

KONSTRUKSI PLASMID PRHA SEBAGAI PEMBAWA GEN ARAA PENYANDI ENZIM L-ARABINOSA I SOMERASE DARI *Thermotoga thermarum*

Masfuroh, Anto Budiharjo dan Hermin Pancasakti K.

Laboratorium Bioteknologi, Departemen Biologi
Fakultas Sains Dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang
Jln. Prof. Soedarto, SH., Tembalang, Semarang, 50275,
Telp: (024) 7474754; Fax: (024) 7474754
E-mail: masfurb@gmail.com

Abstract

D-tagatosa as natural low-calorie sweeteners is likely to be a sugar substitute for diabetics type II. D-tagatosa sweetness levels is by 92% the sweetness of sucrose, but only 38% of calories of sucrose. This study aimed to obtain a recombinant plasmid construction pRHA::*araA*. Results subcloning was then used in biotransformation processes produce D-tagatosa. Propagation vector source pRHA was done with the cloning procedure in *E. coli* TOP'10. The process used the vector source cut with enzyme *NcoI* and *XhoI* and producing pRHA vectore for gene insertion *araA*. *AraA* gene amplification was done using *Polymerase Chain Reaction* (PCR) with primers of AITth-For and AITth-Rev. Ligation was done using T4 ligase enzyme and transformed in *E. coli* TOP'10 by *heat-shock* methods. *E. coli* was grown in LB medium Agar with *ampicillin* concentration of 100 mg/ml. Selection was made on a liquid LB and LB Agar with *ampicillin* concentration range of 100-200 mg/ml. Based on the result of electrophoresis visualization of the pRHA::*araA* recombinant plasmid isolation were negative.

Keyword: L-arabinosa isomerase, *araA*, D-tagatosa, *T. thermarum*, *E. coli*

Abstrak

D-tagatosa sebagai pemanis rendah kalori alami berpeluang menjadi gula pengganti untuk penderita diabetes tipe II. Kadar kemanisan D-tagatosa sebesar 92% kemanisan sukrosa, tetapi hanya 38% kalori sukrosa. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh konstruksi plasmid rekombinan pRHA::*araA*. Hasil subkloning digunakan pada proses biotransformasi menghasilkan D-tagatosa. Perbanyakkan sumber vektor pRHA dilakukan dengan prosedur kloning pada *E.coli* Top'10. Proses restriksi sumber vektor menggunakan enzim *NcoI* dan *XhoI* menghasilkan vektor pRHA untuk insersi gen *araA*. Amplifikasi gen *araA* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer AITth-For dan AITth-Rev. Ligasi vektor pRHA dan *araA* menggunakan enzim T4 Ligase dan ditransformasi pada *E.coli* TOP'10 dengan metode *heat-shock*. *E.coli* ditumbuhkan pada medium LB Agar dengan konsentrasi ampisilin sebesar 100 mg/mL. Seleksi dilakukan pada LB cair dan LB Agar dengan rentang konsentrasi ampisilin dari 100-200 mg/mL. Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis dari isolasi plasmid rekombinan pRHA::*araA* menunjukkan hasil negatif.

Kata kunci: L-arabinosa isomerase, *araA*, D-tagatosa, *T. thermarum*, *E.coli*

PENDAHULUAN

Penyakit diabetes menjadi perhatian dunia pada beberapa tahun terakhir. Estimasi terakhir *International Diabetes Federation* (IDF), terdapat 415 juta orang yang hidup dengan diabetes di dunia pada tahun 2016. Jumlah tersebut diperkirakan akan meningkat pada tahun 2030 menjadi 592 juta orang. Sedangkan di Indonesia penderita diabetes mencapai angka lebih dari 10 juta orang atau 6,9% dari jumlah penduduk pada tahun 2016 (Infodatin, 2015). Berbagai pihak baik pemerintah maupun lembaga swadaya masyarakat berupaya untuk menekan jumlah penderita diabetes. Konsentrasi glukosa dalam darah dapat dikontrol dengan mengurangi jumlah asupan gula yang terdapat dalam makanan. Salah satunya dengan mengganti gula biasa dengan pemanis rendah kalori.

D-tagatose merupakan pemanis yang paling mirip dalam rasadan sifat fisik dengan sukrosa dari seluruh pemanis, selain itu juga dikenal sebagai pengganti gula alami (Kim *et al.*, 2005). Kadar kemanisan D-tagatose sebesar 92% kemanisan sukrosa, tetapi hanya 38% kalori sukrosa. Sejak tahun 2001, D-tagatose telah dikategorikan sebagai *Generally Recognize of Safe* (GRAS) atau sangat aman dikonsumsi oleh *Food and Drug Administration* (FDA) dan *Joint FAO/WHO Expert Commite on Food Additives* (JECFA) (Levin, 2002). D-tagatose memiliki banyak kelebihan yakni meningkatkan rasa pada produk makanan, pengobatan obesitas, mengurangi gejala yang berhubungan dengan diabetes tipe II, hiperglikemia dan anemia (Oh, 2007).

D-tagatose telah diproduksi dengan metode kimia dan biologis. Metode kimia yang digunakan melibatkan hidrolisis laktosa dan isomerisasi galaktosa (Beadle *et al.*, 1991). Sedangkan metode biologis yang digunakan yakni biotransformasi. Biotransformasi galaktosa menjadi D-tagatose melalui L-arabinosa isomerase

(L-AI) (Kim *et al.*, 2001). Biotransformasi merupakan perubahan atau modifikasi senyawa kimia oleh enzim. L-arabinosa isomerase (EC 5.3.1.4) adalah biokatalis penting yang dapat digunakan secara invitro untuk produksi D-tagatose menggunakan D-galaktosa sebagai substrat (Men, 2014). L-arabinosa isomerase berasal dari beberapa bakteri prokariotik, termasuk bakteri mesofilik, termofilik dan hipertermofilik. L-AI termofilik mempunyai temperatur optimum pada 60-70°C yang diakui pantas untuk industrialisasi D-tagatose (Xu, *et al.*, 2011). Penelitian ini menggunakan gen *araA* yang bersumber dari bakteri termofilik *Thermotoga thermarum*. Enzim L-arabinosa isomerase yang dikode oleh gen *araA* dilaporkan telah berhasil di kloning pada beberapa penelitian (Hariyatun, 2014).

Konstruksi plasmid pRHA diperlukan untuk kebutuhan proses selanjutnya yakni subkloning gen. Sumber plasmid pRHA yang digunakan sudah tersisipi protein intimin dari penelitian sebelumnya. Sehingga diperlukan konstruksi plasmid berupa penghilangan sisipan protein dengan restriksi di dua situs, yakni *NcoI* dan *XhoI*. Plasmid pRHA sebagai vektor kloning memiliki promotor berbasis rhamnosa yang teregulasi oleh inducer L-rhamnosa merupakan sistem ekspresi alternatif pada *Escherichia coli*. *E. coli* TOP'10 digunakan sebagai sel inang. *E. coli* merupakan bakteri yang biasa digunakan untuk mengekspresikan protein rekombinan (Sletta *et al.*, 2007).

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian konstruksi plasmid pRHA sebagai pembawa gen *araA* dari *Thermotoga thermarum* dilakukan di Laboratorium Desain Protein, Bidang Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Bogor, Jawa

Barat. Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2015 sampai Januari 2016.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yakni mikropipet 2-20 μL , 10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL . Tube 1,5 mL, tube 150 μL , tips, tabung reaksi, cawan petri, sentrifugator, cool sentrifuge, spektrofotometer, UV transluminator, elektroforesis, *thermal cycler*, inkubator, *shaker incubator*, neraca analitik, vorteks, autoklaf, freezer, microwave, *laminar air flow*, *magnetic stirrer*, ruang asam, falcon ukuran 15 mL dan 50 mL, erlenmeyer, botol scotch, gelas ukur 25 mL, 50 mL dan 100 mL, bunsen, alumium foil, ose, scalpel, *triangle spreader*, tusuk gigi, *ice maker*, *cool box*, kulkas dan alat tulis. Material DNA yang digunakan adalah gen *araA* sebagai sumber gen target berukuran 1441 bp dan vektor pRHA pRHA-SDM::*pelB*-Int282 berukuran 5008 bp. Isolat bakteri yang digunakan adalah *E. coli* TOP'10 dan *E. coli* DH5 .

Cara Kerja

Perbanyakan plasmid pRHA dilakukan dengan transformasi plasmid pRHA ke *E. coli* TOP'10. Plasmid kemudian diisolasi menggunakan *Plasmid or Cosmid DNA Purification Using QIAGEN Plasmid Midi Kit*. Konstruksi plasmid pRHA dilakukan dengan menghilangkan protein Intimin menggunakan enzim restriksi *NcoI* dan *XhoI*.

Amplifikasi gen *araA* sebagai DNA insert menggunakan teknik PCR. DNA hasil PCR kemudian dipurifikasi menggunakan *QIAGEN MinElute Purification Kit*. Ligasi gen *araA* dengan vektor pRHA dilakukan menggunakan enzim T4 DNA ligase. Hasil ligasi yakni vektor rekombinan pRHA::*araA* diinkubasi pada suhu 37°C selama 16 jam. Vektor rekombinan pRHA::*araA* sebanyak 20 μl kemudian ditransformasi ke sel kompeten *E. coli* TOP'10 sebanyak 200 μl dengan metode kejut panas (*heat shock*) (Sambrook & Russel, 2001).

Seleksi plasmid rekombinan dilakukan dengan menumbuhkan klon pada medium LB Agar yang mengandung ampisilin dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Seleksi dilakukan sebanyak 2 kali dengan sistem pengenceran. Koloni tunggal hasil seleksi ke tiga yang tumbuh kemudian diinokulasi pada 5 ml medium LB broth dan ditambahkan 5 μL ampisilin. Inkubasi shaker pada suhu 37°C selama 16 jam. Isolasi DNA plasmid dari kultur *overnight* didasarkan pada metode alkali (Brinboim and Doly, 1979). Isolasi plasmid rekombinan dilakukan sesuai protokol produsen *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Plasmid rekombinan diverifikasi dengan elektroforesis gel agarosa dan diamati dengan UV Transluminator.

HASIL DAN PEMBAHASAN

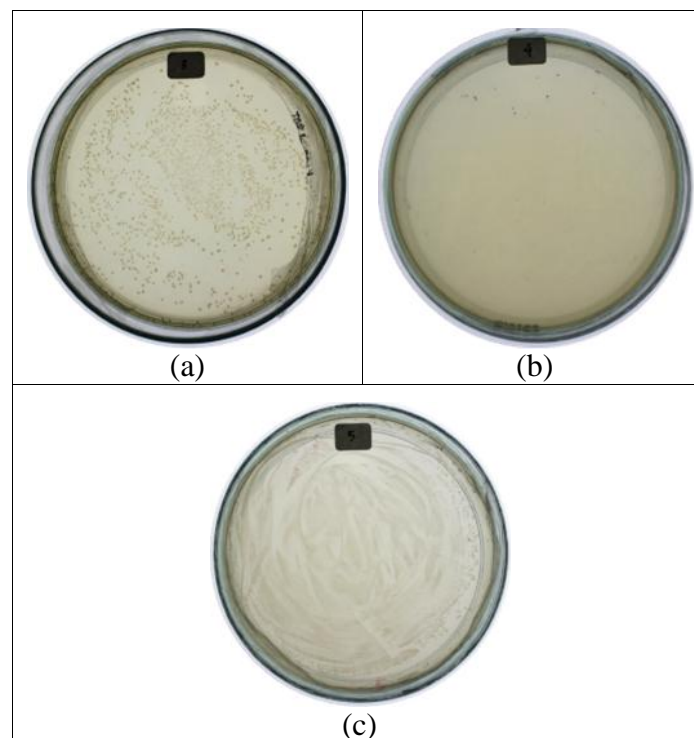
Transformasi plasmid pRHA ke *E. coli* TOP'10 merupakan tahap awal yang bertujuan memperbanyak sumber vektor. Plasmid pRHA adalah plasmid modifikasi dari pJ804:77539. Modifikasi plasmid pJ804:77539 yakni menambah sekuens *pelB* setelah situs *NdeI* dan menambah situs *NcoI* sebelum insert serta insert protein Intimin (Hariyatun, 2014). Hasil transformasi memperlihatkan pertumbuhan *E. coli* TOP'10 yang telah ditransformasi beserta kontrol transformasi (Gambar 1). *E. coli* TOP'10 yang telah ditransformasi dengan sumber vektor pRHA::Int tumbuh dengan baik pada media ampisilin. Hal ini menandakan bahwa vektor telah berhasil ditransformasi.

Transformasi dikatakan berhasil apabila rangkaian DNA yang diintroduksi dapat disisipkan ke genom sel inang (*E. coli* TOP'10), dapat diekspresikan, dan terpelihara dalam seluruh proses pembelahan sel berikutnya. Faktor yang mempengaruhi keberhasilan transformasi antara lain konsentrasi DNA, konsentrasi antibiotik, dan kompetensi sel. Konsentrasi DNA yang terlalu rendah memungkinkan koloni tidak dapat tumbuh. Konsentrasi DNA dipertahankan

pada tingkat 1-10 μg . Konsentrasi antibiotik yang sesuai dengan jenis vektor memungkinkan koloni dapat tumbuh pada media. Sel dibuat kompeten dengan menambahkan larutan Kalsium Klorida (CaCl_2) yang berfungsi mengganggu keseimbangan kalsium dalam membran sehingga membran berhasil terbuka dan

DNA insert dapat masuk (Das & Dash, 2015).

Penggunaan kontrol positif dan negatif bertujuan untuk mengetahui keberhasilan proses transformasi tanpa adanya kontaminasi serta untuk memastikan kualitas sel kompeten yang telah dibuat sebelumnya (Sambrook & Russell, 2011).



Gambar 1. Hasil transformasi plasmid pRHA ke *E. coli* TOP'10. (a) pertumbuhan koloni transforman pada media LB ampicilin, (b) pertumbuhan sel kompeten *E. coli* TOP'10 pada media LB ampicilin (kontrol negatif), (c) pertumbuhan sel kompeten *E. coli* TOP'10 pada media ampicilin (kontrol positif).

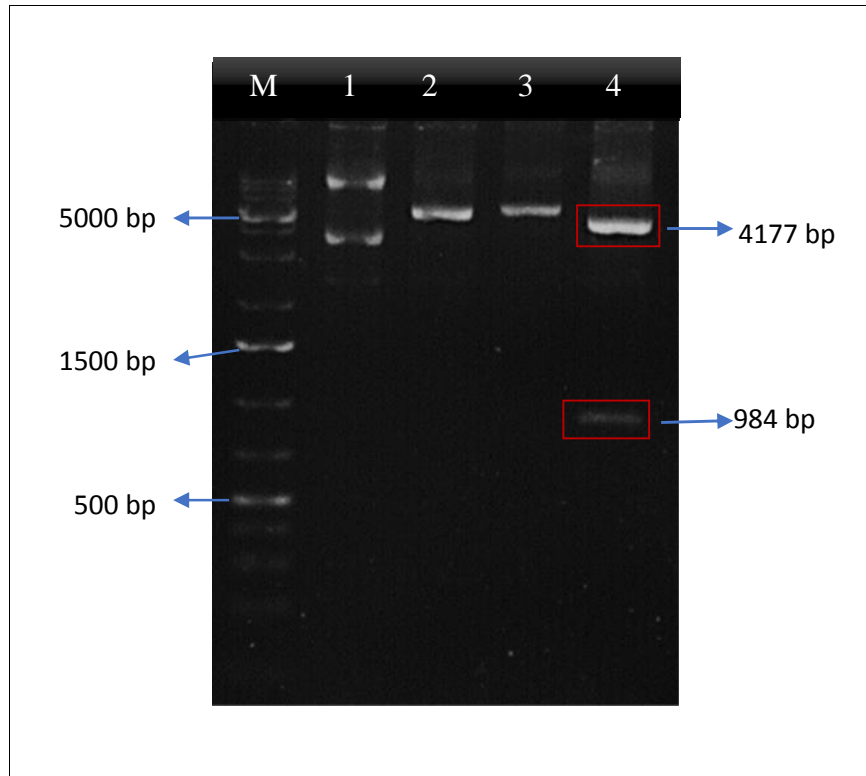
Pembuktian keberhasilan transformasi dilakukan dengan mengisolasi plasmid pRHA dari *E. coli* TOP'10. Plasmid pRHA kemudian direstriksi untuk menghilangkan gen penyandi protein Intimin yang sebelumnya telah disisipkan. Sumber vektor pRHA yang digunakan diperoleh dari konstruksi vektor penelitian sebelumnya yang telah mengalami mutasi situs restriksi. Mutasi berupa penghilangan situs *NdeI* pada posisi basa ke 2907 dan penambahan situs *NcoI* pada

posisi 2017. Penambahan situs *NcoI* dilakukan untuk memberikan titik potong yang sesuai dengan gen yang akan diinsersikan pada vektor (Haryatun, 2014). Titik potong restriksi yang digunakan pada penelitian ini adalah *NcoI* di bagian hulu dan *XhoI* di bagian hilir.

Hasil visualisasi memperlihatkan perbedaan ukuran antara pita (2) dan (3) yang disebabkan perbedaan posisi masing-masing lokasi pemotongan pada daerah *multiple cloning site* (MCS). Selanjutnya, pita (4) menunjukkan dua ukuran pita yang berbeda. Pita di posisi

atas berada pada ukuran 4177 kb merupakan plasmid pRHA, sementara pita di posisi lebih rendah berada pada ukuran 984 kb adalah gen penyandi

protein Intimin yang berhasil direstriksi (Gambar 2).



Gambar 2. Visualisasi hasil digesti plasmid pRHA. (M) marka DNA 1kb, (1)plasmid pRHA, (2)plasmid hasil pemotongan dengan *NcoI*, (3)plasmid pRHA pemotongan *XhoI*, (4)plasmid pRHA hasil pemotongan dengan *NcoI* dan *XhoI* dan gen penyandi protein intimin

Konstruksi plasmid rekombinan yang diharapkan adalah terbentuknya plasmid sirkuler yang membawa gen *araA* yang dapat diekspresikan pada *E. coli* TOP'10. Konstruksi plasmid diperoleh dari ligasi gen *araA* dengan plasmid pRHA menggunakan enzim T4 DNA ligase. Enzim ligase menggunakan kation Mg^{2+} untuk menggabungkan rantai ujung 3' hidroksil dengan rantai 5' fosfat diujung bagian lain rantai DNA, sehingga kedua untai DNA bergabung (Quail, 2005; Yuwono, 2006).

Tahap selanjutnya adalah transformasi hasil ligasi ke dalam sel

kompeten *E. coli* TOP'10 dengan metode *heat shock* (Sambrook & Russel, 2001). Transformasi merupakan proses dimana plasmid masuk kedalam bakteri yang kompeten. Bakteri yang kompeten dapat diperoleh dengan proses induksi kimiawi pada saat fase pertumbuhan log dengan perlakuan menggunakan kalsium klorida ($CaCl_2$) (Tu *et al.*, 2005). Membran sel bakteri dapat menyerap ion klorin namun tidak dapat menyerap ion kalsium. Ion klorin masuk kedalam sel, lalu molekul air akan mengisi partikel-partikel disekitarnya sehingga influks dari molekul air ini menyebabkan sel dapat

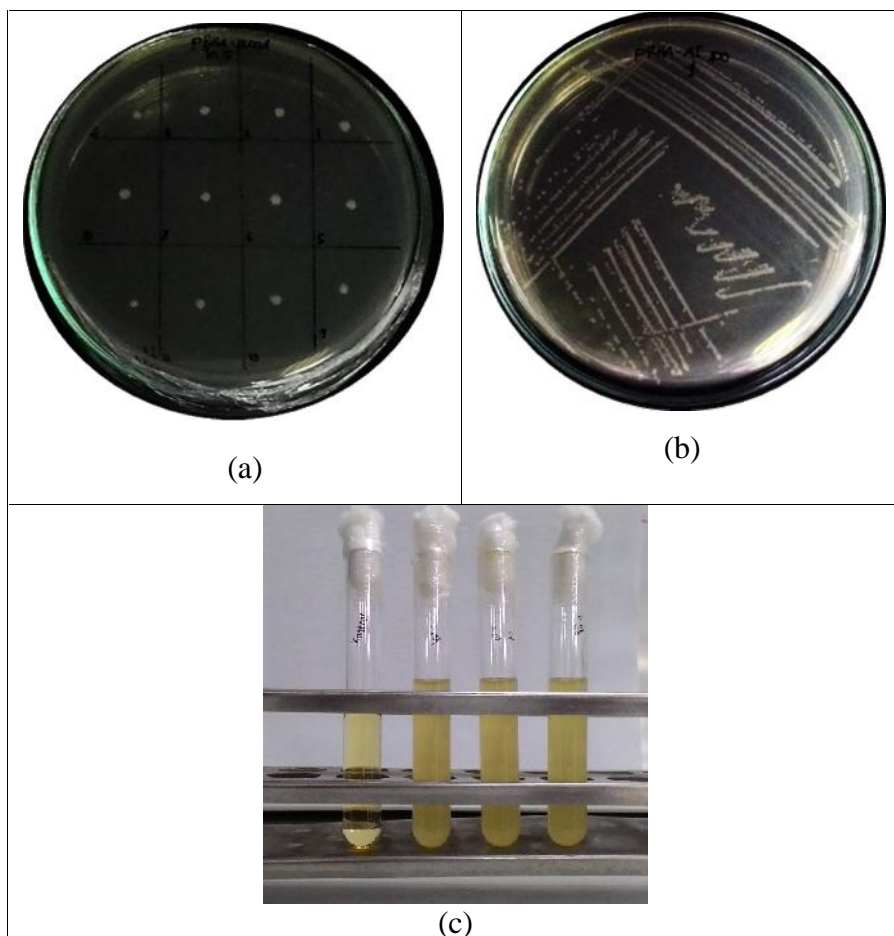
dimasuki DNA asing. Proses induksi kalsium klorida pada *E. coli* TOP'10 ini selanjutnya diberi perlakuan heat shock dengan perlakuan peningkatan suhu (42°C) dalam waktu singkat. Menurut Chen *et al.*, (2001) fase ini adalah fase kritis dimana DNA asing akan masuk ke dalam *E. coli* TOP'10. Kondisi ini menyebabkan gen penyandi yang terdapat dalam *E. coli* TOP'10 terekspresi sehingga *E. coli* TOP'10 dapat bertahan terhadap temperatur yang cukup tinggi.

Transforman atau koloni yang tumbuh dari proses transformasi selanjutnya diseleksi dengan memilih koloni tunggal yang bertujuan untuk menghindari adanya kontaminasi satelit.

Koloni tunggal hasil transformasi dipindahkan pada cawan yang berisi medium baru seperti pada Gambar 3 (a), terdapat 16 koloni yang dapat tumbuh

dan
gan
baik
pada
med
ium
baru
.
Kol
oni
juga
ditu
mbu

hkan pada medium LB cair yang mengandung ampisilin. Hal ini dimaksudkan agar seleksi lebih akurat dan diperoleh koloni yang benar-benar mampu bertahan pada lingkungan dengan ampisilin (Gambar 3 (c)). Kultur terbaik dipilih berdasarkan hasil spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dalam rentang waktu 12 jam. Hasilnya digunakan untuk proses seleksi selanjutnya pada media LB Agar seperti pada Gambar 3 (b). Pada Gambar 3 (b) memperlihatkan seleksi dengan metode cawan gores atau streak plate. Metode cawan gores merupakan metode isolasi kualitatif yang menghasilkan isolat murni dengan tehnik pengenceran. Hasil pengenceran didapatkan isolat murni yang digunakan pada proses selanjutnya yaitu isolasi plasmid.

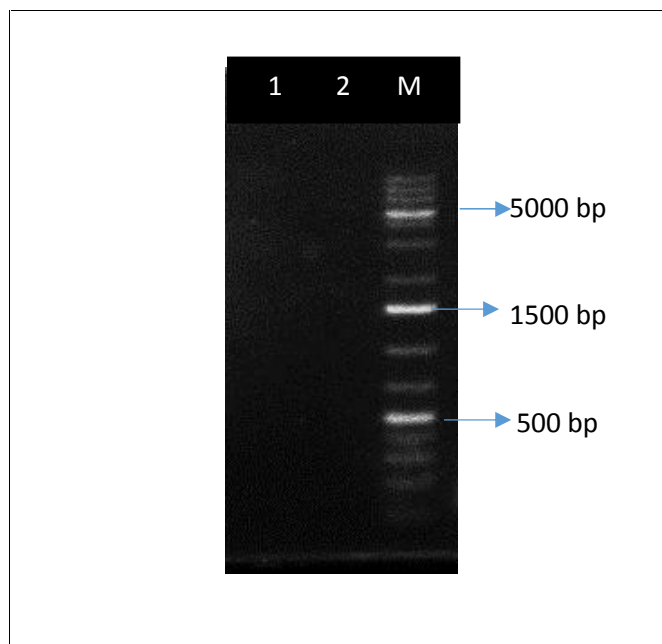


Gambar 3. Seleksi transforman. (a) seleksi ke-1 transforman (b) seleksi transforman dengan metode cawan gores kuadran (c) seleksi transforman pada media LB cair.

Isolat yang mengandung plasmid rekombinan pRHA pembawa *araA* diisolasi menggunakan metode *alkaline*

lysis solution. Isolasi plasmid pRHA::*araA* menggunakan *QIAprep Spin Miniprep Kit*.

Prinsip metode tersebut adalah melisiskan dinding sel bakteri dan memisahkan DNA plasmid dari DNA kromosom (Sambrook & Russel, 2001). Hasil isolasi plasmid rekombinan diperlihatkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Visualisasi isolasi plasmid rekombinan pRHA::*araA*. (1) isolat 1 (2) isolat 2 (3) marka DNA 1kb.

Visualisasi hasil isolasi plasmid rekombinan memperlihatkan tidak adanya pita yang berarti tidak ada plasmid yang berhasil diisolasi dari kultur. Seharusnya pita DNA terdapat pada ukuran sekitar 6500 bp. Hal ini berbeda dengan hasil seleksi dimana *E. coli* TOP'10 menunjukkan resistensi terhadap ampisilin. *E. coli* TOP'10 yang tidak ditransformasi dengan plasmid pRHAdigunakan sebagai kontrol negatif, sehingga dapat dipastikan bahwa sel inang tidak memiliki kemampuan resistensi dari awal. Kemampuan resistensi ini hanya mungkin diperoleh

dari plasmid. Resistensi bakteri merupakan bentuk pertahanan diri terhadap lingkungan, bakteri memperoleh kekebalan melalui akumulasi perubahan genetik selama proses duplikasi genom dengan salah satu mekanismenya mengkode gen yang menghasilkan enzim yang mengurai molekul antibiotik (Blair *et al.*, 2015).

Kemungkinan yang terjadi saat rekombinasi adalah gen resisten ampisilin dari plasmid pRHA masuk ke genom bakteri *E. coli* TOP'10 melalui *crossing over*. *Crossing over* atau pindah silang merupakan proses yang menyebabkan bagian homolog saling bertukar. Proses

pindah ini bisa merupakan pertukaran materi genetik karena terjadinya rekombinasi homolog. Rekombinasi homolog dapat mengubah suatu daerah yang besar pada genom pada bagian yang homolog satu sama lain (Alberts *et al.*, 2002). Dalam hal ini, insert gen resisten ampisilin dari plasmid pRHA berpindah ke kromosom *E. coli*. Kemudian saat isolasi plasmid rekombinan pRHA::*araA* menunjukk hasil negatif.

KESIMPULAN

Konstruksi plasmid pRHA sebagai pembawa gen *araA* penyandi enzim L-arabinosa isomerase yang berasal dari genom *Thermotoga thermarum* belum berhasil dilakukan. Hal ini terlihat dengan belum adanya plasmid rekombinan yang berhasil diisolasi dari *E. coli* TOP'10.

DAFTAR PUSTAKA

- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., dan Pidcock, L.J.V., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13: 42–51.
- Boyce, Sinead and Tipton Keith F. 2001. *Enzyme Classification and Nomenclature*. New York. Els. DOI: 10.1038
- Brown, T.A. 1991. *Gene Cloning an Introduction: Alih Bahasa oleh Soemiati Ahmad Muhammad*. Yayasan Essensia Media. Yogyakarta.
- Brown, T.A. 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis*. UK : Wiley – Blackwell.
- Buchholz Udo., Helen Bernard., Dirk Werber., Merle M. Böhmer, Cornelius Remschmidt., Hendrik Wilking., Yvonne Deleré, ., Matthias an der Heiden., Cornelia Adlhoch., Johannes Dreesman., Joachim Ehlers, Steen Ethelber., Mirko Faber., Christina Frank., Gerd Fricke., Matthias Greiner., Michael Höhl, Sofie Ivarsson, Uwe Jark., Markus Kirchner., Judith Koch, Gérard Krause, Petra Lubber, Bettina Rosner, Klaus Stark, and Michael Kühne. 2012. German Outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 Associated with Sprouts. *N Engl J Med* ; 365:1763-1770. DOI: 10.1056/NEJMoa1106482. England
- Chung, C.T., Suzanne L.N., Roger H.M. 1989. One-step Preparation of Competent *Escherichia coli* : Transformation and Storage of Bacterial Cells in The Same Solution. *Proc. Natl. Acad. Sci* 86 : 2172-2175
- Hariyatun. 2014. Kloning dan Ekspresi Gen Penyuka Fragmen Protein Intimin dari Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Skripsi. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Izumori, K. 2002. Bioproduction strategies for rare hexose sugars. *Naturwissenschaften*. 89(3):120-4
- Kim BC, YH Lee, HS Lee, DW Lee, EA Choe, YR Pyun. 2002. Cloning, expression and characterization of L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*: bioconversion of D-galactose to D-tagatose using the enzyme. *FEMS Microbiol Lett*. 212: 121–126.
- Kim BJ, Hong SH, Shin KC, Jo YS, Oh DK. 2014. Characterization of F280N varian of L-arabinose isomerase from *G. thermodenitricans* identified as a D-galactose isomerase. *Appl MicBiotech*. 98(22): 9271-81
- Kim HJ and Oh DK. 2005. Purification and characterization of an L-arabinose isomerase from an isolated strain of *G. thermodenitricans* producing D-tagatose. *J Biotechnol*. 120: 162-173.
- Kim P. 2004. Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a

- review and future perspective. *Appl Microb Biotech.* 65(3): 243–249
- Kuchel, P. And Ralston G. B. 2006. *Biokimia Schaum's Easy Outlines*, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Lehninger, Albert L. 1982. *Principle of Biochemistry*. Worth Publishers, New York. ISBN 0-87901-1-136
- Levin, G.V. 2002. Tagatose, the new GRAS sweeteners and health product. *J Med Food*. New York
- Liu, Xi., Sha Li, Hong Xu, Lingtian Wu, Zheng Xu, Jing Liu, and Xiaohai Feng. 2014. Efficient Production of D-Tagatose Using a Food-Grade Surface Display System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. China.
- Oh DK, Oh HJ, Kim HJ, Cheon J, Kim P. 2006. Modification of optimal pH in L-arabinose isomerase from *G. stearothermophilus* for D-tagatose isomerization. *J Mol Cat.* 43: 108-112.
- Rhimi, M. & Bejar, S. 2005. Cloning, purification and biochemical characterization of metallic-ions independent and thermoactive L-arabinose isomerase from the *Bacillus stearothermophilus* US100 strain. *Biochim Biophys Acta*, pp. 191–199
- Tobin JF and Schleif RF. 1987. Positive regulation of the *Escherichia coli* L-rhamnose operon is mediated by the products of tandemly repeated regulatory genes. *J Mol Biol.* 196: 789-799.
- Xu, Zheng., Sha Li, Fenggen Fu, Guixiang Li, Xiaohai Feng, Hong Xu, Pingkai Ouyang. 2011. Production of D-tagatose, a Functional Sweetener, Utilizing Alginate Immobilized *Lactobacillus Fermentum* CFMCC2921 Cells. *Application Biochemistry Biotechnology* 166:961-973. China.
- Zheng L, Baumann U, Reymond JL. 2004. An efficient one-step sitedirected and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* 32: 115.