

Azospirillum amazonense Kp1의 질소고정효소계의 활성 및 특성

송승달 · 김성준 · 추연식
경북대학교 자연과학대학 생물학과

Properties and Activities of Nitrogenase System of *Azospirillum amazonense* Kp1

Song, Seung-Dal, Sung-Jun Kim and Yun-Shik Chu

Department of Biology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT: The maximum nitrogen fixation activity of the associative, microaerobic and acid tolerant bacteria, *Azospirillum amazonense* Kp1 was obtained with 0.2Kpa of O₂ and showed a reversible inhibition by the higher concentrations. Ammonium treatment caused a gradual inhibition of the activity up to 350 mM. The nitrogenase systems were purified by gradient chromatography on DEAE-52 cellulose, heat treatment and preparative PAGE. The MoFe protein showed molecular weight of 210,000 including two nonidentical subunits with apparent molecular weights of 55,000 and 50,000 and an isoelectric point of 5.2, and contained 2, 24 and 28 atoms of Mo, Fe and acid labile S per molecule. The Fe protein revealed molecular weight of 66,000 including two types of subunits with molecular weights of 35,000 and 31,000, and an isoelectric point of 4.6, and contained 4 atoms of Fe and 6 atoms of S per molecule. The maximum specific nitrogenase activity attained 2,200 and 1,700nM C₂H₄ mg⁻¹ min⁻¹, respectively for MoFe and Fe proteins at pH7 and 35°C. The activity was lost after 10 and 30 days under the cold room (4°C) condition for Fe and MoFe proteins, respectively.

KEY WORDS □ *Azospirillum amazonense* Kp1, nitrogen fixation, nitrogenase systems

Azospirillum spp.는 각종 비콩과식물의 근권에 단생 또는 협생하며, 미호기적 상태에서 종속영양적으로 대기질소를 고정하여 암모니아를 식물체 및 근권토양에 공급함으로써 각종 생태계에 있어서 1차 생산성을 향상시키는데 기여하는 것으로 밝혀져 왔다(Okon *et al.*, 1976). 현재 이 글에는 *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense* 및 *A. halopraefrans*가 알려져 있으며, 이들의 질소고정활성은 에너지를 필요로 하는 과정으로써 모두 발산을 포함하는 무기염 배지에서 효율적으로 생육할 수 있다. 한편, *A. brasilense* Sp7은 유기산과 당류를 탄소원으로 이용하여 성장하고 질소고정활성을 갖는 반면, 내산성의 *A. amazonense* Y1은 설탕을 포함하는 무기염 배지에서 잘 성장하고 높은 질소고정활성을 갖는 것이 알려졌다(Magalhaes *et al.*, 1983).

질소고정효소는 혐기적 조건에서 각종 질소고정세균의 무세포 추출액으로부터 DEAE-52 크로마토그래

피에 의해 MoFe 단백질(dinitrogenase)와 Fe 단백질(dinitrogenase reductase)의 두 효소계가 순수분리되고 있다(Bergerson, 1980). 특히 *A. brasilense*에 있어서는 Fe 단백질을 활성화시키는 Activating Enzyme(AE)이 순수분리되었고(Ljungstrom *et al.*, 1989), 또한 western blotting 법에 의해 Fe 단백질의 Sodium dodecyl sulfate(SDS)-Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)에서 두 개의 서브유닛으로 구성되는 것을 볼 수 있다(Nair *et al.*, 1983). 그리고 Song 등(1985)은 *A. amazonense* Y1의 Fe 단백질에서 AE 없이 높은 활성을 나타내며 두 개의 서브유닛을 가지는 것을 보고하였다.

질소고정활성은 질소화합물의 존재 그리고 산소농도 및 온도 등에 의해 저해되며 nif 유전자의 post translation 조절이 있음도 밝혀졌다(Fu *et al.*, 1989; Hartmann and Burris 1987). 한편, *R. palustris*에 있어서 암모늄에 의해 가역적으로 활성이 조절되는 것이 알

려졌으며(Zumft and Castillo, 1978), 그 조절기작은 암모늄에 의해 Fe 단백질의 covalent modification 즉 ADP-ribose의 생성에 기인하는 것으로 밝혀졌다(Gotto and Yoch, 1985).

본 연구에서는 우리나라 각지에 널리 자생하는 벼과식물의 근권에 협생적으로 서식하여 그 분포 및 질소고정기작이 중요시되고 있는 *Azospirillum* spp.에 대하여 질소고정활성의 조절에 대한 산소농도 및 암모늄처리에 따른 단계적 저해를 분석 비교하고, 질소고정활성이 높은 조건에서의 배양균으로부터 혐기적 처리에 의해 활성이 있는 질소고정효소계를 분리하여 그 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

질소고정균의 분리, 성장 및 활성

수중의 벼과식물의 뿌리와 토양을 채취하여 semisolid의 무질소 최소배지에 의하여 미호기적 및 내산성의 *Azospirillum* spp.를 분리하였다(Magalhaes *et al.*, 1983). 그 가운데 질소고정활성이 높은 균주를 선별하여 NB 배지에 증식시키고, 0.5% 말산을 탄소원으로 하는 2의 최소배지(KH_2PO_4 0.60g, K_2HPO_4 0.60g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.20g, NaCl 0.10g, CaCl_2 0.02g, FeCl_3 0.01g, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.00 mg, H_3BO_3 2.80 mg, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.04 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.24 mg, per liter, morpholinoethane sulfonic acid(MES) 50 mM, pH 6.0)에 질소원으로써 NH_4Cl 를 20 mM(1차) 및 1 mM(2차) 그리고 산소농도를 0.1-1.0 Kpa로 조절하여 30°C에서 48시간 진탕배양하였다. 균의 성장과정 중 일정한 시간간격으로 소량을 채취하여 성장속도와 질소고정활성을 측정하고, 최대활성에 달한 균체를 15°C 이하로 낮추어 sodium dithionite(DT) 2 mM과 Tris 100 mM을 첨가하고, 혐기적으로 원심분리하여 질소고정효소의 순수분리에 사용하였다.

균체의 질소고정활성측정은 10 ml의 vial을 사용하여 manifold에 의해 알곤가스를 3회 반복 주입하여 혐기적으로 처리하고, 균배양액 1 ml를 주입한 후 산소(0.1-8.0 Kpa)와 NH_4Cl (0-350 mM)를 처리하여 30°C에서 진탕배양하고, 1 ml(10%)의 아세틸렌을 주입하여 반응시키면서 5-10분 간격으로 0.5 ml의 가스샘플을 채취하여 가스크로마토그래피에서 환원된 에틸렌의 양을 측정하였다.

질소고정효소계의 분리

질소고정효소계의 분리과정은 모든 반응계를 혐기적 조건으로 처리하여 DT 2 mM과 dithiothreitol(DTT) 1 mM을 첨가한 300 mM Tris-acetate 완충액(pH 8.5) 20 ml에 균체 10g을 현탁하고, lysozyme 20 mg, DNase 1 mg 및 RNase 2 mg을 첨가하여, 실온에서 30분간 분해시킨 후 초음파세포파쇄(15 W, 2 min)처리를 하고,

초원심분리(200,000×g, 1 hour)하여 짙은 갈색의 효소추출액을 얻었다. 다시 50 mM의 Tris-acetate(pH 7.6)에 희석하여 혐기적으로 평형처리된 DEAE-52 셀룰로스칼럼에 흡수시킨 후 짙은 갈색의 밴드인 MoFe 단백질 분획은 NaCl 200 mM을 함유하는 50 mM Tris 완충액(DT 2 mM, DTT 1 mM, pH 7.6)으로 추출하였고, 다음에 NaCl 450 mM을 함유하는 50 mM Tris 완충액으로 황색의 Fe 단백질 분획을 추출하였다.

MoFe 단백질의 순수분리

1차적으로 분리한 MoFe 단백질 분획은 55°C에서 5분간 열처리한 후 원심분리(200,000×g, 30 min)하고, 상정액은 50 mM Tris 완충액(DT 2 mM, DTT 1 mM, pH 7.6)으로 희석하여 2차의 혐기적 DEAE-52 칼럼에 흡착시켰다. 다시 NaCl 200 mM를 포함하는 Tris-acetate 완충액(DT 2 mM, DTT 1 mM, pH 7.6)으로 MoFe 단백질을 추출하여 30%의 polyethylene glycol(PEG) 4000에 침전시켰다. 이 침전물은 10%의 설탕을 포함하는 소량의 Tris-acetate 완충액(pH 7.6)에 재현탁하여 혐기적으로 18시간 이상 PAGE(분리젤 7%, 흡수젤 4% 및 하부젤 17%)에 의해 순수한 MoFe 단백질을 분리하고, 2 mM DT 및 5 mM Mg-acetate를 포함하는 50 mM Tris-acetate(pH 7.4) 완충액으로 회수하였다(Song *et al.*, 1985).

Fe 단백질의 순수분리

1차적으로 분리한 Fe 단백질 분획은 열처리(55°C, 5 min)하여 원심분리하고, 상정액을 3배의 50 mM Tris-acetate 완충액(DT 2 mM, DTT 1 mM, pH 7.6)으로 희석하여 혐기적으로 평형시킨 2차의 DEAE-52 칼럼에 흡수시켰다. 황색의 Fe 단백질 분획은 450 mM NaCl, 2 mM DT 및 1 mM DTT을 포함하는 50 mM Tris-acetate 완충액(pH 7.8)으로 추출하여, 혐기적 Sephadex G-25 칼럼에서 탈염시킨 후 preparative PAGE에 의해 위의 MoFe 단백질의 경우와 같은 방법으로 순수분리하였다.

SDS-slab gel 전기영동

SDS-PAGE는 Kanemoto와 Ludden(1984)의 개량법으로서 저농도의 cross-linker(10% acrylamide gel의 acrylamide/N,N'-methylene bisacrylamide 비, 30 : 0.174)를 사용하였다. 각종의 효소단백질 약 1-5 μg 을 SDS-cocktail 70 μl (26 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.6 mM EDTA, 2.6% SDS, 29% glycerol, 0.007% bromophenol blue, 3.6% 2-mercaptoethanol 및 70 mM NaOH)와 혼합하여 1분간 열탕 처리한 후 50 μl 를 SDS-slab gel에 주입하고, DC 100 V에서 30분간 그리고 DC 200 V에서 1시간 전기영동하고 Coomassie brilliant blue G 염색으로 표준단백질과 비교하여 분자량을 측정하였다. 등전점은 O' Farrell(1975)의 방법에 따라 약 100 μg 의 MoFe 단백질과 Fe 단백질을 2% ampholine(pH 3-10)을 포함하는 3% acrylamide gel에 주입하고, DC

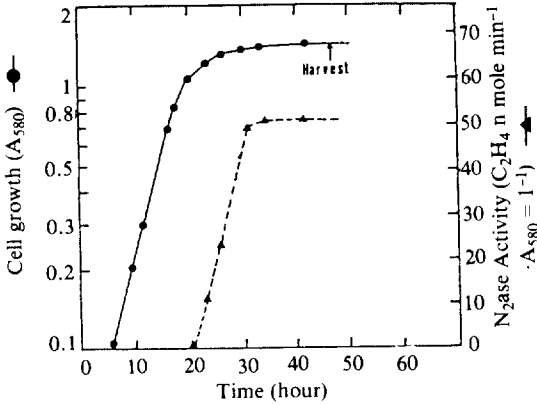


Fig. 1. Time trends of cell growth and nitrogenase activity of *A. amazonense* Kp1 culture with 0.5% malate and 0.1-1.0 Kpa oxygen in minimal medium.

350 V에서 12시간 및 DC 800 V에서 1시간 전기영동하여 측정하였다.

효소단백질의 Mo와 Fe 및 산불안정 S의 함량은 각각 Clark와 Axley(1955), Bogart와 Beinert(1967) 및 King과 Morris(1967)의 방법으로 비색정량하였다. 효소의 단백질함량은 microbiuret법(Goa, 1953)으로 표준 bovine serum albumin(BSA)에 의해 측정하였다.

질소고정효소의 활성분석

순수분리한 질소고정효소의 환성은 5 mM DT를 환원제로 하고 ATP 재생제로써 40 μM 인산크레아틴, 14.5 units 크레아틴인산효소, 25 μM Mg-acetate, 0.5 μM MnCl₂, 30 μM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid(MOPS) 완충액(pH 7.0) 및 5 μM ATP를 포함하는 반응혼합액 1 ml를 10 ml의 주사병에 넣고, manifold에서 혐기상태로 한 후 아세틸렌 1 ml를 가하여 30°C에서 5분간 진탕배양하고 질소고정효소계 (MoFe/Fe 단백질 1-100 μl)를 주입하여 반응시키며, 15분 간격으로 0.5 ml의 가스샘플을 채취하여 가스크로마토그래피에서 환원된 에틸렌의 양을 정량하였다 (Burris, 1972). 비환성은 1 mg의 단백질이 1분간에 환원하는 에틸렌의 nM 수로 산출하였다.

시 약

모든 화학약품은 분석용을 이용하였으며, DTT와 Tris는 Boehringer, Mannheim Biochemicals에서, ATP, ampholine, BSA, DT, DNase, RNase, lysosome, MES, MOPS, creatine phosphokinase 및 phosphocreatine은 Sigma Chemical Co.에서 acrylamide와 N,N'-methylenebisacrylamide는 Bio-Rad Lab.에서, DEAE-52 cellulose는 Whatman Inc.에서, Sephadex G-25 및 PEG 4000은 Pharmacia Inc.에서 공급되는

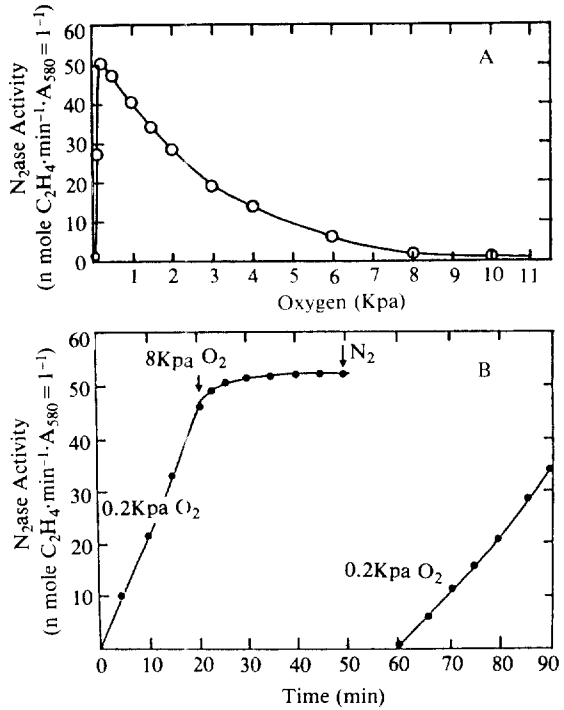


Fig. 2. Influence of dissolved oxygen on the nitrogenase activity of *A. amazonense* Kp1. A, Effect of oxygen concentrations (Kpa) on the activity B, Reversible "Oxygen switch off" of the activity

시약을 사용하였다.

결과 및 고찰

***Azospirillum amazonense* Kp1의 성장**

식물근원으로부터 *Azospirillum* spp. 분리용 semisolid법에 의해 순수분리한 그람음성이며 vibroid로써 미호기성 및 대산성의 균주로 확인되는 *A. amazonense* Kp1은(박, 1987) 말산 0.5%와 NH₄Cl 1 mM을 포함하는 최소배지에서 Fig.1에서와 같이 성장 및 질소고정활성을 보였다. 접종 24시간 후에 대수성장이 끝나고 A₃₈₀ = 1.0에 달하였으며, 이 때 질소화합물이 결핍되어 성장속도는 둔화되나, 균체의 질소고정활성이 출현하여 급격히 증가하고 30시간 후에는 최대활성인 50 μM C₂H₄ min⁻¹ · A₃₈₀ = 1⁻¹에 달하였다. 그러나 배지의 용존산소농도나 임보농도를 증가시키면 균체의 성장은 크게 향상되지만 질소고정활성은 소실되었다(박, 1987).

질소고정활성의 조절

A. amazonense Kp1은 미호기성균으로써 용존산소의 농도에 따라 질소고정활성이 저해되었고, 최적의 용

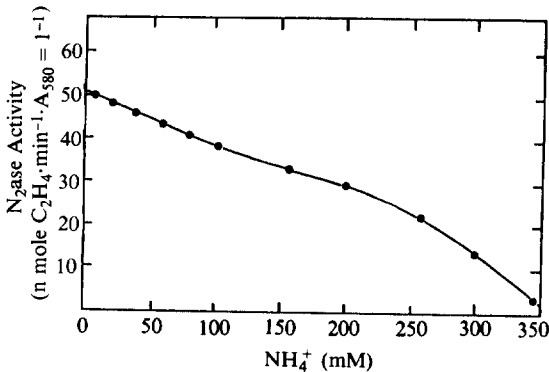


Fig. 3. Effects of ammonium concentrations on the nitrogenase activity in *A. amazonense* Kp1.

존산소농도는 0.2 Kpa였으나, 8.0 Kpa O₂의 고농도에 이르기까지 활성의 점차적 저해를 보였다. 이것은 Hartmann 등(1987)이 보고한 *A. brasilense* Sp7와 *A. lipoferum* Sp Br 17의 질소고정활성에 대한 산소(0.1-1.0 Kpa)의 저해작용에 비하면 보다 높은 용존산소에 대해 내성을 나타내었다. 용존산소농도에 따른 저해작용은 가역적인 것으로서 다시 혐기처리하여 최적용존산소를 유지하면 질소고정활성이 재현되었다(Fig.2A, B).

A. amazonense Kp1의 질소고정활성은 암모늄처리에 따라 Fig.3에서와 같이 350 mM의 고농도에 이르기까지 점차적인 저해를 보였으며, *A. brasilense*나 *A. lipoferum*에서는 1 mM의 암모늄처리로써 질소고정활성이 완전히 switch off 되는 보고(Hartmann et al., 1985)와 비교하면 내성이 상당히 컸다.

질소고정효소계의 특성

Fig.4는 *A. amazonense* Kp1의 질소고정효소의 순수분리 과정별로 SDS-PAGE에 의한 단백질밴드를 비교하였다. 혐기적 PAGE에서 순수분리된 MoFe 단백질(lanes 4 & 7)과 Fe 단백질(lanes 5 & 6)은 모두 2개의 밴드로 나타났다.

순수분리한 MoFe 단백질은 분자량이 55,000 및 50,000달톤인 서브유닛트가 각각 2개로써 210,000달톤이고, 분자당 2원자의 Mo과 24원자의 Fe 그리고 28원

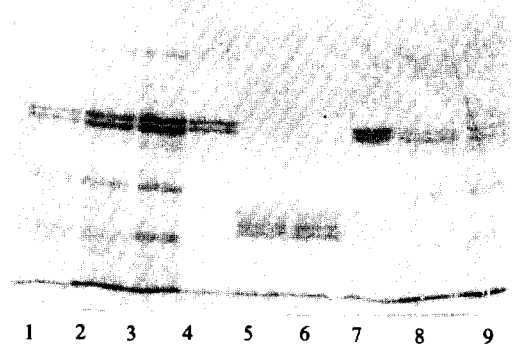


Fig. 4. Comparison of the purification steps of nitrogenase components in SDS-polyacrylamide gel (11% T, 3% C).

- lane 1 & 2, 1.5 and 3 ug of 2nd DEAE-52 MoFe protein fraction.
- lane 3, 3 ug of DEAE-52 Fe protein fraction.
- lane 4 & 7, 1.5 ug of purified MoFe protein from PAGE.
- lane 5 & 6, 2 ug of purified Fe protein from PAGE.
- lane 8, 2 ug of 1st DEAE-52 MoFe protein fraction.
- lane 9, 3 ug of crude enzyme extracts.

자의 산불안정한 S를 함유하였으며, 등전점은 5.2였다. Fe 단백질은 분자량이 35,000 및 31,000달톤의 서브유닛트가 각각 1개로서 66,000달톤이고, 분자당 4원자의 Fe와 6원자의 S를 함유하였으며 등전점은 4.6이었다. 혐기적 PAGE에 의해 순수분리된 MoFe 및 Fe 단백질의 최대비활성은 각각 2,200 및 1,700 nM C₂H₄ min⁻¹ mg protein⁻¹로서 원효소액에 비해 55배와 40배였으며, 효소단백질의 최종수율은 각각 0.86%와 0.61%였다(Table 1).

MoFe 단백질과 Fe 단백질의 몰비를 변화시켜 측정된 질소고정활성은 Fig.5A, B에서와 같다. 순수한 MoFe 단백질과 Fe 단백질은 각각 단독으로는 아세틸렌 환원활성이 없었고, 두 단백질의 최대활성에 대한 몰비는 Fe 단백질에 대해서는 1 : 2로써 과잉의 MoFe

Table 1. Some characteristics of purified nitrogenase systems from *A. amazonense* Kp1

Nitrogenase systems	Purification fold by PAGE	Specific activity (u, mg ⁻¹)	Mol weight (× 10 ⁻³)	Subunit Mol weight (× 10 ⁻³)	Mo (g-atom/mol)	Fe (g-atom/mol)	Acid labile S (g-atom/mol)	Isoelectric point	Protein yield (%)
MoFe protein (Dinitrogenase)	55	2200	210	55 × 2 50 × 2	2	24	28	5.2	0.86
Fe protein (Dinitrogenase reductase)	40	1700	66	35 × 1 31 × 1	0	4	6	4.6	0.61

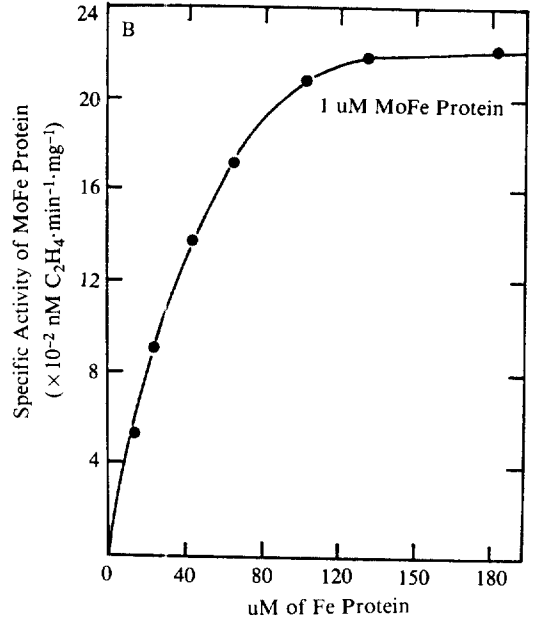
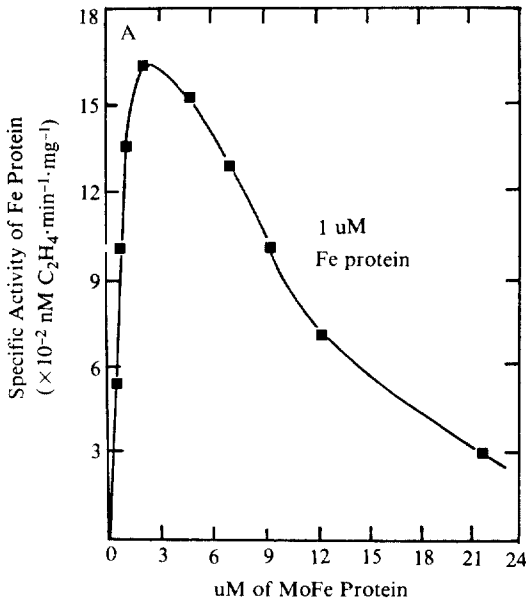


Fig. 5. Titration curves of the acetylene reduction activity.
 A, Fe protein titrated with MoFe protein.
 B, MoFe protein titrated with Fe protein.

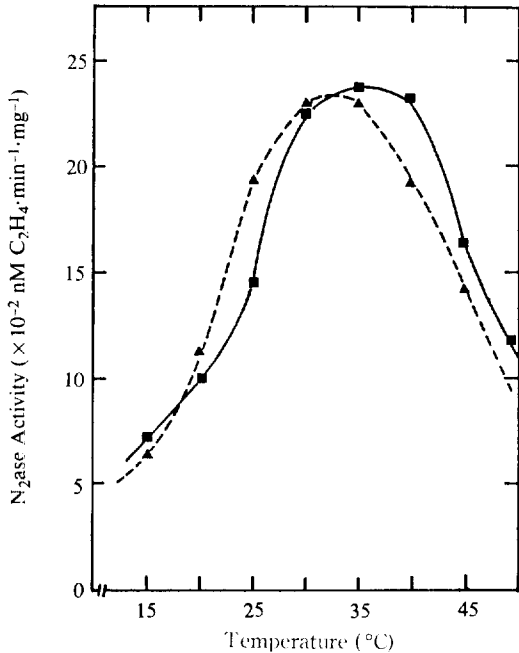


Fig. 6. Temperature profiles of acetylene reduction activity of the purified nitrogenase system (1:120 molar ratio of MoFe to Fe proteins) from *A. amazonense* Kp1.
 —■—, after 10 minutes of incubation; ---▲---, after 20 minutes of incubation.

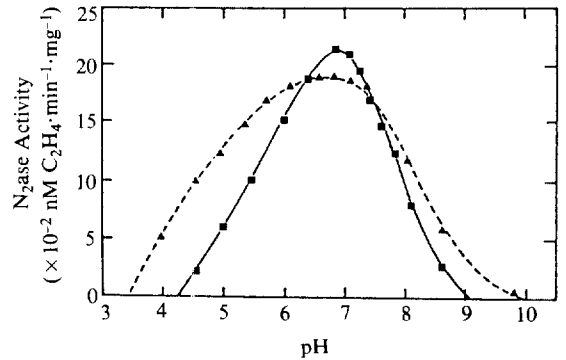


Fig. 7. pH profiles of acetylene reduction activity of the purified nitrogenase system (1:120 molar ratio of MoFe to Fe proteins) from *A. amazonense* Kp1.
 ---▲---, after 5 minutes of incubation; —■—, after 30 minutes of incubation.

단백질에 의해 저해를 보였으나, MoFe 단백질에 대해서는 1 : 120으로 포화곡선을 그렸다.

이 효소계의 활성에 대한 온도와 pH의 영향은 Fig.6 및 7과 같이 최적온도는 35°C였고, 최적pH는 6.0-7.5이었다. 단시간의 반응에서는 보다 높은 온도에서 최대활성이 나타났고, pH 5.0의 산성에서도 50% 이상의 높은 활성을 유지하였다. 이 효소계는 액체질소에서 보존될 수 있으나, 혐기상태가 충분할 때에도 MoFe

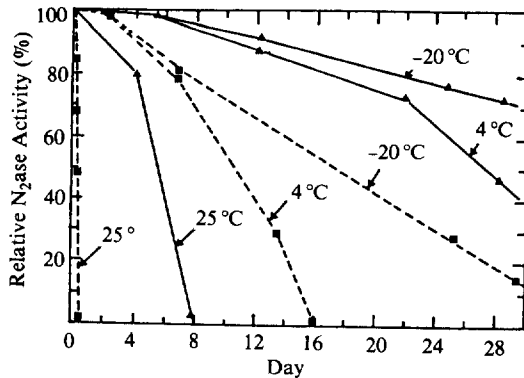


Fig. 8. Time changes of the relative activity of nitrogenase system from *A. amazonense* Kp1 at different temperatures.

—▲—, MoFe protein; ---■---, Fe protein.

단백질은 4°C에서 30일, 실온(25°C)에서는 4일 정도 활성을 유지하였고, Fe 단백질은 4°C에서 10일, 25°C에서는 5시간만에 활성을 소실하였다(Fig.8). Fe 단백질의 불안정성은 각종 질소고정효소계의 공통되는 점으로서 Fe, S 중심이 쉽게 손상되는 것으로 보여진다.

사 사

본 연구는 과학재단 연구비(1987-1988년)의 지원에 의해 수행되었음.

적 요

식물근권에서 분리된 혐성의 미호기성 및 내산성인 *A. amazonense* Kp1의 질소고정은 용존산소농도 0.2 KPa에서 최대활성을 보였다. 혐기상태 또는 고농도의 산소조건에서는 가역적으로 활성이 저해되었고, 암모늄처리하는 350 mM 농도까지 점차적으로 활성을 억제하였다. 최대 질소고정활성을 갖는 균체로부터의 효소추출액을 DEAE-52 크로마토그래피, 열처리 및 PAGE에 의해 순수분리한 질소고정효소계인 MoFe 단백질은 분자량이 210,000 달톤으로 55,000 및 50,000 달톤인 각각 2개의 서브유닛트를 갖고, 2원자의 Mo, 24원자의 Fe 및 28원자의 S를 함유하며, 등전점이 5.2, 그리고 최대비활성이 2,200 nM C_2H_4 $mg^{-1} min^{-1}$ 였다. Fe 단백질은 분자량이 66,000 달톤으로 35,000 및 30,000 달톤인 서브유닛트로써 구성되고, 4원자의 Fe 및 6원자의 S를 함유하며, 등전점이 4.6으로 산성이고, 최대비활성이 1,700 nM C_2H_4 $mg^{-1} min^{-1}$ 였다. 이 효소계는 pH 7, 온도 35°C에서 최적활성을 나타내었고, 4°C에서 MoFe 단백질과 Fe 단백질은 각각 30일과 10일 정도 활성을 유지하였다.

REFERENCES

- Bergersen, F.J., 1980. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. John Wiley & Sons, New York, pp. 213-264.
- Bogart, M.V.D. and H. Beinert, 1967. Micromethods for the quantitative determination of Iron and Copper in biological material. *Anal. Biochem.*, **20**, 325-334.
- Burris, R.H., 1972. Nitrogen fixation assay methods and technique. *Methods in Enzymol* 24B. Academic Press, New York pp. 415-431.
- Clark, L.J. and J.H. Axley, 1955. Molybdenum determination in soils and rocks with dithiol. *Anal. Chem.*, **27**, 2000-2004.
- Fu, H., A. Hartmann, R.G. Lowery, W.P. Fitzmaurice, G.P. Roberts and R.H. Burris, 1989. Post translational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.*, **171**, 4679-4685.
- Goa, J., 1953. A microbiuret method for protein determination. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **5**, 218-222.
- Gotto, J.W. and D.C. Yoch, 1985. Regulation of nitrogenase activity by covalent modification in *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.*, **141**, 40-43.
- Hartmann, A., H. Fu, S.D. Song and R.H. Burris, 1985. Comparison of nitrogenase regulation in *A. brasilense*, *A. lipoferum* and *A. amazonense*. *Azospirillum* III. Springer Verlag, Berlin, pp. 116-126.
- Hartmann, A. and R.H. Burris, 1987. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *A. brasilense* and *A. lipoferum*. *J. Bacteriol.*, **169**, 944-948.
- Kanemoto, R.H. and P.W. Ludden, 1984. Effect of ammonia, darkness, and phenazine methosulfate on whole-cell nitrogenase activity and Fe protein modification on *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.*, **158**, 713-720.
- King, T.E. and R.O. Morris, 1967. Determination of acid labile sulfide and sulfhydryl groups. *Methods in Enzymol.* 10 Academic Press, New York, pp. 623-641.
- Ljungström, E., M.G. Yates and S. Nordlund, 1989. Purification of the activating enzyme for the Fe protein of nitrogenase from *A. brasilense*. *Biochem. Biophys. Acta*, **994**, 210-214.
- Magalhaes, F.M., J.I. Baldani, S.M. Souto, J.R. Kuykendall and J. Döbereiner, 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Brazil. Cienc.*, **55**, 417-430.
- Nair, S.K., P. Jara, B. Quiviger and C. Elmerich, 1983. Recent developments in the genetics of nitrogen

- fixation in *Azospirillum* (W. Klingmüller ed.) *Exper. Suppl.*, **48**, 29-38.
15. **O'Farrell, P.H.**, 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021.
 16. **Okon, Y., S.L. Albrecht and R.H. Burris**, 1976. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.*, **127**, 1248-1254.
 17. **박노윤**, 1987. *Azospirillum* spp.의 분리 및 생장조건, 경북대학교 석사논문, pp.1-24.
 18. **Song, S.D., A. Hartmann and R.H. Burris**, 1985. Purification and properties of the nitrogenase of *A. amazonense*. *J. Bacteriol.*, **164**, 1271-1277.
 19. **Zumft, W.G. and E. Castillo**, 1978. Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodopseudomonas palustris*. *Arch. Microbiol.*, **117**, 53-60.

(Received March, 9, 1990)

(Accepted May 19, 1990)