Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.
Vol. 18, No. 6, 566-570 (1990)

Lactobacillus sporogenes 에서 β-galactosidase 생합성 조절

이정희 · 최용진*

고려대학교 농과대학 유전공학과

Regulation of β-galactosidase Biosynthesis in *Lactobacillus sporogenes*

Lee, Jung-Hee and Yong-Jin Choi*

Department of Genetic Engineering, College of Agriculture, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Regulation of β-galactosidase formation was studied with *Lactobacillus sporogenes*. Synthesis of the enzyme was effectively induced by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) or galactose, and to a much lower level by lactose. When 15 mM glucose was added at the different intervals to the cultures that had been in contact with IPTG, the same levels of inhibition of the enzyme synthesis were observed (approximately one-third the differential rate of a control culture without glucose). This suggests that glucose did not interfere with the entry of the inducer into the cells, but interfere with the formation of β-galactosidase through catabolite repression. The glucose inhibitory effect was not overcome by adding cAMP or cGMP to the culture media.

*Lactobacillus sporogenes*는 식품산업 응용에 적합한 최적 pH와 최적 온도 등 몇 가지 특성을 가지고 있는 세포외 β-galactosidase를 다량 생산하는 유포자 유산균이지만 그 효소합성조절에 대해서는 많이 알려져 있지 않다(1). 따라서 본 연구에서는 *L. sporogenes*에서 β-galactosidase 생합성의 repression과 induction 등에 관한 일련의 실험을 통해 그 효소합성 조절기작의 일부를 조사해 보았다.

재료 및 방법

시약

Isopropyl-β-thiogalactopyranoside(IPTG), o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG), adenosine-3′,5′-cyclic monophosphate(cAMP), guanosine-3′,5′-cyclic monophosphate(cGMP)는 Sigma Chemical Company 제품을, peptone, yeast extract는 Difco Laboratories 제품을 사용하였으며 기타 시약은 모두 시판하고 있는 특급 내지 일급시약을 사용하였다.

Key words: Regulation, β-galactosidase synthesis, *Lactobacillus sporogenes*, catabolite repression
*Corresponding author

균체의 증식

일동제약 중앙연구소로부터 분양받은 *L. sporogenes*는 PGY(Peptone-Glucose-Yeast extract) agar 배지에서 보존하였다. 이 종균 1백금이를 pH6.8인 PGY broth에 접종하여 45℃에서 10시간 진탕배양한 전배양액을 다시 PGY broth에 3%(v/v) 접종한 후 동일한 조건에서 12시간 진탕배양하였다.

β-galactosidase의 유도

배양액을 1000×g에서 15분간 원심분리하여 균체를 얻고, 이를 glycerol 0.3g, peptone 0.5g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1g, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.2g 및 KCl 0.01g을 증류수 100 ml에 용해시킨 후 pH7.0으로 맞춘 효소합성조절실험용 기초배지로 2회 세척하고 동일한 배지에 현탁시켰다. 이 현탁액에 β-galactosidase의 합성을 유도하기 위해

최종농도가 5 mM이 되도록 IPTG를 첨가하고 37℃에서 배양하였다.

β-galactosidase 활성측정

일정량의 배양액을 1000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 균체외 조효소액으로 사용하였다. β-galactosidase의 활성은 Lederberg의 방법을 개량하여 측정하였다(2). 즉 Chromogenic substrate인 ONPG를 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 8 mM되도록 용해한 기질용액 2 ml을 60℃에서 예온하고, 효소액 0.5 ml을 가하여 60℃에서 10분간 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위해 급냉시키면서 1 M Na_2CO_3을 2.5 ml 첨가하고 원심분리한 유리된 o-nitrophenol (ONP)의 양을 420 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 효소활성단위는 위 반응조건에서 1분 동안 1 μmole의 ONP을 생성하는 효소량을 1단위로 하였고, 효소역가는 ONP 표준곡선으로부터 계산하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 효과

β-galactosidase 생합성에 탄소원이 미치는 효과를 알아보기 위하여 lactose를 비롯한 여러 가지 탄소원을 조절실험용 기초배지에 10 mM씩 첨가한 배지를 사용하여 β-galactosidase 생산을 조사하여 보았다(Table 1). Lactose를 첨가한 경우 효소생산량은 1.00 units/A_{660}으로 가장 많은 것으로 나타나 Kim 등이 보고한 결과와 동일하였다(1). 또 galactose와 arabinose을 첨가할 경우에는 각각 0.65, 0.58 units/A_{660}으로 비교적 높은 효소생산을 나타냈으며, glucose를 첨가할 때는 0.14 units/A_{660}으로 가장 낮은 효소생산을 나타냈다. Citti 등은 *S. lactis*에서 비록 galactose가 lactose보다 효과적이지는 못하지만 β-galactosidase의 inducer가 될 수 있다고 보고하였다(3). 마찬가지로 *L. sporogenes*에서도 galactose가 β-galactosidase 생합성에 효과적인 inducer로 사용될 수 있으리라고 생각된다.

Table 1. Effect of various sugars on the β-galactosidase formation by *L. sporogenes*

Carbon source (10 mM)	Cell yield (A_{660})	Specific activity (Units/A_{660})
Arabinose	1.79	0.58
Fructose	1.71	0.82
Galactose	1.69	0.65
Glucose	1.61	0.14
Glycerol	1.74	0.28
Lactose	1.57	1.00
Maltose	1.49	0.20
Ribose	1.47	0.21
Sucrose	0.51	0.29
Xylose	1.81	0.24

The cells were grown in the basal medium prepared for the experiments on the regulation of the enzyme synthesis. Cultivation was done at 37°C with shaking for 36 hours.

Induction system의 조사

앞의 실험에서 galactose를 탄소원으로 하였을 때 비교적 많은 효소생산을 나타냈으므로 galactose의 효소생산 유도효과를 IPTG와 lactose의 유도효과와 비교하여 보았다(Fig. 1). 이 때 배양초기에는 오히려 galactose가 lactose보다 매우 효과적으로 β-galactosidase를 생성시키는 것으로 나타났다. 또한, 별도로 자료를 제공하지 않았지만 장기간의 배양실험에서는 galactose가 초기에 lactose보다 높은 효소생산을 나타내지만 시간이 지날수록 galactose는 급격한 효소생산의 감소를 나타내었고 lactose는 최고치에 도달한 후에도 계속 그 수준의 효소생산을 나타내었다.

일반적으로 대다수의 유산균의 경우 lactose는 phospho-β-galactosidase와 lactose-phosphoenolpyruvate phosphotransferase system (PTS) component 등에 의

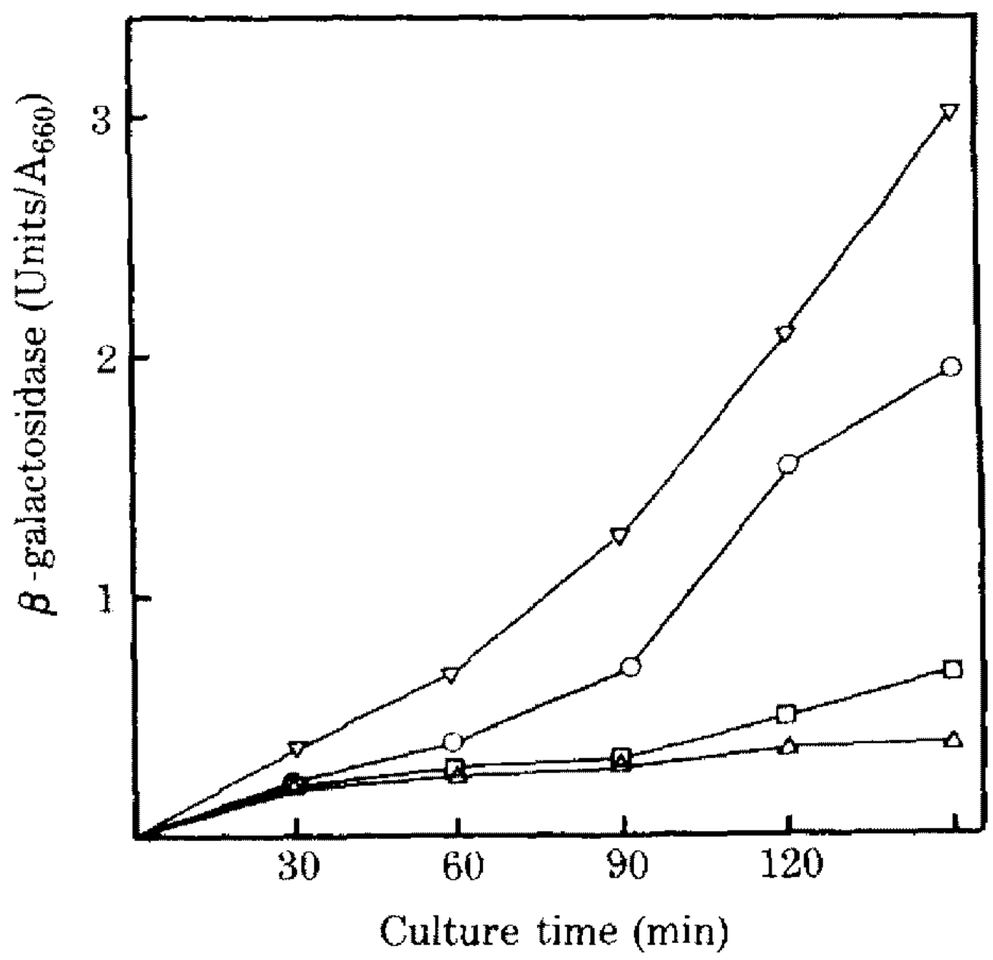

Fig. 1. Effect of various sugars on the induction of β-galactosidase of *L. sporogenes*.
The cells were grown in the basal medium. ▽, 5 mM IPTG; ○, 15 mM galactose; □, 15 mM lactose; △, 15 mM glycerol

해 대사되며, phospho-β-galactosidase와 lactose-PTS component들은 galactose-6-phosphate 또는 β-galactoside 등에 의해 유도된다는 사실이 알려졌다(4, 5). 그러나 Kim은 *L. sporogenes* BV2에서는 lactose-PTS와 galactose-PTS는 존재하지 않고 glucose-PTS만이 높은 역가로 존재한다고 보고하였다(6). 따라서 본 균주에서는 lactose와 galactose가 인산화되지 않은 상태로 세포내로 유입된다고 추측할 수 있다. 또 *E. coli*의 경우 lactose는 β-galactosidase에 의해 allolactose로 되고, 이 allolactose가 lactose operon의 natural inducer로 작용한다고 알려지고 있다(7). 그러나 본 실험에서 lactose가 galactose보다 오히려 낮은 유도효과를 나타내는 것으로 보아 *L. sporogenes*에서는 *E. coli*와는 달리 allolactose가 natural inducer로서의 강력한 효과는 나타내지 않는다고 추측할 수 있다. 또한 본 균주에서는 galactose-PTS가 존재하지 않으므로 galactose가 세포내로 유입될 때 인산화되지 않은 상태로 유입되며, 이 galactose는 Leloir 경로를 거쳐서 EMP로 연결된다고 생각되어진다. 그러므로 세포내에서 galactose-6-phosphate는 거의 생성되지 않고 galactokinase에 의해 galactose-1-phosphate가 중간대사물질로 많이 생성될 것으로 추측된다. 따라서 *L. sporogenes*의 β-galactosidase의 natural inducer는 galactose-1-phosphate나 galactose가 될 것으로 사료된다.

Table 2. Effect of various sugars on the synthesis of β-galactosidase induced by IPTG.

Carbon source (15 mM)	Specific activity (Units/A_{660})
Glyerol	2.79
Arabinose	3.78
Fructose	1.11
Galactose	2.48
Glucose	1.04
Lactose	3.84
Maltose	2.71
Ribose	3.87
Sucrose	4.10
Xylose	2.77

The cells were grown in the basal medium prepared for the experiments on the regulation of the enzyme synthesis. At the start of the experiment IPTG was added to a final concentration of 5 mM. Cultivation was done at 37°C with shaking for 2 hours.

Repression system의 조사

IPTG를 함유하는 조절실험용 기초배지에 여러 가지 다른 탄소원을 15 mM씩 첨가하고 2시간 동안 배양한 후 β-galactosidase의 생산량을 조사하였다(Table 2). 그 결과 arabinose, lactose, ribose, sucrose가 각각 3.79, 3.84, 3.81, 4.10 units/A_{660}으로 높은 효소생산을 나타내었으며, fructose와 glucose는 각각 1.11, 1.04 units/A_{660}으로 효소합성에 뚜렷한 저해효과를 나타내었다. 또 이와 같은 glucose에 의한 저해효과가 inducer의 세포내 유입이 방해됨으로서 일어나는지를 알아보기 위해 IPTG로 미리 유도시킨 후에 일정한 시간 간격으로 glucose를 첨가하여 β-galactosidase의 생산을 비교하여 보았다(Fig. 2). 그 결과 유도시키고 나서 5분, 10분, 15분 지난 후 glucose를 첨가한 것들이 모두 IPTG와 glucose를 동시에 첨가한 것과 동일한 저해효과를 나타냈다. *E. coli*에서는 glucose의 첨가시기가 늦을수록 뚜렷한 완화효과를 나타내어 glucose의 저해효과의 일부는 inducer exclusion에 의해서 일어난다고 인정되고 있다(8). 그러나 본 균주는 *E. coli*와는 달리 glucose의 저해효과가 inducer exclusion에 의한 것은 아닌 것으로 추측된다.

Tyler 등은 glycerol과 glucose가 함께 배지에 존재할 경우 glucose만이 배지에 존재하는 경우에는 없는 β-galactosidase의 일시적인 강력한 저해효과, 즉

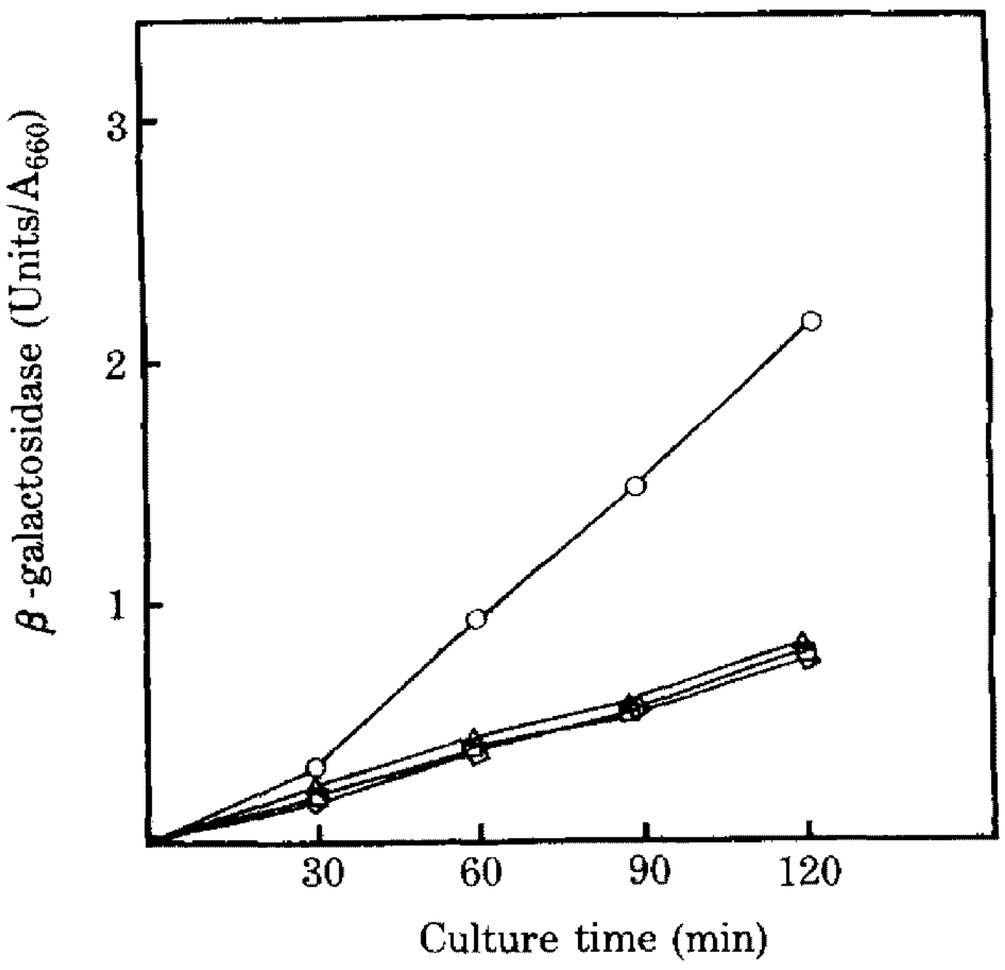

Fig. 2. Effect of glucose on the synthesis of β-galactosidase induced by 5 mM IPTG in *L. sporogenes*. The cells were grown in the basal medium. Glucose was added to a final concentration of 15 mM at various culture time after the start of induction by 5 mM IPTG. ○, No glucose added; △, 0 min; □, 5 min; ◇, 15 min

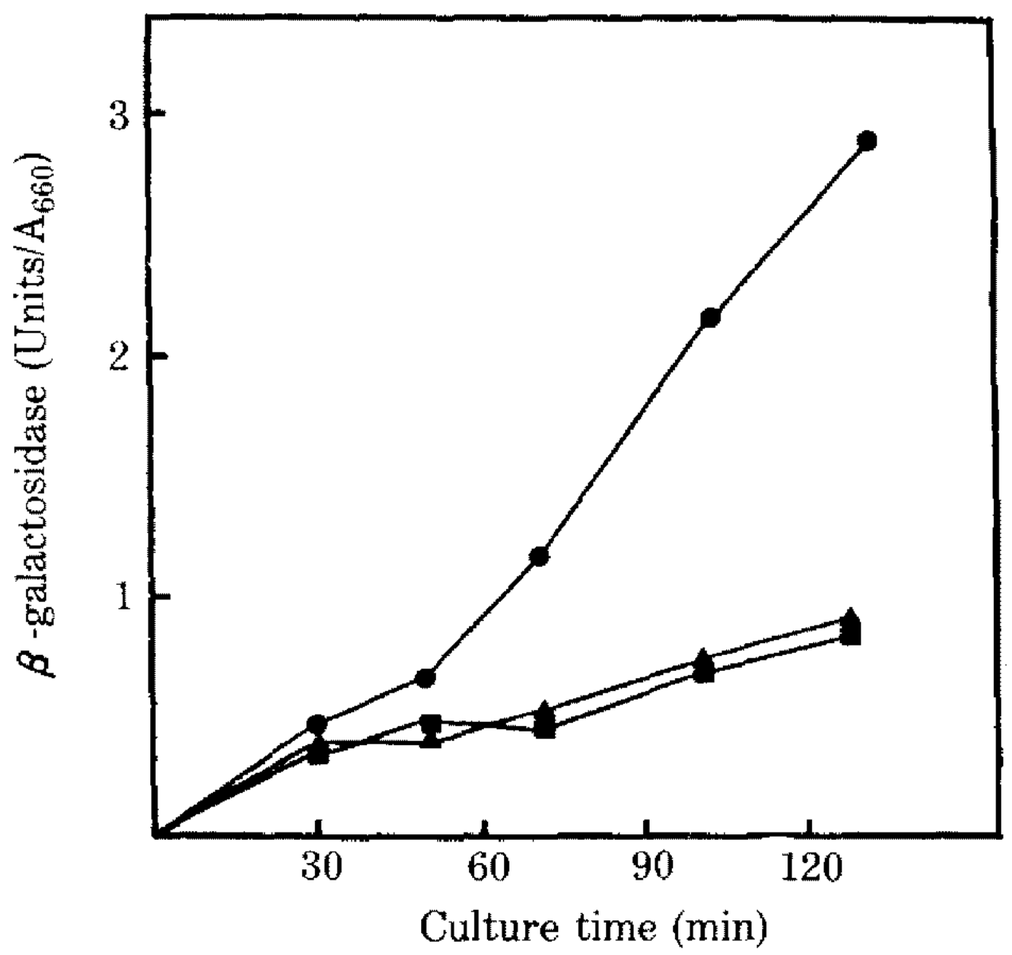

Fig. 3. Catabolite repression of β-galactosidase by glucose in *L. sporogenes*.
The cells were grown in the basal medium containing 5 mM IPTG. ●, 15 mM glycorol; ▲, 15 mM glucose; ■, 15 mM glycerol + 15 mM glucose

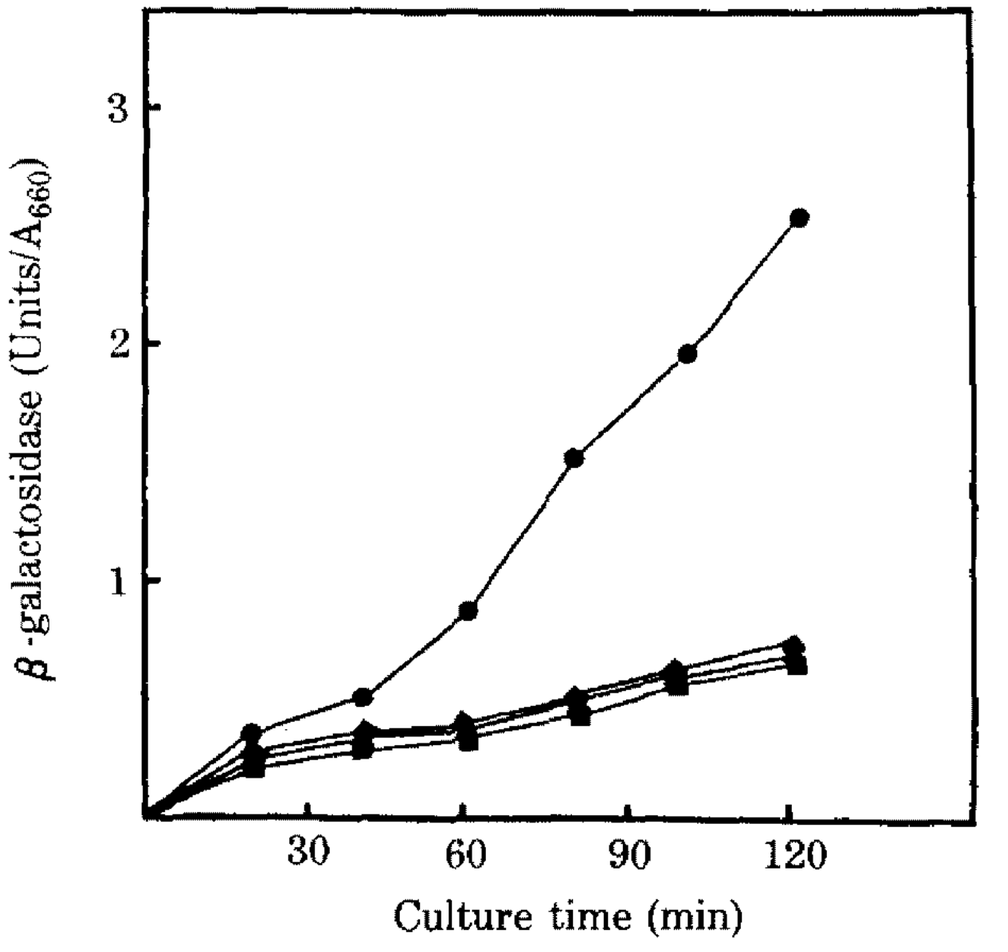

Fig. 4. Effect of cAMP and cGMP on the catabolite repression of β-galactosidase synthesis in *L. sporogenes*.
The cells were grown in the basal medium containing 5 mM IPTG. ●, 15 mM glycerol; ◆, 15 mM glucose; ▲, 15 mM glucose + 5 mM cAMP; ■, 15 mM glucose + 5 mM cGMP

transient repression을 보고하였다(9). 따라서 본 연구에서도 이를 알아보기 위해 IPTG가 함유된 조절실험용 배지에 glucose를 단독으로 혹은 glucose와 glycerol을 함께 첨가한 후 β-galactosidase의 생산을 조사하였다(Fig. 3). 그 결과 탄소원으로 glycerol만을 사용하는 경우에 비해 glucose만을 탄소원으로 사용하는 경우와 glucose와 glycerol을 동시에 탄소원으로 사용하는 경우 모두 상당히 낮은 효소생산을 나타내어 본 균주에서는 transient repression는 관찰되지 않았다.

Catabolite repression에 대한 cAMP의 효과

Glucose에 의한 저해효과는 일반적으로 cAMP의 첨가에 의해 완화될 수 있다고 보고되었으므로(10) 본 균주에서도 cAMP의 완화효과를 알아보는 실험을 실시하였다(Fig. 4). 그 결과 본 균주에서는 cAMP가 완화효과를 나타내지 못했으며, cGMP도 동일한 결과를 나타냈다. *Bacillus* 속 균주에서는 *E. coli*와 동일한 양상의 catabolite repression을 보이지만 *Bacillus* 균체내에서는 *E. coli*와는 달리 cAMP의 존재가 확인되지 않으며, adenylate cyclase의 활성도 검출되지 않는다고 Lopez 등은 보고하였다(11). *L. sporogenes*에서도 *Bacillus* 균주와 같이 cAMP가 관여하지 않는 어떤 기작에 의해 catabolite repression이 일어나는 것으로 추측되나 이를 확증하기 위해서는 cAMP의 세포내 유입실험 등 보다 많은 연구가 필요하다고 본다. 한편, Ullmann 등은 catabolite repression 현상이 나타나는 operon의 발현을 강하게 억제시키는 catabolite modulator factor(CMF)를 발견하고 cAMP는 CMF의 저해효과를 완화시키지 못함을 보고했다(12). 또 Daniel 등은 2-ketoglutarate를 첨가할 경우 β-galactosidase 생산의 강력한 저해가 일어나는 것으로 추측했다(13). 본 균주에서는 아직까지 CMF와 동일한 효과를 나타내는 물질이 발견되지 않았고, 2-katoglutarate의 저해효과도 발견되지 않았지만(자료제공하지 않았음) glucose의 저해효과가 cAMP에 의해 완화되지 못하는 이유가 단순히 cAMP가 세포내로 투과되지 못해서가 아니라면 CMF나 다른 catabolite repressor가 존재할 가능성이 있다고 사료된다.

요 약

*Lactobacillus sporogenes*에서 β-galactosidase의 생합성은 isopropyl-β-galactopyranoside(IPTG)나 galactose에 의해 효과적으로 유도되었으며 배양초기에는 lactose에 의해서도 훨씬 낮은 정도로 유도되었다. Glucose는 inducer exclusion이나 transient repression이 아닌 catabolite repression에 의해 β-galactosidase의 합성을 억제시킴을 알 수 있었다. 또한, glucose에 의한 β-galactosidase의 catabolite repression은

cAMP나 cGMP에 의해 전혀 완화되지 않았다.

참고문헌

1. Kim, Y.M., J.C. Lee, P.K. Chung, Y.J. Choi and H.C. Yang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **11,** 59 (1983).
2. Lederberg,J.: *J. Bacteriol.* **60,** 381 (1950)
3. Citti, J.E., W.E. Sandine and P.R. Elliker: *J. Bacteriol.* **89,** 987 (1965).
4. Morse, M.L., K.L. Hill, J.H. Egan and W. Hengstenberg: *J. Bacteriol.* **95,** 2270 (1968).
5. Chassy, B.M. and J. Thompson: *J. Bacteriol.* **154,** 1195 (1983).
6. 김태한 : 서울대학교 박사학위논문(1985).
7. Jobe, A. and S. Bourgeois: *J. Mol. Biol.* **69,** 387 (1972).
8. Cohn, M. and K. Horibata: *J. Bacteriol.* **78,** 601 (1959).
9. Tyler, B., W.F. Loomis, Jr. and B. Magasanik: *J. Bacteriol.* **94,** 2001 (1967).
10. Perlman, R.L., B.D. Crombrugghe and I. Pastan: *Nature,* **223,** 610 (1969).
11. Lopez, J.M. and B. Thomas: *J. Bacteriol.* **129,** 217 (1977).
12. Dessein, A., F. Tillier and A. Ullmann: *Molec. Gen. Genet.* **162,** 89 (1978).
13. Daniel, J. and A. Danchin: *Biochimie,* **68,** 303 (1986).

(Received September 6, 1990)