علوم و فناوری زیستی مدرس
دورهٔ ۲، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۰

همسان‌سازی ژن LysA در وکتور بیانی برای افزایش تولید اسیدآمینه L- لیزین

سارا چراغی[۵و۱*]، عظیم اکبرزاده[۲]، رضا حاجی حسینی[۳]، هادی انصاری هادی پور[۴]، سمیه حمزه‌ای‌تاج[۵]، سمانه خادمی مزده[۵]، محمد رضا مهرابی[۵]، علی فرهنگی[۵]، زهرا صفاری[۵]، سهیل قاسمی[۵]

۱- کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور تهران
۲- دانشیار بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتوپاستور تهران
۳- دانشیار، دانشگاه پیام نور تهران
٤- استادیار، دانشگاه اراک
۵- بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انیستیتوپاستور ایران

***تهران، صندوق پستی ۱۳۱٦٤**
cheraghi_So@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۸۹/۱۰/٤، پذیرش: ۹۰/۳/۲)

چکیده- L- لیزین یکی از اسیدهای آمینه ضروری است که در تغذیه انسان و دام اهمیت زیادی دارد. این اسیدآمینه به دلیل کاربرد زیاد در صنایع دارویی و غذایی اهمیت دارد. تولید صنعتی لیزین از نظر اقتصادی بسیار مؤثر است. سالانه چندین هزار تن لیزین در جهان به‌وسیله Corynebacterium glutamicum تولید می‌شود.

روش بررسی: پس از تهیه پرایمرهای اختصاصی با دو توالی برشی در انتهای '۵ پرایمرها برای آنزیم-های *NheI* و *HindIII*، ژن مورد نظر با روش PCR تکثیر و برای تعیین ترادف در وکتور pTZ57R/T کلون شد. پس از تعیین ترادف و اطمینان از صحت ژن مورد نظر، قطعه ژنی با انتهای چسبنده در وکتور بیانی pET28a کلون و به سویه *E.coli* BL21 (DE3) انتقال داده شد. پلاسمید نوترکیب با روش‌های هضم آنزیمی و تعیین ترادف ارزیابی شد.

یافته‌ها: ژن LysA به طول ۱/٤ kb با توالی صحیح کلون شد. هضم آنزیمی با موفقیت انجام شد بدین ترتیب که ژن LysA به‌طور کامل از پلاسمید جدا شد. همسان سازی با SDS-PAGE تأیید شد.

بحث: در این مطالعه ژن کدکننده آنزیم دی‌آمینوپیمیلات‌دکربوکسیلاز (EC ٤.۱.۱.۲۰) در وکتور بیانی همسان و وکتور بیانی بررسی شد.

کلید واژه‌گان: pET28a، کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم، دی‌آمینوپیمیلات‌دکربوکسیلاز، pTZ57R/T

۱- مقدمه

حدود ۵۰ سال است که از میکروارگانیسم‌ها برای تولید L – لیزین استفاده می‌شود [۱-۲]. لیزین به‌عنوان مکمل غذایی حیوانات استفاده قرار می‌شود و معمولاً با غلات که فاقد سطح کافی L-لیزین و مورد نیاز برای تغذیه دام‌های اهلی هستند، مخلوط می‌شود. همچنین لیزین کیفیت غذا را با افزایش جذب دیگر اسیدهای آمینه افزایش می‌دهد [۳].

سوش تولیدکننده L-لیزین کورینه‌باکتریوم گرم مثبت، *Corynebacterium glutamicum* است که شامل زیر گونه‌های *Brevibacterium flavum*، *Brevibacterium lactofermentum*، *Corynebacterium lilium*، *Corynebacterium efficiens* و *Brevibacterium divaricatum* است [٤، ٥] که از مهمترین ارگانیسم‌های صنعتی تولیدکننده لیزین به‌شمار می‌رود. از دیگر گونه‌هایی که برای تولید لیزین به‌کار می‌روند، سویه‌های نوترکیب *E.coli* است [٦،٧، ٨]. C.glutamicum باکتری خاکزی، غیربیماریزا، غیرمتحرک [۹-۱۰] و اگزوتروف به ویتامین بیوتین [۱۱] است که به‌طور گسترده برای تولید اسیدهای آمینه به‌کار می‌رود و اولین بار در سال ۱۹۵۰ به‌وسیله کینوشیتا از خاک جدا شد [۱۲]. به دلیل ارزش اقتصادی این میکروارگانیسم، مطالعات زیادی در مسیرهای سنتز، ساز و کار مولکولی تولید، جداسازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتز و همسان سازی اسیدهای آمینه انجام شده است [۱۳].

در این ارگانیسم، لیزین، ترئونین، متیونین و ایزولوسین از آسپارتات مشتق می‌شوند. مسیر بیوسنتز اسیدهای آمینه خانواده آسپارتات در این ارگانیسم‌ها به‌وسیله ساز و کارهای تنظیمی در محل انشعاب کنترل می‌شوند [١٤].

در مسیر بیوسنتز L-لیزین، آنزیم meso-دی‌آمینوپیمیلات دکربوکسیلاز واکنش انتهایی مسیر، واکنش تبدیل meso-دی‌آمینوپیمیلات به لیزین را کاتالیز می‌کند meso-دی‌آمینوپیمیلات همچنین در ساخت دیواره سلولی نقش اساسی دارد [۱۳]. بنابراین meso-دی‌آمینوپیمیلات‌دکربوکسیلاز از مهمترین آنزیم‌های مسیر بیوسنتز لیزین است که افزایش فعالیت و تقویت ژن آن موجب افزایش راندمان تولید می‌شود [۱۵]. در این مطالعه، همسان‌سازی ژن LysA سویه *C.glutamicum* ATCC 21799 گزارش شده است.

۲- مواد و روش‌ها

سویه‌ها، پلاسمید و محیط: *C.glutamicum ATCC 21799* مقاوم به آنالوگ لیزین‌آمینواتیل‌سیستئین واگزوتروف به هموسرین از بانک میکروبی آمریکا (ATCC) خریداری شده است.

E.coli DH5α به‌عنوان ناقل کلونینگ و *E.coli BL21 (DE3)* به‌عنوان میزبان بیانی از بانک ژن و نوترکیب (پلاسمید و میزبان) انستیتو پاستور تهیه شد (جدول ۱).

جدول ۱ باکتری‌ها و پلاسمیدها

Strain or plasmid	Genotype or description	Source
C. glutamicum	Lysine- producing strain AEC^{R*}	ATCC
E.coli DH5α	*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*	NRGB**
E.coli BL21(DE3)	*F– ompT hsdSB(rB– mB–) gal dcm (DE3)*	NRGB
plasmid		
pTZ57R/T	*lacZα Ap^{r***}*	Fermentase
pET28a	*Km^{r***}*	NRGB

*AEC^R indicates resistance to S- 2- aminoethyl- L- cysteine, a Lysine analog.
** National Recombinant Gene Bank- Pasteur Institute of Iran
***Km^r and Ap^r indicate resistance to kanamycin and ampicillin.

C.glutamicum و سویه‌های *E.coli* در محیط LB (Luria bertani) به ترتیب در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شده‌اند. از آنتی‌بیوتیک‌های

آمپی‌سیلین و کانامایسین با غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم استفاده شد پلاسمید بیانی pET28a از بانک ژن نوترکیب (پلاسمید و میزبان) انستیتو پاستور ایران، وکتور pTZ57R/T و تمام مواد مورد استفاده، از شرکت Fermentase تهیه شده است.

استخراج DNA ژنومی از سوش *C.glutamicum*: استخراج DNA ژنومی از سوش *C.glutamicum* ATCC 21799 با روش لیز به وسیله‌ی لیزوزیم و SDS انجام شد [۱۶].

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): واکنش PCR با یک پرایمر در بالادست، شامل ناحیه کدون شروع 5´GCTAGCGAAGATGTAACAATGGC3´ با توالی برشی آنزیم *NheI* و پرایمر پایین‌دست 5´AAGCTTAAGAAACCCAGAAACCC3´ با توالی برشی آنزیم *HindIII* از ژن *LysA* انجام شد. مقادیر استفاده شده در واکنش شامل ۲ میکرولیتر بافر 10x PCR، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl2، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۰/۵ میکرومولار هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم *pfu* پلیمراز و ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود (تمام مواد استفاده شده از شرکت Fermentase تهیه شد).

سیکل دمایی استفاده شده شامل دمای دناتوره شدن ۹٤ درجه سانتی‌گراد، دمای اتصال پرایمر ۵۸ درجه سانتی‌گراد و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد بوده است. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید و سایز مارکر در الکتروفورز ارزیابی و تأیید شدند.

همسان سازی در pTZ57R/T وکتور: برای کاهش احتمال خطا طی تکثیر از آنزیم *pfu DNA Polymerase* که خاصیت تصحیح دارد استفاده کردیم؛ ولی استفاده از این آنزیم، امکان کلونینگ از طریق pTZ57R/T وکتور را غیرممکن می‌سازند زیرا این آنزیم فعالیت طویل‌کننده ندارد و قادر به اضافه کردن یک نوکلئوتیدA اضافه در انتهای ´۳ محصولات PCR نیست. به همین منظور برای اضافه کردن نوکلئوتید A اضافه در انتهای´۳، بعد از تخلیص، محصول PCR از ژل با استفاده از کیت تخلیص از ژل تهیه‌شده از شرکت Intron، محصول در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر با مقادیر ۱ میکرولیتر بافر 10x PCR آنزیم *Taq*پلیمراز، ۱ میلی‌مولار MgCl2، ۱ میکرولیتر dATP و ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز مخلوط شد و مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس در وکتور pTZ57R/T همسان شدند و پلاسمید نوترکیب به سلول‌های *E.coliDH5α* حساس‌شده به روش $CaCl_2$انتقال داده شد [۱٦]. در مرحله بعد سلول‌ها روی پلیت حاوی ۵۰ µg/ml آمپی‌سیلین، IPTG ۲۰mM و X-gal ۲۰ µg/ml کشت داده شدند و بعد از یک شب انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلونی‌های سفید انتخاب شدند. بعد از تخلیص پلاسمید نوترکیب به روش لیز قلیایی [۱۷]، تعیین توالی با استفاده از پرایمرT7 انجام شد. صحت کامل توالی ژن *LysA* کلون شده تأیید شد [۱۸].

تکثیر و آماده‌سازی پلاسمید: پلاسمید pET28a پس از انتقال در *E.coli DH5α* [۱٦] با استفاده از روش لیز قلیایی استخراج و با آنزیم‌های برشی *NheI* و *HindIII* برش داده شد. برای بالا بردن کارایی کلون‌سازی و جلوگیری از خود اتصالی حامل، برداشتن فسفات از انتهای ´۵ آن با استفاده آلکالین فسفاتاز (CIP) انجام شد.

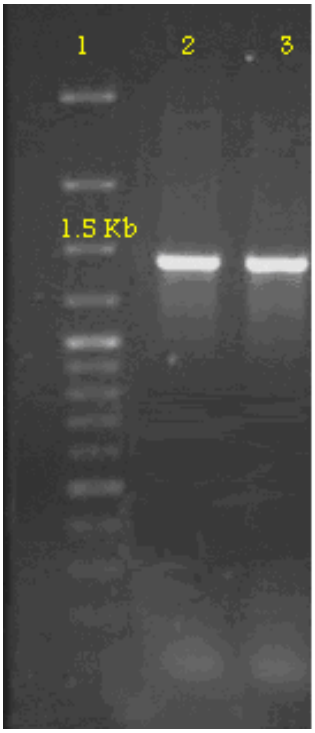
آماده‌سازی و کلونینگ ژن *LysA*: ژن *LysA* همسان شده در وکتور pTZ57R/T با آنزیم‌های برشی *NheI* و *HindIII* برش داده شد. تمام مراحل خالص‌سازی قطعه ژن (insert) و حامل با الکتروفورز و استخراج از ژل آگاروز LMP با استفاده از کیت استخراج از ژل تهیه‌شده از شرکت Intron انجام شد. در نهایت قطعه مورد نظر با فرایند Ligation در حامل بیانی pET28a کلون شد.

انتقال به *E.coli BL21 (DE3)*: سوش *E.coli BL21 (DE3)* به روش CaCl2 حساس‌شده و انتقال پلاسمید نوترکیب انجام شد و پس از انتقال مخلوط اتصالی به سلول *E.coli BL21 (DE3)* و کشت آن روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (mg/ml ۵۰)، کلنی‌های رشدیافته به عنوان کلون‌های واجد حامل و احتمالاً واجد قطعه ژن انتخاب شدند. برای اطمینان از وارد شدن قطعه ژن در حامل، این کلونی‌ها تصادفی انتخاب شدند و به‌وسیله‌ی واکنش PCR، استخراج پلاسمید، هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی و الکتروفورز ژل آگاروز بررسی شدند. در نهایت عمل تعیین توالی، صحت کامل توالی ژن *LysA* و قرارگیری صحیح آن در جایگاه خواندن تایید شد.

بررسی بیان ژن: باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب را در محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (mg/ml ۵۰) کشت داده و زمانی‌که ضریب جذب نوری کشت باکتری (طول موج ٦٠٠nm) ۰/۸– ۰/۵ رسید به میزان mM ۰/۱، IPTG اضافه و رسوب باکتریایی، هر یک ساعت بعد از تلقیح IPTG برداشت شد. رسوب حاصل دوبار با NaCl ۰/۹٪ شست‌وشو داده شد؛ و سپس در بافر TE [تریس اسید ۱۰۰mM و EDTA ۱ mM [pH۸] حل و سونیکاسیون با دستگاه اولتراسونیک مدل هلشر– اولتراسوند تکنولوژی، انجام شد. بعد از سانتریفوژ نمونه، محلول رویی برای سنجش بیان پروتئین با استفاده از ژل ۱۲٪ SDS-PAGE بررسی شد.

۳- یافته‌ها

شرایط بهینه (غلظت‌های مختلف یون منیزیم، dNTP، پرایمر، آنزیم پلیمراز، DNA الگو و درجه حرارت‌های مختلف) برای جداسازی و تکثیر ژن *LysA* از ژنوم *C.glutamicum* ATCC21799 با استفاده از تکنیک PCR انجام شد. شکل ۱ نتایج حاصل از واکنش PCR را نشان می‌دهد.



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE. ۱) سایز مارکر 3 Kb ladder plus ، ۲) محصول PCR با آنزیم *Pfu* پلیمراز، ۳) محصول PCR با آنزیم *Taq* پلیمراز.

محصول PCR در پلاسمید pTZ57R/T همسان شد، پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T به‌وسیله هضم آنزیمی با دو آنزیم برشی *NheI* و *HindIII* و انجام PCR تأیید شدند.

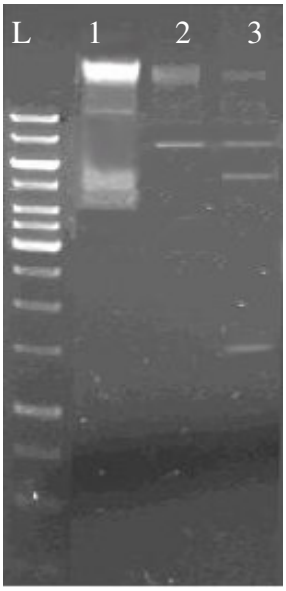
آنالیز هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های *NheI* و *HindIII* (شکل ۲) مشخص کرد که ژن *LysA* به‌طور صحیح در کلونینگ سایت مورد نظر قرار گرفته است.

شکل ۲ الکتروفورز محصول هضم آنزیمی با دو آنزیم *NheI* و *HindIII* بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد. ۱) سایز مارکر ۳Kb ladder plus، ۲) پلاسمید pTZ57R/T حاوی ژن LysA هضم شده با آنزیم‌های برشی

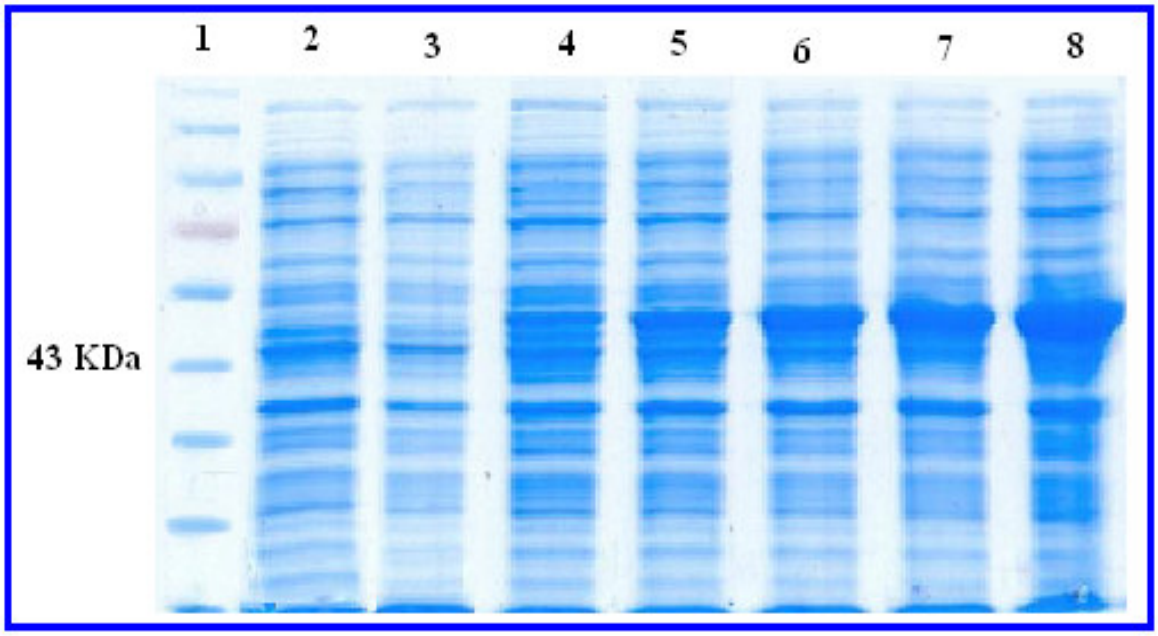
بعد از انجام لیگاسیون ژن *LysA* با انتهای چسبنده و پلاسمید بیانی pET28a و انتقال به سویه *E.coli BL21 (DE3)*، کلونی‌های صحیح با واکنش PCR و سپس هضم آنزیمی انتخاب شدند.

آنالیز هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET28a*LysA* با آنزیم‌های *NheI* و *HindIII* (شکل ۳) مشخص کرد که ژن *LysA* به طور صحیح در کاست بیانی مورد نظر قرار گرفته است. تعیین ترادف سکانس ژن *LysA* نمایانگر آن بود که کاست بیانی به همراه پروموتور T7، محل اتصال ریبوزوم، کدون آغازی (ATG)، قطعه ژن (*LysA*)، برچسب هیستیدینی (6x His tag) و سکانس‌های پایانی، در ترادف مناسب پشت سرهم قرار گرفته‌اند. نتایج تعیین ترادف این ژن با ترادف اعلام شده در بانک ژنی به‌وسیله نرم‌افزار chormas، صحت ژن تکثیریافته را نشان می‌دهد. بررسی نرم‌افزاری حاکی از آن بود که این ژن، پروتئینی به وزن مولکولی ٤٧ کیلودالتون را کد می‌کند ٤٤٥ اسیدآمینه دارد.

نتایج بررسی بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از ژل SDS-PAGE در شکل ٤ نمایش داده شده که در مقایسه با نمونه شاهد، بیان قابل توجهی دارد.



شکل ۳ برش آنزیم محدودالاثر پلاسمید pET28a نوترکیب با آنزیم‌های *NheI* و *HindIII* جهت تائید وجود ژن lysA. L: 10Kb ladder plus، ۱) پلاسمید نوترکیب pET28aLysA هضم نشده، ۲) هضم پلاسمید نوترکیب با آنزیم *NheI*، ۳) هضم با هر دو آنزیم *NheI* و *HindIII*، قطعه همسانه شده از پلاسمید جدا گردید.



شکل ٤ الکتروفورز پروتئین نوترکیب بوسیله SDS-PAGE. ۱) مارکر وزن ملکولی، ۲) کنترل منفی، ۳–۸) بیان پروتئین در زمان ۰، ٦۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲٤۰ و ۳۰۰ دقیقه بعد از تلقیح IPTG (۰/۱ mM).

٤- بحث

در صنعت، L-لیزین با روش‌های مختلفی مانند سنتز آنزیمی، سنتز شیمیایی و روش بیوتکنولوژی تولید می‌شود [۱۹]. در بین این روش‌ها، تولید بیوتکنولوژی مناسب‌تر و اقتصادی‌تر است زیرا در این روش با استفاده از منابع اولیه ارزان‌قیمت و دردسترس می‌توان لیزین تولید کرد. آنزیم دی‌آمینوپیمیلات‌دکربوکسیلاز به‌وسیله ژن *LysA* کد می‌شود [۲۰]. DNAالگو در تکثیر ژن *LysA* از سویه *C. glutamicum* ATCC 21799 تخلیص شد، با توجه به بزرگی اندازه ژن، کیفیت DNA کروموزومی مورد استفاده، اهمیت زیادی دارد؛ به همین دلیل با انجام تغییراتی در پروتکل استاندارد، نتیجه مطلوب حاصل شد. برای به‌دست آوردن محصول PCR بدون هرگونه موتاسیون، پس از ایجاد شرایط بهینه با آنزیم *Taq* پلیمراز، از آنزیم *pfu* پلیمراز که دارای سیستم اصلاح است استفاده شد.

بعد از تکثیر ژن مورد نظر با PCR، همسان‌سازی آن در وکتور pTZ57R/T انجام شد. با همسان‌سازی ژن در وکتور pTZ57R/T، امکان برش آنزیمی با کارایی بالا برای انجام مراحل بعدی امکان‌پذیر می‌شود؛ همچنین وکتور pTZ57R/T مولتی‌کلونینگ سایت است و دارای چندین سایت برشی برای آنزیم‌های اندونوکلئازی است. این استراتژی، همسان‌سازی ژن مورد نظر را در حامل‌های بیانی متعدد امکان‌پذیر می‌سازد.

با کلون کردن ژن در وکتور بیانی pET28a بیان ژن در ناقل بیانی امکان‌پذیر می‌شود و کلونینگ وسیله‌ای برای رسیدن به پروتئین است. وکتور pET28a دارای پروموتور قوی T7 است که برای کنترل بیان پایه

مناسب است (پروموتر قوی T7 از فاژ T7 گرفته شده که کارایی بالایی در نسخه‌برداری دارد)؛ بنابراین با افزایش بیان و بهینه‌سازی محیط کشت انتظار می‌رود که در مطالعات آینده، میزان تولید لیزین نیز افزایش یابد [۱۵]. ما در این مطالعه با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک توانستیم یکی از مهم‌ترین ژن‌های مسیر بیوسنتز لیزین را همسان کنیم. در مطالعات آینده می‌توان با انجام کلونینگ در سویه اصلی تولید این پروتئین و لیزین را افزایش داد. تولید لیزین با روش‌های بیوتکنولوژی می‌تواند گامی مؤثر برای تولید این ماده در کشور باشد و کشور را از واردات این ماده بی‌نیاز سازد.

۵- مراجع

[1] Hirose Y, Shibai H. L-Glutamic acid fermentation. In: Moo-Young M, editor. Comprehensive biotechnology, 1985; 3:595–600.

[2] Eggeling L, Sahm H. L-glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. Appl Microbiol Biotechnol 1999; 52:146–53.

[3] Anastassiadis S., L-Lysine fermentation, Biotechnology, 2007; 1, 11- 24.

[4] Liebl W., Corynebacterium taxonomy. In: Eggeling L, Bott M (eds) Handbook of Corynebacterium glutamicum. CRC, Boca Raton, 2005; Fl, pp 9–34

[5] Liebl W., Ehrmann M., Ludwig W., Schleifer KH., Transfer of Brevibacterium divaricatum DSM 20297t, Brevibacterium flavum DSM 20411, Brevibacterium lactofermentum DSM 20412 and DSM 1412, and Corynebacterium glutamicum and their distinction by rRNA gene restriction patterns. Int J Syst Bacteriol, 1991; 41:255–260.

[6] Imaizumi A., Kojima H., Matsui K., The effect of intracellular ppGpp levels on glutamate and lysine overproduction in Escherichia coli. J Biotechnol, 2006; 125:328–337.

[7] Imaizumi A., Takikawa R., Koseki C., Usuda Y., Yasueda H., Kojima H., Matsui K., Sugimoto S, Improved production of l-lysine by disruption of stationary phase-specific *rmf* gene in Escherichia coli. J Biotechnol. 2005; 117: 111–118.

[8] Tryfona T., Mak T., Fermentative production of lysine by Corynebacterium glutamicum: Transmembrane transport and metabolic flux analysis Process Biochemistry, 2005; 40, 499-508.

[9] Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. Studies on the amino acid fermentation Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. J Gen Microbiol, 1957; 3: 193–205.

[10] Eikmanns B, Kricher M, Reinscheid D. Discrimination of Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum and Brevibacterium lactofermentum by restriction pattern analysis of DNA adjacent to the hom gene. FEMS Microbiol Lett, 1991; 82:203–8

[11] Kinoshita S. Glutamic acid bacteria. In: Demain AL, Solomon NA, editors. Biotechnology of industrial microorganisms. London: Benjamin Cumings, 1985; p. 115–142.

[12] Hermann T., Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. J. Biotechnol. , 2003; 104:155-172.

[13] Jose A. Oguiza, Malumbres M., Eriani G., Pisabarro A. and Martin J., A gene encoding arginyl- tRNA synthetase is located in the upstream region of the *lysA* gene in Brevibacterium lactofermentum: regulation of argS- lysA cluster expression by arginine, J. of Bacteriology, 1998; p: 7356- 7362.

[14] Grace E., Colon, Mike S., Effect of inducible thrB expression on amino acid production in Corynebacterium lactofermentum ATCC 21799, Applied and Environmental Microbiology, 1995; p: 74-78.

[15] Hirono, Seiko, Sugimoto, Masakazu, Nakan, Eiichi, Izui, Masako, Hayakawa, Yoshihara, Method of producing L-lysine, United states patent, 2000; 6090597.

[16] Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982.

[17] Feliciello I, Chinali G. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from Escherichia coli. Anal Biochem. 1993; 212: 394-401.

[18] Maxam, A.M. and Gilbert, W. A new method for sequencing DNA. Biotechnology, 1992; 24: 99-103.

[19] Ault A. and Kauffman G.B., The monosodium glutamate story: the commercial production of MSG and other amino acids. Journal of Chemical Education, 2004; 81 (3): 347-355.

[20] Pfefferle W., Mckel B., Bathe B., Marx A., Biotechnological manufacture of lysine. Adv Biochem Eng Biotechnol., 2003; 79:59–112.