

Bovine serum albumin, Myoinositol과 Ergosterol에 의한 *Candida pseudotropicalis*의 원형질체 재생 및 융합증진

전순배·배 석

전남대학교 자연과학대학 생물학과

Improvement of the regeneration and protoplasts fusion of *Candida pseudotropicalis* by bovine serum albumin, myoinositol and ergosterol

Chun, Soon-Bai and Suk Bai

Department of Biology, College of Natural Sciences,

Chonnam National University, Kwang-ju, Korea

ABSTRACT: The effects of bovine serum albumin, myoinositol and ergosterol on protoplast formation, regeneration and fusion from auxotrophic mutants of *Candida pseudotropicalis* were examined. Frequency of protoplast formation ranged from 43 to 98% depending on auxotrophic types. When myoinositol (0.5 mg/m) and ergosterol (0.1 mg/m) were supplemented in the medium of cell growth, and bovine serum albumin (4 mg/m) was added to protoplasting buffer, 50-100% of cells were converted to protoplasts. Such a treatment of three additives improved 2.2-3.0 fold of regeneration rate of protoplasts. The fusion frequencies between complementary auxotrophs ranged from 7.0×10^{-4} to 1.5×10^{-3} in the optimal conditions. These values showed 1.9-2.3 fold increase when compared with fusion frequencies obtained without the treatment of additives. These results suggested that these compounds may improve protoplast regeneration and fusion between complementary auxotrophs used in this study.

KEY WORDS: *Candida pseudotropicalis*, protoplast regeneration and fusion.

유당을 발효할 수 있는 미생물중 *Candida pseudotropicalis*는 *Kluyveromyces marxianus (fragilis)*의 haploid type으로서 유당을 기질로 β -D-galactosidase나 단세포성 단백질생산에 이용될 수 있을 것으로 알려져 있다(Castillo and Sanchez, 1978; de Bales and Castillo, 1979). 저유당 유제품 제조시 사용되고 있는 β -D-galactosidase 생산능이나 값싼 유청을 이용하여 단세포성 단백질 생산능을 향상시킬 수 있는 균종개발의 한 방안으로서 종내 원형질체 융합을

통한 gene dosage의 증가나(Chun *et al.*, 1986) 유당 발효능은 없지만 알코올 내성 및 생산성이 있는 *Saccharomyces sp.* 사이의 속간 원형질체 융합 및 형질전환에 β -D-galactosidase gene공여체로 *C. pseudotropicalis*가 이용될 수 있을 것이다(Farahnak *et al.*, 1986). 안정된 haploid type인 *C. pseudotropicalis*는 영양요구성 돌연변이 균주의 제조나 유전적 해석측면에서 볼 때 *K. marxianus* 보다 용이할 것으로 본다.

효모종을 이용한 원형질체 융합이나 형질전환에

*이 논문은 한국과학재단의 1985년도 연구비에 의한 연구의 일부임.

관련된 연구의 단계로서는 생존력이 있는 원형질체 형성, 재생 그리고 융합이다. 본 연구에서는 *C. pseudotropicalis* 종내 융합체들에 대한 유전적 연구를 위하여 이로부터 안정된 double auxotrophs를 제조하였으며 원형질체 형성은 널리 사용되고 있는 세포벽 제거효소인 zymolase나 glucylase 보다 값이 저렴한 Novozym 234를 사용하였고, bovine serum albumin(BSA), myoinositol 그리고 ergosterol이 이들 double auxotrophs에 대한 원형질체 형성, 재생 그리고 융합율의 증진효과가 있었기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 보존

사용균주는 Centraalbureau voor Schimmelcultures(CBS, Netherlands)로 부터 구입한 *C. pseudotropicalis* CBS 607 이었고 YM(0.3% yeast extract, Difco; 0.3% malt extract, Difco; 0.5% Bacto-peptone, Difco; 1% glucose; 2% Bacto-agar, Difco) 평판배지에서 colony가 형성될 때까지 30°C에서 3~4일간 배양 후 YM 한천사면배지에 옮겨 3~4일간 배양한 후 4°C에서 유지 보관하고 4주마다 계대 배양하였다.

영양요구성 돌연변이 균주의 제조

돌연변이 균주의 유도는 Chun 등(1986)의 방법에 따라 0.5~1 mg/ml N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG, Sigma)과 3% (v/v) ethyl methane sulfonic acid(EMS, Sigma)를 돌연변이원으로 하여 histidine, tryptophan 그리고 adenine 요구성 돌연변이 균주를 제조한 다음 Poulter 등(1981)의 방법에 따라 0.2-0.5 mg/ml NTG로 유도된 필요한 double 영양요구성 돌연변이 균주를 phloxine B(Fink, 1970)배지상에서 분리하였다. 이들에 대한 reversion frequency는 최소배지[0.67% yeast nitrogen base(YNB, Difco); 1% glucose; 2% Bacto-agar]상에 나타난 colony수(colony forming unit, CFU)를 완전배지(YEPD: 1% yeast extract; 2% Bacto-peptone; 2% glucose; 2% Bacto-agar)상에서 자란 colony수로 나누어 계산하였다.

균주의 배양 및 생장

야생형과 비교적 생장율이 좋고 reversion frequency가 낮은 histidine 및 methionine 요구성 돌연변이 균주(*his met*)를 택하여 YEPD 액체배지에서 30°C, 24시간 전배양한 다음 myoinositol(0.5 mg/ml, Difco)과 0.15% Tween 80에 녹인 ergosterol(0.1 mg/ml, Sigma)를 첨가한 YEPD와 YNB 액체배지에 멸균수로 3회 세척한 세포를 접종하여 myoinositol과 ergosterol이 균 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 이때 영양요구성 돌연변이 균주의 YNB배지에는 histidine(10 mg/l)과 methionine(20 mg/l)을 첨가하여 사용하였다.

원형질체 형성 및 재생

원형질체 형성 및 재생은 Chun 등(1986)의 방법에 따랐다. 세포벽 제거효소인 Novozym 234(Novo industries, Denmark)의 농도는 1 mg/ml이었고 0.5 mg/ml myoinositol과 0.1 mg/ml ergosterol을 첨가한 YEPD에서의 전배양이나 원형질체 형성 완충용액에 4 mg/ml BSA의 첨가 등이 원형질체 형성 및 재생에 미치는 영향을 조사하였다.

BSA, myoinositol 과 ergosterol이 원형질체 안정성에 미치는 영향

Myoinositol과 ergosterol을 YEPD에 전배양시 첨가와 원형질체 형성 완충용액에 BSA첨가가 원형질체 안정성에 미치는 영향을 조사하기 위해 재생시 osmotic stabilizer로 사용한 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 최적농도인 0.5M 혹은 0.3M로부터 0M까지 점차 농도를 감소시켜 가면서 원형질체의 안정성을 상대재생 빈도로 표시하였다. 상대재생 빈도는 osmotic stabilizer 각 농도의 재생배지에서 재생된 colony수를 osmotic stabilizer 최적농도가 들어있는 재생배지에서 나온 colony수로 나누어 백분율로 표시하였다.

원형질체 융합

원형질체 융합은 Chun 등(1986)의 방법에 따라 0-45% polyethylene glycol(PEG, M. W. 4,000, Sigma)과 0-500 mM CaCl_2 가 들어있는 완충용액(pH 4.0-9.5)에서 0-90분간(30°C) 유지시켜 융합율의 최적조건을 조사하였고 융합율은 osmotic stabilizer가 들어있는 최소배지상에서 자

란 colony수를 완전배지상에서 자란 colony수로 나누어 얻었다.

결과 및 고찰

영양요구성 돌연변이 균주의 제조 및 reversion frequency

Single 영양요구성 돌연변이 균주중 비교적 생장이 양호한 histidine 요구성 및 tryptophan 요구성 돌연변이 균주와 붉은색을 띠어 판별하기 쉬운 adenine 요구성 돌연변이 균주를 택하여 histidine 요구성 균주로부터 histidine과 methionine요구성 균주(*his met*)와 histidine과 asparagine 요구성 균주(*his asn*)를, tryptophan 요구성 돌연변이 균주로부터 tryptophan과 aspartic acid 요구성 균주(*trp asp*)와 tryptophan과 leucine 요구성 균주(*trp leu*)를, adenine 요구성 돌연변이 균주로부터 adenine과 asparagine 요구성 균주(*ade asn*)를 각각 제조하였다. 이들의 reversion frequency는 6.2×10^{-8} 이하로 원형질체 융합과 유전적 분석에 적합하였다(Table 1).

Myoinositol과 ergosterol이 균의 생장에 미치는 영향

Myoinositol과 ergosterol은 세포의 생존력과 세포막의 안정성 유지에 관련이 있기 때문에 상기 화합물이 균의 생장에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 1).

YEPD나 YNB 배지에 0.5mg/ml의 myoinositol 첨가가 야생형이나 *his met* 돌연변이 균주의 생장을 촉진하였는데 이같은 결과는 myoinositol이 균의 대사와 분열을 촉진하였기 때문으로 보여진다(Hanson and Lester, 1980; Ridgway and Douglas, 1959). 한편, ergosterol

(0.1mg/ml)을 첨가한 YNB 배지에서 *his met* 돌연변이 균주의 생장을 보면 대수기와 정지기에서 생장에 약간 저해가 있었다. 그러나 나머지 batch에서는 정지기 세포에서만 생장의 저해를 보여주었는데 이같은 현상은 *Saccharomyces cerevisiae*(Hossack and Rose, 1976)에서 보여준 바와 같이 유예기나 대수기의 세포는 총 sterol 함량의 대부분이 free sterol로 존재하나 정지기에 이르면 free sterol이 ester화 됨으로써 형성된 sterol ester가 균의 성장속도를 저하시키는 것으로 보여지며 이에 관한 자세한 연구는 앞으로 해야 할 것으로 본다. 그러나 ergosterol과 myoinositol을 동시에 첨가한 것에는 이를 첨가하지 않은 대조구와 거의 비슷한 성장경향을 보여주었고 또 myoinositol과 ergosterol이 세포의 생존력, 세포막 안정성 유지, 원형질체 재생이나 융합과의 관련성(Atkinson and Ramirez, 1984; Hanson and Lester, 1980; Hossack and Rose, 1976; Papahadjopoulos *et al.*, 1979; Ulazewski *et al.*, 1978)을 고려해 볼 때 영양요구성 돌연변이 균주의 배양기로서는 myoinositol(0.5mg/ml)과 ergosterol(0.1mg/ml)을 첨가한 YEPD가 바람직한 것으로 본다.

BSA, myoinositol 과 ergosterol이 원형질체 재생에 미치는 영향

야생형 균주의 배양시 YEPD 액체배지에 myoinositol과 ergosterol을, 그리고 원형질체 형성 완충용액에 BSA를 첨가한 것과 첨가하지 않은 대조구의 원형질체 재생율을 비교하였다. BSA와 myoinositol 그리고 ergosterol을 동시에 처리했을 때는 원형질체 재생율이 55.0%로 대조구(20.5%)에 비해 약 2.7배의 증진이 있었다. 야생형 균주에 대한 이같은 효과를 돌연변이 균주에 대해서도 조사하였다(Table 2).

Table 2에서 보여준 바와 같이 *his met* 돌연변이 균주, *his asn* 돌연변이 균주 그리고 *trp leu* 돌연변이 균주에서는 야생형 균주와 유사하게 세포막 용해율도 적고 원형질체 형성율이 89.6~97.6%에서 BSA, myoinositol 그리고 ergosterol을 동시에 처리했을 때 92.5-99.7%로 증가하였다. *trp asp* 돌연변이 균주에서는 52%에서 74.7%로 20% 이상의 증진을 보여주었다. 그러나 *ade asn*

Table 1. Spontaneous reversion frequency of auxotrophic mutants from *C. pseudotropicalis*

Phenotype	Reversion frequency
<i>his met</i>	1.1×10^{-9}
<i>his asn</i>	2.5×10^{-9}
<i>trp leu</i>	6.2×10^{-8}
<i>trp asp</i>	2.3×10^{-8}
<i>ade asn</i>	2.8×10^{-9}

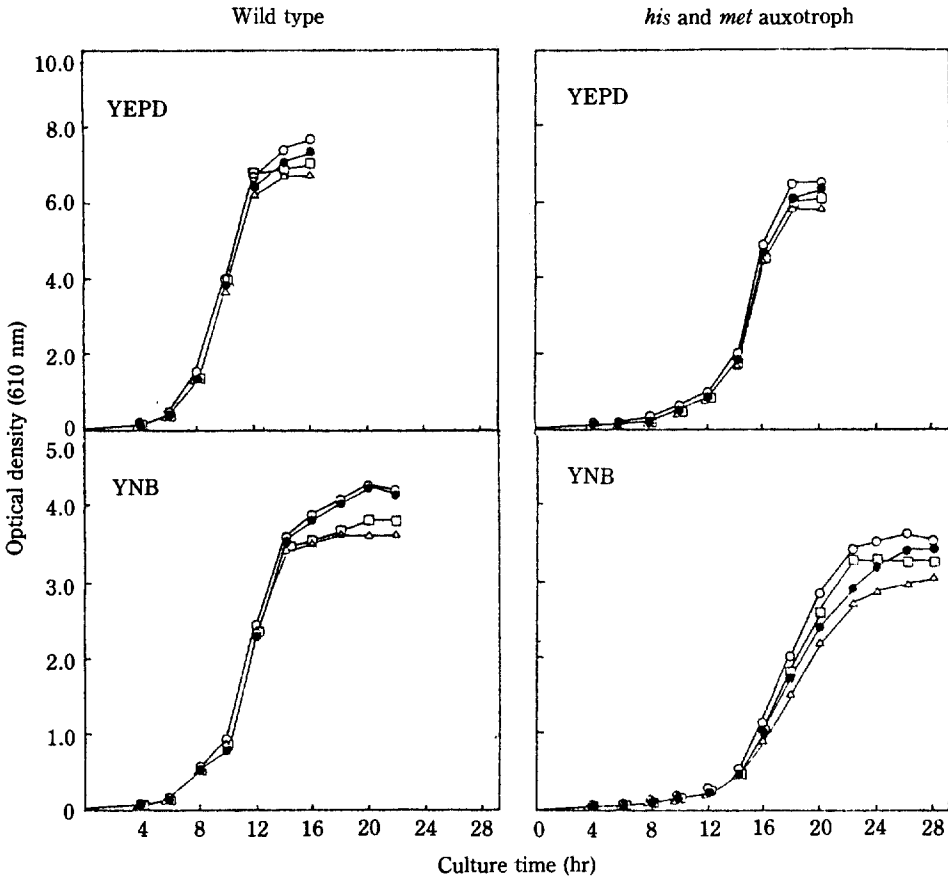


Fig. 1. Effect of the supplement of myoinositol and ergosterol to medium on the growth of wild type and auxotrophic mutant.

The composition of YEPD and YNB media, and culture conditions are described in the text.

Symbols: control(●), 0.5 mg/ml of myoinositol (○), 0.1 mg/ml of ergosterol(△), and both additives(□). Values are average of three experiments.

Table 2. Protoplast formation and regeneration from wild type and auxotrophic mutants

Phenotype	Protoplast	
	Formation(%)	Regeneration(%)
Prototroph	97.6 (99.7) ^a	20.5 (55.0)
<i>his met</i>	97.5 (98.8)	19.1 (42.0)
<i>his asn</i>	94.0 (97.5)	15.6 (37.3)
<i>trp leu</i>	89.6 (92.5)	8.1 (19.3)
<i>trp asp</i>	52.0 (74.7)	7.6 (23.2)
<i>ade asn</i>	48.0 (50.2)	10.1 (27.6)

^a Numbers in parentheses indicate frequencies of protoplast formation and regeneration from cells treated with BSA (4mg/ml), myoinositol (0.5mg/ml) and ergosterol (0.1mg/ml). Values are average of three experiments.

돌연변이 균주에서는 *ade* 돌연변이 균주에서와 같이 별 효과가 없었다. 이는 다른 영양요구성 돌연변이 균주들에 비해 세포들의 응집이 현저하였으며 이와 비슷한 현상은 inositol이 결여된 배지에서 성장한 *Saccharomyces carlsbergensis* (Smith, 1951; Ghosh *et al.*, 1960)와 *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* 그리고 *Kloeckera brevis* (Challinor and Daniels, 1958)에서 관찰된 바 있다. *ade asn* 돌연변이 균주의 경우 inositol이 함유된 배지에서 배양했을 때도 원형질체 형성 및 재생 증진이 전혀 없었던 것은 inositol의 세포 내 흡수나 흡수된 inositol의 세포벽 합성경로에 이상을 일으킬 수 있는 cryptic mutation에 기인된

것으로 예상되며 Ghosh 등(1960)이 지적한 바와 같이 비정상적인 세포벽 합성이 하나의 원인이 될 수 있을 것이다. 따라서 이와 관련된 연구가 있어야 할 것으로 본다. 한편, 다른 영양요구성 돌연변이 균주의 원형질체 재생율을 보면 7.6-19.1%에서 세가지 화합물을 첨가했을 때 19.3-42.0%로 현저한 재생율 증진을 보여 Stephen과 Nasim(1981)의 결과(10~18%)나 Stahl(1978)의 결과(9~10%)보다 높은 경향을 보여주었다. Lai와 Liu(1982) 그리고 Teasdale과 Rugini(1983)는 각각 벼(*Oryza sativa*)와 소나무(*Pinus taeda*)의 원형질체 형성 완충용액에 BSA를 첨가함으로써 세포벽 제거효소 내에 존재하는 protease 활성을 BSA가 완화시켜 세포막을 보호한다고 보고한 바 있다. 본 실험에 사용된 Novozym 234는

zymolase나 glucylase보다 활성이 강한 protease가 함유되어 있기 때문에 BSA의 첨가가 필요한 것으로 보인다. 한편, myoinositol은 효모 세포막의 인지질 성분인 phosphatidylinositol의 선구물질이고, phosphatidylinositol은 세포막의 유연성에 기여하는 것으로 알려져 있다(Atkinson and Ramirez, 1984; Hanson and Lester, 1980; Ulazewski *et al.*, 1978). 또 Hanson과 Lester(1980)는 *S. cerevisiae* 세포벽 성분의 주성분인 β -1,3-glucan의 분비 및 합성에 myoinositol이 중요한 역할을 한다고 보고한 바 있으며, Hosack와 Rose(1976)는 ergosterol이 *S. cerevisiae*의 세포막 유연성에 기여한다고 보고한 바 있다. 이런 증거를 근거로 할 때 *C. pseudotropicalis*와 이의 영양요구성 균주들의 원형질체 재생

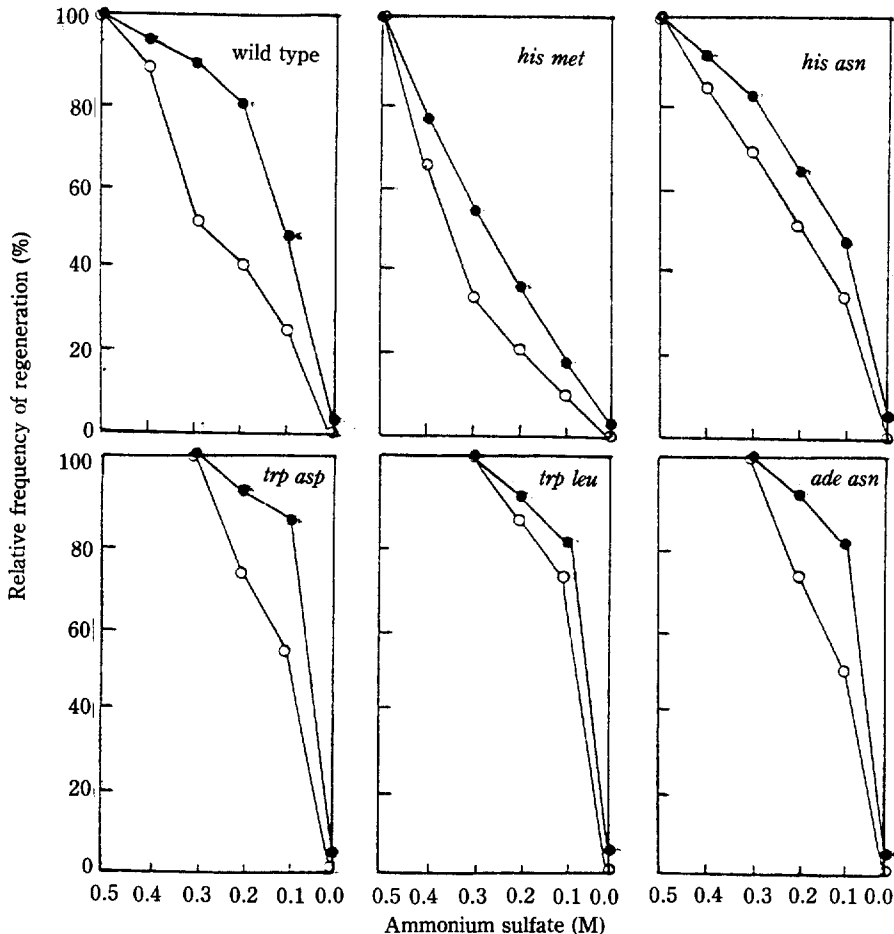


Fig. 2. Stability of protoplasts from wild type and auxotrophic mutants.

Symbols: control(○), and treatment(●). Values are average of three experiments.

율의 향상에 대한 myoinositol과 ergosterol의 효과는 세포막의 생존력 및 유연성의 증진에 기인된 것으로 보여진다. 또한, BSA, myoinositol 그리고 ergosterol처리에 의하여 형성된 원형질체의 안정성을 처리하지 않은 대조구의 그것과 비교하기 위하여 재생배지의 osmotic stabilizer의 농도감소에 따른 상대재생 빈도를 조사하였다(Fig. 2).

Fig. 2에서 보여준 바와 같이 첨가물의 처리구가 대조구에 비해 상대재생빈도의 감소경향이 완만한 것으로 보아 BSA, myoinositol 그리고 ergosterol이 세포막의 안정성을 향상시킨 것으로 본다. 이 같은 원형질체의 안정성은 상술한 바와 같이 원형질체 재생의 증진을 입증해 주고 있다.

BSA, myoinositol 과 ergosterol이 원형질체 융합에 미치는 영향

원형질체 융합조건은 상보적 돌연변이 균주로 reversion율이 낮고 생장율이 양호한 *his met*와 *trp asp*돌연변이 균주를 이용하여 조사하였다. PEG 35%, CaCl₂ 100 mM에서 융합율이 가장 높았고 이때 PEG 노출시간은 30분이 최적이었으며 최적 pH는 6.0이었다. 원형질체 융합에 미치는 PEG의 최적농도는 *S. cerevisiae*, *Rhodospiridium toruloides*, 그리고 *Schwanniomyces alluvius* 등(Farahnak *et al.*, 1982; Maraz *et al.*, 1978; Sipiczki and Ferenczy, 1977a; Wilson *et al.*, 1982)의 35%와 일치했으나 Chun 등(1986)의 *C. pseudotropicalis*에서의 *his*와 *trp* single 영양요구성 균주간의 융합에서는 PEG 최적농도가 20%로 같은 중이지만 융합에 사용되는 돌연변이 균주가 다를 때는 PEG 최적농도도 차이가 나는 것으로 사료된다. 한편, CaCl₂ 최적농도는 100 mM 이었으나 10~100 mM에서는 크게 차이가 없어 Morgan(1983)이 보고한 10

Table 3. Fusion frequency between complementary double auxotrophs.

Phenotype	Fusion frequency
<i>his met + trp asp</i>	1.5 × 10 ⁻³ (6.6 × 10 ⁻⁴) ^a
<i>his met + trp leu</i>	8.7 × 10 ⁻⁴ (4.7 × 10 ⁻⁴)
<i>his asn + trp leu</i>	7.0 × 10 ⁻⁴ (3.6 × 10 ⁻⁴)
<i>his asn + trp asp</i>	9.4 × 10 ⁻⁴ (4.8 × 10 ⁻⁴)

a Numbers in parentheses indicate fusion frequencies of protoplasts formed from cells not treated with BSA, myoinositol and ergosterol. Values are average of three experiments.

~100 mM이 효모의 원형질체 융합에 가장 좋은 농도라는 결과와 일치하고 있다. *his met*와 *trp asp*요구성 균주간의 원형질체 융합조건으로 몇가지 상보적 돌연변이 균주들간의 융합율을 조사하였다(Table 3).

그 결과는 Table 3에서 보여준 바와 같이 7.0 × 10⁻⁴~1.5 × 10⁻³으로 *Candida albicans*의 1.3 × 10⁻⁴~9.1 × 10⁻³(Pesti *et al.*, 1979), *Candida tropicalis*의 3 × 10⁻⁵(Fournier *et al.*, 1977), *S. pombe*의 1.7 × 10⁻³(Sipiczki and Ferenczy, 1977b), 그리고 *Saccharomycopsis lipolytica*의 5 × 10⁻⁴~1.5 × 10⁻³(Stahl, 1978) 등의 수치와 비교하여 유사한 경향을 나타냈다. BSA, myoinositol 그리고 ergosterol을 첨가한 처리구가 비처리구에 비해 *his met + trp asp*에서는 2.3배이고 나머지 상보적 돌연변이 균주들간의 융합에서도 1.9~2.0배의 융합율 향상이 있어 상기 화합물처리에 의해 원형질체 재생은 물론 융합율도 증진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

적 요

*Candida pseudotropicalis*의 영양요구성 돌연변이 균주들에 대한 원형질체 형성, 재생 그리고 융합에 있어서 bovine serum albumin(BSA), myoinositol 그리고 ergosterol의 증진효과를 연구하였다. 원형질체 형성율은 영양요구성 균주의 type에 따라 48%~98%였다. 0.5 mg/ml의 myoinositol과 0.1 mg/ml의 ergosterol을 배양액에 첨가하고 4 mg/ml의 BSA를 원형질체 형성 완충용액에 첨가했을 때는 50~100%의 원형질체 형성율을 얻었다. 영양요구성 균주의 생장배지에 myoinositol과 ergosterol을 동시에 첨가하고 원형질체 형성 완충용액에 BSA를 첨가하면 2.2~3.0배의 원형질체 재생을 증진을 보여주었다.

원형질체 융합의 최적조건에서 상보적 영양요구성 균주간의 융합율은 $7.0 \times 10^{-4} \sim 1.5 \times 10^{-3}$ 이었으며 상기화합물을 처리하지 않고 얻은 융합율과 비교해서 1.9~2.3배의 증가를 보였다. 이러한 결과로 본 연구에서 사용된 균주들에서는 상기화합물 처리에 의해 원형질체 재생은 물론 세포융합율도 증진됨을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Atkinson, K.D. and R.M. Ramirez. 1984. Secretion can proceed uncoupled from net plasma membrane expansion in inositol starved *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **160**: 80-86.
2. Castillo, J.F. and S.B. de Sanchez. 1978. Studies on the growth of *Kluyveromyces fragilis* in whey for the production of yeast protein. *Acta. Cient. Venez.* **29**: 113-119.
3. Challinor, S.W. and N.W.R. Daniels. 1958. Fat production by inositol-deficient yeast. *Nature* **176**: 1267-1268.
4. Chun, S.B., K.C. Chung and S. Bai. 1986. Protoplast fusion of *Candida pseudotropicalis*; the conditions for protoplast formation, regeneration and fusion. *Kor. J. Microbiol.* **24**: 243-250.
5. de Bales, S.A. and F.J. Castillo. 1979. Production of lactase by *Candida pseudotropicalis* grown in whey. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 1201-1205.
6. Farahnak, F., T. Seki, D.Y. Ryu and D. Ogrydziak. 1986. Construction of lactose-assimilating and high ethanol producing yeasts by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 362-367.
7. Fink, G.R. 1970. The biochemical genetics of yeast. In *Methods in Enzymology* (Tabor, H. and C.W. Tabor. ed), vol. 17A. p. 59-78. Academic Press, New York.
8. Fournier, P., A. Provost, C. Bourguignon and H. Heslot. 1977. Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candida tropicalis*. *Arch. Microbiol.* **115**: 143-149.
9. Ghosh, A., F. Charalampous, Y. Sison and R. Borer. 1960. Metabolic functions of myoinositol I. Cytological and chemical alteration in yeast resulting from inositol deficiency. *J. Biol. Chem.* **235**: 2522-2528.
10. Hanson, B.A. and R.L. Lester. 1980. Effect of inositol starvation on phospholipid and glycan syntheses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **142**: 79-89.
11. Hossack, J.A. and A.H. Rose. 1976. Fragility of plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae* enriched with different sterols. *J. Bacteriol.* **127**: 67-75.
12. Lai, K-L. and L-F. Liu. 1982. Correlation between fine structure and viability of rice protoplasts. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. p. 603-604.
13. Maraz, A., M. Kiss and L. Ferenczy. 1978. Protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae* strains of identical and opposite mating types. *FEMS Microbiol. Lett.* **3**: 319-322.
14. Morgan, A.J. 1983. Yeast strain improvement by protoplast fusion and transformation. Lecture proceedings. In 6th International protoplast symposium. Basel. I.P. and C.J. Zurich (ed). Birkhauser Verlag. Basel. p. 155-166.
15. Papahadjopoulos, D., G. Poste and W.J. Vail. 1979. Studies on membrane fusion with natural and membrane models. p. 1-122. In E.D. Korn (ed), *Methods in Membrane Biology*, vol. 10. Plenum Publishing Corp., New York.
16. Pesti, M., E.K. Novak, A. Svoboda and L. Ferenczy. 1979. Protoplast fusion between polyene-resistant and sensitive mutants of *Candida albicans*. 8th Congress of the Hungarian Society of Microbiology, Budapest, Hungary. p. 138 (abstract).
17. Poulter, R., K. Jeffery, M.J. Hubbard, H.G. Shepherd and P.A. Sullivan. 1981. Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. *J. Bacteriol.* **146**: 833-840.
18. Ridgway, G.J. and H.C. Douglas. 1959. Unbalanced growth of yeast due to inositol deficiency. *J. Bacteriol.* **76**: 163-166.
19. Sipiczki, M. and L. Ferenczy. 1977a. Fusion

- of Rhodosporidium (*Rhodotorula*) protoplasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2**: 203-205.
20. Sipiczki, M. and L. Ferenczy. 1977b. Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating type. *Mol. Gen. Genet.* **151**: 77-81.
 21. Smith, R.H. 1951. A study of the role of inositol in the nutrition of *Nematospora gossypii* and *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Gen. Microbiol.* **5**: 772-780.
 22. Stahl, U. 1978. Zygote formation and recombination between like mating type in the yeast *Saccharomycopsis hibernica* by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* **160**: 111-113.
 23. Stephen, E.R. and A. Nasim. 1981. Production of protoplasts in different yeasts by mutanase. *Can. J. Microbiol.* **27**: 550-553.
 24. Teasdale, R.D. and E. Rugini. 1983. Preparation of viable protoplasts from suspension-cultured loblolly pine (*Pinus taeda*) cells and subsequent regeneration to callus. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* **2**: 253-261.
 25. Ulazewski, S., J.R. Woodward and V.P. Ciriello. 1978. membrane damage associated with inositol-less death in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol* **136**: 49-54.
 26. Wilson, J.J., G.G. Khachatourians and W. Ingledew. 1982. Protoplast fusion in the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 95-100.

(Received Oct. 19, 1987)