

## *Brevibacterium lactofermentum*의 원형질체 융합에 의한 유전자 재조합

이혜경 · 최순영 · 윤윤경 · 이영하 · 민경희  
숙명여자대학교 이과대학 생물학과, 충남대학교 미생물학과

### Genetic Recombination of *Brevibacterium lactofermentum* by Protoplast Fusion

Lee, Hae-Kyung, Soon-Young Choi, Yoon-Kyung Yoon, Young-Ha Rhee\* and Kyung-Hee Min

Department of Biology, College of Sciences, Sookmyung Women's University

\*Department of Microbiology, Chungnam University

**ABSTRACT:** *Brevibacterium lactofermentum* SWA (arg trp) and *B. lactofermentum* SWB (met ser) were obtained from UV and NTG treatment. The rates of protoplast formation by *B. lactofermentum* SWA and SWB were 99.93% and 99.98%, respectively when each strain was treated with penicillin G in mid exponential growth phase, followed by incubation with 400 ug/ml of lysozyme in lysis fluid supplemented with 0.4M sucrose. Frequencies of protoplast regeneration in *B. lactofermentum* SWA and *B. lactofermentum* SWB were 9.27% and 10.32% respectively, on regeneration medium containing 0.5M sodium succinate, 50 mM Mg<sup>2+</sup>, and 3% PVP. In intraspecific protoplast fusion between *B. lactofermentum* SWA and *B. lactofermentum* SWB, fusion frequency of  $2.30 \times 10^{-5}$  was observed by using the 100 mM CaCl<sub>2</sub> and 30% PEG 6,000 in fusion fluid. Relative recombinant frequencies in each marker by means of selective media could be used for genetic analysis.

**KWY WORDS** □ Protoplast fusion, genetic analysis of recombinats, *Brevibacterium lactofermentum*

다른 미생물에 비하여 아미노산 및 핵산의 생산성이 높아 산업적으로 매우 중요한 가치가 있는 균주로 알려진 coryneform bacteria의 원형질체 융합에 관한 연구가 최근 진행되었다. 즉, 1979년 Kaneko 등이 *B. flavum*을 이용하여 원형질체 융합을 시도하여 성공하였고 1986년 Karasawa 등이 *B. flavum*의 원형질체 융합법을 이용하여 lysine의 생산성을 높였다는 보고가 있다. 우리나라에서도 Shin et al.(1984)의 원형질체 융합조건의 규명 내지 융합 방법 개발에 관한 연구, Lim, B. S.(1985)의 동종·이종간의 융합에 의한 lysine균주 개발, 그리고 Baek, S. Y.(1987)의 glutamate와 glutamine 생산을 위한 이종간의 원형질체 융합에 관한 연구 등이 시도되었다. 본 연구에서는 유전학적인 견지에서 유전자의 재조합에 의한 새로운

균주 개발이나 아미노산 생산에 기여 하고자 아직까지 mating이 불가능한 coryneform bacteria를 이용하여 원형질체의 형성, 세포벽 재생조건 및 융합조건을 조사하고 최적 조건하에서 융합을 시도 하였으며, 여기에서 얻어진 융합균주들의 유전적 분석을 통하여 유전자간의 순서를 결정하고자 시도하였다.

#### 재료 및 방법

##### 실험재료

**사용균주 :** 본 실험에서 사용한 균주는 *Brevibacterium lactofermentum* SW 181과 이를 UN와 N-methyl-N-nitrosoguanidine(NTG)으로 처리하여 얻은 영양요구성 변이주로서 Table 1과 같다.

본 연구는 한국과학기술재단의 지원에 의한 것임.

**Table 1.** Bacterial strains used in this experiments

Bacterial strains	Genotype	Source
<i>B. lactofermentum</i> SW 181		<i>B. lactofermentum</i> ATCC 13869
<i>B. lactofermentum</i> SWA	arg trp	<i>B. lactofermentum</i> SW 181
<i>B. lactofermentum</i> SWB	met ser	<i>B. lactofermentum</i> SW 181

배지 및 완충용액 : 균주배양에는 Complete Medium(CM), Minimal Medium(MM), Minimal Medium Yeast Extract(MMYE)를 사용하였고, 원형질 융합과 그 재생을 위한 배지 및 완충용액으로는 Lysis Fluid(LF), Dilution Fluid(DF), Fusion Fluid(FF), Tris-Malic Acid(TM) buffer, Regeneration Compete Medium(RCM), 그리고 Minimal Medium(MM)에 0.5M sodium succinate와 3% polyvinyl pyrrolidone을 첨가한 Regeneration minimal medium(RMM)등을 Kaneko et al(1979)와 Lim(1985)의 방법에 따라 사용하였다.

시약 : Penicillin G, lysozyme는 Sigma Co.의 특급을 사용하였고, polyethylene glycol(PEG, M.W. 6,000)은 J.T. Baker Chemical Co.의 제품을 구입하여 사용하였다.

### 실험방법

**영양요구성 변이주의 선별 :** (1) 자외선 처리 : 하루 전에 계대배양한 균을 1백금니 취하여 10ml의 0.85% 생리식염수에 현탁한 후 petri dish에 넣고 magnetic stirrer로 저으면서 자외선을 조사하였으며, 이것을 CM 배지에 도말하고 2일후에 나타나는 colony를 MM과 CM 배지에 각각 picking하여 영양요구주를 분리하였다.

(2) NTG 처리 : 하루 전에 계대배양한 균을 1백금니 취하여 CM에 접종하고 대수 증식기 말기까지 성장한 세포를 원심분리한 후 0.1 M sodium citrate buffer로 세척하고 TM buffer로 현탁하였다. 여기에 NTG를 최종농도가 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 첨가한 후 30분간 정지배양하였다. 여기에서 얻은 세포를 다시 0.1 M sodium phosphate buffer로 2회 이상 세척하고 0.85% 생리식염수에 희석하여 CM plate에 도말한 뒤 2일후에 나타나는 colony를 각각 MM과 CM에 옮겨 영양요구성 변이주를 선별하였으며, 이렇게 얻은 영양요구수에 대해서는 10회 이상 계대배양하여 복귀 여부를 확인하였다.

**원형질체의 형성과 세포벽 재생 :** 원형질체 형성과 세포벽 재생은 Kaneko et al.(1979)의 방법에 기재된 순서에 따라 실험하였다.

**원형질체의 융합 :** 서로 다른 영양요구주인 두 균주의 원형질체들을 동일한 숫자( $3.00 \times 10^8 \sim 5.00 \times 10^8$ )

가 되도록 혼합한 후 즉시 원심분리(3,000 rpm, 5 min, 4°C)하여 침전물을 얻고 이를 FF로 세척하였다. 이어서 100mM  $\text{CaCl}_2$ (Total volume당)를 첨가하고 FF와 PEG를 1 : 9의 비율로 넣어 주어 잘 현탁시킨 다음, 30°C에서 15분간 천천히 진탕배양(50rpm 내외)한 후 FF용액을 동량 첨가하였다. 그 후 다시 원심분리한 뒤 FF로 1회 세척하여 PEG를 완전히 제거하였다. 여기에서 얻은 침전물을 다시 FF로 재현탁시켜 재생용 선별 배지에 도말하였다.

### 결과 및 고찰

#### 영양요구주의 선별

자외선 조사와 NTG 처리에 의해 Table 1에 나타낸 것과 같이 각각 두 개의 아미노산 marker를 가진 영양요구주인 *B. lactofermentum* SWA(arg trp)와 *B. lactofermentum* SWB(met ser)를 분리하였다. 영양요구주 분리에 가장 좋은 조건인 0.1%의 생존율(Palleroni, 1983)을 나타내는 자외선 처리시간은 7분 40초일 때 0.598 erg/mm<sup>2</sup>sec의 조건이며, NTG는 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 30분간 처리하였을 때 가장 효과적일 변이율을 보이는 50%의 생존율(Adelberg et al., 1965)을 나타내었다.

#### 원형질체의 형성과 세포벽 재생

**원형질체 형성 :** 미생물의 세포벽 구성 성분에 따라 원형질체의 형성 방법에 차이가 있는데, 효모에 있어서는 lytic enzyme system과 함께 mercaptoethanol과 KCl을 첨가하여 원형질체 형성을 증가시켰으며(Solingen and Johannes, 1977), 방선균의 경우는 glycine을 배지에 첨가시켰다는 보고(Hammes et al., 1973)가 있다.

#### Lysozyme의 영향

원형질체의 형성과정 중 가장 핵심적인 요인이며 세포벽을 직접적으로 분해하는 효소인 lysozyme의 처리농도 및 처리시간에 대하여 고찰하였다. 그 결과 삼투압 안정제인 0.4 M의 sucrose를 첨가한 Lysis fluid (pH 7.0)에서 *B. lactofermentum* SWA와 *B. lactofermentum* SWB 모두 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 lysozyme 농도로 16시간 처리하였을 때, 각각 99.98%, 99.93%를 나타내었다(Table 2). 이 때 viable cell수는 lysozyme 처리 후 삼투압 안정제를 첨가하지 않는 complete media에서 성장한 콜로니수로 나타내었다.

**원형질체의 세포벽 재생 :** 원형질체의 재생조건은 융합률을 높이는 중요한 요소이므로 재생에 관여하는 다음 조건을 살펴보았다.

#### 2가 양이온의 영향

균주마다 약간의 차이는 있으나 *Streptomyces*속의

**Table 2.** Effect of lysozyme concentration and treatment time on the protoplast formation of *B. lactofermentum* SWA and SWB.

Lysozyme Conc. (ug/m)	Treatment time (hr)	Viable cell (cells/m)		*pff(%)	
		SWA	SWB	SWA	SWB
400	8	3.51 × 10 <sup>6</sup>	5.75 × 10 <sup>6</sup>	98.83	97.50
	12	1.50 × 10 <sup>6</sup>	2.94 × 10 <sup>6</sup>	99.50	98.72
	16	5.00 × 10 <sup>4</sup>	1.60 × 10 <sup>5</sup>	99.98	99.93
	20	3.01 × 10 <sup>4</sup>	2.00 × 10 <sup>4</sup>	99.99	99.99

\* Initial total cell number was 3 × 10<sup>8</sup> cells/m for *B. lactofermentum* SWA and 2.3 × 10<sup>8</sup> cells/m for *B. lactofermentum* SWB.

\* Protoplast formation frequency (pff).

$$pff(\%) = \frac{\text{Total cell number} - \text{Viable cell number}}{\text{Total cell number}} \times 100$$

서는 20 mM Mg<sup>2+</sup>와 50 mM Ca<sup>2+</sup>를 재생배지에 첨가함으로써 재생률을 10배 정도 증가시켰으며(Okanish et al., 1974), coryneform bacteria에서도 25 mM Mg<sup>2+</sup>와 50 mM Ca<sup>2+</sup>를 사용하여 2.1배의 재생률을 증가시켰다는 보고(Shin et al., 1984)에 따라 본 실험에서도 Mg<sup>2+</sup>와 Ca<sup>2+</sup>를 농도별로 재생배지에 첨가하여 재생에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 50 mM Mg<sup>2+</sup> 농도에서는 비교적 높은 재생률을 나타내었으나, Ca<sup>2+</sup>를 단독으로 처리하거나 Mg<sup>2+</sup>와 Ca<sup>2+</sup>를 복합적으로 처리하였을 때는 오히려 재생률이 감소하여 위의 보고와 다른 결과를 보여주었다(Table 3).

**원형질체의 융합**

Kao et al.(1974)이 PEG를 융합에 사용하여 성공한 이래로 PEG는 원형질체 융합에 효과적인 융합 유도체로 사용되고 있으며, CaCl<sub>2</sub>도 이용되고 있다(Fodor and Aloldi, 1976).

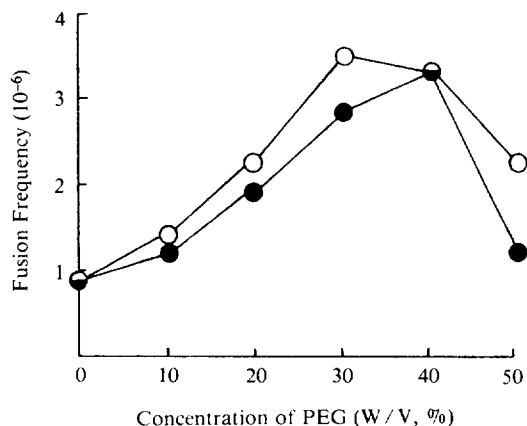
본 실험에서는 Kaneko 등이 사용한 방법을 이용하여 원형질체 형성과 재생의 최적조건으로 원형질체의 재생율을 높이기 위하여 원형질 융합시에 3%의 polyvinyl pyrrolidone을 첨가하고 0.4%의 low melting point agarose를 도달하였다. 또한 PEG의 처리농도와 처리시간에 따른 융합빈도와 CaCl<sub>2</sub>의 처리단계 및 농도별 영향에 대하여 살펴보았다.

**PEG의 영향**: Fig. 1에 나타난 바와 같이 PEG의 농도는 분자량이 1,000보다 6,000에서 약간 높았으며, PEG 6,000, 30%(W/V)에서 3.54 × 10<sup>-6</sup>의 융합빈도를 나타내었다. 또한, PEG 처리시간에서는 5분 내외의 처리가 효과적이라는 보고(Shin et al., 1984)와는 달리 15분간 처리하였을 때가 높게 나타났다.

**CaCl<sub>2</sub>의 영향**: papahadjopoulos et al.(1977)은 이가

**Table 3.** Effect of divalent cations on regeneration frequency of *B. lactofermentum* SWB.

Conc. (mM)		Regeneration	
MgCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	Colony No. formed (per ml)	Relative value (%)
—	—	4.00 × 10 <sup>6</sup>	100
10	—	4.26 × 10 <sup>6</sup>	106
25	—	4.79 × 10 <sup>6</sup>	119
50	—	5.05 × 10 <sup>6</sup>	126
—	10	4.17 × 10 <sup>6</sup>	104
—	25	2.86 × 10 <sup>6</sup>	72
—	50	1.87 × 10 <sup>6</sup>	47
10	10	4.34 × 10 <sup>6</sup>	89
10	25	2.90 × 10 <sup>5</sup>	73



**Fig. 1.** Effect of PEG concentration on the fusion frequency.

PEG 6,000 (○—○), PEG 1,000 (●—●). Treatment with PEG was for 15 min.

\* Fusion frequency = 
$$\frac{\text{Number of colonies per unit volume on selective medium}}{\text{Number of total colonies per unit volume on RC'M}}$$

양이온의 첨가는 융합시 일어나는 hexagonal phase의 형성률을 촉진한다고 보고하였으며, 또한 Hopwood et al.(1977)은 단백질의 응집과 세포간의 접촉을 증가시켜 준다고 보고하였다.

Table 4는 CaCl<sub>2</sub>의 처리단계와 농도에 대한 융합 빈도를 나타낸 결과로써 100 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가했을 때 최고 2.30 × 10<sup>-5</sup>의 융합빈도를 나타내었으며 이는 Karasawa et al. (1986)의 1.00 × 10<sup>-3</sup>과 비교하여 보았을 때 훨씬 낮은 수치였다.

**Table 4.** Effect of CaCl<sub>2</sub> treatment and concentration on the fusion frequency

CaCl <sub>2</sub> (mM)	Fusion frequency			
	FF + PEG	CaCl <sub>2</sub> + FF + PEG	FF + CaCl <sub>2</sub> + PEG	FF + PEG + CaCl <sub>2</sub>
0	3.39 × 10 <sup>-6</sup>	—	—	—
25	—	4.70 × 10 <sup>-6</sup>	1.56 × 10 <sup>-6</sup>	7.14 × 10 <sup>-6</sup>
50	—	6.52 × 10 <sup>-6</sup>	3.26 × 10 <sup>-6</sup>	4.00 × 10 <sup>-6</sup>
75	—	8.08 × 10 <sup>-6</sup>	3.41 × 10 <sup>-6</sup>	2.44 × 10 <sup>-6</sup>
100	—	2.30 × 10 <sup>-5</sup>	3.05 × 10 <sup>-6</sup>	2.28 × 10 <sup>-6</sup>

**Table 5.** Analysis of four-factor protoplast fusion in *B. lactofermentum* SWA (arg met<sup>+</sup> trp ser<sup>+</sup>) × SWB (arg<sup>+</sup> met trp<sup>+</sup> ser)

Genotype of selective progeny				No. of recombination in 10 plates of each medium Supplemented with:									
				Arginine and methionine		Arginine and serine		Tryptophan and methionine		Tryptophan and serine		Avg. frequencies (10 plates)	
				a	b	a	b	a	b	a	b	c	
+	+	+	+	43	50	8	37	21	22	23	38	37	
arg	+	+	+	25	29	12	61	—	—	—	—	45	
+	met	+	+	18	21	—	—	12	13	—	—	17	
+	+	trp	+	—	—	—	—	58	61	46	75	68	
+	+	+	ser	—	—	59	290	—	—	27	44	167	
arg	met	+	+	14	16	—	—	—	—	—	—	12	
+	+	trp	ser	—	—	—	—	—	—	4	7	—	
arg	+	+	ser	—	—	21	104	—	—	—	—	57	
+	met	trp	+	—	—	—	—	9	10	—	—	—	
No. of recombinants analyzed				100	—	100	—	100	—	100	—	—	
No. of recombinants per 10 plates				—	116	—	492	—	106	—	164	—	

Column a, sample of recombinants analyzed in each of the four selective media; column b, total count of recombinants per 10 plates of each medium; column c, average values for the figures in appropriate column b.

**Table 6.** Relative recombination frequency of each pair of marker in the cross SWA × SWB

Components	Avg. frequency*					
	arg-met	arg-trp	arg-ser	met-trp	met-ser	trp-ser
	37	45	37	37	17	37
	68	68	17	45	167	45
	167	12	68	167	12	17
	12	57	57	57	57	12
Total	284	182	179	306	253	111

\* From Table 5.

**재조합체의 유전적 분석**

원형질체 융합에 의해 만들어지는 재조합체는 *B. lactofermentum* SWA(arg trp)와 *B. lactofermentum* SWB (met ser)의 four factor crossover의 결과적 산물

로써, 이들 두 균주 사이의 four factor cross로 생길 수 있는 재조합체의 종류는 모두 7가지이며, 이들 7가지의 유전자형 분석을 위해 arginine + methionine (Selecting trp<sup>+</sup> and ser<sup>+</sup>), arginine + serine(selectint

trp<sup>+</sup> and met<sup>-</sup>), tryptophan+methionine(selecting arg<sup>+</sup> and ser<sup>+</sup>), tryptophan+serine(selecting arg<sup>+</sup> and met<sup>+</sup>) 등 모두 4가지의 selective media를 사용하였다. 그 후 각 medium에서 생긴 colony의 수를 계산하였고 각 medium에서 생긴 colony의 2가지 non-selected marker를 확인하기 위해 각각 4가지의 가능한 genotype을 분석하였다.

Recombinant의 유전적인 분석은 Hopwood et al. (1971)와 Norberto J. P.(1983)의 보고를 기초로 하였다. 4가지 selective media에서 얻은 재조합체의 total number는 Table 5에 나타내었고, Ccolumn의 average frequency는 marker의 각 pair에 대한 relative recombination frequency를 알아보는데 사용하였다. 여러 가지 종류의 genotype을 선별배지를 사용하여 분석하였으나

complementary genotype의 progeny수가 유사하지 않게 나타난 것이 문제점이었다. 이론적인 수치와는 달리 arg ser의 progeny수는 met trp의 progeny수와 유사하지 않았으며, arg met 또는 trp ser의 progeny도 위와 동일한 결과를 나타내었다. 그러므로 Table 6에서는 circular linkage map 작성을 위한 충분한 결과를 얻을 수 없었다.

다만 Table 6에 나타난 바와 같이 arg-met는 284, arg-trp은 182, arg-ser는 179, met-trp은 306, met-ser는 253, met-ser는 111를 나타내었다. 따라서 각 marker 사이의 거리가 멀수록 cross의 확률이 커지고 가까이 있을수록 cross의 확률이 작아진다는 이론을 도입하여 arg-met과 met-trp 사이는 다소 가까이 위치한다고만 추정할 수 있었다.

## 적 요

원형질체 융합에 사용할 genetic selection marker로써 자외선 조사와 NTG 처리에 의해 *Brevibacterium lactofermentum* SWA(arg trp)와 *B. lactofermentum* SWB(met ser)를 분리하였다. 이 균주를 배양하여 증식기에 penicillin G를 처리한 후, 0.4 M sucrose를 첨가한 lysis fluid에서 lysozyme을 400 $\mu$ g/ml의 농도로 16시간 처리하였을 때, *B. lactofermentum* SWA는 99.98%, *B. lactofermentum* SWB는 99.93%의 원형질체 형성률을 나타내었다.

원형질체 융합에서는 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 30%의 PEG 6,000과 fusion fluid를 15분간 처리하였을 때, *B. lactofermentum* SWA와 *B. lactofermentum* SWB의 융합빈도는 2.30 $\times 10^{-5}$ 로 나타내었다. 원형질체 융합에 의해 얻어진 융합균주의 유전적 분석을 위해 selective media와 non-selective media에서 생장한 colony를 계산함으로써 각 marker간의 재조합체의 형성빈도를 조사하였으며, 이들을 분석하여 유전자간의 순서를 결정하였다.

## 참고문헌

1. Adelberg, E.A., M. Mandel and G.C.C. Chen, 1965. Optical conditions for mutagenesis by N-methyl-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **18**, 788-795.
2. Akamatsu, T. and J. Sekiguchi, 1981. Studies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplast. *Agric. Biol. Chem.*, **45**(12), 2887-2894.
3. Baek, S.Y., 1987. L-glutamate and L-glutamic acid production by interspecific protoplast fusion of coryneform bacteria. Master Thesis, Sookmyung Women's University.
4. Foder, K. and L. Alfoldi, 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**(6), 2147-2150.
5. Hammes, W., K.H. Schleifer and O. Kandler, 1973. Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J. Bacteriol.*, **116**(2), 1029-1053.
6. Hopwood, D.A., 1972. Genetic analysis in microorganisms. p. 29-158, In J.R. Norris and D.W. Ribbons (ed.). *Methods in microbiology*. Vol. 7B. Academic Press, Inc. New York.
7. Hopwood, D.A., H.M. Wright, M.J. Bibb and S.N. Cohen, 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. *Nature (London)*, **268**, 171-174.
8. Kaneko, H. and K. Sakaguchi, 1979. Fusion of protoplast and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, **43**(5), 1107-1013.
9. Kao, K.N. and N.R. Michayluk, 1974. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplast. *Planta*, **115**, 355-367.
10. Karasawa, M., O. Tosaka, S. Ikeda and H. Yoshii, 1986. Application of protoplast fusion of the development of L-threonine and L-lysine producers. *Agric. Biol. Chem.*, **50**(2), 339-346.
11. Lim, B.S., 1985. Studies on breeding of L-lysine producing microorganisms by cell fusion and bioreactor system by immobilization of fusant. Ph. D. Thesis, Korea University.
12. Norberto, J.P., 1983. Genetic recombination in *Actinoplanes brasiliensis* by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**(6), 1865-1869.
13. Okamoto, T., Y. Fujita and R. Irie, 1983. Protoplast formation and regeneration of *Streptococcus lactis* cells. *Agric. Biol. Chem.*, **47**(2), 259-263.
14. Okamoto, T., Y. Fujita and R. Irie, 1983. Fusion of protoplasts of *Streptococcus lactis*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**(11), 2675-2676.
15. Okanishi, M., K. Suzuki and H. Umezawa, 1974. Formation and reversion of streptomycete protoplasts: cultural condition and morphological study. *J. Gen.*

- Microbiol.*, **80**, 389-400.
16. **Palleroni, N.J.**, 1983. Genetic recombination in *Actinoplanes brasiliensis* by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1865.
  17. **Papahadjopoulos, D., W.J. Vail, C. Newton, S. Nir, K. Jacobson, G. Poste and R. Lazo**, 1977. Studies on membrane fusion. III. The role of calcium-induced phase change. *Biochim. Biophys. Acta.*, **465**, 579-598.
  18. **Shin, M.G., S.Y. Lee, B.S. Lim and M.J. Chun**, 1984. The protoplast formation, regeneration and fusion of coryneform bacteria. *Kor. Jour. Microbiol.*, **22**(3), 175-181.
  19. **Shirahama, T., T. Furmai and M. Okanishi**, 1981. A modified regeneration method for streptomycete protoplasts. *Agric. Biol. Chem.*, **45**(5), 1271-1273.
  20. **Solingen, P. and B.P. Johannes**, 1977. Fusion of yeast spheroplasts. *J. Bacteriol.*, **130**(2), 946.

(Received May 1, 1990)

(Accepted May 15, 1990)