

Nif A의 Overproduction에 의한 *Klebsiella oxytoca* 균주의 질소 고정력 증진 효과

서현창* · 유익동

신구전문대학 식품영양과*, 한국과학기술연구원 유전공학연구소

Effect of Nif A Overproduction on the Improvement of Nitrogenase Activity of *Klebsiella oxytoca* Strains

Hyun-Chang Seo*, Ick-Dong Yoo

Department of Food and Nutrition, Shingu Junior College, Sunghnam 462-743, Korea*

Genetic Engineering Research Institute, Korea Institute of Science and Technology, Daejeon 305-606, Korea

Abstract

As a research for developing biofertilizers, *Klebsiella oxytoca*, an associative nitrogen fixer in the rhizosphere of rice plant in the soil of paddy field, was subjected to molecular breeding. The results obtained were as followings : 1). By transforming pMC71A, Nif A overproducing plasmid, into *Klebsiella oxytoca* NG13, *Klebsiella oxytoca* SH31, and *Klebsiella oxytoca* SH161, nitrogenase activities in the absence of nitrogen source in the medium were increased 6.4, 17.2, and 13.5 times, respectively, in comparison with the parent strains. 2). Nitrogenase activity of *Klebsiella oxytoca* NG13, *Klebsiella oxytoca* SH31, and *Klebsiella oxytoca* SH161 was completely repressed in the presence of 15mM NH_4^+ . But, nitrogenase activities of *Klebsiella oxytoca* NG13/pMC71A, *Klebsiella oxytoca* SH31/pMC71A, and *Klebsiella oxytoca* SH161/pMC71A, harboring pMC71A, were 13.7%, 7.7%, and 6.2% of the nitrogenase activities in the absence of nitrogen source in the medium, respectively.

Key words : Nitrogen fixation, *Klebsiella oxytoca*, rice, *nif* LA, pMC71A, recombinant DNA, biofertilizer.

서론

*Klebsiella oxytoca*는 벼의 근권에서 질소를 고정하는 중요한 질소고정 미생물의 하나로 알려져 있다¹⁻³⁾. 두과작물과 공생관계를 갖고 있는 *Rhizobium* sp. 균주들의 경우는 뿌리혹을 형성하여 두과작물에 질소를 공급해 주는 반면에, *Klebsiella oxytoca*는 뿌리혹을 형성하지 않으므로 벼의 뿌리 주변에서 협력적인 관계로 벼에 질소를 공급해 주는 것으로 알려져 있다. 그러나, *Klebsiella* sp.를 비롯한 대부분의 근권 질소고정 미생물의 경우, 고농도의 암모니아태 질소가 존재하는 환경에서 질소고정력이 완전히 억제된다는 점 때문에 미생물 비료로서의 활용이 제한되어 왔다. 유전자 조작을 통해서 질소고정 미생물의 질소고정력을 향상시키고 암모니

아태 질소의 존재 하에서도 질소고정 능력이 억제되지 않고 항상적으로 질소를 공급해 줄 수 있는 미생물이 개발된다면 농업생산성 향상과 토양환경의 보존에 많은 기여를 하게 될 것이다. 따라서 고농도의 암모니아태 질소의 존재하에서도 질소고정 활성을 나타내는 미생물의 육종은 미생물 비료 개발을 위한 일차적 과제이다.

질소고정 유전자, 즉 *nif* 유전자는 20여개의 gene cluster로 구성되어 있으며, 7~8개의 operon으로 구성되어 있다^{4,5)}. 이들 operon의 transcription 방향⁶⁾, 그리고 대부분의 *nif* gene의 protein product와 기능이 확인되고 있다^{7,8)}. 이러한 질소고정 유전자 중 *nif* KDH 유전자는 N_2 를 NH_3 로 환원하는 nitrogenase를 구성하는 구조 유전자로 알려져 있고, *nif* LA 유전자는 조절 유전자로 알려져 있다.

암모니아태 질소의 존재로 인한 질소고정력의 억제는 질소고정의 조절 유전자와 관련된 것이며, 현재까지도 많은 관심이 집중되고 있는 부분이 질소고정 유전자의

조절에 관한 연구이다^{9,10}. *Klebsiella* 균주들의 질소 고정 유전자는 질소가 결핍된 상태에서 *ntr* 계¹¹⁻¹⁵)와 *nif* A에 의한 조절을 받는다. 이중 *nif* A gene product는 *nif*-specific transcriptional regulator로 작용하고 그 자체의 operon을 제외한 모든 operon의 발현에 필요한 것으로 알려져 있다^{16,17}. 한편, 암모니아¹⁸)와 산소¹⁹) 등에 의해 질소고정 활성이 억제되는데, 이러한 repression이 *nif* LA operon에 의해 일어나며 이는 *nif* L gene product가 *nif* A gene product의 activity를 조절하기 때문이라는 사실이 확인되었다²⁰). 따라서 질소 고정 조절 유전자인 *nif* LA 유전자에 관한 연구를 통해 고농도의 암모니아태 질소의 존재하에서도 질소고정 활성을 나타내며 질소고정력이 우수한 미생물의 육종이 가능할 것이다.

본 연구에서는 *nif*-specific transcriptional regulator로 작용하여 *nif* LA를 제외한 다른 operon의 발현에 필요한 *nif* A gene product의 transcription level을 Nif A overproducing 플라스미드인 pMC71A의 도입을 통해 증가시켜, *Klebsiella oxytoca* NG13 과 *nif* L⁻A^c의 chromosome 구조를 갖도록 육종한 *Klebsiella oxytoca* SH31 과 SH161 균주의 질소고정력을 증진시키려고 하였으며 암모니아태 질소의 농도에 따른 질소 고정 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 미생물 균주와 plasmid 는 Table 1과 같았다. *Klebsiella oxytoca* SH31과 *Klebsiella oxytoca* SH161 은 *Klebsiella oxytoca* NG13 의 *nif* LA 구조를 *nif* L⁻A^c 구조로 만든 플라스미드인 pNOS3를 형질전환하여 homologous recombination 방법을 통해 chromosome 의 구조를 *nif* L⁻A^c 구조로 만든 균주였다(Fig. 1)²¹). pMC71A(Fig. 2)도 *nif* L⁻A^c 구조로 된 것으로 KCTC에서 분양 받아 사용하였다.

2. 사용 배지 및 시약

E. coli 와 *Klebsiella oxytoca*의 배양은 LB 배지로 하였으며, 질소고정력 유도과 질소고정균 선발에 쓰는 무질소 배지는 MacNeil²²) 이 사용한 무질소 배지(sucrose 6g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, Na₂HPO₄ 13.9g, KH₂PO₄ 1.7g, NaCl 2g, FeCl₃ · 6H₂O 8mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 1mg, thiamine 1mg, Difco agar 13g, H₂O 1l) 를 사용하였다. 질소고정 활성 측정을 위한 무질소 배지는 Cannon 등이 보고한 NFDM 배지²³) (Glucose 20g, FeSO₄ · 7H₂O 25mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 25mg, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, K₂HPO₄ 12.06g, KH₂PO₄ 3.4g, H₂O 1l) 였고, 질소원 첨가는 (NH₄)₂SO₄ 를 농도별로 첨가하여 사용하였다. 항생물질은 각각 stock solution²⁴) 으로 만들어 사용했으며 chloramphenicol은 25μg/ml, tetracycline은 10μ

Table 1. List of bacterial strains and plasmids used in this work.

| Strains | Relevant markers | Source |
|---|--|-------------|
| <i>E. coli</i> JM109 | F ⁺ , <i>rec</i> A ⁻ | KCTC |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> NG13 | <i>nif</i> ⁺ , wild | Komagata K. |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> SH31 | <i>nif</i> L ⁻ A ^c | This work |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> SH161 | <i>nif</i> L ⁻ A ^c | This work |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> NG13 /pMC71A | Cm ^r , <i>nif</i> ⁺ | This work |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> SH31 /pMC71A | Cm ^r , <i>nif</i> L ⁻ A ^c | This work |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> SH161 /pMC71A | Cm ^r , <i>nif</i> L ⁻ A ^c | This work |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> UNF745 | <i>nif</i> A ⁻ | KCTC |
| pNOY9Cm | Cm ^r , TC ^r | Uozumi T. |
| pNOS3 | Cm ^r | This work |
| pMC71A | Cm ^r | KCTC |

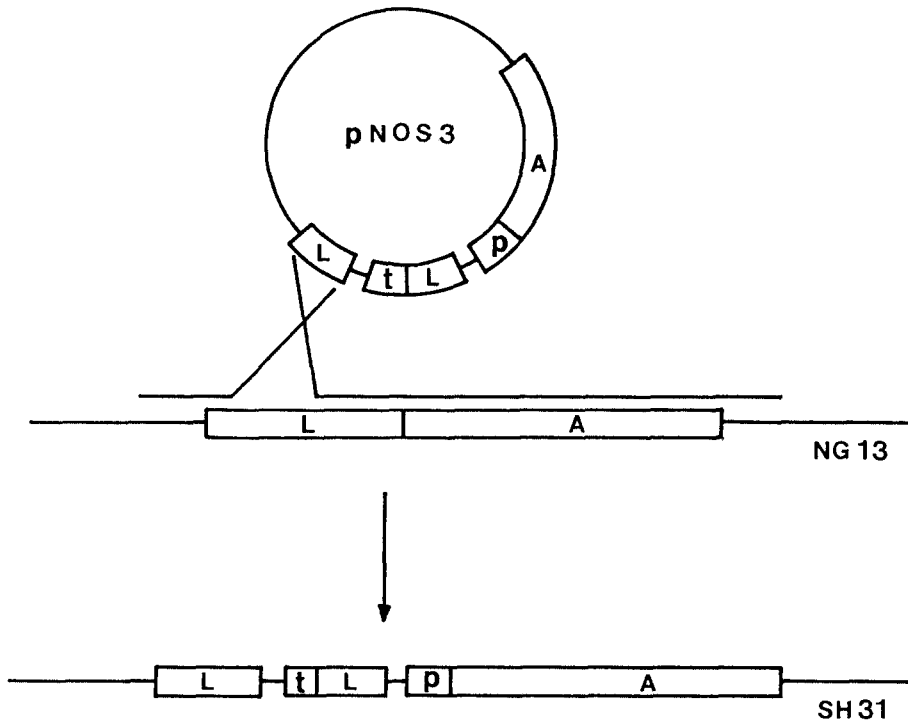


Fig. 1. Induction of homologous recombination between plasmid, pNOS3 and *nif* LA operon of *Klebsiella oxytoca* NG13 to make a new chromosomal structure, *nif* L⁻A^c

g/ml의 최종 농도로 사용했다.

3. 형질전환과 플라스미드 분리

플라스미드의 분리와 형질전환은 Manniatis²⁴⁾의 방법에 준하였고, *Klebsiella oxytoca* 균주들의 형질전환을 위한 완충용액은 wash buffer 로 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM Tris · Cl, pH 7.6 용액을, CaCl₂ buffer로는 100mM CaCl₂, 250mM KCl, 5mM MgCl₂, 5mM Tris · Cl, pH 7.6 용액을 사용하였다.

4. 질소고정 활성의 측정

질소고정 활성의 측정은 Riedel 등²⁵⁾의 방법을 변형시켜 사용하였다. (NH₄)₂SO₄ 2mg/ml과 casamino acid 100μg/ml이 함유된 NFDm 배지(5ml/25ml vial)에 LB 배지에서 8시간 키운 각각의 균을 200μl 씩 접종시켜준 후, butyl rubber로 마개를 하여 30℃에서 overnight culture를 하였다. 균체를 회수한 후

NFDm 배지로 washing 하였고, 다시 5ml의 NFDm 배지에 균체를 회석하여 vial에 넣고 butyl rubber로 마개를 한 후 gas phase 를 10% acetylene, 90% argon으로 치환해 주었다. 30℃에서 12시간 배양한 후 생성된 ethylene의 양을 gas chromatography (Porapak R₁₅₀ column)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

1. *Klebsiella oxytoca*의 형질전환

pMC71A는 Fig. 2에서와 같이 *Klebsiella pneumoniae*의 *nif* L 부분을 일부를 deletion 하여 *nif* L의 repressor기능을 없애고 *nif* A가 copy 수가 많은 플라스미드인 pACYC184에 들어 있도록 제조된 것이었다. *Klebsiella pneumoniae*의 *nif* A를 포함하고 있는 pMC71A를 *Klebsiella oxytoca* 균주들에 형질 전환한 후 플라스미드를 분리하여 pMC71A의 존재를 다시 확

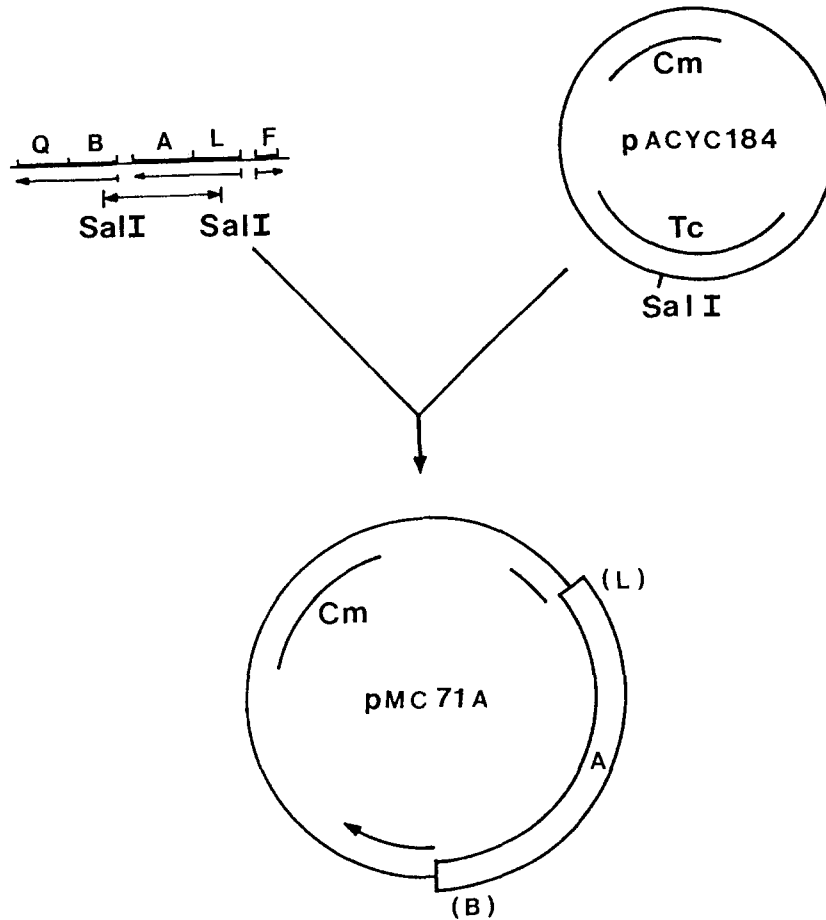


Fig. 2. Construction of pMC71A

인한 후, Table 2와 같이 질소고정 활성을 측정된 결과 *Klebsiella pneumoniae*의 *nif A*가 *Klebsiella oxytoca* 균주 내에서도 잘 발현된다는 사실을 확인하였다.

2. 질소고정 활성의 측정

본 연구에서는 *Klebsiella oxytoca* NG13 균주와 이 균주 chromosome의 *nif LA* operon의 구조가 Fig. 1과 같이 *nif L⁻A^c* 구조로 치환된 균주인 *Klebsiella oxytoca* SH31 과 *Klebsiella oxytoca* SH161(균주²¹)의 질소고정능과 *nif A* gene product가 overproduction 되는 plasmid인 pMC71A가 도입된 새로운 균주인 *Klebsiella oxytoca* NG13/pMC71A, *Klebsiella oxytoca* SH31/pMC71A, *Klebsiella oxytoca* SH161

/pMC71A의 질소고정능을 암모니아태 질소의 농도별로 조사하였는데 그 결과는 Table 2, Table 3, Table 4와 같았다. 무질소 배지, 1mM의 저농도, 15mM의 고농도의 암모니아태 질소의 존재하에서 모두 pMC71A의 도입으로 질소고정능이 현저히 증가됨을 알 수 있었다. 먼저 무질소 배지에서의 질소고정능이 비교한 결과는 Table 2와 같았는데 이 결과를 통해 pMC71A의 도입으로 *Klebsiella oxytoca* NG13의 경우는 6.4배, *Klebsiella oxytoca* SH31의 경우는 17.2 배, *Klebsiella oxytoca* SH161의 경우는 13.5배의 질소고정능이 증진됨을 알 수 있었다. 이는 pMC71A의 도입에 따른 *nif A* gene product의 overproduction으로 nitrogenase의 structural gene인 *nif KDH* operon과 다른 질소고

정 관련 유전자의 transcription이 촉진되었기 때문으로 생각되었다.

한편 1mM의 저농도의 암모니아태 질소의 존재 하에서의 질소고정능을 비교한 결과는 Table 3과 같았다. 대부분의 *Klebsiella* 균주의 경우 0.25mM의 저농도의 NH_4^+ 존재 하에서도 질소고정능의 완전한 저해를 받는다고 알려져 있다. 본 연구의 결과(Table 2, Table 3), 1mM의 저농도의 암모니아태 질소의 존재 하에서 *Klebsiella oxytoca* NG13의 경우는 무질소 배지에서의 질소고정능에 비해 92.9%가 저해되었고, *Klebsiella oxytoca* SH161의 경우는 90.5%가 저해된 반면에 *Klebsiella oxytoca* SH31의 경우는 68.8%의 저해로 암모니아태 질소에 의한 질소고정능의 저해를 가장 적게 받았다. 이는 *Klebsiella oxytoca* SH31의 경우에 repressor 기능을 하는 *nif* L 구조가 바뀌어 Nif L에 의한 repression을 완전히 하지 못한 때문으로 생각된다. 반면에 pMC71A가 도입된 균주의 경우는 *Klebsiella oxytoca* NG13/pMC71A의 경우는 37.9%, *Klebsiella oxytoca* SH161/pMC71A의 경우는 39.1%, *Klebsiella oxytoca* SH31/pMC71A의 경우는 30.0%로 1mM의 저농도의 암모니아태 질소의 존재 하에서 모균주와 비교해 볼 때 질소고정능의 저해율이 낮았음을 알 수 있었다. 그 이유는 pMC71A의 도입으로 인한

Nif A의 overproduction으로 설명되어야 하는데, 암모니아태 질소에 의한 repression의 원인이 *nif* L gene product가 *nif* A gene product의 activity를 조절하기 때문이라는 결과²⁰⁾와 *nif* L gene product는 Nif A에만 작용한다는 사실을 볼 때, 결국 *nif* L gene product가 Nif A의 activity를 충분히 저해하지 못했다는 의미로 결국 product의 양적인 상쇄가 가능하다는 새로운 해석을 할 수 있겠다. 이상의 결과를 Table 4의 repression 결과와 관련하여 해석할 때, 암모니아태 질소의 농도에 따라 *nif* L의 transcription level이 조절될 수 있다는 하나의 가능성을 제시하는 결과라 하겠다.

15mM NH_4^+ 의 고농도 암모니아태 질소 존재하에서 *Klebsiella oxytoca* NG13, *Klebsiella oxytoca* SH161, *Klebsiella oxytoca* SH31의 경우 모두 질소고정능의 완전한 저해를 받았다(Table 4). 반면에 pMC71A가 도입된 경우는 15mM NH_4^+ 의 고농도 암모니아태 질소 존재하에서도 무질소 배지에서의 질소고정력에 비해 각각 13.7%, 6.2%, 7.7%의 질소고정 활성을 보였다(Table 2, Table 4).

이상의 결과에서 질소고정능의 증진과 고농도의 암모니아태 질소의 존재하에서의 질소고정력의 발현에는 *nif* A gene product가 중요한 역할을 한다는 사실을 확인할 수 있었다. 한편 이러한 근권 미생물을 미생물

Table 2. Effect of Nif A overproduction on the nitrogenase activity of *Klebsiella oxytoca* strains in the absence of nitrogen source. (nmole C_2H_4 /h · vial)

| Strains | -pMC71A | +pMC71A | % increase* |
|---------------------------------|---------|---------|-------------|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> NG13 | 204.2 | 1297.6 | 640 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> SH31 | 58.6 | 1007.4 | 1720 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> SH161 | 73.7 | 991.4 | 1350 |

* % increase = $100 \times \text{nitrogenase activity in the presence of pMC71A} / \text{nitrogenase activity in the absence of pMC71A}$.

Table 3. Effect of Nif A overproduction on the nitrogenase activity of *Klebsiella oxytoca* strains in the presence of 1 mM NH_4^+ as a nitrogen source. (nmole C_2H_4 /h · vial)

| Strains | -pMC71A | +pMC71A |
|---------------------------------|---------|---------|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> NG13 | 14.5 | 806.0 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> SH31 | 18.3 | 704.8 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> SH161 | 7.0 | 603.7 |

Table 4. Effect of Nif A overproduction on the nitrogenase activity of *Klebsiella oxytoca* strains in the presence of 15 mM NH₄⁺ as a nitrogen source. (nmole C₂H₄/h · vial)

| Strains | -pMC71A | +pMC71A |
|---------------------------------|---------|---------|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> NG13 | 0 | 178.3 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> SH31 | 0 | 77.9 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> SH161 | 0 | 61.8 |

비료로 토양에 사용하려 할 때 다른 토양 미생물과의 상호작용과 경쟁적 관계, 그리고 벼 품종에 따른 친화성 문제도 더 검토되어야 할 사항이다.

요 약

논토양 층에 벼의 근권에 서식하여 벼에 협력적인 관계로 질소를 공급해 주는 질소고정 미생물인 *Klebsiella oxytoca*를 미생물 비료로 활용하기 위한 새로운 질소고정 균주의 육종을 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *Klebsiella oxytoca* NG13, *Klebsiella oxytoca* SH31, *Klebsiella oxytoca* SH161에 pMC71A를 형질전환한 경우, 무질소 배지에서 원래의 균주의 질소고정력에 비해 질소고정력이 각각 6.4배, 17.2배, 13.5배 증진되었다.
2. 15mM의 NH₄⁺ 존재하에서, *Klebsiella oxytoca* NG13, *Klebsiella oxytoca* SH31, *Klebsiella oxytoca* SH161의 경우는 모두 질소고정능의 완전한 저해를 받은 반면 pMC71A가 도입된 *Klebsiella oxytoca* NG13/pMC71A, *Klebsiella oxytoca* SH31/pMC71A, *Klebsiella oxytoca* SH161/pMC71A의 경우는 무질소 배지에서의 질소고정력에 비해 각각 13.7%, 7.7%, 6.2%의 질소고정 활성을 보였다.

참고문헌

1. Hirota, Y., Fujii, T., Sano, Y. and Iyama, S.: Nitrogen fixation in the rhizosphere of rice. *Nature* 276 : 416-417(1978)
2. Bally, R., Thomas-Bauzon, D., Heulin, T., Balandreau, J., Richard, C. and Deley, J.: Determination of the most frequent N₂-fixing bacteria in a rice rhizosphere. *Can. J. Microbiol.* 29 : 881-887(1983)
3. Barraquiuo, W.L. and Watanabe, T.: Occurrence of aerobic nitrogen fixing bacteria in wetland and dryland plants. *Soil Sci. Plant Nutr.* 27 : 121-125(1981)
4. Riedel, G.E., Ausubel, F.M. and Cannon, F.C.: Physical map of chromosomal nitrogen fixation (*nif*) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 : 2866-2870(1979)
5. Puhler, A., Burkardt, H.J. and Klipp, W.: Cloning of the entire region for nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* on a multicopy plasmid vehicle in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 176 : 17-24(1979)
6. Beynon, J., Cannon, M., Buchanan-wollaston, V. and Cannon, F.C.: The *nif* promoter of *Klebsiella pneumoniae* have a characteristic primary structure. *Cell.* 34 : 655-671(1983)
7. Roberts, G.P., MacNeil, T., MacNell, D. and Brill, W.J.: Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* genes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 136 : 267-279 (1978)
8. Brown, S.E. and Ausubel, F.M.: Mutants affecting regulation of the *Klebsiella pneumoniae nif* H(Nitrogenase reductase) promoter. *J. Bacteriol.* 157 : 143-147(1984)
9. Gussin, G.M., Ronson, C.W. and Ausubel, F.M.: Regulation of nitrogen fixation genes. *Ann. Rev. Genet.* 20 : 567-591(1986)
10. Roberts, G.P. and Brill, W.J.: Genetics and regulation of nitrogen fixation. *Ann. Rev. Microbiol.* 35 : 207-235(1981)

11. de Bruijin, E.J. and Ausubel, F.M.:The cloning and characterization of the *glnF* (*ntrA*) gene of *Klebsiella pneumoniae* : role of *glnF* (*ntrA*) in the regulation of nitrogen fixation (*nif*) and other nitrogen assimilatory gene. *Mol. Gen. Genet.* **192** : 342-353(1983)
12. Espin, G., Alvarez-Morales, A., Cannin, F., Dixon, R. and Merrick, M.:Cloning of the *glnA*, *ntrB* and *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* **185** : 518-524(1982)
13. Hawkes, T., Merrick, M. and Dixon, R. :Interaction of purified *ntrC* protein with nitrogen regulated promoters from *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.* **201** : 492-498(1985)
14. Magasanik, B. :Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* **16** : 135-368(1982)
15. Hirschman, J., Wong, P.K., Sei, K., Keener, J. and Kutsu, S. :Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription *in vitro*. Evidence that the *ntrA* product is a sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82** : 7525-7529(1985)
16. Buchanan-Wollaston, V., Cannon, M.C., Beynon, J.L. and Cannon, F.C. :Role of *nif A* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature.* **293** : 776-778(1981)
17. Dixon, R., Eady, R.R., Espin, G., Hill, S. and Iaccarino, M. :Analysis of regulation of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation gene cluster with gene fusion. *Nature* **286** : 128-132 (1980)
18. Tubb, R.S. :Glutamine synthase and ammonium regulation of nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature.* **251** : 481-485 (1974)
19. Hill, S., Kennedy, C., Kavanagh, E., Goldberg, R.B. and Hanau, R. :Nitrogen fixation gene(*nif L*) involved in oxygen regulation of nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature.* **290** : 424-426(1981)
20. MacNeil, D., and Brill, W.J. :Mutations in *nif* genes that cause *Klebsiella pneumoniae* to be derepressed for nitrogenase synthesis in the presence of ammonium. *J. Bacteriol.* **144** : 744-751(1980)
21. 유익동 외, 생물질소고정에 관한 분자유전학적 연구, 과학기술처연구보고서 BSN 7051-123-1, pp. 25-59(1989)
22. MacNeil, T., Brill, W.J. and Howe, M.M. :Bacteriophage Mu-induced deletions in a plasmid containing the *nif* (N_2 fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **134** : 821-829(1978)
23. Cannon, F.C., Dixon, R.A., Postgate, J.R. and Primrose, S.B. :Plasmid formed in the nitrogen fixing *Escherichia coli-Klebsiella pneumoniae* hybrids. *J. Gen. Microbiol.* **80** : 227-239 (1974)
24. Manniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. : Molecular cloning, pp.71-96., Cold Spring Harbor Lab., New York(1982)
25. Riedel, G.E., Brown, S.E. and Ausubel, F.M. : Nitrogen fixation by *Klebsiella pneumoniae* is inhibited by certain multicopy hybrid *nif* plasmid. *J. Bacteriol.* **153** : 45-56(1983)

(1992년 10월 10일 수리)