Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 27, No. 3, 260–265(1999)

*E. coli*에서 탄수화물원에 따른 Lactococcal β-galactosidase의 발현

류현주 · 장지윤 · 이형주[1] · 김정환[2] · 정대균[3] · 이종훈[4] · 장해춘*
조선대학교 식품영양학과, [1]서울대학교 식품공학과, [2]경상대학교 식품공학과,
[3]경희대학교 유전공학과 및 유전공학연구소, [4]경기대학교 식품생물공학과

Induction of Lactococcal β-Galactosidase in *E. coli*. Ryu, Hyun Ju, Ji Yun Chang, Hyong Joo Lee[1], Jeong Hwan Kim[2], Dae Kyun Chung[3], Jong Hoon Lee[4], and Hae Choon Chang*. *Department of Food and Nutrition, Chosun University, Kwangju 501-759. [1]Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, [2]Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 669-701, [3]Institude and Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Suwon 449-701, [4]Department of Foods and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea* –The structural β-galactosidase gene (*lacZ*) from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 7962 was cloned into plamid vector pKF18, which was designated as pKF-gal. Expression of the *lacZ* from *L. lactis* 7962 was found to be higher when cells were grown at 30 °C than 37 °C. Maximum β-galactosidase activity was obtained when *E. coli*/pKF-gal was cultivated for 6 hr at 30 °C and for 3 hr at 37 °C, and *L. lactis* 7962 was grown for 8 hr at 30 °C. Enzyme induction was achieved by the addition of lactose, galactose, or lactose+IPTG to growing culture. The addition of glucose had no effect on enzyme induction.

Key words : induction, β-galactosidase, *L. lactis* ssp. *lactis* 7962, *E. coli*

오랜 세월 동안 미생물에서의 β-galactosidase는 유도효소의 발현체계를 연구하는데 모델로 이용되어 왔다. Jacob와 Mond[14]가 *E. coli*로부터의 β-galactosidase는 유도효소(inducible enzyme)이며 이 효소의 합성은 유전적 조절에 의하여 이루어진다는 가설을 내세운 이래 광범위하게 생화학적, 유전학적 연구가 가장 많이 잘 이루어져 왔다[17, 31]. 그 이후 다른 많은 미생물에서의 β-galactosidase도 lactose 하에서 균을 배양하면 유도 효과(inducible)를 나타낸다는 보고들이 있었다[1, 3, 6, 13, 15, 16, 21, 24, 25, 29].

Bacteria에서 lactose의 대사경로는 크게 두 가지 경로로 나눌 수 있는데, 첫째는 β-galactoside permease에 의해 lactose가 세포 내로 이동되고 이것이 β-galactosidase에 의하여 glucose와 galactose로 가수분해된다는 것이고, 둘째는 lactose phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system(PEP-PTS)에서 phospho-β-galactosidase(p-β-gal)에 의하여 lactose가 glucose와 galactose-6-phosphate로 분해되는 경로이다[8]. Lactococci나 lactobacilli와 같은 낙농 유산균은 lactose를 일차적 에너지원으로 이용한다. 이때 대부분의 이들 미생물은 PEP-PTS를 통한 후자의 방법(p-β-gal)을 주로 사용하며, 이에 대한 생화학적, 유전학적 조절 체계 등에 대하여서는 잘 알려져 있다[2, 23]. 이에 반해 β-galactosidase permease에 의한 전자의 방법(β-gal)은 낙농유산균에서는 아주 드문 경우이기 때문에, 낙농 유산균으로부터의 β-galactosidase에 대한 생화학적 유전학적 연구 보고 역시 적은 편이다. 최근까지 보고된 바로는 고온성균인 *Streptococcus thermophilus*, lactobacilli로써 homofermentative인 *L. bulgaricus*와 *L. heliveticus*, heterofermentative인 *S. brevis*와 *L. buchneri*에 관한 보고로 정리할 수 있다[11, 12, 26]. 전통적으로 발효유제품에서 중요한 starter strain인 중온성 lactococci에서는 거의 대부분 p-β-galactosidase에 의한 lactose 대사체계를 갖고 있다. 그러나 특이하게 이 중 *L. lactis* 7962만은 β-galactosiadse 역가를 지니고 있으며[5, 9], 본 연구팀은 이 7962 균주로부터 β-galactosidase의 유전자를 cloning하고 그 DNA 염기서열을 밝혀 보고한 바 있다[4, 19]. 이와 아울러 본 연구에서는 7962의 structural β-galactosidase gene(pKF-gal)을 β-galactosidase의 역가가 없는 *E. coli*에서 발현시켜, 탄수화물 배지원에 따른 β-galactosidase의 유도효과 및 배양온도와 배양시간에 따른 β-galactosidase의 역가 차이를 알아보고자 하였다. 즉 모균주인 *L. lactis* ssp. *lactis* 7962와 더불어 pKF-gal을 지닌 *E. coli* 형질전환주를 각기 다른 탄수화물원, 배양시간 및 온도에서 배양하여, 이 때의 β-galactosidase에 대한 유도효과에 대하여 알아보고자 한다.

L. lactis ssp. *lactis* 7962[9]는 American Type Culture Collection(Rockville, Md)으로부터 구입하여 사용하였다. 균주의 계대는 30℃, M17 배지에서[28] 0.5%(w/v) glucose (M17-G) 또는 0.5%(w/v) lactose(M17-L)를 보충한 배지에

*Corresponding author
Tel. 82-62-230-7345, Fax. 82-62-234-4326
E-mail: hcchang@mail.chosun.ac.kr

서 행하였다. Cloning vector는 kanamycin 저항성을 지니는 pUC계열 vector인 pKF18[7]을 사용하였다. β-Galactosiadse 발현을 위한 형질전환에는 *E. coli* JM109[30]를 숙주세포로 사용하였다. *L. lactis* ssp. *lactis* 7962의 *lac* operon 중 β-galactosidase(*lacZ*)유전자의 양 끝에 *Sal* I 과 *Pst* I site를 PCR 에 의하여 만들어준 단편[18]을 pKF18[10] vector의 *Sal* I 과 *Pst* I site에 삽입하여 pKF-gal(pKF18+*lacZ*=5,246 bp)을 재구성하여, *E. coli* JM109에 Sambrook 등[27]에 의한 방법으로 형질전환시켰다. *L. lactis* 7962의 *lacZ* 유전자를 지닌 pKF-gal을 지닌 *E. coli* 형질전환체의 확인은 LB[20] 배지에 kanamycin(50 mg/ml), 5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-D-galactoside(X-gal, 40 μg/ml)와 0.2 mM isopropyl-β-D-thiogalacto pyronoside(IPTG)를 첨가한 배지에서 푸른색 col-ony를 형성하는 것으로 하였다. 푸른색 colony는 akaline lysis 방법[27]에 의하여 plasmid를 추출하여 7962의 *lacZ* 유전자의 삽입을 확인하였다. 동시에 이 형질전환주의 β-gal-actosidase역가는 Miller 방법[22]을 사용하여 7962의 *lacZ* 가 들어 있지 않는 *E. coli* JM109의 대조구와 함께 그 형질발현(β-galactosidase 역가 발현)을 확인하였다(data not shown).

pKF-gal을 지닌 *E. coli* JM109는 50 μg/ml의 kanamycin이 첨가된 LB 배지에서 30 °C와 37 °C에서 각각 진탕 배양하였다. 이때 각각의 탄수화물원에 따른 β-galactosidase의 역가를 알아보기 위하여 동배지에 2%(w/v) glucose, 2%(w/v) galactose, 2%(w/v) lactose, 0.2 mM IPTG, 그리고 2% lactose와 0.2 mM IPTG를 첨가한 각각의 배지에서 *E. coli* 형질전환주를 배양하였다. 모든 배양은 Km(50 μg/ml)을 첨가한 각각의 배지에서 하룻밤 전배양을 실시한 후, 각각의 50 ml배지에 전배양액을 1%접종하여 12시간 동안 배양하였다. 이때 매 3시간마다 그때의 cell양과 β-galactosidase의 역가를 측정하였다.

모균주인 *L. lactis* 7962의 배양은 기본배지로는 M17배지를 사용하였으며, 이때 0.5%(w/v) glucose, 0.5%(w/v) galactose, 0.5%(w/v) lactose, 0.2 mM IPTG, 그리고 0.5% lactose+0.2 mM IPTG를 기본배지인 M17에 첨가한 배지를 각각 전배양과 본배양시 사용하였다. 7962의 배양은 위 배지조건하에서 30 °C에서 각각 정치 배양하였으며, 총 12시간동안 매 4시간마다의 cell양과 β-galactosidase의 역가를 측정하였다.

β-Galactosidase의 역가는 Miller의 방법[22]을 약간 변형하여 사용하였다. 배양이 끝난 균체는 Sorval SS-34 rotor를 사용하여 4 °C, 5,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 균체만을 모은 후 Z완충액(60 mM Na_2HPO_4, 40 mM NaH_2PO_4, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 5 mM β-mercaptoethanol, pH 7.0)에서 2번 씻은 후 현탁하여 1 ml으로 만든다. 0.1%(w/v) SDS 50 μl와 chloroform 두 방울을 넣고 5초 동안 완전히 섞은 다음 28 °C에서 5분 동안 방치시킨다. *o*-nitrophenyl-D-galactopyranoside(ONPG)용액(4 mg/ml)을 200 μl 넣고 노란색이 나타나면 이때의 반응시간을 기록하고, 1 M Na_2CO_3 500 μl를 넣어 반응을 중지시킨다. 최종 반응물에서 빛을 산란시키는 세포찌기는 원심분리(12,000×g, 5분)하여 제거한 후 420 nm에서 흡광도를 재었다. β-Galactosidase 역가는 다음과 같이 계산하였다.

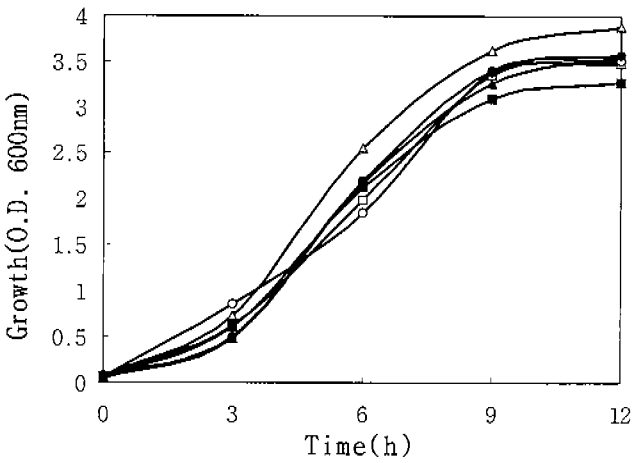

Fig. 1. Growth curve of *E. coli*/pKF-gal at 30 °C.
The cell was grown on LB media containing none(□), 2% glucose(■), 2% galactose(△), 2% lactose(▲), 0.2 mM IPTG(○), and 2% lactose+0.2 mM IPTG(●).

· Activity

$$\text{Units} = 1,000 \times \frac{A_{420}}{V \times t \times A_{600}}$$

A_{420} : 420 nm에서 흡광도
A_{600} : 600 nm에서 V의 흡광도
V : 배양액의 총 부피
t : 역가 측정에 소요된 반응시간

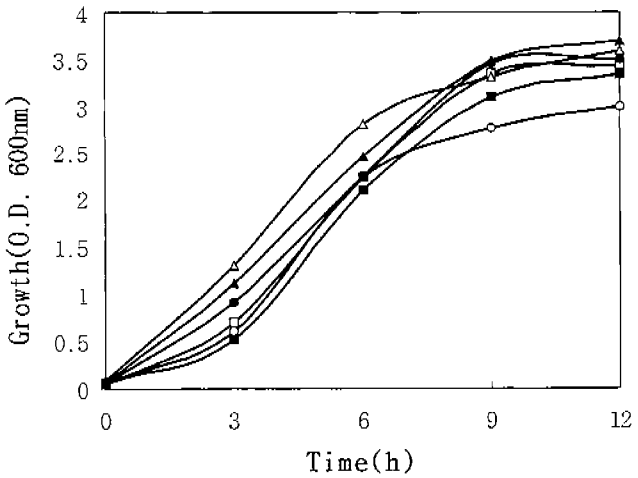

Fig. 2. Growth curve of *E. coli*/pKF-gal at 37 °C.
The cell was grown on LB media containing none(□), 2% glucose(■), 2% galactose(△), 2% lactose(▲), 0.2 mM IPTG(○), and 2% lactose+0.2 mM IPTG(●).

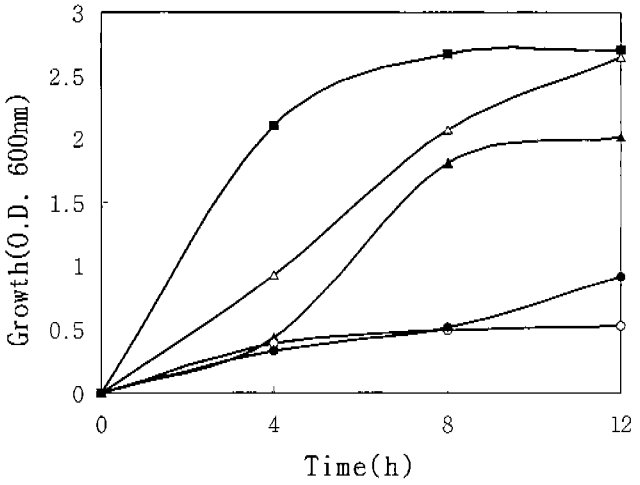

Fig. 3. Growth curve of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 7962 at 30 °C.
The cell was grown on M17 media containing 0.5% glucose(■), 0.5% galactose(△), 0.5% lactose(▲), 0.2 mM IPTG(○), and 0.5% lactose+0.2 mM IPTG(●).

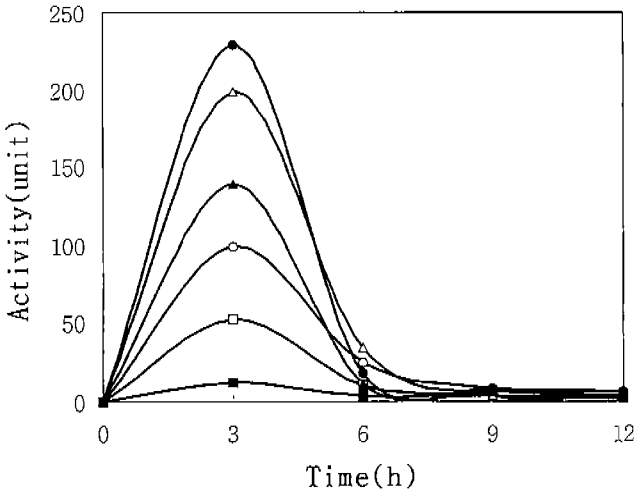

Fig. 5. β-Galactosidase activity from *E. coli*/pKF-gal at 37 °C cultivation.
The cell was grown on LB media containing none(□), 2% glucose(■), 2% galactose(△), 2% lactose(▲), 0.2 mM IPTG(○), and 2% lactose+0.2 mM IPTG(●).

LB기본 배지와 여기에 2% glucose, galactose, lactose, 0.2 mM IPTG, 그리고 0.2 mM IPTG+2% lactose를 첨가한 배지에서 pKF-gal을 지닌 *E. coli* 형질전환주(*E. coli*/pKF-gal)를 30 °C(Fig.1)와 37 °C(Fig.2)에서 각각 배양하였다. 각 배지에서의 생육곡선을 살펴보면, 약 9시간만에 생육정지기에 이르며, 배양온도(30°C와 37 °C)에 따른 균체의 생육패턴은 별 차이점이 없었다. 다만 37 °C배양이 30 °C배양에서 보다 더 빠른 생장율을 보였으나, 최종 정지기에서는 거의 비슷한 균 성장 양상을 나타내었다.

L. lactis ssp. *lactis* 7962를 M17배지를 기본 배지로 하고 30 °C에서 0.5% glucose, galactose, lactose, 0.2 mM IPTG 또는 0.2 mM IPTG와 0.5% lactose를 혼합한 배지에서 생육시켰을 때는 탄수화물 영양원에 따라 각기 다른 생육곡선을 나타내었다(Fig. 3). Glucose 배지에서 가장 빠르고 높은 균 성장을 보였으며, 그 다음은 galactose, lactose 배지 순으로 나타났다. Lactose+IPTG나 IPTG를 M17에 첨가한 배지에서는 아주 낮은 성장률을 보였다.

30 °C에서 다양한 탄수화물배지원에 따라 *E. coli*/pKF-gal을 배양하였을 때 발현된 β-galactosidase의 역가를 매 3시간마다 측정하였다(Fig. 4). 30 °C에서 배양된 cell의 β-galactosidase 역가를 살펴보면 전체적으로 대수기 중기에 해당하는 배양시간 6시간째에 최고의 역가를 나타내었으며, 이 시간 이후에는 차츰 감소하여 정지기때는 배양 6시간째의 약 80%정도의 효소 활성을 나타내었다. 탄수화물원에 따른 유도효과는 lactose+IPTG, lactose, IPTG, galactose 순으로 높게 나타났다. 기본배지인 LB 배지나 여기에 glucose를 첨가한 경우에는 아주 낮은 역가를 나타내어, β-galactosidase에 대한 유도효과는 없는 것으로 나타났다.

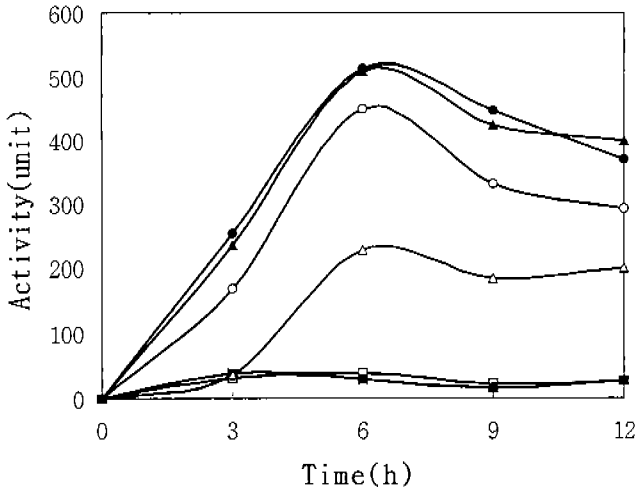

Fig. 4. β-Galactosidase activity from *E. coli*/pKF-gal at 30 °C cultivation.
The cell was grown on LB media containing none(□), 2% glucose(■), 2% galactose(△), 2% lactose(▲), 0.2 mM IPTG(○), and 2% lactose+0.2 mM IPTG(●).

배양온도가 37 °C인 경우에도 탄수화물배지원에 따라 역가 차이는 있으나 탄수화물원에 상관없이 전체적으로 대수기 초기에 해당하는 배양 3시간째에 최고의 역가를 나타내다가 그 이후에 급격히 역가가 소실되는 패턴으로 나타났다(Fig. 5). 37 °C에서의 탄수화물원에 따른 유도효과는 lactose +IPTG가 역시 가장 컸으며, galactose, lactose, IPTG, LB 기본배지, glucose 순으로 높게 나타났으나, 효소의 역가가 배양시간에 따라 안정되게 유지되지 못하므로 탄수화물원에 따른 유도효과의 차이를 결정하기에는 다소 어려운 듯 하였다.

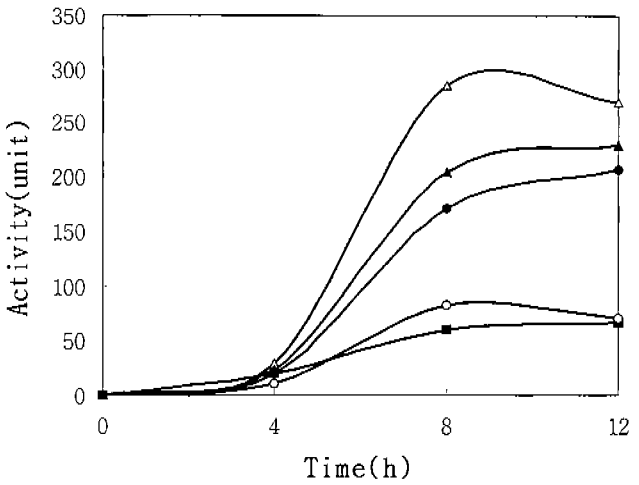

Fig. 6. β-Galactosidase activity from *Lactococcus lactis* 7962 at 30 °C cultivation.
The cell was grown on M17 media containing 0.5% glucose(■), 0.5% galactose(△), 0.5% lactose(▲), 0.2 mM IPTG(○), and 0.5% lactose+0.2 mM IPTG(●).

30 °C에서 배양한 *L. lactis* 7962의 경우에는 배양 8시간 때에 가장 안정되고 높은 효소역가를 나타내었다가, 그 이후 탄수화물원에 따라 약간 감소하기도 하였으나 비교적 안정되게 그 활성을 유지하였다(Fig. 6). 탄수화물원에 따라서는 galactose가 가장 높은 유도 효과를 나타내었으며, 그 다음으로 lactose, lactose+IPTG, IPTG, glucose 순으로 나타났다.

배양시간과 배양온도에 따른 활성을 살펴보면, *Lactococcus lactis* 7962의 β-galactosidase 유전자를 *E. coli*에서 발현시켰을 때(*E. coli*/pKF-gal), 37 °C에서 보다 30 °C 배양에서 더 높고 안정된 효소 활성을 나타냄을 알 수 있었다(최대 역가 기준시; 30 °C : 520 units, 37 °C : 230 units). 배양시간에 따라서 β-galactosidase의 활성은 조금씩 차이가 있어서, *E. coli*/pKF-gal을 30 °C 배양시는 6시간 때, 37 °C 배양시는 3시간만에 그리고 모균주인 *L. lactis* 7962는 8시간 때에 각각의 cell부터의 β-galactosidase는 최대의 활성을 나타내었다. 특히 7962의 β-galactosidase를 지닌 *E. coli*를 37 °C에서 발현시켰을 때는 배양시간에 따른 역가의 차이가 굉장히 커서, 배양 3시간이 지나고 나면 급격히 그 역가가 떨어지게 나타났다. 균의 성장정도는 30 °C, 37 °C에서 큰 차이가 없었으나 β-galactosidase의 역가는 전체적으로 37 °C가 30 °C보다 더 낮았으며, 그 역가도 불안정하여 배양시간에 따라 대수기 초기에 잠깐 역가가 나타났다가, 그 이후부터는 급격히 감소함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 β-gal-actosidase발현이 온도에 영향을 받는 것으로 사료되어진다.

본 실험에서는 7962가 지닌 전체 *lac* operon중 lactose를 glucose와 galactose로 분해하는 β-galactosidase 구조 유전자만을 분리하여, *E. coli* JM109에서 발현시켜 다양한 탄수화물원에 따른 유도효과를 모균주인 *L. lactis*와 비교하여 살펴보았다.

30 °C에서 탄수화물원에 따른 유도효과를 살펴보면, 모균주인 7962에서는 galactose가 가장 높은 유도효과를 나타내었고 그 다음은 lactose, lactose+IPTG인데 비하여, 7962의 β-galactosidase(*lacZ*)유전자를 지닌 *E. coli*에서는 lactose+IPTG, lactose, IPTG가 galactose보다 더 높은 유도효과를 나타내었다. Glucose는 모균주인 7962와 *lacZ*유전자를 지닌 형질전환주인 *E. coli*에서 모두 균 생육은 잘 이루어지나 효소활성에는 아무런 유도효과를 일으키지 일으키지 못하는 것으로 나타냈다. 이러한 현상은 기존의 다른 연구결과와 일치하는 현상이다. 즉 glucose는 많은 미생물이 선호하는 탄소원이나 이 균주를 glucose가 있는 배지에서 배양하였을 때 그 균주가 지닌 유도효소는 유도(induce)될 수 없는데 이러한 현상을 carbon catabolite repression이라 한다[20]. 보고에 의하면 이러한 glucose의 저해 현상은 발현되는 미생물에 따라 조금씩 차이가 있어, *E. coli*나 *S. lactis*에서는 심각한 저해를 받으나[5, 20], *Kluyveromyces lactis*의 경우에서는 *E. coli*에서 만큼도 심각하지 않는 것으로 나타났다[7]. 기존의 보고들에 따르면 각 탄수화물원의 β-galactosidase에 대한 유도 효과는 균종에 따라 다른데 galactose의 경우 *E. coli*[15]와 *S. sonnei*[6]에서는 그다지 큰 유도효과를 못 일으키나 *S. aureus*에서는 lactose보다도 더 큰 유도효과를 나타내었다[21]. Thiogalactoside인 IPTG는 *E. coli*에서는 효소활성에 효과적인 유도물질로 작용하였으나[13], *K. lactis*[7]나 *S. lactis*[5]에서는 별 효과를 나타내지 못하는 것으로 나타났다. 탄수화물원에 따른 유도효과는 전배양의 탄수화물원에 따라서도 달라질 수 있는데, 7962 균주를 M17-glucose배지에서 전배양을 하고 각각의 다른 탄수화물원에서 본배양을 하여 유도효과를 본 경우[32]와 전배양과 본배양을 동일한 탄수화물원배지에서 배양하여(this study) 탄수화물원에 따른 유도효과를 알아보았을 때 전자는 lactose가 후자는 galac-tose가 조금씩 높은 것으로 나타났다. 이는 전배양을 통한 대사산물들이 본배양에서의 β-galactosidase 발현에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

본 실험에서의 결과에 따르면 모균주의 전체 *lac* operon 중 *lacZ* 유전자만을 *E. coli*에 옮겨놓았을 경우에 7962의 β-galactosidase는 lactose를 glucose와 lactose로 분해하는 역할만 수행하고 나머지 대사 체계는 숙주인 *E. coli*의 체계를 따르므로 모균주인 7962에서는 galactose가 β-galactosidase에 대해 가장 유도효과가 컸으나, 이 β-galactosidase를 *E. coli*에 옮겨와서 발현시켰을 때는 *E. coli*에서 보다 효율적인 유도물질인 lactose나 IPTG가 galactose보다 그 유도효과가 크게 나타났다. 이는 lactose의 대사가 *lacZ*구조유전자에만 의한 것이 아니라 전체 lac operon유전자와 발현되는 숙주세포의 cell permeability 차이 등에 의해 결정되기 때문일 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구비(97-04-02-03-03-3)에 의하여 수행된 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Anderson, J. M. and H. V. Rickenberg. 1960. β-Galactosidase of *Paracolobactrum aerogenoides*. *J. Bacteriol.* **80**: 297–304.
2. Boizet, B., D. Villeval, P. Slos, M. Novel, G. Novel, and A. Mercenier. 1988. Isolation and structural analysis of the phospho-β-galactosidase from *Streptococcus lactis* Z268. *Gene* **62**: 249–261.
3. Burchhardt, G. and H. Bahl. 1991. Cloning and analysis of the β-galactosidase-encoding gene from *Clostridium thermosulfurogenes* EM1. *Gene* **106**: 13–19.
4. Chang, H. C., Y. D. Choi, and H. J. Lee. 1996. Molecular cloning of β-D-galactosidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 7962. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 386–390.
5. Citti, J. E., W. E. Sandine, and P. R. Elliker 1965. β-Galactosidase of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **89**: 937–942.
6. Clausen, C. R. and M. Nakanamura. 1963. β-Galactosidase of *Shigella sonnei*. *Nature* **197**: 570–573.
7. Dickson, R. C. and J. S. Markin 1980. Physiological studies of β-galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **142**: 777–785.
8. Dills, S. S., A. Apperson, M. R. Schmidt, and M. H. Saier, Jr. 1980. Carbohydrate transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **44**: 385–418.
9. Gui, J. E., W. E. Sandine, and P. R. Elliker. 1965. β-Galactosidase of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **89**: 937–942.
10. Hashimoto-Gotoh, T., K. Yasojima, and A. Tsujimura. 1995. Plasmids with a kamamycin-resistance gene for site directed mutagenesis using the oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method. *Gene* **167**: 333–334.
11. Hickey, M. W., A. J. Hillier, and G. R. Jago. 1986. Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 825–831.
12. Hutkins, R., H. A. Morris, and L. L. Mckay. 1985. Galactose transport in *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 772–776.
13. Jobe, A. and S. Bourgeois. 1972. *Lac* repressor-operator interaction. VI. The natural inducer of the *lac* operon. *J. Mol. Biol.* **69**: 397–408
14. Jocob, F. and F. Monod. 1961. On the regulation of gene activity. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**: 93. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A
15. Koppel, J. L., C. J. Porter, and B. F. Croker. 1953. The mechanism of the synthesis of enzymes. I. Development of a system suitable for studying this phenomenon. *J. Gen. Physiol.* **36**: 703–722.
16. Landman, O. 1957. Properties and induction of β-galactosidase in *Bacillus megaterium*. *Biochem. Biophys. Acta* **23**: 558–569.
17. Langridge, J. 1968. Genetic and enzymatic experiments relating to the tertiary structure of β-galactosidase. *J. Bacteriol.* **96**: 1711–1717.
18. Lee, J. M. 1997. Characterization of β-galactosidase gene from *L. lactis* ssp. *lactis* 7962. *M.S. Thesis.* Seoul National University.
19. Lee, J. M., D. K. Chung, J. H. Park, W. K. Lee, H. C. Chang, J. H. Kim, and H. J. Lee. 1997. Cloning and nucleotide sequence of the β-galactosidase gene from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962. *Biotechnol. Letters* **29**: 179–183.
20. Magasanik, B. 1970. Glucose effects: Inducer exclusion and repression, pp. 189–219. *In* J. R. Beckwith and D. Zipser(eds.), *The Lactose Operon.* Cold Spring Harbor Labortory, Cold Spring Harbor, NY.
21. McClatchy, J. K. and E. D. Rosenblum. 1963. Induction of lactose utilization in *Streptococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **86**: 1211–1215
22. Miller, J. H. 1972. *Experiment in Molecular Genetics,* pp. 47–55. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A
23. Porter. E. V. and B. M. Chassy. 1988. Nucleotide sequence of the β-D-phosphogalactoside galactohydrolase gene of *Lactobacillus casei*; Comparison to analogous *pbg* genes of other Gram positive organisms. *Gene* **62**: 263–276.
24. Priyoldar, M., C. K. K. Nair, and D. S. Pradhan. 1989. Purification and characterization of an inducible β-gal-actosidase from *Corynebacterium murisepticum*. *Arch. Microbiol.* **151**: 49–53.
25. Rickenberg, H. V. 1960. Occurence of β-galactosidase in the genus *Shigella*. *J. Bacteriol.* **80**: 421–422.
26. Romano, A. H., G. Brino, A. Peterkofsky, and J. Reizer. 1987. Regulation of β-galactosidase transport and accumulation in heterofermentative lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* **169**: 5589–5596.
27. Sambrook, J., E. Fritsch, and J. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual,* 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A
28. Terzaghi, B. E. and W. E. Sandine. 1975. Improved medium for lactic *Streptococci* and their bacteriophage. *Appl. Environ. Microbiol.* **29**: 803–813.
29. Vakil, J. R. and K. M. Shahani, 1962. Different pathways of lactose metabolism of *Streptococcus lactis* and their sensitivity to antibiotics. *J. Dairy Sci.* **45**: 655.
30. Yanisch-Perron, C., J. Vierira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103–119.

lactose permease protein and thiogalactoside transacetylase, pp. 89–121. *In* J. Miller and W. S. Reznikoff (eds.), *The Operon.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

32. Vaughan, E. E., R. D. Pridmore, and B. Mollet. 1998. Transcriptional regulation and evolution of lactose genes in the galactose-lactose operon of *Lactococcus lactis* NCDO 2054. *J. Bacteriol.* **180**: 4893–4902.

(Received Junuary 30, 1999)