

*Candida kefyr*의 β -D-galactosidase 合成誘導에 關한 研究(I)

全 順 培

全南大學校 自然科學大學 生物學科

Studies On Induction of β -D-galactosidase In *Candida kefyr*

Chun, Soon-Bai

(Department of Biology, College of Natural Sciences, Chonnam University)

ABSTRACT

This examined some conditions for the induction of β -D-galactosidase synthesis in *Candida kefyr* CBS 834. The optimal pH, temperature, and inoculum size either for growth or β -D-galactosidase synthesis were 5.5, 30°C and above 0.2 at A610nm, respectively. Enzyme activity began to increase at 2h after the addition of inducer, and continued to increase linearly up to 2~3h before reaching stationary phase, and thereafter its activity was decreased. β -D-galactosidase was induced either by lactose or galactose but not either by glucose or ethanol. The greater activity of β -D-galactosidase on galactose than on lactose indicated that the former might be a natural inducer for β -D-galactosidase synthesis. The rate of its induction as a function of lactose concentration showed that enzyme activity increased linearly above 4mM, while it was very low below that. Glucose repressed the induction of β -D-galactosidase, and the period of adaptation to inducer from other carbon sources was relatively short.

緒 論

*Candida kefyr*는 *Kluyveromyce fragilis*, *K. lactis* 그리고 *Candida pseudotropicalis*에서와 같이 lactose를 에너지源 및 炭素源으로 利用할 수 있는 出芽酵母이다(Lodder, 1970). lactose는 β -D-galactosidase에 의하여 glucose와 galactose로 加水分解되며 lactose의 利用에는 β -D-galactosidase의 活性과 lactose運搬系의 誘導가 要求된다(Dickson et al., 1979; Dickson & Markin, 1980; Dickson & Barr, 1983; Pedrique & Castillo, 1982).

lactose에 依한 β -D-galactosidase의 誘導에 걸리는 時間은 *K. fragilis*, *K. lactis*, 그리고 *C. pseudotropicalis*에서는 짧았지만 *Saccharomyces chevalie*의 galactozymase처럼 매우 긴 것도 있었다(Spiegelman et al., 1950). 그런데 *C. kefyr* CBS 834는 lactose上에서 生長이 느리기 때문에

β -D-galactosidase의 合成誘導에 걸리는 時間도 길 것으로 豫想된다. 따라서 *K. fragilis*, *K. lactis*, 그리고 *C. pseudotropicalis*들과는 誘導物質의 運搬 및 酵素合成 誘導機作에 있어서 差異點이 있을 것으로 본다. 上記 3種에 關해서는 制限의이기는 하지만 이에 關連된 研究報告가 있다(Davies, 1956; Dickson & Markin, 1980; Pedrique & Castillo, 1982; Dickson & Barr, 1983). 그러나 *Candida kefyr*에 對해서는 위와 關係된 研究 報告가 없었다. 本研究에서는 上記 種에 對한 β -D-galactosidase 合成機作에 對하여 보다 詳細하게 研究를 하기 爲한 基礎資料를 얻고자 β -D-galactosidase 合成에 對한 몇 가지 條件을 調査하였다.

材料 및 方法

1. 使用 微生物 및 培地

Candida kefyr CBS 834는 Holland의 CBS로

부터 求入하여 2% lactose와 2% glucose 含有 YM 寒天培地上에서 保存하였고 繼代培養은 2個月 間隔으로 하여 4°C에서 保存하였다. 本實驗에 使用된 培地로서는 K_2HPO_4 , 0.3% (w/v); yeast extract, 0.5% (w/v)인 D培地와 Difco laboratories의 指針書에 表示된 量을 2배로 調製한 YNB를 使用하였다. 培地の pH는 1N NaOH와 1N HCl로 調整하였다.

2. 培養條件

Batch培養은 培養液 50ml가 든 솜마개를 한 250ml들이 Erlenmyer flask에서 實施하였다. 菌의 接種은 pH 4.5로 맞춘 D培地를 使用하여 30°C의 往復 震盪器(120strokes/min)에서 後期代數期까지 前培養한 酵母 현탁액을 炭素源이 없는 2×YNB溶液으로 洗滌한 다음 所定の 細胞濃度로 맞추어 恒溫水槽 震盪器(Forma Scientific Co.)를 利用, 2×YNB培地에서 培養하였으며 接種量의 크기 및 酵素合成에 關한 實驗條件은 fermentor (New Brunswick Bioflow Model C-30)에서 교반속도, 6000rpm/min; aeration rate, 30volume/min; 溫度, 30±1°C; 作動 volume 250ml이었고 pH는 自動調節器(New Brunswick Co.)를 使用 1N NaOH로 소정의 pH로 調整하였다.

3. 酵素의 定量

β -D-galactosidase의 定量은 O-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG)를 基質로 하여 分光光度計法으로 하였고 酵素의 抽出 및 定量條件은 아래와 같이 實施하였다. 酵母현탁액 1ml을 取해, 0.1M potassium phosphate; 10mM KCl; 1mM $MgSO_4$; 0.1mM $MnCl_2$ 그리고 50mM 2-mercapto ethanol을 含有한 緩衝溶液(pH 7.0), 1ml와 混合한 다음 1.2ml toluene을 加해 15~20秒間 tubemixer에서 교반한 다음 30°C에서 80分間 震盪시켰다(Dickson & Markin, 1980). 上記 混合液에 0.8ml (4mg/ml 水溶液) ONPG를 加해 30°C에서 30分間 反應시킨 다음 1M Na_2CO_3 0.2 ml로 酵素反應을 停止시킨후 5000×g에서 遠心 分離시킨 다음 上澄液中에 生成된 O-nitrophenol 量을 A420nm에서 測定한 吸光度를 가지고 미리 작성된 檢量線에 依해 환산하여 計算하였다. 酵素의 活性單位는 μ mole O-nitrophenol/min/ml 이었고 이 條件下에서의 分子吸光係數는 $4.0 \times$

$10^{-3}M$ 이었다.

4. 生長量의 測定

生長量은 A610nm에서 測定한 吸光度로서 細胞濃度를 表示하였다. 吸光度值가 0.7以上인 경우에는 희석하였고, 酵母현탁액 ml當 蛋白質量과 乾燥量 및 細胞數와 吸光度와의 關係는 거의 直線의 關係를 보여주었다.

5. 其他 定量

蛋白質量은 Lowry (1951)法에 依하였고 lactose量은 Nickerson (1975)의 方法에 따랐다.

結 果

1. pH 및 溫度가 *C. kefyr*의 生長에 미치는 영향
lactose를 에너지源 및 炭素源으로 한 2×YNB 上에서 pH別 生長率을 보면 pH 4.0~5.5 사이에서 生長이 좋았으며 溫度는 30°C를 頂點으로 其 以下나 以上에서는 生長의 底下를 볼 수 있었다(Fig. 1, 2).

2. 接種量의 크기가 *C. kefyr*의 生長 및 β -D-galactosidase 合成猶豫期間에 미치는 영향
lactose上에서 *C. kefyr*의 β -D-galactoside合成 誘導 및 生長猶豫時間을 보면 pH 5.5가 生長이나 酵素合成에 適合함을 볼 수 있었다(Table 1). 그래서 pH 5.5, 溫度 30±1°C로 維持된 fermentor에서 batch培養을 實施하였다. 接種量의 크기에 따른 生長, 酵素誘導時間, 그리고 그의 活性

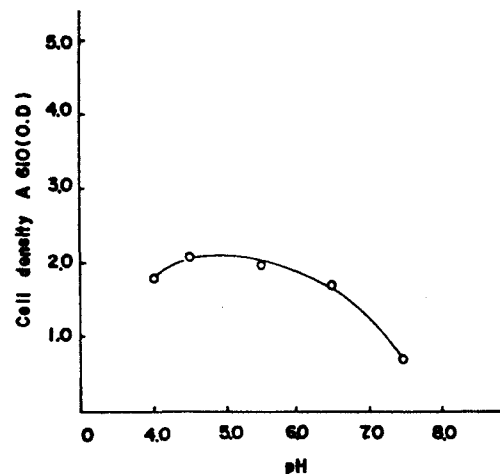


Fig. 1. Growth curve of *C. kefyr* at different pH. Cells were grown in 2×YNB containing 20 mM lactose for 16hr at 25°C. pH was adjusted to given values with 1N NaOH or 1N HCl.

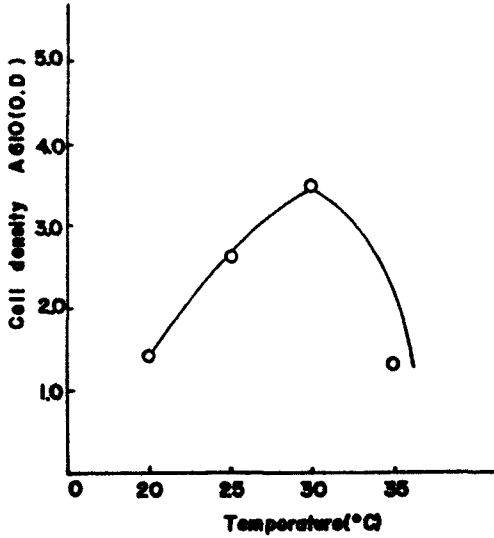


Fig. 2. Growth curve of *C. kefyri* at different temperature. Cells were grown in 2×YNB containing 20mM lactose for 24hr at different temperature.

Table 1. The lag time for growth and enzyme induction in *Candida kefyri* at different pH

pH	Lag time	
	Growth	Enzyme induction
4.5	4 ^a	6 ^b
5.5	2	2
6.5	8	8

a. the hours taken to end the lag phase

b. time taken for the first detection of β -D-galactosidase after addition of inducer (lactose)

All experiment was carried out in fermentor as described in the text. Cell density was adjusted to 0.3 ± 0.03 at A610

은 Fig. 3과 Fig. 4에 나타나 있다. Fig. 3에서 보여준 바와 같이 生長率은 接種量의 크기와는 관계없이 倍加時間이 4.01時間이었으며, 生長의 猶豫時間은 A610nm, 0.02單位에서 12時間, A610nm, 0.2單位에서 4時間, 그리고 A610nm, 0.3單位에서 2時間이었다.

猶豫時間의 현저한 단축은 A610nm, 0.2와 A610nm, 0.3 사이에서 볼 수 있었다(Fig. 3). 한편 接種量의 크기에 따른 정확한 猶豫時間을 알아보기 위해 β -D-galactosidase가 최초로 검출되는데 걸리는 시간을 조사하였다(Fig. 4). Fig. 4에서 보여준 바와 같이 β -D-galactosidase合成猶

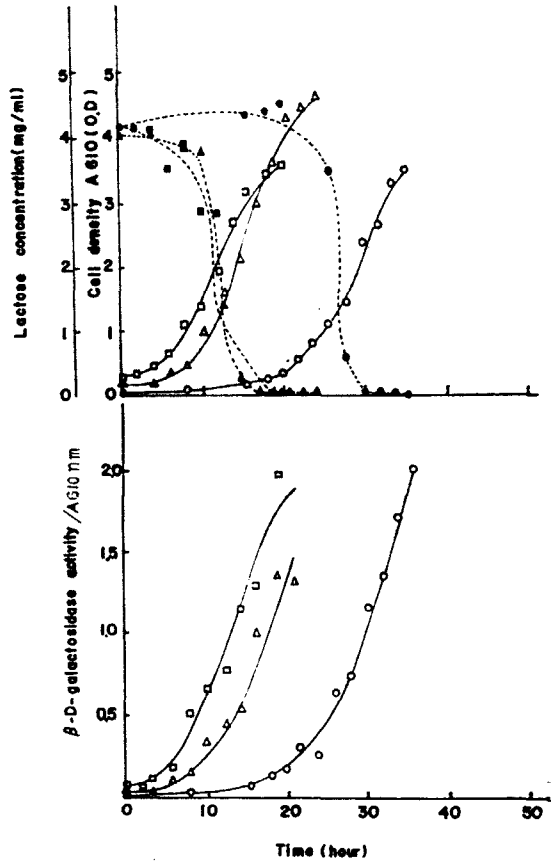


Fig. 3. Growth curve and β -D-galactosidase activity by different inoculum size at pH 5.5. *C. kefyri* was grown in 2×YNB containing 20 mM lactose using fermentor. All culture conditions were as described in the text. Symbols: \square - \square , 0.3 at A610; \triangle - \triangle , 0.202 at A610; \circ - \circ , 0.022 at A610; \bullet ... \bullet , lactose content at 0.022; \blacktriangle ... \blacktriangle , lactose content at 0.202 \blacksquare ... \blacksquare , lactose content at 0.3

豫時間은 A610nm, 0.02에서 9時間, A610nm, 0.2에서 4時間 그리고 A610nm, 0.3에서 2時間이 소요되었다. β -D-galactosidase에서도 生長의 경우와 비슷하게 A610nm, 0.2와 A610nm, 0.3 사이에서 酵素合成猶豫時間을 단축시키는데 效果의임을 알 수 있었다. 또, Fig. 4에서 보여준 바와 같이 A610nm, 0.02~A610nm, 0.2에서는 單位接種量當 5時間을 A610nm, 0.02~0.3에서는 7時間을 단축시켰다. 따라서 A610nm, 0.2單位나 其 以上(上限線은 앞으로 檢討해야 할 것으로 본다)의 接種量이 酵素合成猶豫期를 단축

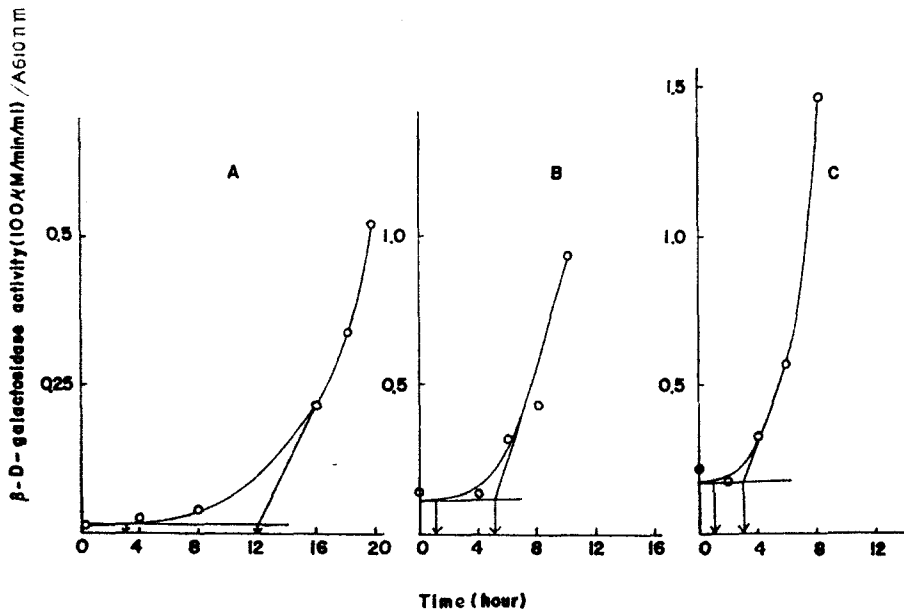


Fig. 4. The relationship between time taken for the first detection of β -D-galactosidase and different size of inoculum. All conditions for cultivation were the same as in Fig. 3. A, B and C were 0.02, 0.20, and 0.31 at A610, respectively.

시키는데 效果的인 것 같다. lactose의 減少경향을 보면 적어도 接種量의 크기가 A610nm, 0.2~0.3 사이에서는 共히 10時間 以內에 lactose의 急激한 減少가 始作되고 있다(Fig. 3). 이는 接種의 크기가 적어도 A610nm, 0.2 以上은 되어야 함을 立證해 주고 있다.

3. 몇 가지 炭素源上에서 *C. kefyri*의 生長 및 酵素合成

4種의 炭素源上에서 *C. kefyri*의 生長은 매우 느렸다. 其中 生長이 가장 빠른 것은 glucose(世代時間(g)=240分)이었고, lactose (g=276分), galactose (g=324分)의 順이었으며, ethanol (g=576分)上에서 가장 느렸다(Fig. 5). 한편 酵素의 活性을 보면 生長과는 對照的으로 lactose上에서 보다 galactose上에서 酵素活性이 約 2倍以上이나 높았고 代數期 以前에는 酵素活性이 不規則하나 其 以後부터는 急速히 증가하여 정지기 數 時間前에 減少하였다. 그러나 lactose上에서는 代數期 以前에는 이와같은 不規則性은 없었으나 其 以後에는 galactose의 경우와 비슷한 경향을 볼 수 있었다(Fig. 5). 한편 glucose나 ethanol上에서는 酵素合成水準이 매우 낮았으나 glucose上에서 보다는 ethanol上에서 약간

높은 水準의 酵素合成을 보여주었다(Fig. 5).

4. lactose濃度에 따른 β -D-galactosidase의 合成

lactose量이 3mM 以下에서는 酵素活性이 매우 낮았으나 4mM 以上에서는 그의 增加가 현저함을 볼 수 있었고 lactose量의 增加에 따라 相對的인 酵素合成의 增加와 猶豫時間의 단축경향이 있었다(Fig. 6). 또 酵素合成의 增加幅이나 猶豫時間의 단축이 컸던 濃度範圍는 16mM에서 20mM이었다.

5. Ethanol과 glucose에 적응시킨 細胞가 lactose나 galactose上에서 β -D-galactosidase合成에 미치는 영향

ethanol, 그리고 glucose에 適應시킨 다음 lactose나 galactose에서 β -D-galactosidase를 誘導시킨 결과, 곧 바로 酵素合成이 誘導되었으며 그 樣相이 直線的이었으나 glucose나 ethanol上에서는 酵素合成이 最低水準을 維持하였다(Fig. 7).

6. glucose가 β -D-galactosidase 合成에 미치는 영향

glucose에 依한 transient repression을 排除하기 爲하여 ethanol培地에서 정지기까지 前培養한 다음 糖混合培地에서 β -D-galactosidase 合成을 誘導시켜 본 結果, lactose만이 培地에 存在했을

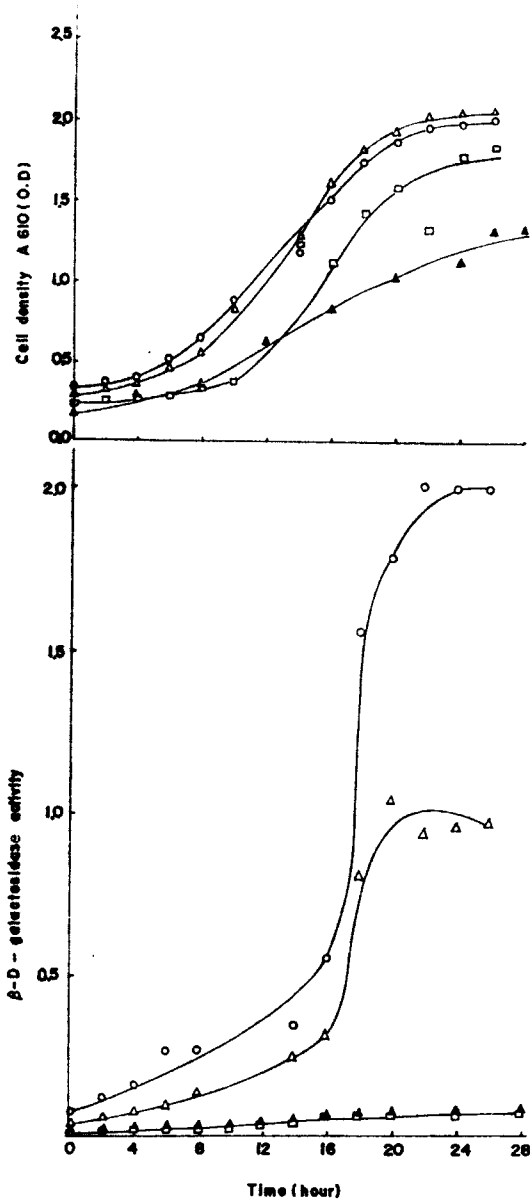


Fig. 5. Growth curve and β -D-galactosidase activity of *C. kefyri* growing in 2 \times YNB containing 40mM of galactose (O), 40mM of glucose (\square), 20mM of lactose (\triangle), 20mM of ethanol (\blacktriangle). Cells were precultured twice in D medium and washed twice with 2 \times YNB solution without any sugars. Enzyme was induced at zero time with the inoculum of between 0.25 and 0.29 at A610.

때는 初期에, 그리고 直線的으로 酵素誘導가 일어났으나 lactose와 glucose, 그리고 galactose와 glucose가 含有된 培地에서는 diauxie生長曲線을

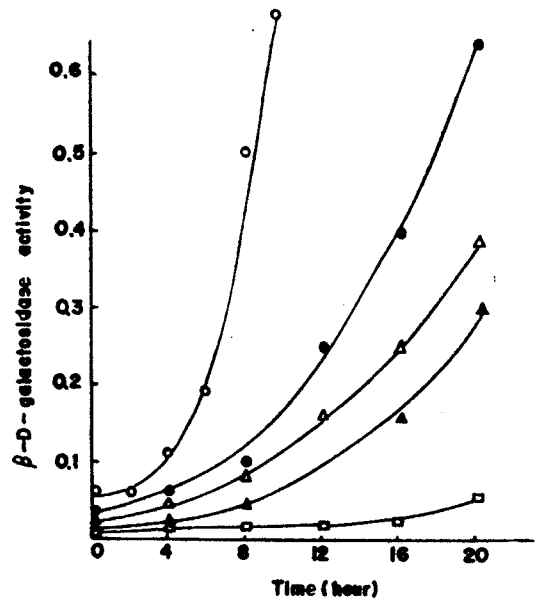


Fig. 6. Effect of inducer concentration on the kinetics of induction of β -D-galactosidase. *C. kefyri* was precultured in D medium containing 20 mM ethanol for 72hr, then grown again in 2 \times YNB containing 20mM ethanol up to late log phase, harvested, and washed twice with 2 \times YNB solution without sugars. Enzyme was induced with different concentration of lactose at zero time. Inoculum size was 0.3 at A610.
Symbols; \square — \square , 2mM; \blacktriangle — \blacktriangle , 4mM; \triangle — \triangle , 8mM; \bullet — \bullet , 16mM; \circ — \circ , 20mM

그리면서 β -D-galactosidase合成의 猶豫가 있다가 glucose가 모두 消耗되는 時期에 곧바로 β -D-galactosidase合成의 誘導가 直線的으로 增加하였다(Fig. 8).

考 察

*Candida kefyri*의 生長과 β -D-galactosidase 合成誘導의 最適 pH, 溫度는 各各 5.5, 30°C이었다(Fig. 1, 2). 酵素生成 最適 pH가 *C. pseudotropicalis*에서는 培養 初期의 3.5 (Bales & Castillo, 1979), *Kluyveromyces fragilis*에서는 4.0 ~ 4.7이었다(Wendorff et al., 1978). 한편 *Streptococcus thermophilus*에서는 6.5~7.4이었다(Ramana Rao & Dutta, 1977). 이러한 結果는 whey milk上에서 얻은 것이기 때문에 YNB上에서의 *C. kefyri*의 경우와는 비교할 수 없지만 *S.*

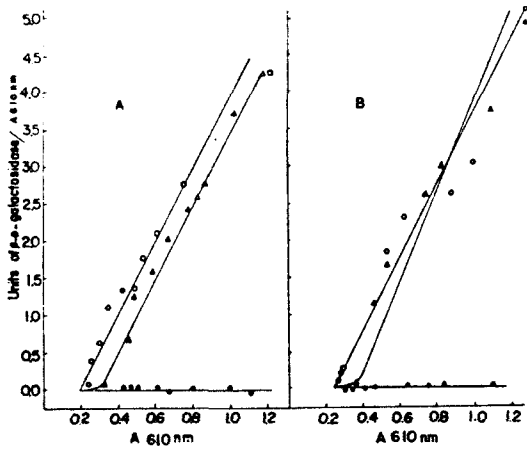


Fig. 7. Effect of cells adapted to ethanol and glucose on subsequent induction of β -D-galactosidase. Yeast cells were grown to stationary phase in 2 \times YNB containing 20mM glucose or ethanol at 30C, collected, washed twice with 2 \times YNB without sugars, and induced with 20mM lactose (A) or 20mM galactose (B) at A610 of 0.24 ± 0.024 .

Symbols:

- A; \circ — \circ , ethanol grown cells+lactose;
 \triangle — \triangle , glucose grown cells+lactose;
 \bullet — \bullet , glucose or ethanol grown cells +glucose
 B; \circ — \circ , ethanol grown cells+galactose;
 \triangle — \triangle , glucose grown cells+galactose;
 \bullet — \bullet , glucose or ethanol grown cells +glucose

*thermophilus*와 *K. fragilis*의 中間 pH 範圍를 보여주었다. 한편 *C. kefyri*의 生長과 酵素合成이 30°C에서 좋았는데 (Table 1) 이와같은 結果는 *K. fragilis* (Davies, 1956), *C. pseudotropicalis* (Bales & Castillo, 1979), 그리고 *K. lactis* (Dickson & Markin, 1980)의 경우와 類似함을 보여주었다.

酵素合成 誘導와 生長에 接種量이 미치는 영향을 보았을 때 生長에 있어서는 A610nm, 0.2單位以上이 效果的이었는데 (Fig. 3), 이때 集團의 最高 크기는 A610nm에서 3單位 以上の 범위에 있었다 (Fig. 3). 이는 集團의 最高 크기의 10% 程度의 接種量이 生長에 效果的임을 立證해 주고 있다 (Pirt, 1975). 이와 類似하게 酵素 誘導時間의 단축에도 生長에 相應한 效果를 볼 수 있었다. 한편 生長의 猶豫期와 酵素合成의 그것간에는 一般的으로 一致한다고 알려져 있는

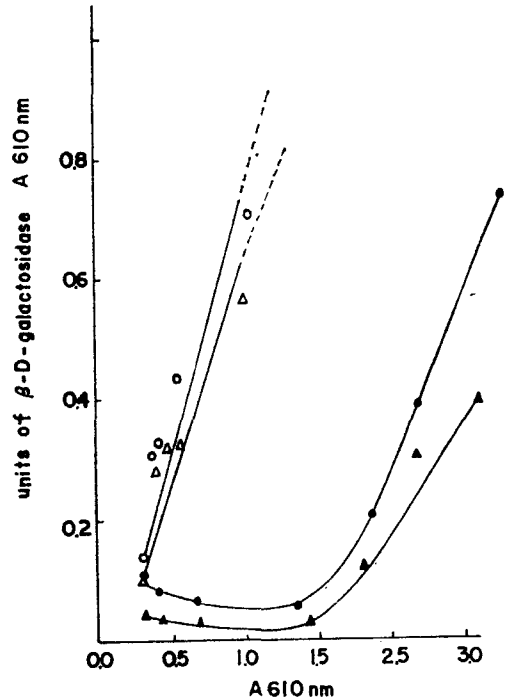


Fig. 8. Effect of glucose on β -D-galactosidase induction. Yeast cells were grown to stationary phase in 2 \times YNB with 20mM ethanol, and induced with sugar mixture at A610 of 0.30, 0.02. Symbols:

- \circ — \circ , 20mM lactose;
 \triangle — \triangle , 20mM lactose+40mM galactose;
 \bullet — \bullet , 40mM glucose+20mM lactose;
 \blacktriangle — \blacktriangle , 40mM glucose+40mM galactose.

데 pH 5.5와 6.5에서와는 달리 pH 4.5에서는 이들 간에 差異가 있었다 (Table 1), 이같은 현상은 Young과 Healey (1957)에 依해 *Saccharomyces fragilis*에서 觀察된 바 있다.

*C. kefyri*의 酵素合成猶豫期를 보면 A610nm, 0.3單位에서 2時間으로 *K. lactis* (Dickson & Markin, 1980)와 *C. pseudotropicalis* (Pedrique & Castillo, 1982)의 6~15분에 比하면 8~10배나 길고 *Saccharomyces chevalie* (Spiegelman et al., 1950)의 galactozymase에 比하면 12배나 짧다. 이와같은 差異는 接種量의 크기, 細胞年齡, 培養條件等에 對한 研究者間의 差異에서 基因될 수도 있고 또 種間, strains間의 遺傳的 差異에 依할 수도 있는데 이는 運搬系에 對한 誘導物質의 親和性이 낮거나 運搬系 酵素合成에 필요한 誘導物質의 細胞內 最適濃度가 높은 것에서 基

因될 수 있다. 其 理由는 일단 酵素合成의 誘導가 始作되면(4~16時間) A610nm 3~4單位까지는 酵素合成이 直線的으로 增加하였기 때문이다(Fig. 3, 4, 5). 이점에 對해서는 앞으로 誘導物質에 對한 運搬系酵素의 親和性이나 吸收率 그리고 酵素合成에 對한 誘導物質의 細胞內 最適濃度를 調査함으로써 보다 確實한 結論을 얻을 수 있을 것으로 본다. *C. kefyr*에서도 *C. pseudotropicalis*와 *K. lactis*, *K. fragilis*, (Tingle & Halvorson, 1972; Dickson & Markin, 1980; Davis, 1956)에서와 같이 lactose나 galactose가 β -D-galactosidase의 誘導物質이었다. 本 實驗에서 주어진 galactose의 농도는 40mM, lactose는 20mM로서 化學的으로는 等量이나 galactose量으로 보면 lactose에 비해 2배가 된다. 그러나 生長은 오히려 lactose 위에서 더 좋았으나 酵素活性의 最高値는 오히려 galactose 위에서 더 높았다(Fig. 5). 따라서 galactose가 天然 誘導物質일 가능성이 높다. 이와 비슷한 현상을 Pedrique와 Castillo (1982)가 *C. pseudotropicalis*에서 觀察한 바 있다. 이에 對한 보다 確實한 結論은 galactose와 lactose의 無償性 誘導物質(gratuitous inducer)에 의한 β -D-galactosidase의 誘導合成率 및 活性을 比較하므로써 내릴 수 있을 것으로 본다.

誘導物質의 함수로서 酵素合成誘導를 보면 lactose의 濃도가 4mM 以上에서는 濃度增加에 따라 酵素活性이 增加했을 뿐만 아니라 酵素誘導猶豫期間의 減縮傾向을 볼 수 있었다(Fig. 6). *C. kefyr*의 最低濃度인 4mM은 *K. lactis* (Dickson & Markin, 1980)의 2mM에 비해 2배나 높은 濃度이었다. 이는 前述한 바와 같이 誘導物質에 對한 運搬系의 親和性이나 運搬酵素系 합

成에 對한 細胞內 誘導物質의 最適濃度 差에 基因된 것 같다. 또 誘導物質의 濃度 增加에 따른 酵素合成猶豫期間의 短縮現象은 Adames (1972)가 *Saccharomyces chevalie*로부터 分離한 galactokinase의 경우와 비슷하였다.

ethanol이나 glucose와 같은 糖에 대해 適應된 細胞가 此後 誘導物質의 存在下에 β -D-galactosidase 合成의 誘導에 미치는 영향을 보면 galactose와 lactose上에서는 前培養에서 適應된 糖에 關係없이 β -D-galactosidase의 誘導는 곧바로 그리고 直線的으로 酵素活性의 增加가 있었으나 glucose에서는 그 數値가 最低水準을 維持했는데 이는 *C. pseudotropicalis* (Pedrique와 Castillo, 1982)와 *K. lactis* (Dickson & Markin, 1980)에 對해 報告된 것과 類似하다. 단 glucose上에서 最低水準値와 同 mole로 주어진 lactose나 galactose로부터 誘導된 酵素의 活性을 比較해 보았을 때 lactose上에서 보다 galactose上에서 酵素活性이 約 1.2배나 높았는데(Fig. 7) 이는 前述한 바와 같이 galactose가 自然誘導物質일 가능성이 높음을 示唆해 주고 있다.

glucose上에서 適應시킨 *C. kefyr*의 細胞는 此後 lactose上에서 β -D-galactosidase의 誘導에 영향을 주지 못했으나 lactose와 glucose가 混合된 培地上에서는 初期 細胞濃度の 3배加時間까지는 酵素合成의 誘導가 없었다가, 以後에 急激히 增加하였다(Fig. 8). 앞으로 酵素合成에 미치는 glucose의 精確한 濃度別 영향이 밝혀져야 하겠지만 本 實驗에서 주어진 濃度에서의 結果는 *K. fragilis* (Dickson & Markin, 1980)와 *C. pseudotropicalis* (Pedrique & Castillo, 1982)에서 처럼 *C. kefyr*에도 catabolite repression이 存在하고 있음을 보여주고 있다.

摘 要

本 研究는 *Candida kefyr* CBS 834의 β -D-galactosidase 合成誘導에 關한 몇가지 條件을 調査한 것이다. 生長 및 β -D-galactosidase 合成에 最適 pH, 溫度 및 接種量은 各各 5.5, 30°C, A610nm에서 0.3單位이었다. 酵素活性은 誘導物質을 添加한 후 2時間째 부터 나타나기 始作하여 정지기 2~3시간前까지 계속 增加하다가 其 以後부터 減少하였다. β -D-galactosidase는 lactose나 galactose에 의해 誘導되었으나 glucose나 ethanol에 의해서는 誘導되지 않았고 lactose上에서 보다는 galactose上에서 β -D-galactosidase의 活性이 큰 것은 galactose가 β -D-galactosidase의 天然誘導物質일 가능성이 있음을 보여 주었다. lactose의 濃度函數로서 β -D-galactosidase의 誘導率을 보면 4mM 以上에서는 그의 活性이 誘導物質의 濃度增加에 따라 增加했으나 4mM 以下에서는 그의 活性이 매우 낮았으며 glucose는 β -D-galactosidase 誘導를 억제하였고 他炭素源으로부터 유도물질에 對한 適應期間은 比較的 짧았다.

引用文獻

- Adams, B.G., 1972. Induction of galactokinase in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics of induction and glucose effect. *J. Bacteriol.* 111:308-315.
- Davies, A., 1956. Some factors affecting lactase formation and activity *Saccharomyces fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* 14:425.
- Dickson, R.C., L.R. Dickson, and J.S. Markin, 1979. Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 137:51-61.
- Dickson, R.C., L.R. Dickson, and J.S., Markin, 1980. Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 142:777-785.
- Dickson, R.C., L.R. Dickson, and K. Barr, 1983. Characterization of lactose transport in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* 154:1245-1251.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.C., Farr, and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lodder, J. (ed), 1970. The yeast, a taxonomic study, North Holland and pub. co. Amsterdam. pp.982, 1025, 341, and 346.
- Nickerson, T.A., I.F. Vujicic, and A.Y. Lin, 1975. Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. *J. Dairy Sci.* 59:386-390.
- Pedrique, M. and F.J. Castillo, 1982. Regulation of β -D-galactosidase in *Candida pseudotropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:303-310.
- Pirt, S.J. (ed), 1975. Principles of microbiology and cultivation. John Wiley and Sons. New York. U.S.A. pp.4-5.
- Ranana Rao, M.V., and S.M. Dutta, 1977. Production of beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:185-188.
- Spiegelman, S., R. Sussman, and E. Pinska, 1950. On the cytoplasmic nature of long-term adaptation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 36:591-606.
- Tingle, M., and H.O. Halvorson, 1972. Mutants in *Saccharomyces lactis* controlling both-glucosidase and-galactosidase activities. *Genet. Res.* 19:27-32.
- Wendorff, W.L., C.H. Amundson, and N.F. Olson, 1978. Nutrient requirements and growth conditions for production of lactase enzyme by *Saccharomyces fragilis*. *J. Milk Food Technol.* 33:451-455.
- Young, H., and R.P. 1957. Production of *Saccharomyces fragilis* with an optimum yield of lactase. U.S. Pat. 2,776,98. Jan.