

원형질체 내 Plasmid Electroporation에 의한 벼 배발생세포의 형질전환 1. 벼의 Electroporation 원형질체로부터 식물체 재분화

김 명 덕 · 최 성 진 · 김 준 철
강원대학교 자연과학대학 생물학과

Transformation of Rice Embryogenic Cells by Electroporation Mediated Plasmid Uptake into Protoplasts 1. Plant Regeneration from Electroporated Protoplasts of Rice

Myoung Duck Kim, Seong Jin Choi and Joon Chul Kim

Department of Biology, Kangwon National University Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

Calli were induced from leaf base region of germinated rice (*Oryza sativa* L. cv. Nakdong) with high frequency of up to 65% on LS medium supplemented with 2.5mg/ℓ 2, 4-D in the dark at 27°C. Embryogenic calli of pale yellow, globular type were selected and used for the initiation of cell suspension cultures in AA₂ liquid medium with 2mg/ℓ 2, 4-D, 0.2mg/ℓ kinetin and 0.1mg/ℓ GA₃. Protoplasts were isolated from the embryogenic cell suspensions after 4 months of culture and then were electroporated with 400V/cm for 1 msec. Electroporated protoplasts divided with plating efficiency of 1.1% on PCM liquid medium supplemented with 2.5mg/ℓ 2, 4-D, 0.1mg/ℓ kinetin and 10mM proline. The protoplasts-derived microcalli were cultured on 0.2μm membrane filter placed onto LS2.5 solid medium containing fine suspension cells as a feeder cells, for 2 weeks in the dark at 27°C. After an additional 2 weeks of culture under fluorescent light of 30 ± 3μE · m⁻²s⁻¹, yellow calli of 2mm diameter were transferred to regeneration medium. Shoots were produced from the green spot of protoplasts-derived calli and plants were regenerated from protoplast-derived green calli with frequencies of 11~33%.

서 론

식물의 형질전환에는 여러 가지 방법이 적용될 수 있으나 *Agrobacterium* 속의 미생물은 숙주의 제한으로 인하여 화분과 식물체에 적용은 어렵다. 따라서, 벼를 포함한 화분과 식물의 형질전환은 PEG(1), electroporation(2), bombardment(3) 등의 직접 유전자 전이가 사용된다. 직접유전자 전이방법 중 매우 간단하면서도 사용이 용이한 electroporation 방법은 순간적인 전기충격으로 열려진 세포막을 통

하여 외래 유전자를 도입하는 방식으로 원형질체 배양조건이 확립되었을 때 이와 같은 electroporation 방법은 매우 간단하면서도 효율적으로 사용될 수가 있다(2).

화분과 식물의 원형질체 배양은 *Pennisetum americanum*의 배에서 유도된 현탁배양세포에서 분리한 원형질체를 배양하여 식물체의 재분화(4) 가능성을 입증하였다. 이후, 벼에서도 몇몇 품종의 원형질체로부터 식물체 재분화(5, 6)가 이루어졌는데, 단자엽 식물체는 기내 증식이 어려워 조직에서 직접분리한

원형질체가 아니라 주로 종자에서 유도한 callus를 현탁배양하여 원형질체 분리에 사용하였다. 벼 원형질체 배양을 통한 재분화에 관한 초기의 실험에 의하면 분화능이 높은 "cell line"의 선택과 현탁배양 과정에서 현미경적 관찰에 의한 embryogenic 세포의 선별, 유지가 매우 중요하다고 하였다(6). 현탁배양을 시작하면 주로 타원형과 불규칙한 원통형의 세포가 유리되는데, 타원형의 세포는 크기가 작고 세포질에 전분을 다량 함유하고 있어 생존력이 높기 때문에 embryogenic callus를 형성하는 것으로 알려졌다(7, 8). 벼의 원형질체 배양에서도 embryogenic cell이나 원형질체로부터 재분화가 용이하게 이루어지도록 하기 위해 대부분의 연구는 배지조성이 복잡한 KPR(9)배지를 사용하고 배양시에는 agarose bead culture(10)를 이용한 간호배양을 하기 때문에 이와 같은 과정은 벼의 형질전환에 적용하기에는 많은 시간과 노력을 필요로 한다.

최근에 벼의 원형질체 배양기술이 확립되어감에 따라 원형질체 융합에 의한 체세포 잡종의 생성 및 직접적인 외래 유전자 도입에 의한 유전적 형질변환이 광범위하게 시도되고 있다. 본 실험에서도 벼 하배측에서 유기된 callus를 현탁배양하여 totipotency를 갖는 원형질체를 분리하고 electroporation된 원형질체를 MS 배지에서 배양을 시도하고, 원형질체 유래 callus로부터 재분화 등의 일련의 과정을 수행하여 배지 조성과 배양 방법을 단순화하여 벼의 원형질체 배양체계를 확립하고 벼의 형질전환 체계를 용이하게 하고자 하였다.

재료 및 방법

Callus 유도 및 현탁배양

국내 육성종인 낙동벼(*Oryza sativa* L. cv. Nakdong) 종자의 종피를 제거하여 4% NaOCl이 포함된 유한락스를 25%로 희석된 용액에 45분 동안 100 RPM으로 진탕하면서 표면을 소독하였다. 소독된 종자는 멸균증류수로 5회 세척한 후, 1% sucrose를 포함한 MS 배지(11)에 치상하여 27°C 암조건에서 발아시켰다. 발아 후 1주일 정도 경과한 유식물의 하배측부분(leaf base region)은 2~4mm로 잘라 여러 가지 농도의 2,4-D가 첨가된 LS 배지(12)에 치상하여 27°C 암조건에서 배양하여 callus를 유도하였다.

현탁배양은 3회 이상 계대배양한 callus로부터 embryogenic callus만을 1g 정도 선별하여 2mg/ℓ

2,4-D, 0.2mg/ℓ kinetin, 0.1mg/ℓ GA₃의 호르몬이 첨가된 50ml의 AA₂(13)배지로 250ml 삼각플라스크에서 현탁배양을 시작하였다. 처음 2개월은 3~4일 간격으로 이후는 7일 간격으로 계대배양하였으며 계대배양 중에 커다란 세포괴를 제거하기 위해서 2주 간격으로 680 μ m 스테인레스체로 걸러주었다.

원형질체 분리 및 Electroporation

원형질체 분리는 4개월 이상 현탁배양한 세포를 계대배양 3일 후에 680 μ m 스테인레스체를 통과하여 수집된 세포를 0.1% pectolyase Y-23, 2% cellulase R-10, 13% mannitol, 5mM MES가 포함된 CPW용액을 pH 5.6으로 조정된 효소액에 넣어 30 RPM으로 5시간 정도 진탕하여 분리하였다. 분리한 원형질체는 45 μ m 스테인레스체로 걸러 세포찌꺼기를 제거하고 800 RPM에서 5분간 원심분리하여 상층부의 효소용액을 제거한 다음 여기에 멸균된 CPW 13M 용액을 넣어 재현탁한 후 3회 이상 세척하여 electroporation의 최종 시료로 사용되었다. 분리된 원형질체는 electroporation buffer(0.8g NaCl, 0.02g KCl, 0.115g Na₂HPO₄, 100g glucose pH 7.1)에 5 \times 10⁷/ml의 밀도로 현탁하여 Nunc multidish(24 well)의 chamber에 200 μ ℓ씩 분주하고 얼음위에 2분간 방치한 후 5mm 간격의 전극을 넣고 1msec와 2msec의 시간에서 200~800V/cm의 전압으로 electroporation을 실시하여 voltage에 따른 원형질체의 영향을 24시간 후에 1% FDA(fluorescein diacetate)로 염색하여 관찰하였다.

원형질체 배양

Electroporation된 원형질체의 배양은 액체배양과 변형한 feeder cell layer method(14, 15)를 연속으로 사용하였다. 액체배지는 MS를 기본배지로 2mg/ℓ NAA, 0.5mg/ℓ BAP이 첨가된 MSP1 배지와 2.5mg/ℓ 2,4-D, 0.1mg/ℓ kinetin, 10mM proline이 첨가된 PCM 배지를 사용하였으며 삼투조절제로는 9% mannitol과 19% sucrose를 각각 첨가하였다. 배양시 원형질체의 수는 혈구계를 이용하여 3 \times 10⁵ protoplast/ml이 되도록 하였다. 지속적인 성장을 위해 배양 24일 후 feeder cell로써 현탁배양 중인 fine cell을 2,4-D가 2.5mg/ℓ 첨가된 LS 배지(12) 위에 뿌리고 그 위에 0.2 μ m membrane filter를 얹고 microcalli를 형성한 배양액 500~700 μ ℓ를 치상하여 골고루 퍼뜨린 후 27°C 암상태에서

배양하였으며, 2주 후 원형질체가 치상되어 있는 membrane filter를 새로운 feeder cell이 있는 LS 배지 위로 옮겨 배양하였다.

식물체 재분화

Membrane filter 위에서 microcolony가 형성되면 feeder cell이 없는 LS 배지로 옮겨 callus 크기가 2mm 정도 성장하도록 한 후 재분화 배지에 옮겨 27°C와 $30 \pm 3 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 의 광조건에서 분화를 유도하였다. 재분화 유도배지는 MS 기본배지에 2mg/l NAA, 0.5mg/l BAP가 첨가된 MSP1 배지, 1mg/l zeatin이 첨가된 MSZ 배지, 2mg/l IAA, 1mg/l BAP가 첨가된 MS3 배지와 N_6 기본배지(16)에 0.2mg/l NAA와 2mg/l kinetin이 첨가된 배지를 사용하였다. 분화된 shoot는 호르몬이 첨가되지 않은 MS 배지로 옮겨 뿌리를 생성시켜 완전한 개체로 유도하였고, 순화과정을 거친 후 토양으로 이식하여 온실에서 완전한 식물체로 성장시켰다.

결과 및 고찰

Callus 유도 및 현탁배양

벼에서의 callus 유도(5, 6, 15)는 대부분 성숙 또는 미성숙 종자의 배를 이용하였으나, 본 실험에서는 1% sucrose가 포함된 MS 배지에서 발아된 유식물의 하배축부분(leaf base region)으로부터 callus를 유도하였다. 발아 후 일주일된 유식물의 하배축을 2~4mm로 절단하여 여러 가지 2,4-D 농도별 처리 배지에서 배양했을 때 callus는 2,4-D가 0.5mg/l 이상 첨가한 배지에서 유도되었고 2.5mg/l 2,4-D를 첨가한 배지에서 치상효율은 최고 65%를 보였다. 하배축에서 이러한 2.5mg/l의 2,4-D는 종자에서 callus를 유도하기 위한 최적 농도인 1~2mg/l의 2,4-D보다 높은 농도였으며(17) 이는 조직에 따라 callus의 유도 조건에 차이가 있음을 보여 준다. 종자에서 유도된 callus는 표면이 매끈하고 잘 떨어지는 열은 노란색을 띠는 embryogenic callus와 표면이 거칠고 물기가 많은 non-embryogenic callus로 구분되는데(18) 하배축에서 형성된 callus도 종자에서 유래한 callus와 마찬가지로 embryogenic callus와 non-embryogenic callus로 구분되어 육안으로도 식별이 가능하였다. 이때 embryogenic callus만을 형태적으로 선별하여 AA_2 액체배지(12)로 옮겨 진탕배양하며 일부 잔존하는 non-embryogenic cell을 분리 제거하였는데 효율적으로 원형질

체를 분리 및 배양하기 위해서는 균질한 작은 embryogenic 세포괴를 확립하는 것이 필수적이었다(6). 배양 초기에 관찰되던 세포질이 텅빈 세포들은 단일 세포로 존재하거나 가볍기 때문에 배지 교환시 제거되고 배양 4개월 후에는 10~50개 세포로 구성된 균질화된 노란색의 embryogenic cell suspension을 확립할 수 있었으며 이들 세포괴는 세포질이 매우 충만한 모습이었다. AA_2 배지는 약유래 callus(19), 종자 배반 유래 callus(20)와 잎기부 유래 callus(21)로부터 현탁배양에 적합한 배지임이 보고되었으며 본 실험에서도 AA_2 배지를 사용하여 현탁배양하였을 때 10~50개의 세포로 균질화된 노란색의 배양세포를 유지할 수 있었다.

Electroporation 및 원형질체 배양

계대배양 후 3일된 현탁배양세포 1g 정도에 10ml 효소액을 첨가하여 27°C 암상태에서 30 RPM으로 진탕하면서 원형질체 분리율을 측정하였는데 5시간 배양시 5×10^7 protoplast/ml 정도의 양호한 원형질체를 얻을 수 있었으며, 효소처리 동안에 분리되지 않은 세포는 스테인레스체로 거르고 원심분리 과정

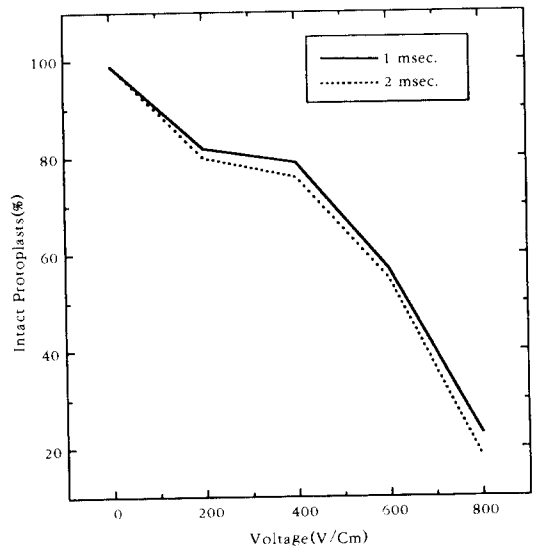


Fig. 1. Effect of various voltages on cell viability of intact rice protoplasts for electroporation of 1 msec and 2 msec. Viability of electroporated protoplasts was determined by FDA method. Each data point is based on the mean of at least 300 protoplasts from 3 separate experiments.

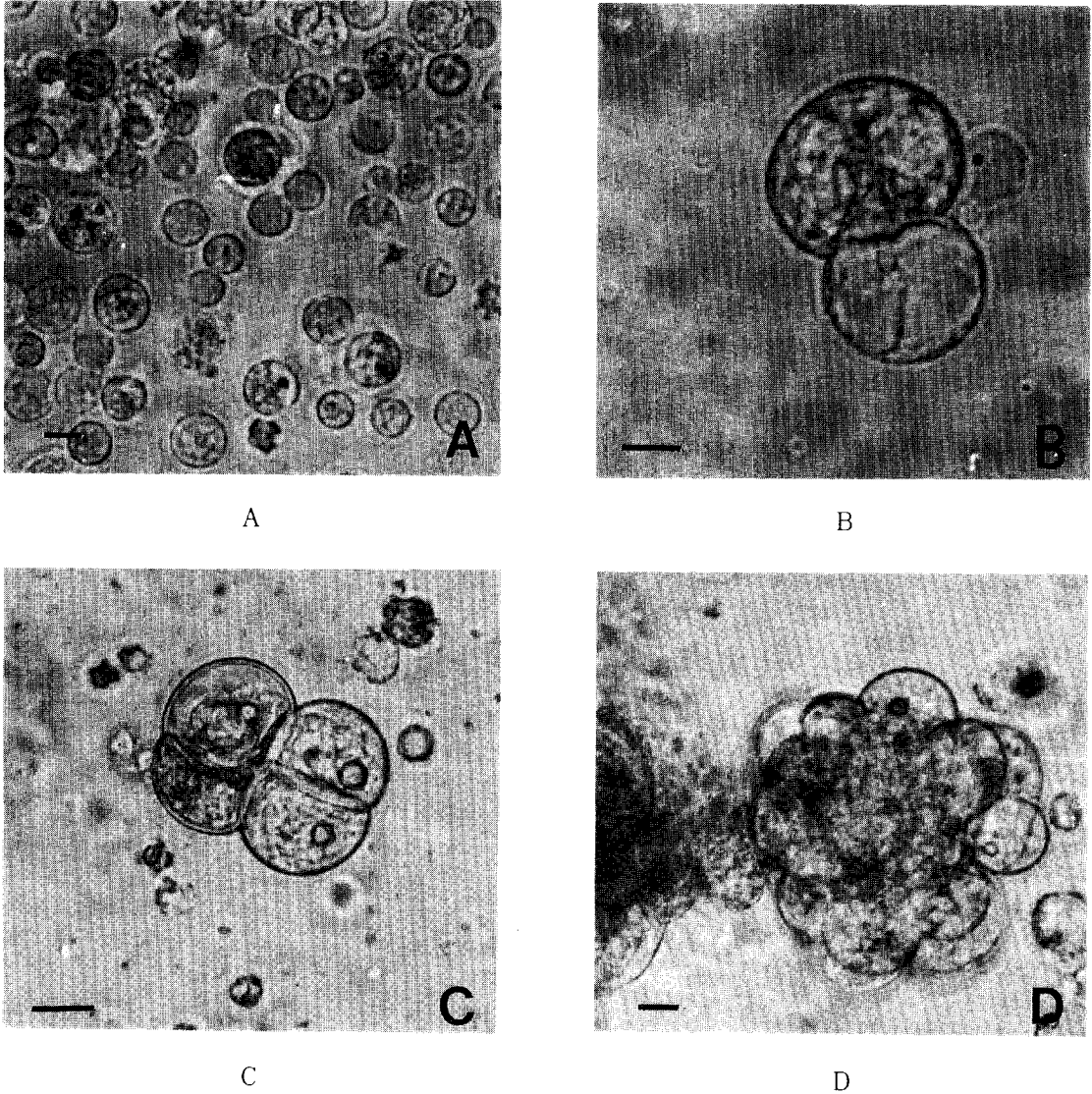


Fig. 2. Cell colonies derived from electroporated protoplast of rice in liquid PCM medium. A, Electroporated protoplast with 400 V/cm for 1 msec; B, First cell division after 5 days of culture; C, Divided cells after 14 days of culture; D, Micro colonies formed after 24 days of culture. Bars = 30 μ m.

을 통해 제거될 수 있었다. Fig. 1은 정제된 원형질체에 electroporation buffer 첨가 후 electroporation을 실시하였을 때, voltage 변화에 따른 원형질체의 생존율 변화를 보여준다. 200과 400V/cm에서 원형질체는 20% 정도의 원형질체만이 파괴되었으나 voltage가 상승할수록 원형질체의 파괴가 심하였

으며 800V/cm에서는 80% 이상의 거의 모든 원형질체가 파괴되었다. 시간에 따른 원형질체의 변화는 2msec에서의 원형질체가 약간 더 많은 영향을 받는 것으로 나타났다.

Electroporation된 원형질체는 MS 배지를 기본으로 한 액체배양과 변형한 feeder cell layer(14) 방

Table 1. Effect of media on microcalli formation and plating efficiency from the electroporated protoplasts of rice for 1 msec.

Liquid medium	Voltage	Plating efficiency(%)	Microcalli formation(%) ^a
PCM	200	1.0	50
	400	1.1	48
MSP1	200	0.38	20
	400	0.37	20

^a Percent of microcalli per dividing protoplasts

법을 연속적으로 이용하여 배양되었으며 Fig. 2A는 정제된 원형질체로 세포질이 충만한 모습을 보여주고 있다. 액체배양 후 약 4일부터 electroporation된 원형질체는 첫번째 분열을 시작하여 등근상태에서 분열하는 모습이 관찰되었다(Fig. 2B). 액체배양 2주 후부터 삼투압을 조절해 줌으로써 세포분열을 효과적으로 이룰 수 있었는데 이것은 Wang 등(22)이 보고한 것과 같이 microcallus를 형성하는데 필수적이었다. 이때 배양 2주 후부터 PCM은 소량 첨가하고 MSP1은 3% mannitol의 배지를 첨가하여 농도를 낮추어 빠른 분열을 유도(Fig. 2C)할 수 있었으며, 배양 3주 후부터 세포피를 형성하기 시작하여 24일 후에는 지름이 0.5mm 정도의 callus가 형성되었다(Fig. 2D). 200V와 1ms에서 electroporation된 전체 원형질체 중 10일 후 분열 중인 원형질체 비율은 2mg/l NAA와 0.5mg/l BAP가 첨가된 MSP1 배지에서 0.38%이었으며 2.5mg/l 2, 4-D와 0.1mg/l kinetin이 첨가된 PCM 배지에서는 1.0%로 MSP1 배지에서보다 PCM 배지에서 높았다. Microcallus의 형성률은 MSP1에서 20%, PCM에서 50% 이상이었으며 400V에서는 약간 낮은 결과를 나타냈다(Table 1).

24일 후 액체배지에서 형성된 microcalli는 재분화 배지로 옮기기 전에 2.5mg/l 2, 4-D가 첨가된 LS 배지에서 feeder cell로 동종의 작고 고운 현탁 배양 세포를 뿌리고 그 위에 membrane filter를 얹은 LS배지와 feeder cell이 없는 LS 배지에서 callus의 성장을 유도하였다. 동일한 조건에 2주 간격으로 2~3회 계대배양하였을 경우 feeder cell이 있는 처리구에서는 왕성한 성장을 하였으나, feeder cell이 없는 처리구에서는 거의 성장이 이루어지지 않았다. 이는 Kyojuka et al.(23)이 보고한 것과 같이 feeder cell의 첨가로 원형질체 성장을 자극하는 nutrient의 영향이라고 생각된다.

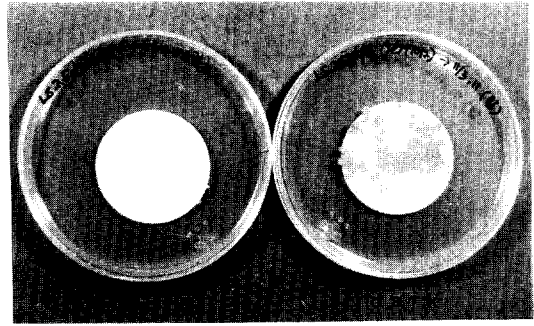


Fig. 3. Microcalli plated on the 0.2/µm membrane filter onto LS2.5 agar medium containing feeder cells of rice suspension cultured cells. Left, Microcalli under light condition ; Right, Under dark condition.

LS 배지 위에서 microcallus의 성장에 미치는 광의 영향을 파악하기 위하여 암조건과 광조건 아래 연속 배양하였다. 암배양에서는 microcalli가 2mm 이상의 크기로 성장하였으나 광배양에서는 microcalli로부터 callus를 형성하지 못해(Fig. 3) microcallus에서 세포분열을 유도하여 callus를 형성하는데 있어서 빛이 저해요인으로 작용함을 보여주었다.

식물체 재분화

식물체 재분화를 위하여 암조건의 LS 배지에서 형성된 callus와 액체배지에서 형성된 microcalli를 Table 2의 여러 가지 재분화배지에 치상하였을 경우 LS 배지에서 형성된 대부분의 callus는 초기에 부피 성장을 하였으며 배양 2주부터 3주 사이에 대부분의 배지에서 부스러지기 쉬운 callus가 증가하였고 여러 곳에서 녹점(green spot)을 관찰할 수 있었으나, 액체배지에서 형성된 microcalli의 경우는 극히 성장이 미약하였다. 따라서 원형질체로부터 형성된 세포피를 직접 재분화 배지로 옮겼을 때보다는 4주 정도 성장한 callus를 재분화배지로 옮기는 것이 녹점 및 shoot의 형성을 촉진시키는 것으로 보인다(24). 이것은 개체로의 분화를 유도하기 위해서는 4주 정도 callus의 생장이 요구되며 callus 성장배지에 첨가된 2, 4-D에 의해서 embryogenic한 성질을 유지하기 때문으로 밝혀졌다(24). 배양 30일 후 배지에 따라 5~15% 정도의 녹점 형성률을 나타냈으며, 이 녹점으로부터 shoot가 분화되었고(Fig. 4A), 형성된 shoot는 호르몬이 첨가되지 않은 MS배지로 옮겨

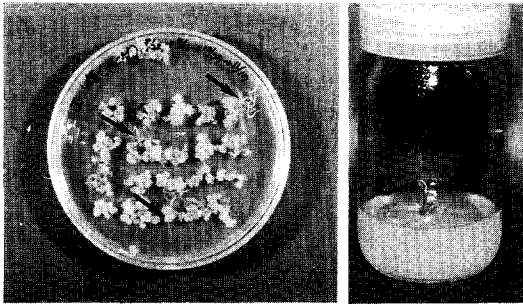


Fig. 4. Plant regeneration from the protoplast-derived calli of rice. A, Shoot differentiation (arrows) in regeneration medium ; B, Plantlet regeneration. Bars = 1cm.

Table 2. Frequency of plant regeneration from protoplast-derived calli on various media.

Regeneration media	Frequency of green spot formation(%) ^a	Frequency of plant regeneration(%) ^b
MSP1	5	33
MSZ	11	28
MS3	15	11
N ₆	15	22

^a Percent of green spot calli per total calli plate

^b Percent of regenerated plants per green spot calli

(Fig. 4B) 완전한 뿌리를 유도시켰다. 녹점으로부터 식물의 재분화율은 11~33%로 나타났으며, 녹점의 형성과 재분화 정도는 재분화배지에 따라 차이가 있는 것으로 사료된다(Table 2). 순화과정을 거쳐 pot로 이식된 식물체는 종자가 결실된 완전한 식물체를 이룰 수 있었다(Fig. 5).

이상의 결과들로부터 국내 재배종인 낙동벼의 유식물 하배축 callus의 현탁배양세포에서 분리한 원형질체를 400V/cm에서 1msec 동안 electroporation하고 MS 액체배지를 이용하여 재분화능력을 갖춘 원형질체 배양체계를 확립할 수 있었으며 이를 외래 유전자 도입 등과 같은 형질전환 실험에 적용 가능하리라 사료된다.

요 약

밭아된 벼(*Oryza sativa* L. cv. Nakdong)의 하배축에서 callus를 유도하고, 현탁배양한 세포에서 원형질체를 분리하여 MS 배지에서 재분화를 수행하

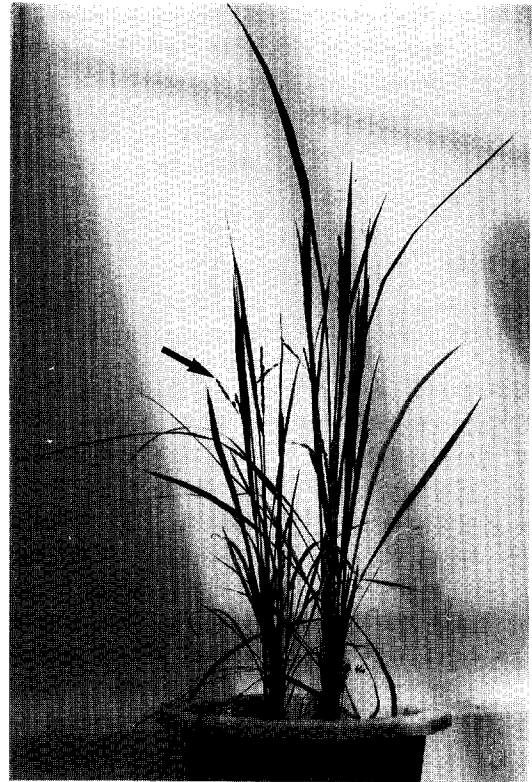


Fig. 5. Mature plants derived from rice protoplast green house. Arrow=seed.

였다.

Callus는 하배축으로부터 2.5mg/l 2,4-D를 첨가한 LS 배지에서 최고 65%의 치상효율로 유도되었으며, 형태적으로 선별 가능한 embryogenic callus는 2mg/l 2,4-D, 0.2mg/l kinetin과 0.1mg/l GA₃가 첨가된 AA₂ 배지에서 현탁배양하였다. 4개월 이상 현탁배양한 세포로부터 분리한 원형질체는 voltage를 400V/cm와 1msec 동안 electroporation했을 때 2.5mg/l 2,4-D, 0.1mg/l kinetin과 10mM proline이 첨가된 PCM 배지에서 1.1%의 치상효율을 보였다. 형성된 microcalli는 LS2.5 배지에 치상된 feeder cell에 0.2 μ m membrane filter를 얹은 위에 옮겨 암소에서 2주 동안 배양한 후, 30 \pm 3 μ E \cdot m⁻²s⁻¹의 형광하에서 2주 동안 배양했을 때 2mm 직경의 노란색 callus를 형성하였다. 형성된 callus를 재분화 배지에 치상하였을 때, 녹점(green spot)에서 shoot 형성과정을 거쳐 완전한 식물체로 분화되었으며 재분화율은 11~33%였다.

감 사

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모와 제 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. I. Potrykus, M. W. Soul, J. Petruska, J. Pazkowski and R. D. Shillito(1985), *Mol. Gen. Genet.*, **199**, 183-189.
2. M. E. Fromm, L. P. Taylor and V. Walbot (1986), *Nature*, **319**, 791-793.
3. J. M. Klein, E. D. Wolf, R. Wu and J. C. Sanford(1987), *Nature*, **327**, 70-73.
4. V. Vasil and I. K. Vasil(1980), *Theor. Appl. Genet.*, **56**, 97-99.
5. T. Fujimura, M. Akagi, T. Negishi and A. Hirose(1985), *Plant Tissue Culture Letters*, **2**, 74-75.
6. Y. Yamada, Y. Zhhi-Qi and T. Ding-Tai (1986), *Plant Cell Rep.*, **5**, 85-88.
7. M. W. Nabors, J. W. Heyser and K. J. Demott(1983), *Planta*, **157**, 385-391.
8. V. Vasil and I. K. Vasil(1984), *Genetics of Plant*, **1**, 152-158.
9. K. N. Kao(1977), *Mol. Gen. Genet.*, **150**, 225-230.
10. R. D. Shillto, J. Paszkowski and I. Potrykus (1983), *Plant Cell Rep.*, **2**, 244-247.
11. T. Murashige and F. Skoog(1962), *Physiol. Plant*, **15**, 473-497.
12. E. M. Linsmaier and F. Skoog(1965), *Physiol. Plant*, **18**, 100-127.
13. A. J. Muller and R. Grafe(1978), *Mol. Gen. Genet.*, **161**, 67-76.
14. L. Lee, R. E. Schroll, H. D. Grimes and T. K. Hodges(1989), *Planta*, **178**, 325-333.
15. Y. H. Lee, H. I. Kim and T. Y. Chung(1991), *Korean J. Plant Tissue Culture*, **18**, 383-388.
16. C. C. Chu, C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu and F. Y. Bi(1975), *Sci. Sin.*, **18**, 659-668.
17. S. C. Suh, H. I. Kim, T. Y. Chung and H. S. Chung(1992), *Res. Rept. RDA(B)*, **32**, No. 2, 9-17.
18. B. Hwang, M. K. Kim and I. K. Vasil(1988), *Korean J. Bot.*, **31**, No. 1, 41-49.
19. K. Toriyama and K. Hinata(1986), *Theor. Appl. Genet.*, **73**, 16-19.
20. J. A. Thompson, R. Abdullah and E. C. Cocking(1986), *Plant Sci.*, **47**, 123-133.
21. R. Abdullah, E. C. Cocking and J. a. Thompson(1986), *Bio/Tech.*, **4**, 1087-1090.
22. D. Wang, P. D. Miller and M. R. Sondahl (1989), *Plant Cell Rep.*, **8**, 329-332.
23. J. Kyozyuka, Y. Hayashi and K. Shimamoto (1987), *Mol. Gen. Genet.*, **206**, 408-413.
24. M. D. Kim, S. J. Choi, Y. C. Park, E. A. Lee and J. C. Kim(1993), *J. of Science and Technology*, **32**, 32-37.