Journal of Radiation Industry 13(4) : 369~375(2019)

방사선 제조 나노복합체 적용 ROS 센서의 온실재배 환경 내구성 평가 및 식물의 Oxidative Burst 패턴 측정

이중화[1,2] · 송아람[1] · 한명희[1] · 오상근[2,*] · 박해준[1,*]

[1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소 방사선연구부, [2]충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

A Evaluation of ROS Sensor with Nanocomplex Preparing Irradiation Technology for Green House Culture System and Detection of Plant Oxidative Burst by Using the Sensor

Joung-Hwa Lee[1,2], Aram Song[1], Myeong-Hee Han[1], Sang-Keun Oh[2,*] and Hae-Jun Park[1,*]

[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongup 56212, Republic of Korea*

[2]*Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciece, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea*

Abstract - We developed a noble assay method for a quantitative measurement of ROS by using a nano biosensor system using the highly durable nanocomplex under hydroponics culture conditions in a greenhouse. The highly durable nanocomplex, in which nano-Ag is bound to silica and PANI, has been synthesized by using γ-irradiation at room temperature. In this study, the sensor electrode has a working life of at least 3 months and a measuring range of 4~60℃ in the pH 4~8 area. In addition, We developed a manufacture process for mass production of electrode by introducing electronic printing system (1000 pieces·hour^{-1}). With the ROS sensor, we determined an induction pattern of oxidative burst in plant when plant pathogen attack the plant. It was suggested a possibility for real-time continuous measurement of oxidative burst (ROS) patterns induced by plants.

Key words : Nanosensor, Irradiation technology, Solanaceae plant, Nanocomplex, ROS (reactive oxygen species, ICT agriculture

서 론

현재 우리나라는 농업인구의 고령화와 귀농인구의 증가로 저하된 농업 생산량을 제고하기 위하여 ICT 농업 기술개발에 박차를 가하고 있다. 지금까지의 ICT 농업 기술개발은 양액의 pH, 온실관리 등 환경적 요인제어 시스템화에 초점이 맞춰 개발되어 왔다. 그러나 병충해 및 식물 저항성 관리와 같은 병방제 제어 시스템에 대해서는 바이오센서의 원천기술 부족으로 제어 시스템화 개발이 더디게 진행되고 있으며 대부분 육안으로만 진행되고 있다. 일반적으로 바이오센서란, 생물학적 감응을 전기적인 신호로 전환하여 검출하기 위해 필요로 하는 Electronic transducer 역할을 하는 전극센서를 의미한다. 의료분야 등에서 개발되어 활용되고 있는 바이오센서가 감지 또는 측정하는 것들 중에 대표적인 것으로서 과산화수소(H_2O_2)가 있다(Kim *et al*. 2010).

H_2O_2는 호흡하는 생물환경 내에서 발생하는 활성산소종(Reactive oxygen species: ROS)의 한 종류로서 생물학적 반

* Corresponding author: Hae-Jun Park, Tel. +82-63-570-3190, Fax. +82-63-570-3195, E-mail. hjpark@kaeri.re.kr
Sang-Keun Oh, Tel. +42-821-5762, E-mail. sangkeun@cnu.ac.kr

응에 있어서 매우 중요하게 생물학적 대사 조절에 관여하는 중간체이며, ROS는 식물의 유도저항성 및 병 스트레스 반응이 유도될 경우 특이적인 패턴으로 생성되며 이를 측정함으로써 작물의 면역생리 상태를 쉽게 알 수 있다(Wojtaszek 1997; Rajasekhar *et al*. 1999; Stéphan Dorey *et al*. 1999; Vinagolu *et al*. 1999; Bhattacharjee 2005; Yoshioka *et al*. 2008; Krishnamurthy and Rathinasabapathi 2013; Miguel *et al*. 2016).

Kim 등은 ITO 도전성 집전체에 나노복합체(Ag-PANI-silica)가 포함된 나노복합체 용액을 스핀 코팅법에 의해 ITO 도전성 집전체에 도포함으로써, 나노복합체가 형성된 과산화수소(H_2O_2) 검출용 센서전극을 개발하였다. 이러한 센서전극에 생체친화성 재료로서 Horseradish peroxidase (HRP)를 물리적 방법에 의해 추가로 형성함으로써, 또 다른 형태의 HRP가 더 고정된 과산화수소(H_2O_2) 검출용 바이오센서 전극을 제조하였다. (Kim *et al*. 2012) 그러나 농업환경에서는 내구성과 경제적인 문제로 상용되고 있지 못하였고 이를 ICT 농업 조건에서, 무배액 작물 육성에 사용하기 위해서는 양액조건에서 측정 가능한 센서로 개선되어야 한다. 최근 ICT 농업에서는 토양을 전혀 사용하지 않으며 일반 수경재배와 같이 순환된 양액을 폐액시키는 농업이 아니라 무배액 제어 시스템이 자리잡음에 따라 전혀 폐액 배출이 없는 농업시스템으로 진화하고 있다. 그러므로 일반적인 의료용 바이오센서와 달리 무배액 육성배드의 양액조건에서 그 센서의 역할이 이루어져야 한다. 더욱이 양액 상에서 식물병리학적, 식물면역학적 상호작용들이 주로 일어나고 활성산소종(ROS)이 그 핵심적 역할하기 때문에 작물 육성배드상 양액에서의 ROS 센서 사용할 수 있도록 검토되어야 한다.

그러므로 방사선 조사 기술을 이용하여 화학적 환원제 없이 상온 상압의 단순공정으로 균일한 크기의 나노입자를 실용화 생산할 수 있는 방사선 나노복합체 제조기술을 이용하여 전도성 유무기 나노하이브리드 구조체 장착한 ROS 센서를 실용화 생산할 수 있는 공정을 개발하였다. 또한 그 내구성을 개선하여 온실 작물 양액재배 환경에서의 실용적으로 측정할 수 있는 ROS 센서를 개발하고 재배환경 내에서 ROS 측정 및 센서의 내구성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

나노 복합체를 제조하기 위하여 Aniline monomer 99.9% (Aldrich-Sigma사), Silver nitrate $AgNO_3$ 99.8% (Aldrich-Sigma사), sodium silicate solution Na_2SiO_3 (Samchun사)를 사용하였다. 센서의 성능을 검정하기 위하여 공시처리 용액으로 Hydrotgen Peroxide 34.5% (Samchun사)을 사용하였다.

ROS센서 일전극(working electrode)의 기판은 다솜RMS사의 ITO Glass (370 × 470 × 1.1 mmt)를 사용하였다. 핵심소재인 전도성 나노복합체는 Kim *et al*.(2010)의 제조방법을 응용하여 30 kGy의 전자선 ^{60}Co gamma-irradiator (150 TBq of capacity; ACEL, Canada을 이용하여 조사하여 합성하였다 (Fig. 1).

2. 센서 제조

표준 ROS 센서의 일전극은 Kim *et al*.(2011)의 스핀코팅법

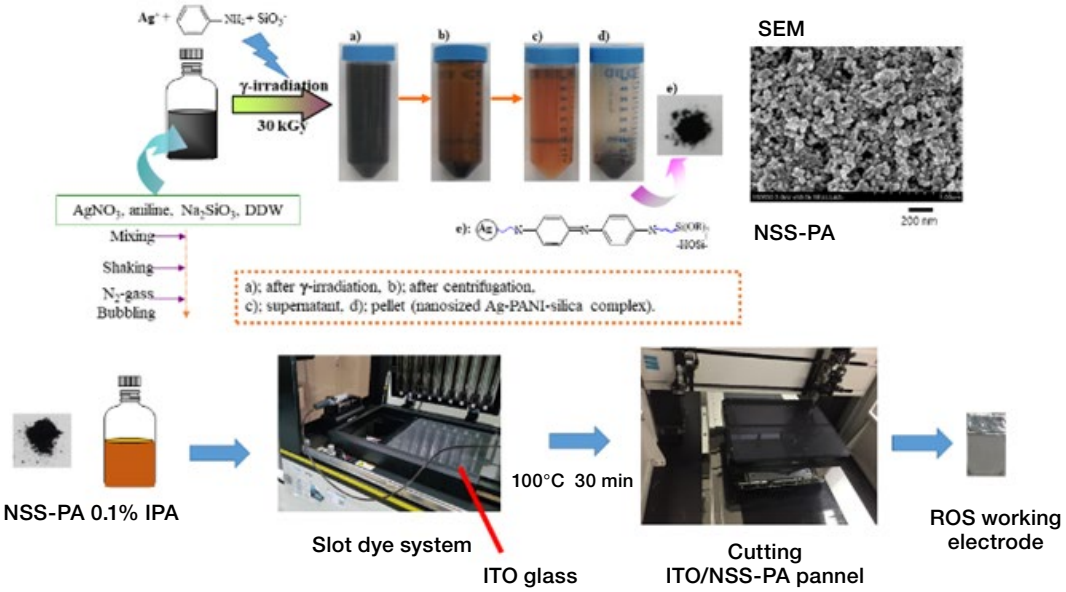

Fig. 1. Schematic diagram of mass production process of sensors using NSS-PA1 manufacturing method and Slot-die Coating.

을 이용하여 15 Cycle (회당 10 µl, 20 s, RPM)의 반복코팅 과정을 거쳐 제작하였다. 한편 실용화 생산 시제 전극 제작을 위하여 전자부품연구소의 디씨엔사 Slot-die System을 이용하여 Slot-die Cotting 기법을 사용하여 실용화 생산(시간당 1000개) 제작하였다 (Fig. 1). Slot-die Coating 기법은 일반적으로 전극 실용화 생산 공정에서 사용되는 전자인쇄 코팅법이며 큰 기판을 코터 위에 장착 후 넓은 면을 여러 번에 걸쳐 코팅하는 공정으로, 본 센서 일전극 제조 세팅조건은 다음과 같다. 상기 제조된 나노복합체를 이소프로판 용매 0.1% 함량이 되게 용해시킨 다음 그 용액을 시스템 로드에 장착하였다. 유량설정을 5.0 ml·m^{-1}, 내경 28.5 mm하여 실린지 펌프를 코팅 높이 300 µm, 주행속도 10.0 mm·s^{-1}, 주행거리 515 mm하여 전극 기판을 인쇄하였다. 인쇄된 전극기판을 오븐에서 100°C 처리를 하고 충분히 냉각한 다음 기판절단기를 이용하여 활용사이즈(1.1×0.7 cm)로 재단하였다.

3. 작물재배 및 병원균 준비

양액은 MB Cell사의 Hoagland Salt Medium/Calcium Nitrate 2제 Cat. no MB-H4365를 사용하였다. 10배수 Stock Solution 제조 후 냉장 보관하고 관수 시 1배수로 희석하여 사용하였다. 재배에 적용한 암면은 유알사의 암면 블록(UR-BLOCK) / 유알 매트(UR-MAT)을 사용하였다. 파프리카 유묘를 정식하여 무배액 육성를 하였으며 6엽기 이상의 개체를 사용하였다.

병원 접종원으로서는 V8 Media에서 배양한 고추역병균-*Phytophthora capsici* 유주자를 1×10^5 CFU의 농도로 양액으로 희석하여 준비하였다.

4. ROS 측정

무배액 식물 육성 암면에 상기 제작된 일전극과 대항전극 및 레퍼런스 전극을 각각 장착하고 ROS에서 의해 발생되는 전극 신호를 받아 Chrono Ahmperometry (CA) 또는 Cycliuc Voltametry (CV)로 변환하여 측정하였다 (Fig. 2). CV는 Kim *et al.* (2011)이 발표한 선행연구 조건에 따라 진행하였으며 CA는 측정된 CV에서 전압값을 고정하여 측정하였다.

전극에서 송출된 CA 및 CV 신호를 측정하기 위하여 Electrochemical Analyser system (Chrono Ahmperometer CompactStat) - Ivium사 제품을 사용하여 측정하였다.

5. 내구성 검토

시제 센서들을 저온(4°C), 상온(25°C), 고온(40°C, 60°C)의 조건으로 1개월씩 보관하고 1주 단위로 내구성 평가를 하여 온도변화에 따른 내구성 검토를 진행하였다. 농업분야에서는 상온에서 센서를 사용하나 여러 관리 조건 또는 천재지변 조건에 따라 저온 또는 고온 내구성이 요구되므로 각각 저온(4°C), 상온(25°C), 고온(40°C, 60°C)에서 검토하였다. 저온은 냉장 보관고에서 진행하였으며 고온은 보존 테스트 전용 인큐베이터를 사용하였다.

결 과

1. 수경재배 양액 조건 암면베드에서 식물면역반응 발생유도 패턴 측정

일반적으로 식물병원에 의해서 식물에서는 oxidative burst가 유도된다 (Wojtaszek 1997). 무배액 재배 조건의 육성 암면에서, oxidative burst에 의해 식물 근권에서 방출된 H_2O_2를 시제전극이 인식하는지를 알아보고 그 유도패턴을 측정하기 위하여 유사환경을 조성하고 전극 성능을 검토하였다. Fig. 2에 나타낸 것과 같이 50% 양액 함유 암면(500 cm^3)에 시제전극을 장치한 후 CA를 측정하면서 30분마다 H_2O_2 용액을 (10 mM) 1 ml씩 암면에 투여하였다. 그 결과 비접종 식물을

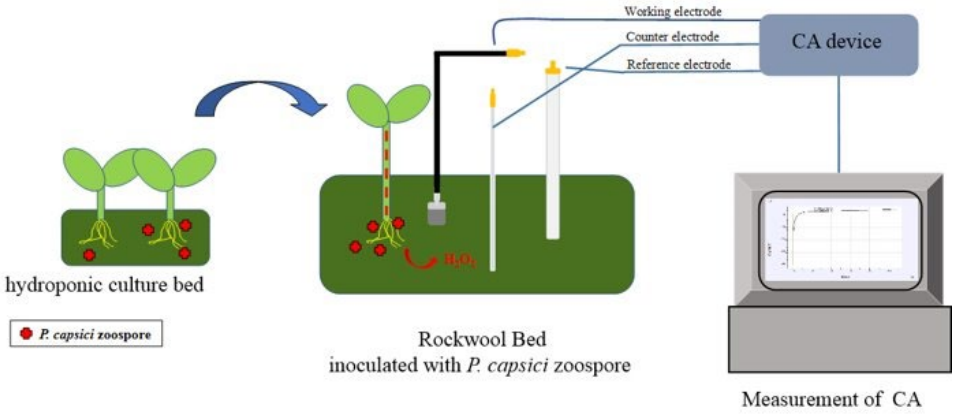

Fig. 2. Schematic of chrono ahmperometer measurement using ROS sensor during hydroponic cultivation.

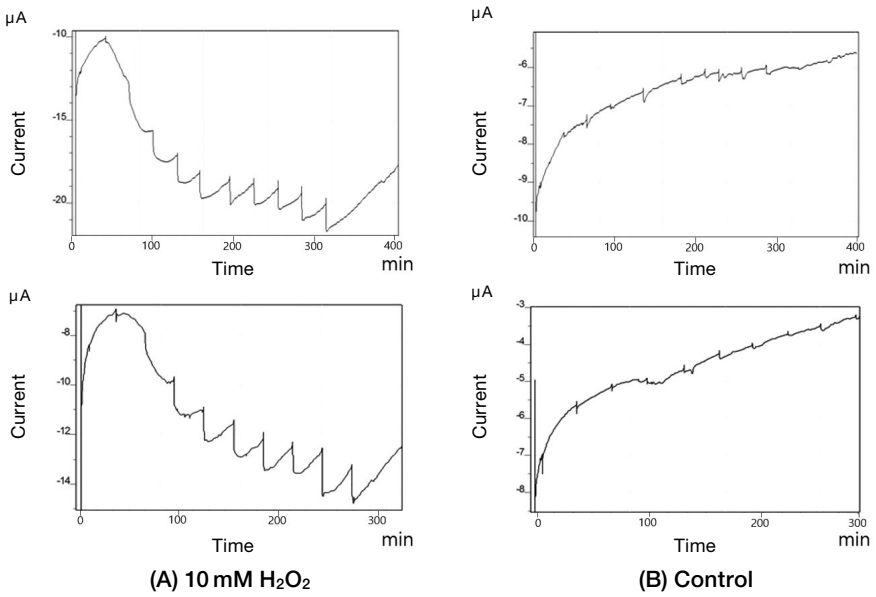

Fig. 3. Simulation of oxidative burst patterns near plant roots in Rockwool-Chronoamperometry measurement. Add 1 ml every 3 minutes. (A) Hydroponic cultivation solution under 10 mM H_2O_2 condition, (B) Hydroponic cultivation solution (X: μA / Y: min).

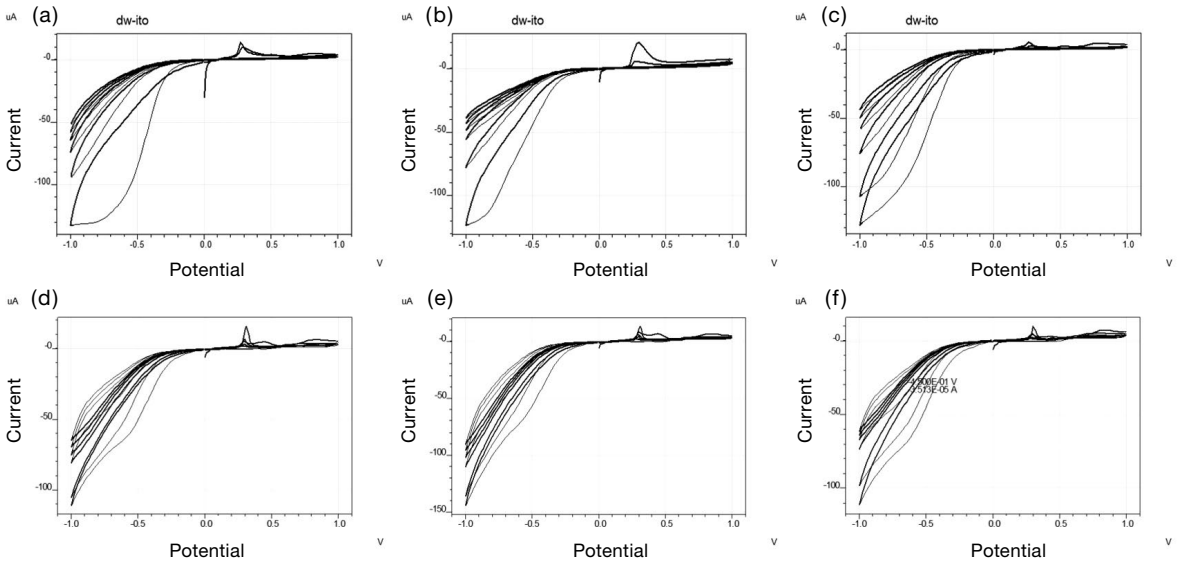

Fig. 4. ROS sensor cyclic voltametry measurement under nutrient solution of 1 mM H_2O_2 (a), (b), (c) standard electrode (d), (e), (f) mass production prototype electrode.

가상하여 암면에 DDW를 투여한 A에서는 완만히 상승하는 시그널 패턴을 보여주었다. 반면 식물에 병원균이 접종되어 oxidative burst가 유도된 상황으로 가상하여 H_2O_2 용액을 투여한 B는 계속 하강하는 시그널 패턴을 보여주었다 (Fig. 3).

2. Slot-die Coating 실용화 생산 시제전극 평가

Slot-die Coating법에 의해 생산된 시제 전극이 종래의 spin coating법에 의제 제조된 표준전극의 성능차이를 알아보기 위하여, H_2O_2 (1 mM) 양액 용액 조건에서 CV 측정하여 검토하여 비교해 보았다. 그 결과 동일한 가변전압 조건 내에서 전류 측정값이 +20~−150 μA 내의 측정값을 보이며 그래프의 패턴이 유사한 것으로 판단하였고, 표준전극과 실용화 시제전극의 성능에 변화가 없음을 확인하였다.

3. 열처리에 의한 내구성 강화

먼저 pH 변화에 따른 전극의 유효 성능 한계를 측정하였으

며, 그 결과로 열처리 단계를 통해 제조된 시제전극은 pH 4 내지 pH 9의 범위에서도 작동이 가능한 반면, 열처리 단계 없이 제조된 시제전극은 pH 3 및 pH 9에서는 신호의 패턴 및 노이즈로 보아 정상적으로 작동하지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 5).

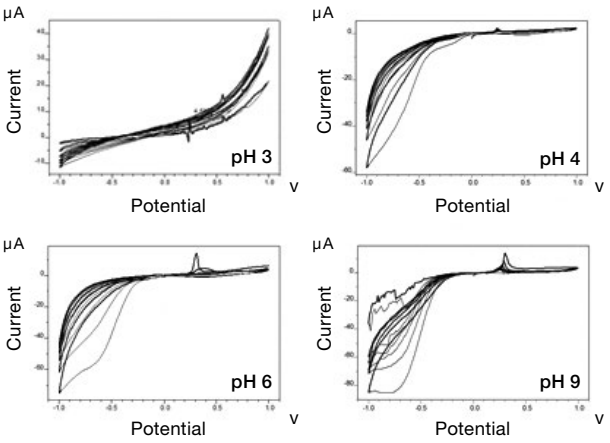

Fig. 5. Result of CV measurement in nutrient solution for each pH section [pH 3/4/6/9 (1 mM H_2O_2 Hydroponic Cultivation Solution)].

상이한 온도에서, 보다 구체적으로 각각 4°C, 25°C, 40°C 및 60°C에서 30일 동안 전극을 보관하여, 온도에 따른 전극의 유효 성능 한계를 측정하였으며, 그 결과, 실용화 제조 시제전극은 60°C 이상에서 30일 동안 보관한 경우에도 작동이 가능한 반면, 열처리 단계 없이 제조된 표준전극은 40°C 이하에서 30일 보관 시에는 전극 성능이 유지되나, 60°C에서 30일 보관 시에는 전극 성능을 상실하는 것을 확인하였다 (Fig. 6).

시제전극을 오븐에서 100°C 열처리하여 내구성을 비교 분석하였다. 시제전극은 열처리 단계를 통하지 않은 표준전극과 비교하여 전극의 수명이 연장되는 효과 및 또는 더 넓은 범위의 pH에서 작동하는 효과 및 온도에서 작동하는 효과를 나타낼 수 있다. 열처리 단계를 통해 제조된 시제전극은 60°C의 수경재배용 양액에서 30일 보관 후에도 전극 기능이 유지되어 정상적인 작동을 하나, 열처리 단계를 통하지 않고 표준 전극은 60°C의 수경재배용 양액에서 15일 보관 후에는 전극 기능이 유지되는 반면, 30일 보관 후에는 전극기능을 상실하였다. 열처리 단계를 통해 제조된 시제전극은 작물 수경재배용 양액에서 보관 90일 이후에도 전극기능을 유지하였다 (Fig. 7). Figs. 5~7의 결과로서 pH는 4~9까지 사용이 가능하며 1개월 동안 작동이 가능하여 전극의 유효성능 한계를 확인하였다.

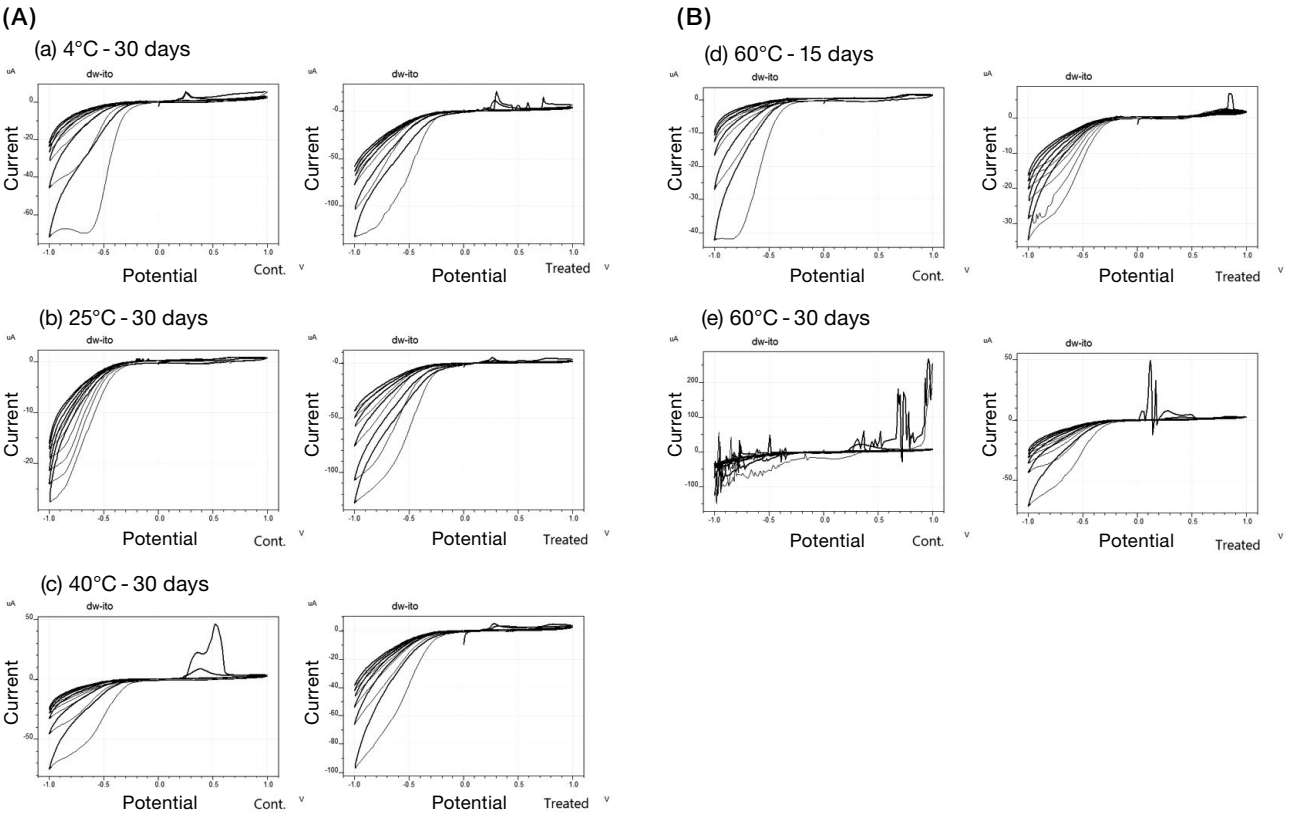

Fig. 6. Durability test after sintering ITO glass electrode coated with NSS PA-1 without heat treatment at different temperature - untreated group / 1 mM H_2O_2 treated group cyclic voltametry proceeded (a) 30 days storage at 4°C, (b) 30 days storage at 25°C, (c) 30 days storage at 40°C, (d) 15 days storage at 60°C, (e) 30 days storage at 60°C.

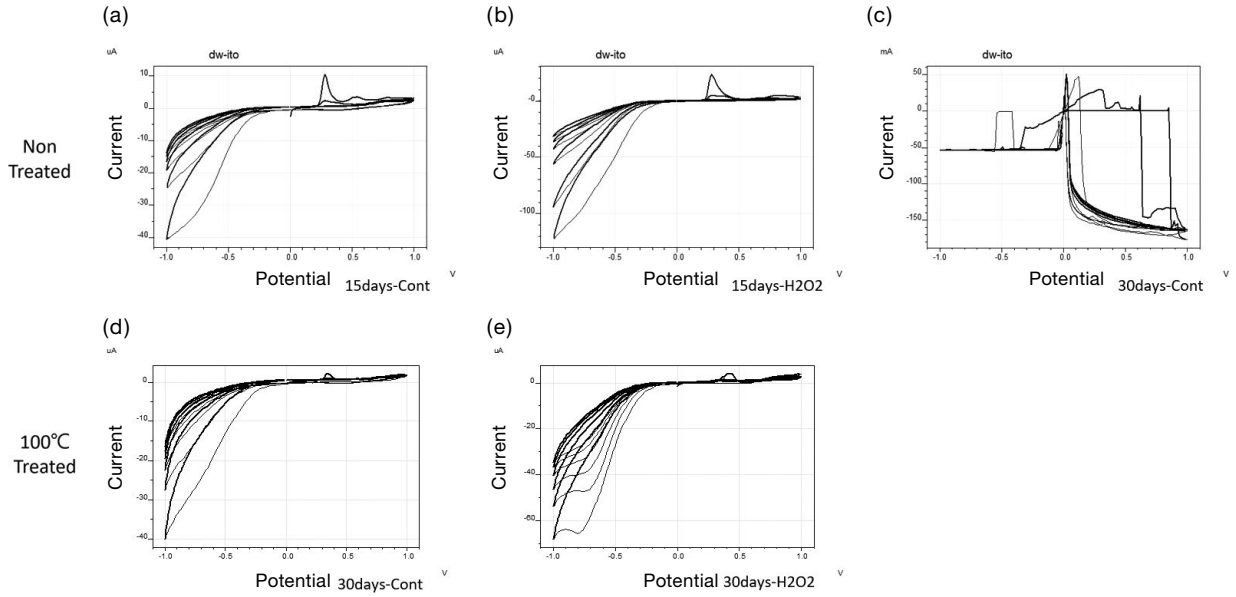

Fig. 7. Calculation of desorption threshold by device material by harshing experiment (existing electrode) in 60 degrees nutrient solution (a): Stored for 15 days, (b): Stored for 15 days and treated with 1 mM H_2O_2, (c): Stored for 30 days 100 degrees 30 minutes heat treatment process manufacturing electrode 60 degrees in nutrient solution, (d) 30 days storage, (e) 1 mM H_2O_2 treatment after 30 days storage.

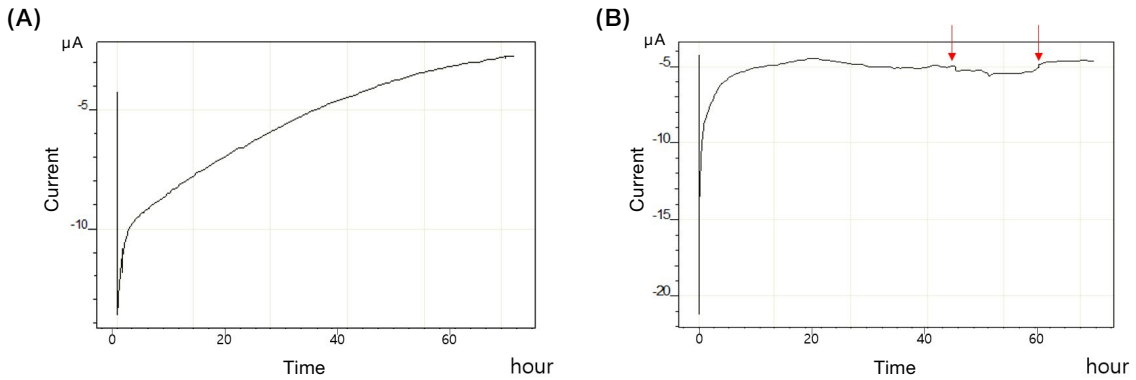

Fig. 8. Example of chrono ahmperometry measurement of ROS pattern induced by root roots of *pythophthora capsici* inoculated with zoospore for 3 days (A) Untreated, (B) inoculated (X: μA / Y: hour).

4. 식물병원균에 유도되는 Oxidative Burst 패턴 측정

무배액 양액 육성조건에서, 시제 전극을 사용하여 식물에 병원균이 접종되었을 때 유도되는 Oxidative Burst를 측정하였다. 파프리카를 정식한 암면에서 3일 CA측정하였다. 병원인 고추역병균 유주자를 1×10^5 CFU의 농도로 양액에 희석하여 암면에 접종하였다. 대조군에서는 Fig. 3에서 수행된 모사실험의 대조구와 같이 CA 신호패턴이 완만한 상승이 유지되는 패턴을 나타낸 반면 유주자를 접종한 실험구에서는 접종 후 10시간 후 CA 신호패턴이 하강하기 시작하여 평행을 유지하였다 (Fig. 8).

고 찰

Figs. 1, 3 및 4의 결과로 인쇄 후 인쇄된 전극의 표면에 HRP와 같은 효소를 이용하여 표면개질하는 단계를 포함하지 않고, 제조공정을 단순화 및 실용화 생산 목적에 맞게 개선하였음을 확인하였다.

Fig. 3은 균에 접종된 식물의 면역반응에 의해 분출되는 H_2O_2를 실시간 지속적 측정이 가능하다는 것을 보여주고 있다. 최근 논문에 따르면 병원균이 침입하였을 때 방어 및 타 식물 신호전달목적으로 Oxidative Burst가 유도되고 그로인해 다량의 활성산소가 일정시간 지속적으로 분출되는 것으로 보고되고 있다 (Wojtaszek 1997; Rajasekhar *et al*. 1999;

Bhattacharjee *et al*. 2005; Yoshioka *et al*. 2008). 본 연구에서 개발된 시제센서를 활용하면 30분 이상 지속적으로 H_2O_2를 측정 가능함에 있어 식물 병 진단센서로 활용 가능할 것으로 생각한다.

Figs. 5, 6 및 7에서의 결과로 열처리 단계를 통해 제조된 시제전극은 열처리 단계를 통하지 않은 시제전극과 비교하여 전극의 수명이 연장되는 효과 및 또는 더 넓은 범위의 pH에서 작동하는 효과 및 또는 더 넓은 범위의 온도에서 작동하는 효과를 나타내었다. 따라서 열처리 단계를 통해 제조된 시제센서는 60°C의 수경재배용 양액에서 30일 장착하여도 전극 기능이 유지될 수 있고 상온 재배환경에서 적어도 90일 동안 성능을 유지하여 측정할 수 있음을 확인하였다. 아울러 열처리 제조된 시제센서는 pH 4 내지 pH 9의 범위의 극한 재배조건에서 성능을 유지하여 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 이러한 내구성이 증가하는 이유는 열처리를 통하여 전도성 폴리머가 서로 결합 후 ITO Glass에 부착이 되어 내구성이 증가하는 것으로 사료된다 (Fig. 5). 상기 열처리 온도는 100°C 이상의 온도에서 수행되는 것이 효율적으로 생각한다. Fig. 7의 결과로서, 열처리하여 제조된 열처리 전극 시제센서는 적어도 3개월 이내의 수경재배에서 작기의 작물의 재배에는 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

실용화 생산 시제센서를 사용하여 파프리카를 정식한 암면에서 병원균 인식에 의한 Oxidative Burst 패턴을 측정할 수 있음을 확인하였다. 3일 CA 측정한 결과로, 접종하지 않은 대조군에서는 Fig. 3에서 수행된 모사실험의 유지되는 패턴을 나타내고 있다. 이는 고추역병을 인식한 파프리카 근권에서 H_2O_2가 분출이 지속적으로 유도되는 Oxidative Burst 패턴을 나타내고 있음을 시사하고 있다. 아울러 암면에 접종한 유주자가 유영하여 10시간 이전에 근권에 접촉을 했을 가능성이 높으며 접종구에서 CA 신호패턴이 하강한 후 유지되는 것으로 보아 적어도 3일간 Oxidative Burst 반복적으로 유도됨을 알 수 있었다 (Fig. 8).

결 론

이상의 결과로부터 방사선 제조 전도성 나노복합체를 적용하여 열처리 공정을 통하여 식물 ICT 농업환경에 적용할 수 있는 ROS 센서를 제작하였으며 장기간 무배액 양액재배 환경에서 식물의 Oxidative Burst의 패턴을 측정할 수 있음을 확인하였다. ROS 센서의 제조공정에 실용화 생산에 Slot-die 코팅법을 활용하여 센서를 시간당 1000개 이상 실용화 생산할 수 있도록 공정을 구축하였다. 아울러 스마트 무배액 재배 농업환경에 활용하여, 식물병원에 의해 식물에서 유도되는 Oxidative Burst의 패턴을 실시간으로 측정할 수 있음을 시사하였다.

사 사

본 연구는 미래창조과학부 방사선기술개발사업 (No. 2015M2A2A6A03045350)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 저자들은 장비 사용을 도와주신 전자부품연구원 장소라님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

Bhattacharjee, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science* 89.

Dorey S, Kopp M, Geoffroy P, Fritig B and Kauffmann S. 1999. Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitin. *Plant Physiol*. **121**(1):163-172. doi:10.1104/pp.121.1.163

Kim HJ, Park S and Park, HJ. 2010. Synthesis of a new electrically conducting nanosized Ag-polyaniline-silica complex using γ-radiolysis and its biosensing application. *Radiation Physics and Chemistry* **79**:894-899. 10.1016/j.radphyschem.2010.02.005.

Kim HJ, Park S and Park HJ. 2011. Hydrogen Peroxide Sensor Based on Electrically Conducting Nanosized Ag-Polyaniline-Silica Complex. *Sensor Letters* **9**:59-63. 10.1166/sl.2011.1419.

Krishnamurthy A and Rathinasabapathi B. 2013. Oxidative stress tolerance in plants: novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. *Plant Signal Behav*. **8**(10):10.4161/psb.25761.

Miguel AT, Jonathan DG and Jones JL. 2006. Dangl Published June 2006. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.106.079467

Rajasekhar VK, Lamb C and Dixon RA. 1999. Early events in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent pseudomonas syringae pv glycinea. *Plant Physiol*. **120**(4):1137-1146. doi:10.1104/pp.120.4.1137

Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J*. **322**(3):681-692. doi:10.1042/bj3220681

Yoshioka H, Bouteau F and Kawano T. 2008. Discovery of oxidative burst in the field of plant immunity: Looking back at the early pioneering works and towards the future development. *Plant Signal Behav.* **3**(3):153-155. doi:10.4161/psb.3.3.5537

Received: 2 October 2019
Revised: 17 October 2019
Revision accepted: 18 November 2019