

대장균에서 분자 chaperone에 의한 alginate lyase의 가용성 발현 증대

신은정¹ · 이재형¹ · 박소림² · 김형락³ · 남수완^{1,4*}

¹동의대학교 바이오물질제어학과, ²(주)바이오리더스, ³부경대학교 식품생명과학과, ⁴동의대학교 생명공학과

Received December 21, 2006 / Accepted January 10, 2007

Enhancement of Soluble Expression of Alginate Lyase By Molecular Chaperone in *E. coli*. Eun-Jung Shin¹, Jae Hyung Lee¹, So-Lim Park², Hyeung-Rak Kim³ and Soo-Wan Nam^{4*}. ¹Department of Biomaterial Control, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ²BioLeaders Corp., Daejeon 301-212, Korea, ³Division of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, ⁴Department of Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – When alginate lyase gene (*aly*) from *Pseudoalteromonas elyakovii* was expressed in *E. coli*, most of the gene product was produced as aggregated insoluble particles known as inclusion bodies. In order to produce a soluble and active form of alginate lyase, *E. coli* cells were cotransformed with the plasmids designed to permit coexpression of *aly* together with molecular chaperones such as DnaK/DnaJ/GrpE or GroEL/ES chaperones. The results revealed that the coexpression of *aly* together with DnaK/DnaJ/GrpE chaperone had a marked effect on the production of this protein as a soluble and active form, presumably through facilitating correct folding of alginate lyase protein. The optimal concentration of L-arabinose for the induction of DnaK/DnaJ/GrpE chaperone was found to be 0.05 mg/ml. When DnaK/DnaJ/GrpE chaperone was coexpressed, about 34% in the total alginate lyase was produced in the soluble fraction. By addition of 10% cetylpyridinium chloride, a clear zone around the colony coexpressing *aly* and DnaK/DnaJ/GrpE chaperone was formed, indicating that the alginate in the medium was hydrolyzed by active alginate lyase enzyme.

Key words – Alginate lyase, molecular chaperone, coexpression, *E. coli*

서 론

*E. coli*에서 재조합 단백질 생산 시 native 상태로 접히지 못한 단백질들이 축적되어 내포체(inclusion body)를 형성하는 문제점이 있다[1]. 그러나 이러한 문제점들의 해결책으로 GroEL/ES나 DnaK/DnaJ/GrpE 같은 molecular chaperone을 이용하여 재조합 단백질의 접힘(folding)을 촉진시키는 방법이 제시되어져 왔다[21-23]. DnaK/DnaJ/GrpE는 nascent polypeptide와 반응하여 비가역적인 응집을 막고, 부분적으로 접힘을 촉진시키는 기능을 하는 것으로 알려졌으며[4,20] GroEL/ES는 이미 접혀진 단백질과 부분적으로 반응하여 접힘을 보다 완벽하게 할 수 있도록 도와주는 역할을 한다[3,9]. 이와 같은 molecular chaperone 들과의 공발현은 단백질 접힘을 도와 활성형 형태의 단백질 생산 증대에 큰 영향을 미친다[5,7,13]. 그리고 접힘 이외에도 chaperone은 단백질의 응집, 안정성, heat response의 조절, 단백질의 분비 등에도 영향을 미친다[6,8,14].

본 실험에서 사용한 모델 단백질은 *Pseudoalteromonas elyakovii* 유래의 alginate lyase (*aly*)이며 약 51 kDa의 분자량으로 *E. coli*에서 비가용성 내포체 형태로 발현됨을 확인하였다.

이러한 내포체 형성의 주요단계는 peptide translation 그리고 부분적으로 접혀진 단백질들의 응집체 형성이 그 원인일 것으로 보고 있으며, 전체 단계는 번역 속도, peptide 농도, 및 확산에 의존하고, 그리고 이러한 변수들 역시 chaperone 처럼 pH, 염농도, 온도 같은 환경적 요인에 영향을 받는다. Alginate는 높은 점착성 용액을 형성하며 금속이온을 킬레이팅하는 능력을 갖기 때문에 넓게는 식품과 제약 산업에 유용하다[25]. 이러한 alginate를 분해하는 alginate lyase는 hydrolase보다 일정하게 분해할 수 있으며, polysaccharide의 D-mannuronate 나 L-gluronate rich region을 특이적으로 분해한다. 또한 반응 산물의 비환원성 말단 부분에 4-deoxy-L-erythro-hex-4-enopyranosyluronate의 구성을 이루게 하는 β -elimination 촉매작용에 의해 alginate의 분해를 촉매하기도 한다[18]. 최근, alginate lyase는 *Pseudomonas aeruginosa*의 균주에 의해 방출되는 점액상의 alginate를 액화시킬 수 있으며, 이것은 낭포성 섬유증 환자의 치료제로서 좋은 후보 효소로 알려지고 있다[12].

이전 연구에서 cyclodextrin glucanotransferase와 GroEL/ES를 공발현시켰을 때 가용성 형태로 생산됨을 보고한 바 있으며[9], 다른 연구에서는 human granulocyte-colony stimulating factor를 DnaK/DnaJ/GrpE와 공발현시켜 활성형으로 발현시켰다[15]. 또한 배양 온도와 내포체 형성간의 관계가 가용성 단백질의 생산 증대의 또 다른 방안으로 제시되기

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2276, Fax : +82-51-890-2632

E-mail : swnam@dongeui.ac.kr

도 했는데[19-21,24], 그 중 β -glucosidase는 GroEL/ES 발현 생산과 함께 25°C에서 저온 배양했을 때, 37°C에서 단독 발현시킨 것에 비해 20배나 향상된 단백질 활성도를 보였다 [17].

따라서, 본 연구에서는 *E. coli*에서 비가용성 내포체 형태로 발현되는 alginate lyase를 GroEL/ES 또는 DnaK/DnaJ/GrpE와 같은 molecular chaperone과 공발현시켜 수용성 및 활성형으로 발현·생산하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주와 플라스미드

제조합 단백질의 발현을 위한 숙주세포로 *E. coli* BL21 (DE3) [*F*, *ompT*, *r_B*, *m_B*, (DE3)]를 사용하였다. 제조합 플라스미드로 pG-KJE6 (TaKaRa Korea Inc., Seoul, Korea)와 pALP4를 사용하였다. *Pseudoalteromonas elyakovii* 유래 alginate lyase (*aly*, 1.19 kb)를 *XhoI/NdeI* 부위를 인식하는 제한효소로 처리하여 GeneClean Kit (Bio101, USA)을 사용하여 아가로즈겔상에서 정제한 DNA 밴드를 pET25-vector에 subcloning 한 결과, 6.7 kb의 플라스미드 pALP4를 얻었다[18]. *groEL/ES*와 *dnaK/dnaJ/grpE*를 발현하는 pG-KJE6은 pACYC184가 기본 플라스미드로 chloramphenicol 내성을 가지며 각각 *Pzt-1* promoter와 *araB* promoter에 의해 조절된다[14].

Co-transformation

제조합 플라스미드 pALP4와 pG-KJE6는 Mandel과 Higa 등[11]이 확립한 CaCl₂ 방법에 따라 같은 양 1 μ g 씩 *E. coli* BL21 (DE3)에 co-transformation 시켰으며 형질전환된 *E. coli*는 50 μ g/ml ampicillin (pALP4의 선별)와 50 μ g/ml chloramphenicol (pG-KJE6의 선별)이 함유된 LB agar 배지에서 각각 선별하였다.

배지와 배양 조건

E. coli 배양을 위해 LB 배지(1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 0.5% NaCl)를 사용하였다. pALP4와 pG-KJE6의 공발현 배지는 50 μ g/ml ampicillin과 50 μ g/ml chloramphenicol이 함유된 LB 배지에서 배양, pALP4의 단독 발현시에는 50 μ g/ml ampicillin을 함유한 LB 배지를 이용하였다. 37°C에서 전 배양한 후 10 ml 시험관로 옮겨 배양하면서 *groEL/ES*와 *DnaK/DnaJ/GrpE* gene의 발현을 위해 각각 tetracycline 0, 10, 20 50, 100 ng/ml과 L-arabinose 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 5.0 mg/ml를 대수증식기 초기(OD₆₀₀=0.5: 배양 2 시간 췌)에 첨가하였고, 또한 *aly* gene의 발현을 위해 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 0, 10, 20, 50, 100 μ M을 대수증식기 중기(OD₆₀₀=0.8: 배양 3 시간 췌)에 첨가하였다[11].

SDS-PAGE 분석

생산된 alginate lyase의 응집정도를 알아보기 위해 배양이 끝난 세포만을 모아 초음파 파쇄를 한 뒤 4000 \times g에서 10분 동안 원심 분리하여 가용성(soluble)과 불용성(Insoluble) 분획으로 나눈 뒤 각각의 시료를 Laemmli 등[10]의 방법에 따라 수행된 SDS-PAGE (8% gel)로 분석하였다. Alginate lyase와 chaperone protein은 Coomassie brilliant blue에 의해 염색 확인하였고, gel은 Image Analyzer (Image Master VDS, Pharmacia Biotech., NJ, USA)로 scanning하여 분석하였다.

Alginate lyase 활성 측정

Alginate lyase 활성 측정은 다음의 방법을 사용하였다. 각 검정반응 산물은 반응시간과 효소의 농도에 비례하여 증가하는 것을 측정하였다. Alginate lyase는 0.2% sodium alginate (Sigma, USA)를 포함하는 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.3 M NaCl의 완충용액에서, 37°C에서 5분 동안 반응시켜 효소의 유무에 따라 235 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 1.0 unit는 1분당 235 nm에서 흡광도를 1.0 씩 증가시키는 효소의 양으로 정하였다.

Alginate lyase 발현 콜로니 선별

E. coli 균주로부터 생산되는 alginate lyase는 1% agarose, 1% sodium alginate를 포함하는 LB 고형배지에서 30°C, 5일간 배양하였다. 이후 10% cetylpyridinium chloride로 상온에서 20분간 잠기게 하여 반응하였다[16].

결과 및 고찰

*E. coli*에서 alginate lyase 발현

pALP4로 형질전환된 *E. coli* 세포는 50 μ g/ml ampicillin이 포함된 LB agar 고형배지에서 얻었다. *aly* 발현을 위하여 IPTG를 각각의 농도로 사용하였고, 가용성 분획에서 효소 활성이 매우 낮았다. 이것은 *E. coli* 세포 내에서 높은 *aly* 발현속도에 따른(세포 내 alginate lyase 단백질의 용해도를 초과함에 따른) 비가용성의 불용성 내포체를 형성하기 때문인 것으로 판단되었다. 이때 불용성 분획에서 *aly*가 최대 발현되는 IPTG의 농도를 20 μ M로 정하여 계속되는 chaperone과의 공발현 실험에 사용하였다(Fig. 1).

Chaperone Teams의 효과

가용성 alginate lyase 생산에 미치는 chaperone의 효과를 알아보기 위해 *E. coli*에 pALP4와 pG-KJE6을 함께 형질전환시켜 L-arabinose 농도를 바꿔가면서(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 5 mg/ml) 대수증식기 초기(OD₆₀₀=0.5: 배양 2 시간 췌)에 첨가하였고, 또한 *aly*의 발현을 위해 20 μ M IPTG를 대

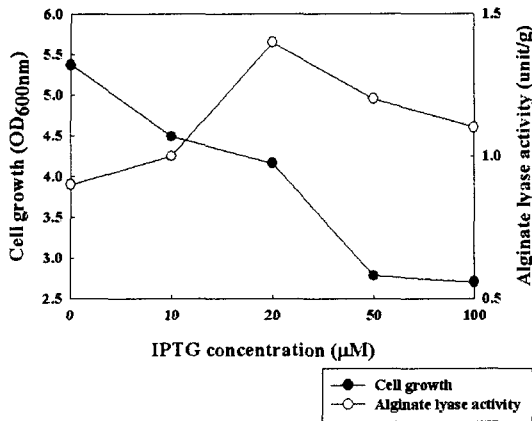


Fig. 1. Effect of IPTG concentration on the alginate lyase production in the recombinant *E. coli* BL21/pALP4. The cell was grown on 10 ml LB with IPTG (0~100 μM), which was added at the mid-exponential phase. After 5 hr induction, the cells were harvested and disrupted with sonication. The soluble fractions were used to assay the alginate lyase activity.

수증식기 중기(OD₆₀₀=0.8; 배양 3시간 쯤)에 첨가하였다(Fig. 2). 이후 5 시간 동안 *aly*의 발현을 유도하고 세포를 모아 가용성과 불용성 분획으로 나누었다. 이 중 L-arabinose 농도를 0에서 5 mg/ml까지 첨가한 결과, DnaK/DnaJ/GrpE chaperone band는 각각 70, 40, 그리고 26 kDa으로 관찰되었으며, 특히 L-arabinose 농도가 1 mg/ml일 때 가장 많이 가용성 분획에서 발현됨을 확인할 수 있었다. 그러나 가용성 분획에서 더 많은 양의 alginate lyase는 L-arabinose 0.05 mg/ml일 때 얻을 수 있었다(Fig. 2). L-arabinose 농도가 0.1 mg/ml 이상에서는 alginate lyase가 가용성 분획에서 감소하는 반면, DnaK/DnaJ/GrpE chaperones은 가용성 분획에서 과발현되었다. 이러한 결과는 DnaK/DnaJ/GrpE chaperone의 과발현에 따른 대사적 부담과 배지내 영양 성분의 고

같이 원인으로 추정된다[3].

또한, GroEL/ES chaperone에 대한 효과를 분석하기 위하여 tetracycline을 0, 10, 20, 50, 100 ng/ml 농도로 바꿔가면서 대수증식기 초기(OD₆₀₀=0.5; 배양 2 시간 쯤)에 첨가하였으나, alginate lyase를 가용성 분획에서 생산하는 데에는 큰 효과를 볼 수 없었다(Fig. 3). 이전 실험에서도 GroEL/ES chaperone 보다 DnaK/DnaJ/GrpE chaperone과의 공발현으로 human granulocyte-colony stimulating factor를 활성형의 가용성으로 생산하는데 효과가 있음을 관찰한 바 있다[15].

DnaK/DnaJ/GrpE chaperone은 가용성을 유지하고 단백질 응집을 방지하기 위하여 풀린 polypeptide의 소수성 부위에 결합하는 것으로 알려져 있다[2]. 이와 대조적으로 GroEL/ES chaperone system은 잘못 접힌(misfolded) polypeptide에 결합하여 재접힘을 일으켜 방출시킨다고 알려져 있다[8]. 그러므로 본 연구에서 사용한 alginate lyase의 경우, 잘못 접힌 alginate lyase가 GroEL/ES chaperone과 결합하는 것 보다, alginate lyase의 소수성 부위와 DnaK/DnaJ/GrpE chaperone과 상호작용을 더 잘 함으로써 alginate lyase의 가용성 생산에 더 효과적으로 기여하는 것으로 판단 된다.

Alginate lyase의 Image 분석

E. coli 세포에서 발현된 alginate lyase의 양을 분석하기 위하여 세포 용해물(cell lysates)을 가용성 분획과 불용성 분획으로 나누고 SDS-PAGE 후 나타난 단백질 밴드들을 scanning하여 분석하였다. 각 분획의 단백질 밴드 총 비율을 100%로 보고, alginate lyase 밴드만의 비율을 측정하여 비교하였다. Fig. 2의 gel을 scanning 한 결과, alginate lyase를 단독 발현했을 때 가용성 분획에서의 alginate lyase 밴드 비율은 3%에 그쳤다. 그러나 DnaK/DnaJ/GrpE chaperone과 alginate lyase를 공발현시켰을 경우, 34% 이상의 alginate

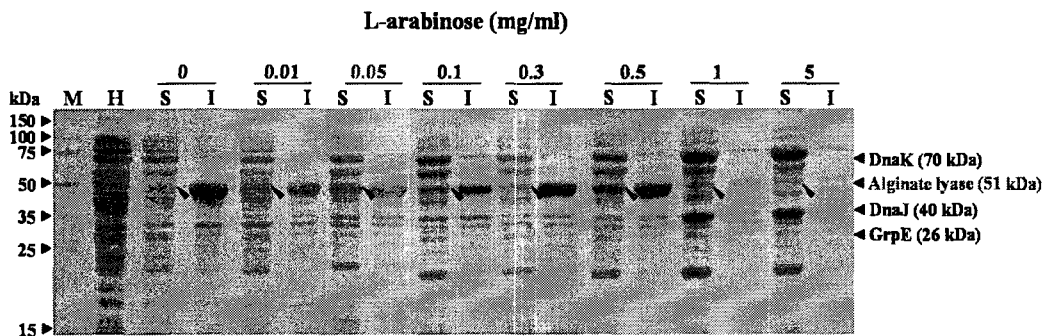


Fig. 2. Effect of DnaK/DnaJ/GrpE chaperones on the alginate lyase production in the recombinant *E. coli* BL21/pALP4 + pG-KJE6. The cell was grown on 10 ml LB with L-arabinose (0~5 mg), which was added at the early-exponential phase. After 5 hr induction, the cells were harvested, disrupted with sonication, and separated as soluble (S) and insoluble (I) fractions. Each fraction was analyzed by SDS-PAGE 10%. DnaK, DnaJ, GrpE, and alginate lyase proteins are clearly visible on the gel as bands with the expected molecular weights of 70, 40, 26, and 51 kDa, respectively. Lane M, molecular weight markers (150, 100, 75, 50, 35, 25, 15); Lane H, *E. coli* BL21 cell lysate.

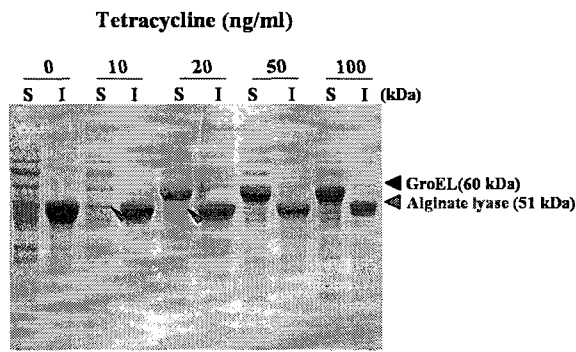


Fig. 3. Effect of GroEL/ES chaperones on the alginate lyase production in the recombinant *E. coli* BL21/pALP4 + pG-KJE6. The cell was grown on 10 ml LB with tetracycline (0~100 ng), which was added at the early-exponential phase. After 5 hr induction, the cells were disrupted with sonication, and separated as soluble (S) and insoluble (I) fractions. Each fractions were analyzed by SDS-PAGE(10% gel).

lyase가 가용성 분획에서 생산되었다. 실제로 L-arabinose 농도를 0.05 mg/ml 까지 증가시킴에 따라 alginate lyase 효소 활성이 1.4 unit/g-soluble protein에서 20.0 unit/g-soluble protein으로 14배나 증가함을 확인하였다(data not shown).

결론적으로 GroEL/ES chaperone 보다 오히려 DnaK/DnaJ/GrpE chaperone과의 공발현이 가용성 활성형 alginate lyase의 생산에 더 효과적이었으며, 다른 재조합 단백질을 활성형 및 수용성 형태로 생산하는 데에도 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Alginate lyase의 depolymerization 분석

숙주세포 *E. coli* BL21 (DE3), alginate lyase를 단독 발현하는 형질전환체(BL21/pALP4), alginate lyase와 DnaK/DnaJ/GrpE chaperone을 공발현하는 형질전환체(BL21/pALP4+pG-KJE6)들은 alginate를 함유한 LB 배지에서 5일간 배양한 후, 10% cetylpyridinium chloride으로 콜로니가 잠길 수 있도록 붓고, 20분간 상온에서 shaking하여 반응하였다. 그 결과, BL21/pALP4의 단독 발현 콜로니와 비교하면 BL21/pALP4+pG-KJE6의 공발현 형질전환 콜로니 주위에 투명환이 뚜렷이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이와 같은 공발현 콜로니 주위에 투명환 생성은 alginate의 분해에 의한 것으로 생각되며, 이런 alginate 고형배지를 사용하면 낭포성 섬유증 환자의 치료제 효소인 alginate lyase 생산 미생물의 선별에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

*E. coli*에서 *Pseudoalteromonas elyakovii* 유래의 alginate lyase 유전자(*aly*)를 발현시킬 때, 대부분의 단백질이 불용성

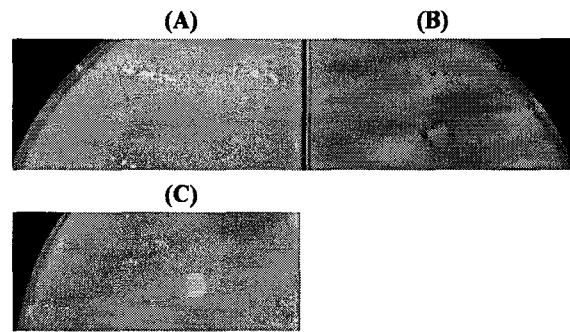


Fig. 4. Plate assay for alginate lyase activity with transformants *E. coli* BL21/pALP4(A), BL21/pAL4+pG-KJE6(B) and host cell BL21(C). Cells were grown on LB agar containing 1% sodium alginate at 30°C and then 10% cetylpyridinium chloride (CPC) solution was poured on to the plate. After approximately 20 min at room temperature, the formation of clear zones was examined.

내포체 형태로 발현됨을 확인하였다. Alginate lyase를 가용성 활성형으로 생산하기 위해 *aly*와 DnaK/DnaJ/GrpE 또는 *aly*와 GroEL/ES을 공발현하는 형질전환체를 얻었다. 공발현 결과, 단백질의 올바른 접힘을 도와주는 DnaK/DnaJ/GrpE chaperone이 가용성 및 활성형의 alginate lyase 생산에 매우 효과적임을 알 수 있었다. DnaK/DnaJ/GrpE chaperone의 발현에 유도제인 L-arabinose 최적 농도는 0.05 mg/ml이었으며, 이러한 공발현에 의해 약 34%의 alginate lyase가 가용성 분획에서 생산되었다. 또한 10%의 cetylpyridinium chloride를 첨가함으로써, 공발현 콜로니 주위에 투명환이 형성됨을 확인할 수 있었고, 이는 활성형 alginate lyase 효소에 의해 alginate가 분해되었음을 시사하였다.

감사의 글

본 연구는 동의대학교 2004년 일반 연구과제 지원에 의하여 이루어졌으며, 이 연구에 참여한 신은정은 교육부의 2단계 BK21 사업의 지원을 받았습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Baneyx, F., M. Mujacic. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1399-1408.
2. Chen, Y., J. Song, S. F. Sui and D. N. Wang. 2003. DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA overexpressed in *Escherichia coli*. *Prot. Expr. Purif.* **32**, 221-231.
3. Gonzalez-Montalban, N., M. M. Carrio, S. Cuatrecasas, A. Aris and A. Villaverde. 2005. Bacterial inclusion bodies

- are cytotoxic *in vivo* in absence of functional chaperones DnaK or GroEL. *J. Biotechnol.* **10**, 406-412.
4. Gragerov, A., E. Nudler, N. Komissarova, G. A. Gaitanaris, M. E. Gottesman and V. Nikiforov. 1992. Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 10341-10344.
 5. Han, N. S. and B. Y. Tao. 1999. Enhancement of solubility of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase by thioredoxin fusion. *Food Sci. Biotechnol.* **8**, 216-279.
 6. Hartl, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-580.
 7. Kondo, A., J. Kohda, Y. Endo, T. Shiromizu, Y. Kurokawa, K. Nishihara, H. Yanagi, T. Yura and H. Fukuda. 2000. Improvement of productivity of active horseradish peroxidase in *Escherichia coli* by coexpression of Dsb proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **90**, 600-606.
 8. Kwak, Y. H., S. J. Kim, K. Y. Lee and H. B. Kim. 2000. Stress responses of the *Escherichia coli* groE promoter. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 63-68.
 9. Kwon, M. J., S. L. Park, S. K. Kim and S. W. Nam. 2002. Overproduction of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase in *E. coli* by coexpression of GroEL/ES chaperone. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 1002-1005.
 10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 11. Mandel, M. and A. Higa. 1970. The calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
 12. Murata, K., T. Inose, T. Hisano, S. Abe, Y. Yonemoto, T. Yamashita, M. Takagi, K. Sakaguchi, A. Kimura and T. Imanaka. 1993. Bacterial alginate lyase: enzymology, genetics, and application. *J. Ferment. Bioeng.* **76**, 427-437.
 13. Nishihar, K., M. Kanemori, H. Yanagi and T. Yura. 2000. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 884-889.
 14. Nishihar, K., M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi and T. Yura. 1998. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1694-1699.
 15. Park, S. L., E. J. Shin, S. P. Hong, S. J. Jeon and S. W. Nam. 2005. Production of soluble human granulocyte colony stimulating factor in *E. coli* by molecular chaperones. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 1267-1272.
 16. Pecina, A., A. Pascual and A. Paneque. 1999. Cloning and expression of the *algL* gene, encoding the *Azotobacter chroococcum* alginate lyase: purification and characterization of the enzyme. *J. Bacteriol.* **181**, 1409-1414.
 17. Sachiko, M., Y. Yu, S. P. Singh, J. D. Kim, K. Hayashi and Y. Kawata. 1998. Overproduction of β -glucosidase in active form by an *Escherichia coli* system coexpressing the chaperonin GroEL/ES. *FEBS Microbiol. Lett.* **159**, 41-46.
 18. Sawabe, T., H. Takahashi, Y. Ezura and P. Gacesa. 2001. Cloning, sequence analysis and expression of *Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594 gene (*alyPEEC*) encoding the extracellular alginate lyase. *Carbohydr. Res.* **335**, 11-21.
 19. Standberg, L. and S. O. Enfors. 1991. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1669-1674.
 20. Szabo, A., T. Langer, H. Schroder, J. Flanagan, B. Bukau and F. U. Hartl. 1994. The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system-DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 10345-10349.
 21. Thomas, J. G., A. Ayling and F. Baneyx. 1997. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 197-238.
 22. Wall, J. G. and A. Pluckthun. 1995. Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 507-516.
 23. Wegrzyn, R. D. and E. Deuerling. 2005. Molecular guardians for newborn proteins: ribosome-associated chaperones and their role in protein folding. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 2727-2738.
 24. Wetzel, R. and B. A. Chrnyk. 1994. Inclusion body formation by interleukin-1 β depends on the thermal sensitivity of a folding intermediate. *FEBS Lett.* **350**, 245-248.
 25. Yoon, H. J. and W. Hashimoto, O. Miyake, M. Okamoto, B. Mikami, and K. Murata. 2000. Overexpression in *Escherichia coli*, purification and characterization of *Sphingomonas* sp. A1 alginate lyases. *Prot. Expr. Purif.* **19**, 84-90.