rimsky, S. and Pugsley, A. P. (2000) The ChiA (*YheB*) protein of *Escherichia coli* K-12 is an endochitinase whose gene is negatively controlled by the nucleoid-structuring protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **35**, 1506-1517.
- Franctic, O., Belin, D., Badaut, C. and Pugsley, A. P. (2000) Expression of the endochitinase type II secretion pathway in *Escherichia coli* lead to chitinase secretion. *EMBO J.* **19**, 6697-

- 6703.
15. Ueda, M., Kawaguchi, T. and Arai, M. (1994) Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding chitinase II from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. *J. Ferment. Bioeng.* **78**, 205-211.
 16. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 17. Tronsmo, A. and Harman, G. E. (1993) Detection and quantification of *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Anal. Biochem.* **208**, 74-79.
 18. Ahn, Y. K. (1994) Enzyme Purification Method, Yangseogak, Seoul.
 19. Wang, S. L. and Chang, W. T. (1997) Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozyme extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 380-386.
 20. Lee, H.-S., Han, D.-S., Choi, S.-J., Choi, S.-W., Kim, D.-S., Bai, D.-H. and Yu, J.-H. (2000) Purification, characterization and primary structure of a chitinase from *Pseudomonas* sp. YHS-A42. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 397-405.
 21. Kenji, M., Shuichi, K., Tetsuya, M., Kazuo, S. and Kunio, O. (2001) Characterization of *Clostridium paraputrificum* chitinase A from a recombinant *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **5**, 466-468.
 22. Tujibo, H., Hantano, N., Endo, H., Miyamoto, K. and Inamori, Y. (2000) Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and cloning of the encoding gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 96-102.
 23. Wiwat, C., Swayapraporn, P. and Bhumiratana, A. (2000) Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No. 4.1. *Curr. Microbiol.* **39**, 134-140.
 24. Aji, M. U., Hiroshi I., Takashi, K., Yoshihisa, N., Motoo, A. and Kazutaka, M. (2001) Expression of a gene encoding chitinase (pCA 8 ORF) from *Aeromonas* sp. No. 10S-24 in *Escherichia coli* and enzyme characterization. *J. Biosci. Bioeng.* **6**, 599-602.
 25. Kenji, S., Akira, Y., Hajime, K., Mamoru, W. and Mitsuaki, M. (1998) Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Appl. Environ. Microbiol.* **9**, 3397-3402.

Purification and Characterization of the Overproduced *E. coli* Endochitinase

Hee-Young Hwang and Woo-Yeon Kim* (*Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea*)

Abstract: The putative endochitinase gene, *yheB* of *Escherichia coli* K-12 is not expressed under lab culture conditions. The endochitinase gene was amplified by PCR and subcloned into pET28c vector and pQE9 vector, respectively. The endochitinase produced in *E. coli* harboring pET28c containing *yheB* or pQE9 vector containing *yheB* was partly released into the growth medium. The overproduced endochitinase was partially purified by His-affinity column chromatography and DE-52 column chromatography. The apparent molecular weight of the endochitinase determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was about 97,000. The purified *E. coli* endochitinase showed maximal chitinolytic activity at pH 6 and 40°C.

Key words: *E. coli* endochitinase, expression, purification, characterization

*Corresponding author