

BIOSENSORS IN AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL SYSTEMS

M. J. Delwiche, D. M. Jenkins, X. Tang, and E. S. Jackson

Department of Biological & Agricultural Engineering
University of California, One Shields Avenue
Davis, CA 95616, USA
E-mail: mjdelwiche@ucdavis.edu

ABSTRACT

A brief general discussion of the nature and function of biosensors is presented. While the primary motivator for biosensor development has been the health-care industries, recent research efforts have spread to problems in agriculture and biological production systems. To illustrate some of the research from our laboratory, three example biosensors and their corresponding applications are presented. The first of these is an immunosensor for measurement of the hormone progesterone during milking as a method to improve reproductive management of dairy herds. The second example is an enzyme sensor for measurement of urea in milk as a means to determine the efficiency of conversion of input protein to milk protein and, thus, improve nutritional management of dairy herds. The third example is a DNA sensor using polymerase chain reaction to detect pathogenic bacteria in the wash water of fresh and minimally processed fruits and vegetables. The potential for application of biosensors in agriculture, agrobiotechnology, food processing, and environmental monitoring has barely been realized.

INTRODUCTION

A biosensor can be generally defined as a device that incorporates a *biological sensing element* in close association with a *signal transducer*, and is typically used to measure the presence or concentration of a target analyte (Hall, 1990). It is generally acknowledged that the first biosensor was reported by Clark and Lyons (1962), who developed an enzyme-electrode for detection of glucose, which was commercialized in 1974 by the Yellow Springs Instrument Company. From the start, the primary impetus for biosensor development has come from the health-care industries. In more recent years, applications have spread to other areas such as environmental monitoring, food processing, biotechnology, and national defense. Such diversification was evident at the Sixth World Congress on Biosensors (2000) held this year in San Diego, California, although health-care remains the primary commercial motivator. By comparison, the development and application of biosensors in agricultural and biological production is less well advanced, due mostly to low unit costs and profit margins in these industries. However, more attention is now being focused in this area. In fact, a technical committee was formed this past summer within the Biological Engineering Division of the American Society of Agricultural Engineers to focus on biosensor research and applications.

Molecular recognition in a biosensor is performed by a biological sensing element, with the usual goals of high specificity, sensitivity, and long-term stability. Standard biorecognition molecules are *enzymes*, *antibodies*, and *nucleic acid* sequences. Enzymes are proteins which act as catalysts for reaction of their substrates, and the reaction products are usually detected. Antibodies are proteins in the humoral immune system which bind to a cell or biomolecule containing the appropriate antigenic determinant. Various types of labels (enzymes, fluorescent molecules, radioactive tags, gold colloids) are used on either

the antibody or the antigen to detect the degree of binding. Nucleic acids are sequences of nucleotides (nitrogenous base+sugar+phosphate) which bind to strands with a complementary sequence of bases. Short sequences with fluorescent labels are commonly used to detect their complements.

A wide range of signal transduction methods have been integrated with these molecular recognition reactions. Potentiometric sensors such as glass membrane electrodes, ion selective electrodes, and field effect transistor devices give voltage signals according to the Nernst equation. Amperometric devices generally measure the transfer of charge between an electrode and an electroactive compound at the surface of the electrode. Photometric sensors employ a range of methods to measure optical properties of the bioactive system, such a change in absorption, fluorescence, or chemiluminescence. One of the more successful commercial instruments uses surface plasmon resonance to monitor affinity reactions in real-time (Biacore International, Uppsala, Sweden). Piezoelectric sensors are used to measure the change in vibrational characteristics caused by mass loading on the bioactive surface. Numerous other transduction methods are reported each year in academic journals such as *Biosensors and Bioelectronics* (Elsevier Science, Oxford, UK). Continued developments in micromachining will lead to biosensors with integrated fluidics, chemistry, sensing, and signal processing.

In this paper we report on some of the biosensor developments in our laboratory to illustrate a range of sensor types and applications and, we hope, to stimulate future research in agricultural and biotechnological areas.

EXAMPLE BIOSENSOR DEVELOPMENTS

Immunosensor for Reproductive Hormones in Milk

Management of reproductive health is one of the most challenging activities facing operators of large US dairy herds. Significant time and effort is made to detect estrus, the time period just prior to ovulation, thus allowing successful artificial insemination. While a variety of methods based primarily on behavior are used for estrus detection, the most effective approach is to track the estrous cycle by periodic measurement of reproductive hormones in the blood plasma or milk (Pope et al., 1976). On-farm test kits using various immunoassay protocols have been commercially developed to measure progesterone in milk, with potential diagnostic use for estrus, pregnancy, and some reproductive disorders (Nebel et al., 1987; Nebel, 1988). The main factor limiting widespread use of this technology in the intensively managed dairy environment is the need for labor to collect and store milk samples, run the assay, and record the results. Based on previous research and the limitations of the current progesterone sensor prototypes, our objectives in this research project were to (1) develop an improved assay for measurement of progesterone in milk at follicular phase concentrations in real-time and (2) to develop and calibrate a second generation biosensor from implementation of the new assay.

An antigen-capture with antigen-competition assay (Harlow and Lane, 1988) was developed for use in the second generation sensor. Anti-progesterone monoclonal antibody was purchased from a commercial source (Clone P01-92-11M-P, Biostride, Inc., Palo Alto, California, USA). Progesterone labeled with horse-radish peroxidase was used as the conjugate (P 3659, Sigma, St. Louis, Missouri, USA) and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride (No. 34015, Pierce, Rockford, Illinois, USA) with hydrogen peroxide was used as the substrate. Disks of 7.9 mm diameter 12 mm pore-size nitrocellulose membrane (AE100, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) were coated with antibody solution in carbonate buffer, blocked with casein, and stored at 4 °C.

The basic format of the assay comprised two steps: (1) an antigen binding step, during which free progesterone in the sample and enzyme labeled progesterone competed for antibody binding sites on the membrane, followed by (2) a substrate development step, during which the bound enzyme catalyzed oxidation of the substrate and caused a change in absorbance. Compared with our previous assay (Claycomb et al., 1998), fluid volumes were increased by an order of magnitude to reduce the effects of variations in pump stroke volume. A standard spectrophotometer cuvette was used for the reaction chamber to hold the increased fluid volumes (0.5-1.2 ml). Based on our previous research and the requirement for the sensor to operate on-line, binding time was fixed at 5 min and substrate development time was limited to 3 min, giving an overall assay time, including fluid handling, of less than 10 min. Substrate optical density was read dynamically at 645 nm (Josephy et al., 1981). The rate of change in optical density (mOD/s) was calculated over the 3-minute development period. The protocol of the real-time assay used for the sensor is summarized in Table 1.

Table 1. Protocol for Progesterone Assay Used in the Sensor

Antibody Coating

- (1) Add 10 μ l MAb (49.3 μ g/ml in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6) to 7.9 mm diameter disk of nitrocellulose membrane (12 μ m pore size); incubate 2.5 hr in sealed bag at room temperature.
- (2) Dry membrane at room temperature for 0.5 hr.
- (3) Add 500 μ l blocking buffer (0.5% casein and 1% glycine in carbonate buffer) into membrane cell; incubate for 2 hr at room temperature.
- (4) Remove membrane from cell and dry for 0.5 hr at room temperature; store at 4 °C.

Antigen Binding

- (5) Insert coated disk in reaction chamber.
- (6) Add 550 μ l conjugate (2.0 μ g/ml progesterone – horse radish peroxidase in assay buffer*) and 550 μ l test sample; incubate for 5 min with recirculation.
- (7) Wash x 5 (1.5 ml assay buffer with 0.05% Tween 20).

Substrate Development

- (8) Add 1.2 ml substrate (0.32 mM TMB-2HCl, 0.006% H₂O₂, and 12.5% methanol in 51.4 mM phosphate/24.3 mM citrate buffer, pH 5.0); incubate with recirculation.
- (9) Read optical density (645 nm) at 10 s intervals and calculate rate of development for 3 min.

*Assay buffer – phosphate (0.1 M) buffered saline (0.15 M), pH 7.0.

A schematic of the fluid handling system is shown in Figure 1. To minimize optical and chemical interferences, the reaction chamber was made from a standard quartz cuvette (Type 5 H, NSG Precision Cells, Inc., Farmingdale, NY, USA) Reagents were pumped into and out of the reaction chamber with four solenoid activated pumps capable of delivering 50 μ l per stroke (LPLA1220050L, The Lee Co., Westbrook, CT, USA). Two-way normally-closed valves were used for selecting the reagents and a three-way valve was used for priming the lines (LFFA1201710H and LFFA1201410H, The Lee Co.) A separate pump and lines were used for the labeled progesterone (conjugate) to minimize contamination of the reagent pump, manifold, and priming valve with peroxidase. Mixing was accomplished using another pump to provide recirculation (Delwiche et al., 2000). The substrate, conjugate, mix, and supply lines to the reaction chamber were made from 1.6 mm inner diameter Viton tubing (06434-01, Cole-Parmer Instrument Corp., Vernon Hills, IL, USA), with the remaining lines Tygon tubing (14-169-1B, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) of the same inner diameter. Stainless steel tubes with an inner diameter of 1.1 mm (HTX-17,

Small Parts Inc., Miami Lakes, CA, USA) were inserted in a Teflon spacer cap and used to inject the reagents and drain the chamber.

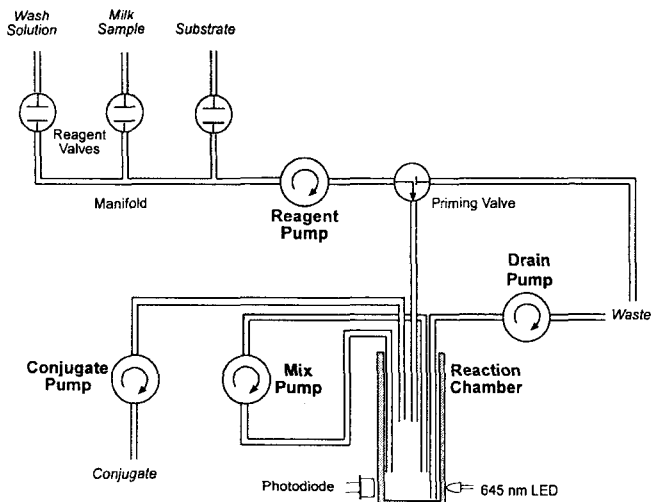


Figure 1. Schematic of the fluid handling system.

Absorbance of the substrate was measured by positioning a 645 nm light-emitting diode (LED) (HLMP-4101, Hewlett Packard, San Jose, CA, USA) on one side of the reaction chamber and a large-area photodiode (BPX 61, Siemens Components, Inc., Cupertino, CA, USA) on the other side. Light from the LED was collimated with a simple peep-hole configuration (Delwiche et al., 2000). Light current from the photodiode was fed to the input of a photovoltaic amplifier with a gain of 10^4 V/A. Low frequency noise was then removed with 4th order Butterworth low-pass filter ($f_c = 10$ Hz). An inverter with a fixed gain of 10 and adjustable offset was used in the final stage, with V_{out} proportional to the intensity of light transmitted through the substrate. Relative optical density, OD, was calculated based on the output at the start of substrate development. A control computer was used to sequence the pumps and valves, and to read the sensor output.

The sensor was calibrated with raw milk samples by comparison with radio-immunoassay (RIA) results, assumed to give the “true” progesterone concentration. Milk samples were collected at the UC Davis Animal Science Dairy from 22 cows in various stages of lactation. Approximately 5 ml of milk was stripped from the left front quarter and then a 15 ml sample of foremilk was collected in a clean container before the milking machine was attached. The sample was immediately tested with the biosensor to avoid problems with separation of the fat layer. The remainder of the sample was stored at 4 °C and tested by RIA (Munro and Stabenfeldt, 1984) in the Endocrinology Lab of the UC Davis Veterinary School within several days.

One limitation of calibration procedure outlined above was the problem of separating the sensor variability from the RIA variability. To more clearly identify variability due to operation of the biosensor, another test was run on progesterone-spiked milk taken from a single cow 9 days after parturition. The progesterone concentration this early after birth was assumed to be close to zero since there is virtually no ovarian steroid production during this time (Hopkins, 1986). Standard solutions were prepared by dissolving progesterone (P-0130, Sigma Chemical Co.) in ethanol at concentrations of 10, 100, 1000, and 10000 ng/ml. Various aliquots of these standards were transferred to glass

tubes and the ethanol evaporated before adding the milk sample. Progesterone concentrations were selected to bracket the physiological range (0, 0.2, 0.5, 2, 5, 10, and 20 ng/ml) and three replications were made at each concentration.

The results of calibrating the biosensor with RIA measurement of foremilk samples are plotted in Figure 2. Because the samples were unadulterated, progesterone was limited to normal physiological levels and ranged from 0.1 to 16.2 ng/ml. The linear regression of development rate, R (in mOD/s), on the log of the progesterone concentration, P (in ng/ml), gave a standard error of regression of $S_{R \cdot \log P} = 0.083$ mOD/s. The calibration equation was derived by inverting the regression result and solving for the predicted concentration. Results of the sensor tests on spiked early post-partum milk gave similar regression coefficients but a lower standard error, $S_{R \cdot \log P} = 0.046$ mOD/s, indicating some of the variability in calibration was due to the RIA measurement.

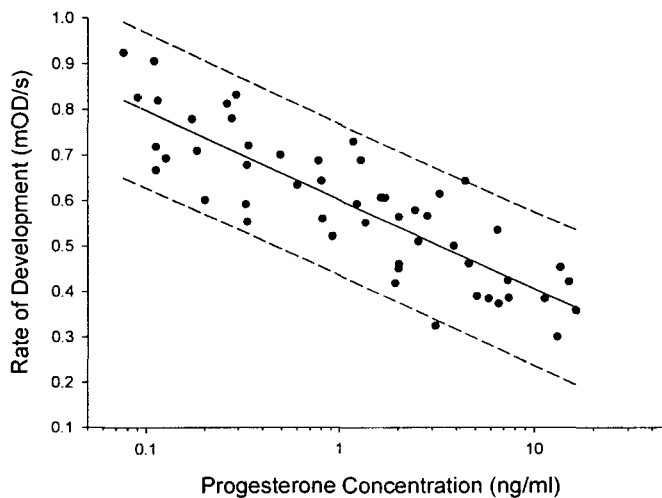


Figure 2. Calibration of the sensor by radioimmunoassay measurement of foremilk.

Variability of the RIA measurement and nonlinearity of the calibration equation complicate estimation of predicted concentration errors. For example, suppose we have a sensor reading that gives a predicted concentration of 0.5 ng/ml (corresponding to a typical concentration during the follicular phase). Using the standard error of regression from the spiked milk test to estimate the sensor variability and $\pm 2s_{\log P}$ for a 95% confidence interval (Doebelin, 1990), conversion to concentration gives an error range of 0.2 to 1.5 ng/ml.

The main goal of this research was to develop a sensor with the capability of distinguishing the progesterone concentration of a cow in the luteal phase (i.e., with a functioning corpus luteum) from one in the follicular phase and, thus, be able to detect an ovulatory event. Pope et al. (1976) reported the average progesterone concentration in whole milk of five cows in estrus was 0.86 ng/ml. Laing and Heap (1971) reported an average of 3.82 ng/ml for cows with a mid-cycle corpus-luteum. These levels are clearly distinguishable with the biosensor developed here.

Enzyme Sensor for Urea in Milk

Milk urea nitrogen (MUN) has been established as a reliable indicator of the efficiency of protein and energy utilization of lactating dairy cows. Management of herd diets based on observed MUN can lead to considerable savings in feed costs (Baker et al.,

1995; Broderick and Clayton, 1997), and may further lead to decreases in urinary nitrogen loss (Hof et al., 1997; Schepers et al., 1998) and improvement of reproductive performance (Butler et al., 1996; Larson et al., 1997). Milk from many dairies is tested for MUN at remote labs, though collecting and handling the samples can be difficult and expensive. Test results may not be known for a period of several days, and samples may be mishandled at the dairy, in the lab, or in transit to the lab. The goal of this project was to develop a reliable and inexpensive on-line MUN sensor to eliminate these problems.

An assay for urea was developed at the University of California at Davis (Jenkins et al., 1999) in which volatile gas pressure due to CO₂ is measured after hydrolysis of urea by the enzyme urease. The assay was deemed suitable for application in milk because of the robust transduction mechanism in which the milk never touches the sensing element. By comparison, other urea sensing technologies may not be able to operate in the complex medium of whole milk and require expensive and complicated systems to remove milk solids. On-line automation of the volatile gas assay was a logical approach due to its accuracy, simplicity, robustness, low cost, and lack of toxicity of the reagents and products.

The fluidics of the automated sensor (Figure 3) consisted of a bank of pinch valves (Neptune Research Inc. 161P011, West Caldwell NJ) on a common manifold through which the reagents were selected. The reagents were pumped into a reaction cell by a solenoid activated diaphragm pump with a nominal stroke volume of 50 µl (Bio-Chem Valve Inc. 120SP 12 50-4, Boonton, NJ). By energizing some combination of a waste and bleed valve (Neptune Research Inc. 225P011-21), the reaction cell could be filled, flushed, and washed. By de-energizing both of these valves, the cell could be sealed from the atmosphere. The volume of the cell was 1.2 ml and the total volume of the enclosed space including the tubing to the transducer was estimated to be about 1.45 ml. The tubing used was made especially for the pinch valves (Neptune Research Inc. TBGM107 upstream of pump, and TBGM 101 downstream of pump). The sequence of the automated assay, excluding the extraction of sample from the milking machine, is described in Table 2. The entire sequence took about five minutes. Control of the system was achieved with a single board computer (Tern Inc. TD40, Davis, CA).

Signals from pressure and temperature transducers were digitized by the analog to digital converter (ADC) on the control board after amplification and filtering. The output from the pressure transducer (Motorola Inc. MPX-2010DP, Phoenix, AZ) was amplified by an instrumentation amplifier with a gain of 106, then filtered with a 6th order low pass (LP) Butterworth switched capacitor filter (National Semiconductor Corp. MF6-50, Santa Clara, CA) configured for a cutoff frequency of 20 Hz. A spare op-amp on the filter chip was configured as a 2nd order Sallen Key LP filter, with a cutoff frequency of 50 Hz, in order to attenuate the 1000 Hz clock noise from the switched capacitor filter. The temperature transducer was a thermistor (Keystone Thermometrics, RL0503-5820-97-MS, Edison, NJ) in a bridge circuit. The output of the bridge was sent through an instrumentation amplifier with a gain of 1 and then filtered with a 2nd order Sallen Key LP filter with a cutoff frequency of 3.4 Hz. The amplified and filtered signals of both instruments were digitized by the ADC on the microcontroller. Noise from 60 Hz was notched out digitally by averaging 16 consecutive samples sampled at 480 Hz.

by comparison to the true values. This was consistent with our research on the manual version of the assay (Jenkins et al., 2000), and the precision (± 0.7 mg/dl) was within the limits prescribed by the goals of the research (± 1.0 mg/dl).

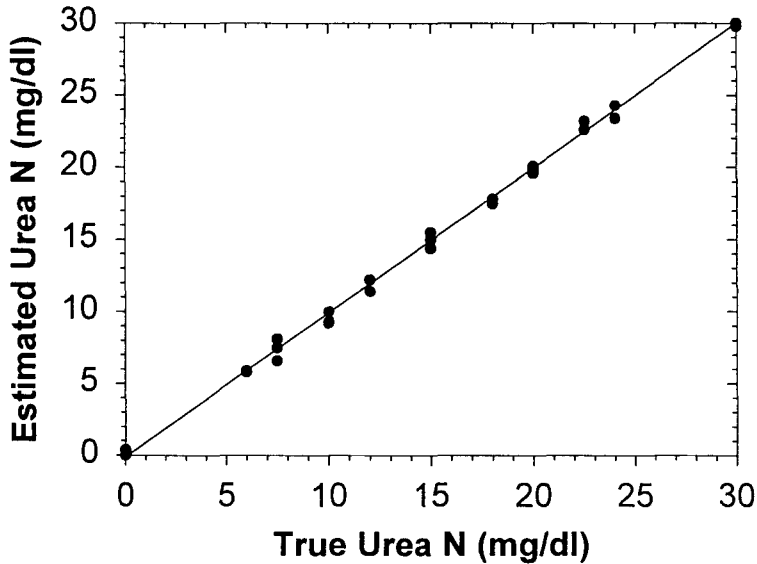


Figure 4. Calibration of the sensor with urea N in standards prepared in EDTA buffer.

DNA Sensor for Bacterial Pathogens on Sprouts

Salmonella and Escherichia coli O157:H7 have been associated with at least eleven sprout outbreaks since 1995. Sprout production is unusual compared to other fresh produce because the same conditions that encourage germination and growth of sprout seeds (temperature, available moisture, and nutrients) also encourage the growth of bacterial pathogens (United States Food and Drug Administration, 1999). On green leaf sprouts such as alfalfa, broccoli, and radish, bacteria from contaminated seeds can multiply by several orders of magnitude during the first few days of germination. Because sprouts are usually not cooked before eating and washing in water only slightly reduces the bacterial contamination, they are a good vehicle for food-borne pathogens (Andrews et al., 1982).

The United States Food and Drug Administration (FDA) provides sprout producers with guidelines for rapid screening and formal confirmation methods for Salmonella and E. coli. However, these can be costly and time consuming; even the rapid screening requires more than 48 hours (United States Food and Drug Administration, 1999). To make the production process more efficient, industry is turning to biosensors for fast and sensitive detection of pathogens in their product. Genetic-based sensors have detected as few as 5 colony forming units (CFU) within 9 minutes (Belgrader et al., 1999), and may be the answer for industry. The key to genetic-based sensors is the polymerase chain reaction (PCR), which amplifies DNA. As well, molecular beacons are now making real-time analysis of PCR possible.

Analysis of DNA using PCR has become a standard genetic tool. PCR meshes well with biosensors, because it creates detectable amounts of DNA from samples that have too little DNA to detect directly. PCR amplifies a specific region of DNA by thermally cycling the sample between three temperatures, each of which optimizes a particular reaction in the

amplification process (Figure 5). DNA is first denatured at 94 °C for 30 s to break double stranded DNA into two single strands. Primers are then annealed to the DNA. Primers are a pair of 10-30 nucleotide sequences designed to complement the beginning and end portions of the region of interest. The optimum duration and temperature for this reaction depends on the design of the primers, but is usually around 54 °C for 30 s. The last step of PCR is extension, in which the enzyme DNA polymerase completes the new strands with free nucleotides from solution. This is typically done for 1 min at 72 °C. The result of one cycle of PCR is to double the amount of original DNA. Typical times for PCR are 1-2 h for 30-40 cycles, which theoretically yields billions of copies of the target DNA.

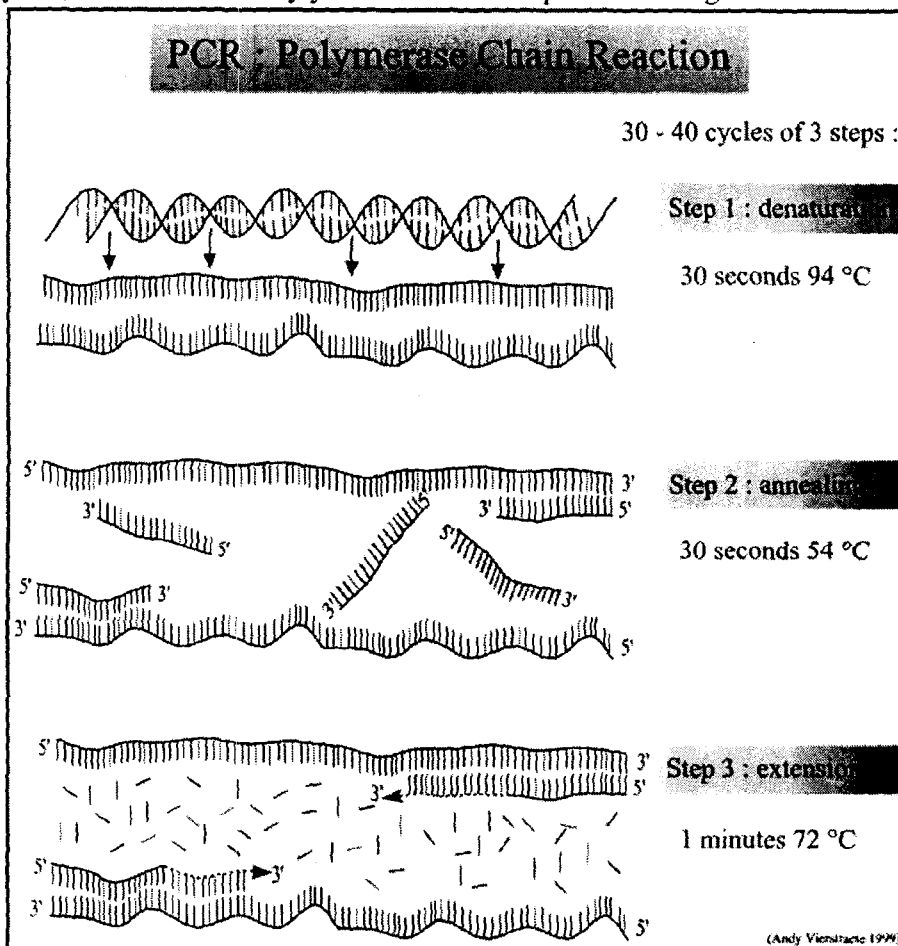


Figure 5. Diagram of a typical PCR (A. Vierstraete, 1999, RUG, Belgium).

When choosing a region of DNA to be amplified, the primers should be common to all organisms that need to be detected and should not react with DNA from undesirable organisms. For detection, a smaller PCR product is desirable. A smaller product could be produced with faster cycle times and would probably be more stable than larger products.

Due to inhibitors of PCR (primarily inhibitors of Taq polymerase), DNA is often extracted from the background (cellular and environmental components). Bacterial DNA is extracted by breaking the cell open and separating the components by centrifugation. Commercial products are available to aid this process. PCR can be done without extracting

the DNA from bacteria (Belgrader et al., 1999), but this is dependent on the environmental background of the sample.

Detection of the PCR products is usually done by gel electrophoresis, which separates DNA fragments based on size. The DNA is loaded into a polyacrylamide matrix and an electric field is applied. DNA has a negative charge and will migrate toward the positive side of the field. Fragments of different sizes will move at different rates through the matrix, and are compared with standard-sized fragments also placed in the matrix. The DNA is visualized in the gel by staining with an intercalating dye such as ethidium bromide, which fluoresces under ultraviolet light.

Molecular beacons now offer the option of real-time monitoring of PCR without use of electrophoretic methods. Molecular beacons (Tyagi and Framer, 1996; Chen et al., 2000) are 15-33 nucleotide sequences custom-designed to bind to a desired sequence of DNA. They have a fluorophore and a non-fluorescent quencher molecule at each end. The ends are designed to be complementary and, when free in solution, form a hairpin structure in which the fluorophore is quenched by the quencher molecule. When the molecular beacon binds to its target, the fluorophore is separated from the quencher molecule and, thus, fluoresces. During each cycle, the molecular beacons will bind to the product formed and the results can be monitored in real-time. Besides offering real-time detection, molecular beacons also provide a secondary specificity check. If PCR has somehow amplified the wrong DNA, molecular beacons will not bind to the product, and no fluorescence will not be detected.

A biosensor utilizing PCR and molecular beacons is now being designed. The sensor will consist of sample reaction chamber that is thermally cycled and optically monitored for fluorescence. Fluid samples will be moved by miniature pumps and valves to create PCR-sized samples (around 50 μ l) from the production process effluent. Filtering (Waage et al., 1999) or immunomagnetic particles (Cudjoe et al., 1995) may be used as pretreatments. Also, there will be a platform for isolating DNA if that is required.

CONCLUSIONS

To date, most research and commercial development of biosensor systems have been in the health-care area. Perhaps the most notable examples are the sensors for continuous monitoring of blood glucose and control of insulin injection to treat people with diabetes. In spite of significant research activity over the past three decades, many potential application areas are untouched. Problems remain with sensor accuracy, long-term stability, and system robustness. By comparison with health-care, very little research has been done on the development and application of biosensors in agriculture and agrobiotechnology. Food quality, microbial safety, production control, process control, waste treatment, and environmental monitoring are but a few areas that would benefit from sensor technology to directly measure the important chemical components. While subject to the same problems sited above, biosensor applications in agriculture and agrobiotechnology will also be constrained by the need for lower costs.

REFERENCES

- Andrews, W.H., P.B. Mislivec, C.R. Wilson, V.R. Bruce, P.L. Poelma, R. Gibson, M.W. Trucksees, and K. Young. 1982. Microbial hazards associated with bean sprouting. *J. Assoc. Of Anal. Chem* 65(2):241-8.
- Baker, L. D., J. D. Ferguson, and W. Chalupa. 1995. Responses in urea and true protein of milk to different feeding schemes for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:2424-2434.

- Belgrader, P., W. Benett, D. Hadley, J. Richards, P. Stratton, R. Mariella Jr., and F. Milanovich. 1999. PCR detection of bacteria in seven minutes. *Science*, 284:449-450
- Biosensors 2000. The Sixth World Congress on Biosensors, May 24-26, 2000, San Diego, California, Elsevier Science, Oxford, UK.
- Broderick, G. A. and M. K. Clayton. 1997. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *J. Dairy Sci.* 80:2964-2971.
- Butler, W. R., J. J. Calaman, and S. W. Beam. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:858-865.
- Chen, W., G. Martinez, and A. Mulchandani. 2000. Molecular Beacons: A real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Analytical Biochemistry*, 280:166-172.
- Claycomb, R. W. 1997. Biosensor for On-Line Measurement of Bovine Progesterone During Milking. PhD Thesis, University of California, Davis, CA.
- Claycomb, R. W., M. J. Delwiche, C. J. Munro, and R. H. BonDurant. 1996. Enzyme immunoassay for on-line sensing of milk progesterone. *Trans. ASAE*, 39(2):729-734.
- Claycomb, R. W., M. J. Delwiche, C. J. Munro, and R. H. BonDurant. 1998. Rapid enzyme immunoassay for measurement of bovine progesterone. *Biosensors and Bioelectron.*, 13:1165-1171.
- Claycomb, R. W., and M. J. Delwiche. 1998. Biosensor for on-line measurement of bovine progesterone during milking. *Biosensors and Bioelectron.*, 13:1173-1180.
- Delwiche, M., E. Cox, B. Goddeeris, C. Van Dorpe, J. De Baerdemaeker, E. Decuypere, and W. Sansen. 2000. A biosensor to detect penicillin residues in food. *Trans. ASAE*, 43(1):153-159.
- Cudjoe, K.S., T. Hagtvedt, and R. Dainty. 1995. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP)-ELISA. *International Journal of Food Microbiology*, 27:11-25.
- Doebelin, E. O. 1990. *Measurement Systems* 4th ed. McGraw Hill Pub. Co., New York, NY.
- Hall, E. A. H. 1990. *Biosensors*. Open University Press, Buckingham, UK.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. *Antibodies – A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY.
- Hof, G., M. D. Vervoorn, P. J. Lenaers, and S. Tamminga. 1997. Milk urea nitrogen as a tool to monitor the protein nutrition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:3333-3340.
- Hopkins, S. M. 1986. Bovine anestrus. In: *Current Therapy in Theriogenology*, 2nd ed., D. Morrow, editor, pp 247-250. W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA.
- Jenkins, D. M., M. J. Delwiche, E. J. DePeters, and R. H. BonDurant. 1999. Chemical assay of urea for automated sensing in milk. *J. Dairy Sci.* 82:1999-2004.
- Jenkins, D. M., M. J. Delwiche, E. J. DePeters, and R. H. BonDurant. 2000. Refinement of the pressure assay for milk urea nitrogen. *J. Dairy Sci.* (In Press).
- Josephy, P. D., T. Eling, and R. Mason. 1982. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. *J. of Bio. Chem.*, 3669-3675.
- Laing, J. A., and R. B. Heap. 1971. The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. *Br. vet. J.*, 127(8):xix-xxii.
- Larson, S. F., W. R. Butler, and W. B. Currie. 1997. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:1288-1295.

- Marsh, W. H., B. Fingerhut, and E. Kirsch. 1957. Determination of urea nitrogen with the diacetyl method and an automatic dialyzing apparatus. *Am. J. Clin. Pathol.* 28:681-688.
- Munro, C., and G. Stabenfeldt. 1984. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for determination of progesterone. *J. Endocr.*, 101:41-49.
- Nebel, R. L. 1988. On-farm milk progesterone tests. *J. Dairy Sci.*, 71(6):1682-1690.
- Nebel, R. L., W. D. Whittier, B. G. Cassell, and J. H. Britt. 1987. Comparison of on-farm and laboratory milk progesterone assays for identifying errors in detection of estrus and diagnosis of pregnancy. *J. Dairy Sci.*, 70(7):1471-1476.
- Pope, G. S., I. Majzlik, P. J. H. Ball, and J. D. Leaver. 1976. Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Br. vet. J.*, 132:497-506.
- Schepers, A. J. and R. G. M. Meijer. 1998. Evaluation of the utilization of dietary nitrogen by dairy cows based on urea concentration in milk. *J. Dairy Sci.* 81:579-584.
- Tyagi, S. and F.R. Framer. 1996. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 14:303-308.
- United States Food and Drug Administration. 1999. Guidance for industry: reducing microbial food safety hazards for sprouted seeds and guidance for industry: sampling and microbial testing of spent irrigation water during sprout production. *Federal Register* 64(207):57893-57902).
- Waage, A.S., T. Vardund, V. Lund, and G. Kapperud. 1999. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *Journal of Applied Microbiology*, 87:418-428.

농업 및 생물계에서의 바이오 센서

BIOSENSORS IN AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL SYSTEMS

M. J. Delwichi, D. M. Jenkins, X. Tang, and E. S. Jackson
Biological & Agricultural Engineering University

번역 : 조한근 (전북대학교 교수)

적 요

바이오 센서의 본질과 기능에 관한 일반적인 논의가 간단히 제시되었다. 바이오 센서 개발에 대한 주 동기는 건강관리 산업이었지만, 최근의 연구 노력은 농업 및 생물 생산 시스템에서의 문제로 확산되고 있다. 우리 실험실에서 연구된 것들을 설명하기 위하여 세 가지의 바이오 센서 예와 그들의 적용에 대해 소개한다. 첫째는 젖소의 번식관리 향상을 위해 프로게스테론 호르몬을 착유할 때 측정하는 면역센서이다. 둘째는 우유에 있는 요소(尿素, urea)의 측정을 위한 효소 센서로서, 투여되는 단백질의 우유 단백질로의 전환효율을 구하기 위한 도구이며 이로 인해 젖소의 사양관리를 향상시킬 수 있다. 셋째는 신선하며 최소 가공된 야채와 과일을 씻은 물에 있는 극소량의 병원성 박테리아를 검출하기 위한 PCR(중합효소연쇄반응)을 이용한 DNA 센서이다. 농업과 농업생물공학, 식품가공 그리고 환경 모니터링에 있어서의 바이오 센서의 적용 가능성은 이제 겨우 이해되고 있다.

서 론

바이오 센서는 대개 생물학적 감지 요소와 신호변환기를 통합한 장치로 정의되는데 일반적으로 목표량의 존재여부나 농도를 측정하는데 이용된다 (Hall, 1990). 일반적으로 알려진 최초의 바이오 센서는 Clark 과 Lyons(1962)에 의해 보고되었으며 포도당을 검출하기 위한 효소-전극이 개발되었으며 Yellow Springs Instrument Company에 의해 1974년 상품화되었다. 처음 바이오 센서 개발에 대한 주 관심은 건강관리 산업으로부터 나오게 되었다. 최근 몇 년에는 바이오 센서의 활용이 환경 모니터링, 식품 가공, 생물공학 그리고 국가 방어 등의 다양한 분야에까지 확산되었다. 이와 같은 다양성은 올해 미국 캘리포니아 샌디에고에서 개최된 제6차 바이오 센서 세계회의(2000)에서 확인되었는데, 건강관리 분야가 여전히 상업적 자극제 역할을 하고 있다. 대조적으로 농업과 생물생산 분야에서의 바이오 센서의 개발과 적용은 진척이 덜 되고 있는데 그 이유는 이 분야에서의 낮은 단가와 적은 이윤 폭 때문이다. 그러나 요즘 보다 많은 관심이 이 분야에 맞추어지고 있다. 사실상 지난 여름 미국 농공학회 생물공학부 내에 바이오 센서의 연구와 적용에 초점을 둔 기술위원회가 설치된 바 있다.

바이오 센서에서의 분자 인식은 생물학적 감지 요소에 의해 수행되는데, 높은 특이성, 감도 및 장기간의 안정성을 보통의 목표로 한다. 표준 생물인식 분자로는 효소, 항체 및 핵산 시퀀스가 있다. 효소는 기질과의 반응에 대해 촉매와 같은 역할을 하는 단백질이며 보통 반응 생성물이 검출된다. 항체는 체액의 면역시스템에 있는 단백질로서 적절한 항원 결

정체를 포함하고 있는 세포나 유생 분자와 결합한다. 다양한 형태의 식별자 (효소, 형광성 분자, 방사성 태그, 금 콜로이드)들은 결합 정도를 검출하기 위해 항체 또는 항원에 사용된다. 핵산은 뉴클레오타이드의 연속물(질소 염기 + 당분 + 인) 로서, 염기의 보완적인 연속물에 결합하여 고정시킨다. 형광 식별자의 짧은 연속물은 일반적으로 보완물을 검출하는데 이용된다.

광범위한 신호변환 방법은 이러한 분자인식 반응들을 결합해 왔다. 유리 막 전극, 이온 선택적 전극, FET(전계 효과 트랜지스터)와 같은 전위차계 센서는 Nernst 방정식에 따라 전압 신호를 준다. 암페어미터 장치는 일반적으로 전극과 전극 표면 전기 화합물 사이의 전하의 이동을 측정한다. 광도계 센서는 흡광, 형광 또는 화학 발광에서의 변화와 같은 생물 반응계의 광학적 특성을 측정하기 위한 광범위한 방법을 이용한다. 보다 성공적이며 상품화된 장치는 친화성 반응을 실시간으로 감지하기 위해 표면 플라즈마 공명을 이용한다 (Biacore International, Uppsala, Sweden). 압전 센서는 생물작용 표면 위의 질량 하중에 의한 진동특성의 변화를 측정하기 위해 사용된다. 다수의 변환 방법들이 'Biosensors and Bioelectronics와 같은 학술지에 매년 보고 된다 (Elsevier Science, Oxford, UK). 미세 기계가공의 지속적인 발달로 유체공학, 화학, 센싱, 신호처리를 포함하는 바이오 센서를 개발하게 될 것이다.

이 논문에서는 우리 실험실에서 개발된 바이오 센서 일부를 보고하여 센서의 형식과 적용 범위를 설명하고, 농업과 생물기술분야에서의 미래 연구가 활성화되도록 기대한다.

바이오 센서 개발 예

우유의 번식 호르몬에 대한 면역센서

번식 건강 관리는 대규모 미국 낙농업자들이 직면하고 있는 가장 어려운 일 중의 하나이다. 배란직전 시기인 발정을 감지하여 성공적인 인공수정을 가능케 하기 위해 상당한 시간과 노력을 기울였다. 우선적으로 행동의 변화에 근거한 다양한 방법으로 발정을 감지하지만, 가장 효과적인 접근 방법은 혈장 또는 우유에 있는 번식 호르몬의 주기적인 측정으로 인해 발정 주기를 추적하는 것이다(Pope et al. 1976). 우유에 있는 프로게스테론을 측정하여 발정, 임신 및 번식관련 질병에 대한 진단이 가능하도록, 다양한 면역기법을 사용하는 농장용 실험 키트가 상품화되어 왔다 (Nebel et al. 1987; Nebel, 1988). 집중적으로 관리되는 낙농 환경에 있어 이런 기술의 광범위한 사용을 제한하는 주요 요인은 우유 시료를 수집하고 저장하고 평가하고 그 결과를 기록할 노동력이 필요하기 때문이다. 이전 연구와 현재 프로게스테론 센서 모형의 한계를 기초로 하여, 이 연구에 있어 우리의 목표는 (1) 실시간으로 난포상태에서의 우유에 있는 프로게스테론의 농도측정으로 향상된 평가방법을 개발하는 것이고 (2) 새로운 기법의 도입으로 2세대 바이오 센서를 개발하고 보정하는 것이다.

항원경쟁기법으로 항원을 포착하는 방식이 2세대 센서에 이용되기 위해 개발되었다 (Harlow and Lane, 1988). 항프로게스테론 단클론 항체는 판매회사에서 구입하였다 (Clone P01-92-11M-P, Biostride, Inc., Palo Alto, California, USA). Horse-radish 과산화 효소 식별자를 갖는 프로게스테론이 복합물로 이용되었고(P 3659, Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 그리고 3,3', 5,5'

-tetramethylbenzidine dihydrochloride(No. 34015, Pierce, Rockford, Illinois, USA)가 기질로 사용되었다. 기공크기가 12 μ m 인 니트로 셀룰로스 멤브레인(nitrocellulose membrane, AE100, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)을 직경 7.9mm 크기의 원판으로 만든 후, 탄산염 버퍼용액에 있는 항체액으로 코팅 처리하고, 카제인으로 블로킹 처리한 후 4 $^{\circ}$ C에서 저장된다.

기법의 기본 형태는 두 단계로 구성된다: (1) 항원 결합단계로 시료 내에 있는 자유 프로게스테론과 효소 식별자가 부착된 프로게스테론이 멤브레인 위의 항체 결합 위치에서 서로 경쟁하며, 다음에는 (2) 기질 발달 단계로서 결합한 효소가 기질의 산화 작용을 촉진시켜 흡광도에 있어 변화를 가져오는 단계이다.

우리의 이전 기법과 비교하여(Claycomb et al., 1998), 액체 체적은 펌프 스트로크 체적 변화 효과를 줄이기 위한 양만큼 증가하였다. 증가한 액체 체적(0.5-1.2ml)을 유지하기 위한 반응조로 표준 분광 광도계용 큐벳을 사용하였다. 우리의 이전 연구와 센서의 온라인 조작의 필요에 기초하여 결합 시간은 5분으로 고정되었고, 기질 반응시간은 3분이며 분석에 필요한 모든 시간은 액체 조작시간을 포함하여 10분을 초과하지 않았다. 기질의 흡광도는 645nm에서 동적으로 판독하였으며 흡광도(mOD/s) 변화는 3분 후에 측정하였다. 센서에 이용된 실시간 분석의 프로토콜은 표1에 요약되어 있다.

Table 1. Protocol for Progesterone Assay Used in the Sensor

항체코팅
(1) 직경 7.9mm 니트로셀룰로스 멤브레인(기공 크기 12 μ m) 디스크에 단클론 항체 (49.3 μ g/ml in 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6) 10 μ l을 첨가한다. 상온에서 밀폐용기로 2.5 시간 배양한다.
(2) 멤브레인을 0.5시간동안 상온에서 건조한다.
(3) 멤브레인 셀(반응조)에 500 μ l 블로킹 버퍼(carbonate 버퍼에 있는 0.5% casein 과 1% glycine)를 첨가한다.
(4) 반응조로부터 멤브레인을 제거하고 상온에서 0.5시간동안 건조한 후 4 $^{\circ}$ C에서 저장
항원결합
(5) 반응조에 코팅된 디스크를 삽입한다.
(6) 복합물 550 μ l (2.0 μ g progesterone-horse radish peroxidase in assay buffer *)에 시료 550 μ l 을 첨가 : 재순환시키며 5분간 배양
(7) 5회 세척(1.5ml assay buffer with 0.05% Tween 20).
기질반응
(8) 기질 1.2ml (0.32mM TMB-2HCl, 0.006% H ₂ O ₂ and 12.5% methanol in 5.14 mM phosphate/24.3 mM citrate buffer, pH 5.0) 추가: 재순환시키며 배양.
(9) 10초 간격으로 흡광도(645nm)를 읽고, 3분동안 반응비율을 계산한다.

* Assay buffer - phosphate (0.1 M) buffered saline (0.15 M), pH 7.0

액체 처리 시스템의 개략도는 그림 1에 보여준다. 광학적, 화학적 간섭을 최소화하기 위해서 반응조는 표준 수정 큐벳(Type 5H, NSG precision Cells, Inc., Farmingdale, NY, USA)으로

만들어졌으며, 시약은 행정당 $50\mu\text{l}$ (LPLA1220050L, The Lee Co., Westbrook, CT, USA)의 이송 용량을 가진 4개의 솔레노이드 펌프에 의해 주입되고 배출된다. 양방향 보통 닫힘 밸브는 시약 선택에 이용되고, 세 방향 밸브는 이송관(LFFA1201710H and LFFA1201410H, CT, USA)의 프라이밍에 이용된다. 시약펌프, 분기관, 그리고 주입밸브가 과산화물 효소에 오염되는 것을 최소화하기 위하여 식별자를 부착한 프로게스테론(복합물)을 위해 별도의 펌프 1개와 이송관이 이용된다. 다른 펌프로 재 순환을 하여 혼합과정을 진행한다(Delwiche et al., 2000). 기질, 복합물, 혼합 및 반응조 공급 배관은 내경 1.6mm 바이톤 튜브(06434-01, Cole-Parmer Instrument Corp., Vernon Hills, IL, USA)로, 나머지 이송관은 같은 내경의 타이콘 튜브(14-169-1B, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)로 제작된다. 내경 1.1mm를 갖는 스테인레스 강 튜브(HTX-17, Small Parts Inc., Miami Lakes, CA, USA)는 테프론 스페이서 캡에 삽입되어 시약을 주입하고 반응조를 배수하는데 이용된다.

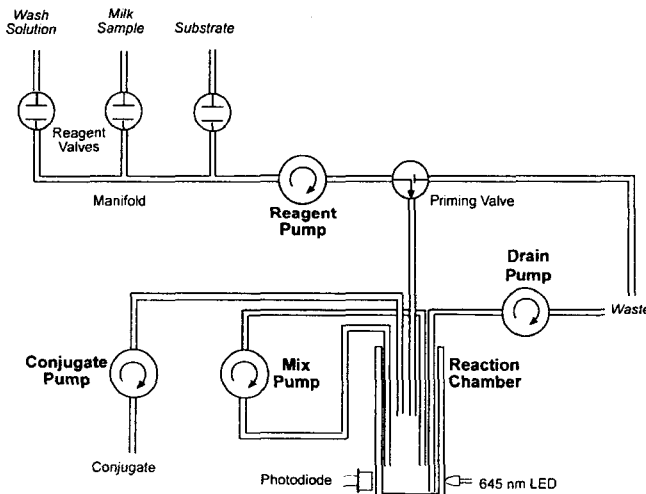


Figure 1. Schematic of the fluid handling system.

기질의 흡광도는 반응실 한쪽에 있는 645nm 발광 다이오드(LED)(HLMP-4101, Hewlett Packard, San Jose, CA, USA)와 다른 면에 위치한 넓은 면적의 포토다이오드(BPX 61, Siemens Components, Inc., Cupertino, CA, USA)에 의해 측정된다. LED의 빛은 단순한 틈 구멍으로 평행하게 조준된다(Delwiche et al., 2000). 포토 다이오드로부터의 광전류 10^4 V/A의 이득을 갖는 광전압 증폭기의 입력으로 공급된다. 저주파 노이즈는 4차 버터워즈 저역통과필터($f_c=10\text{Hz}$)에 의해 제거된다. 고정 이득이 10이며 조정 가능한 오프셋을 갖는 인버터를 최종단계에 사용하여 기질을 통해 투과되는 빛의 밀도에 비례하는 전압을 출력한다. 흡광도(OD)의 상대값은 기질 발달 초기단계의 출력을 기초로 하여 계산된다. 제어 컴퓨터는 펌프와 밸브를 순차적으로 작동시키고, 센서 출력을 읽기 위해 이용된다.

센서는 원유 샘플로 방사성 면역 분석(RIA) 결과와 비교하여 보정하고, 실제 프로그

스테론 농도값을 제시하는 것으로 가정한다. 우유 시료들은 UC Davis 축산학과 젖소 사육장에 있는 수유기의 다양한 단계에 있는 22마리의 젖소로부터 수집되었다. 착유기를 연결하기전 전좌(前左) 유방에서 대략 5 ml의 우유는 버려지고 깨끗한 용기에 전유(前乳) 시료 15ml를 수집한다. 이 시료는 지방층 분리의 문제를 피하기 위해 바로 바이오 센서에 테스트된다. 나머지 시료는 4℃에 저장되고 수일 내에 UC Davis 수의과대학 내분비실험실에서 RIA(Munro and Stabenfeldt)에 의해 검사된다.

위에 약술된 보정 절차의 한가지 제한은 RIA 변이성으로부터 센서 변이성을 분리해 내는 문제에 있다. 바이오 센서의 조작에 의한 변이성을 좀더 확실하게 식별하려면 분만 후 9일 지난 소로부터 우유를 채취하여 프로그스테론을 시험하는 것이다. 분만후의 초기 프로그스테론 농도는 거의 0에 가깝다고 가정할 수 있고 사실상 이 기간동안 난소의 스테로이드 생산은 거의 없을 것이다 (Hopkins, 1986). 표준 용액은 10, 100, 1000 그리고 10000 ng/ml의 농도에서 에탄올에 용해된 프로그스테론에 의해 준비된다(P-0130, Sigma Chemical Co.). 이러한 다양한 표준들은 유리 시험관에 옮겨지고 에탄올은 우유시료를 첨가하기 전에 증발되어진다. 프로그스테론 농도는 생리학적 범위(0, 0.2, 0.5, 2, 5, 10, and 20 ng/ml)로 다루어져 선택되어지고, 각 농도에 3회 반복이 만들어진다.

전유(前乳, foremilk) 시료의 RIA 측정으로 인한 바이오 센서의 보정 결과는 그림 2에 나타난다. 시료가 깨끗하기 때문에 프로그스테론은 정상적인 생리학적 등급보다 제한되어 있으며 그 범위는 0.1에서부터 16.2 ng/ml이다. 프로그스테론 농도, P(ng/ml)의 상용로그 값에 대한 R(mOD/s)의 선형 회귀율은 0.083mOD/s의 표준 오차를 갖는다. 회귀 결과를 역으로 하고 예측 농도를 구하여 보정 방정식을 유도하였다. 산후 초기 우유로 센서를 실험한 결과 회귀 계수는 비슷하게 나왔으나 표준 오차(0.046 mOD/s)는 작아졌으며, 보정 상 변이성이 나타난 것은 RIA 측정에 기인되었다.

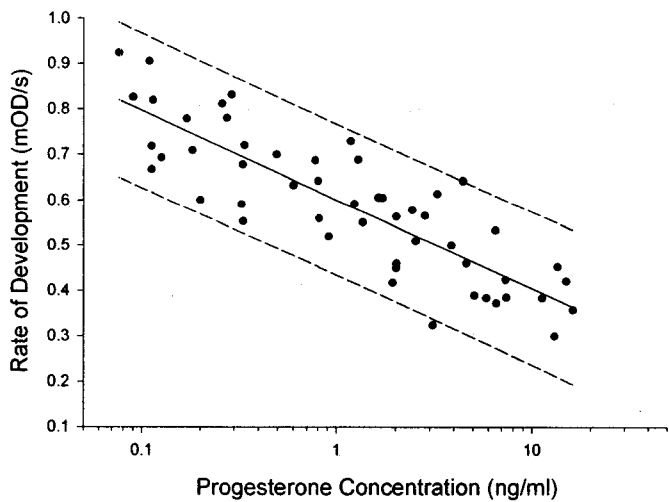


Figure 2. Calibration of the sensor by radioimmunoassay measurement of foremilk.

RIA 측정의 변이성과 보정 방정식의 비선형성은 예측 농도 오차의 평가를 복잡하게 한다. 예를 들어, 우리의 센서가 발정기(follicular phase)의 일반적 농도에 해당되는 0.5 ng/ml를 예측한다고 가정한다. 호르몬 첨가 유 실험에서의 표준 회귀 오차와 95%의 신뢰도 구간에 대해 $\pm 2s_{logP}$ 를 이용하여 센서 변이성을 추정하여 (Doebelin, 1990), 농도로 변환하면 0.2에서 1.5 ng/ml의 오차 범위가 된다.

이 연구의 주목적은 황체 형성기에 있는 젖소의 프로게스테론 농도와 발정기의 농도를 구별하는 능력을 갖는 센서를 개발하는데 있으며 이로서 배란기를 검출하는데 있다. Pope 등(1976)은 발정상태에 있는 다섯 마리 젖소에서 전유(全乳, whole milk)중의 프로게스테론 농도는 평균 0.86 ng/ml라고 보고하고 있다. Laing 과 Heap(1971)는 난소황체의 중간 주기에서의 농도는 평균이 3.82 ng/ml라고 보고하고 있다. 이런 농도는 여기에서 개발된 바이오 센서로 명확히 구별될 수 있다.

우유의 요소(尿素, Urea)에 대한 효소 센서

우유 요소 질소(MUN)는 낙농우의 단백질과 에너지 이용 효율의 확실한 척도로 입증되어 왔다. MUN 관찰에 기초한 젖소의 사양관리는 사료비의 상당한 절약을 가능케 하며 (Baker et al., 1995; Broderick and Clayton, 1997), 더 나가서 비뇨기계 질소 손실의 감소를 초래하며 (Hof et al., 1996; Schepers et al., 1997), 번식성능의 향상을 가능하게 한다 (Butler et al., 1996; Larson et al., 1997). 시료를 수집하고 처리하는 것이 어렵고 비용이 들지만, 많은 낙농가에서 수집된 우유의 MUN이 먼 거리에 있는 실험실에서 시험된다. 시험 결과는 수일 내에 알 수 없으며, 시료는 낙농가, 실험실 혹은 운반 중에 잘못 처리될 수 있다. 이 연구의 목표는 이러한 문제를 해결할 신뢰적이며 저렴한 실시간 MUN 센서를 개발하는 것이다.

요소(尿素, urea)에 대한 분석기법은 UC Davis에서 개발되었으며 (Jenkins 등, 1999), 이산화 탄소에 기인한 휘발성 가스 압력은 효소 우라아제에 의한 요소(尿素, urea)의 가수분해 후에 측정된다. 이 분석기법은 강인한 변환 메카니즘 때문에 우유에 적용하는 것이 적합한 것으로 간주되는데, 이때 우유는 감지요소와 전혀 접촉을 하지 않는다. 이와 비교하여 다른 요소(尿素, urea) 감지 기술들은 전유(全乳)라는 복잡한 매체에서는 작동되지 않을 수 있으며, 우유 고형물을 제거하기 위해 복잡하며 고가의 설비가 필요해진다. 휘발성 가스 분석기법의 온라인 자동화는 그것의 정확성, 간편성, 강인성, 저 비용 및 시약이나 반응물의 무독성 때문에 합리적인 접근방법이 되었다.

자동화 센서(그림 3)의 유체공학은 시약이 선택되는 공통의 분기관 위에 핀치 밸브(Neptune Research Inc. 161P011, West Caldwell NJ)의 층으로 구성되었다. 시약은 50 μ l 스트로크 체적을 갖는 솔레노이드 다이어프램 펌프에 의해 반응조로 이송된다(Bio-Chem Valve Inc. 120SP 12 50-4, Boonton, NJ). 폐기와 유출 밸브의 조합을 여자하여 반응조는 채워지고 배출되며 세척된다. 이 두 밸브를 소자하면 반응조는 외부와 차단된다. 반응조의 체적은 1.2ml 이고 변환기까지의 튜빙을 포함한 총 체적은 약 1.45ml이다. 사용된 튜빙은 핀치 밸브용으로 특별히 제작되었다 (Neptune Research Inc. TBGM107 upstream of pump, and TBGM 101 downstream of pump). 착유기로부터 시료 추출을 제외한 자동화 분석 시퀀스는 표 2에 나타

나 있다. 전체적인 시퀀스에는 대략 5분의 시간이 소요된다. 시스템 제어는 단일 보드 컴퓨터로 수행되었다 (Tern Inc. TD40, Davis, CA).

압력과 온도 변환기로부터의 신호는 증폭과 필터링 후 제어 보드 위에 있는 아날로그-디지털 변환기(ADC)에 의해 디지털 값으로 변환되었다. 압력 변환기(Motorola Inc. MPX-2010DP, Phoenix, AZ)로부터의 출력은 106의 이득을 갖는 계측용 증폭기에 의해 증폭되었으며 6차 저역통과 버터워즈 접점 용량 필터(National Semiconductor Corp. MF6-50, Santa Clara, CA)에 의해 여과되어 20Hz의 차단 주파수를 형성한다. 필터 칩 위의 별도의 연산증폭기는 접점 용량 필터로부터의 1000Hz 클럭 노이즈를 감쇄시키기 위해 50Hz의 차단 주파수를 갖는 2차 살렌키 저역통과 필터로 형성되었다. 온도 변환기는 브리지 회로에 있는 서미스터이다 (Keystone Thermometrics, RL0503-5820-97-MS, Edison, NJ). 브리지 출력은 이득이 1인 계측용 증폭기에 의해 보내진 후 차단 주파수가 3.4Hz인 2차 살렌키 저역통과 필터에 의해 여과된다. 두 계측기로 증폭 여과된 신호는 마이크로 컨트롤러에 있는 ADC에 의해 디지털 값으로 변환되었다. 60Hz의 소음은 480Hz에서 샘플링 된 연속 데이터 16개를 평균하여 제거하였다.

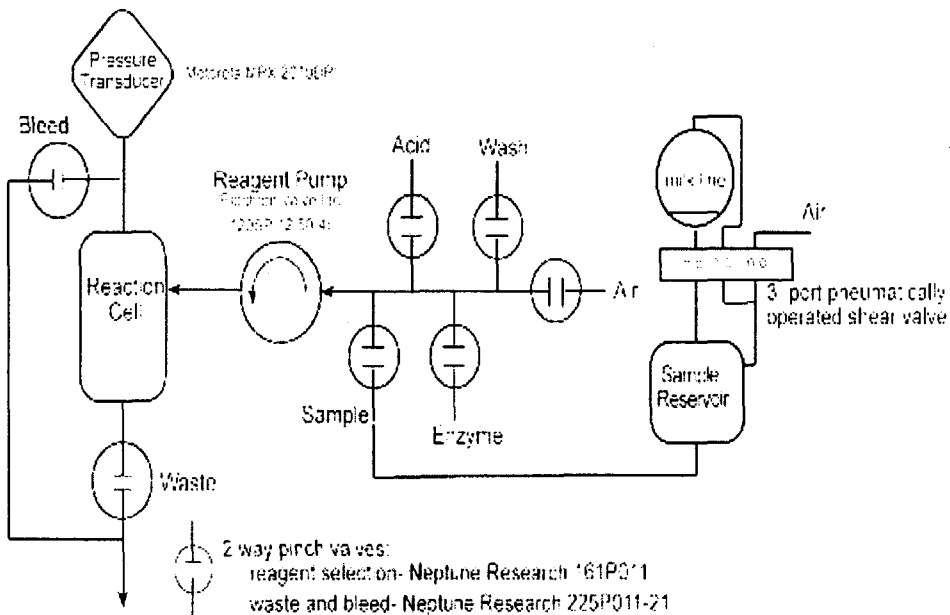


Figure 3. Schematic of the urea sensor fluidics.

Table 2. Sequence of automated assay for urea sensor.

1. 시료 반응조에 프라임하고 세척한다. 시료 15 스트로크, 요소(尿素, urea) 2 스트로크를 주입하고, 반응조를 0.5초 동안 흔들고, 1분 간 배양한다.
2. 반응조를 12 스트로크의 신선한 공기로 환기하고, 1.5M 구연산(1.2% w/v Brij 35⁺와 0.4% w/v Tween 20⁺) 3 stroke를 주입한다. 16초간 흔들고 압력 변화를 기록한다. 온도를 기록한다.
3. 세척액(0.1% Brij35⁺, 0.1% Tween 20⁺ in EDTA buffer*)으로 반응조를 세척한다.
4. 휘발성 가스의 배경농도 수정을 위해 시료에 효소대신 세척액을 추가하고 배양하지 않고 1-3단계를 반복한다.

* 34 mM K-EDTA, pH 7.6

+ 지방과 다른 우유 고형분 부착을 억제하는 세제

센서 보정을 위한 요소(尿素, urea)의 표준은 EDTA 버퍼로 준비되었다. 탄산나트륨의 변량을 표준에 추가하여 탄산염과 우유내의 다른 용존 가스의 영향을 모의하였다. 그 후 온도를 가능한 일정하게 유지하면서, 센서의 압력 변화를 위해 이 표준을 분석하였다. 효소 처리를 하거나 하지 않은 시료에서 압력변화에 대한 요소(尿素, urea) 농도의 계수는 다중 선형 회귀를 통하여 얻어진다. 이러한 계수는 센서가 보정 된 온도 값에 정규화 된 온도 종속적인 보정 계수에 의해 조절된다. 결과 식은 효소 처리를 하거나 하지 않은 측정된 압력 변화에 대한 요소(尿素, urea) 농도를 추정하는데 이용된다. 보정식은 우유에 대해 두 가지 다른 방법으로 확인되었다. 첫째 방법은 센서에 의해 평가된 MUN 값과 자동분석기(Technicon Corp. Series 2 Autoanalyzer, Tarrytown, NY)에 의해 평가된 대응 값을 비교하는 것인데, 자동분석기는 요소와 디아세틸 일산화물(Marsh et al., 1957)과의 색채 반응을 측정한다. 둘째 방법은 기지의 우유 요소(尿素, urea) 농도의 표준을 준비하고(Jenkins et al., 2000), 센서 값을 참값과 비교하는 것이다.

센서 보정(그림 4)은 센서가 주변 탄산염의 농도가 변할 때도 버퍼에서는 정확함을 보여준다. 보정된 센서의 우유에 적용한 결과, 디아세틸 일산화물을 갖는 자동분석기 값과 비교하고, 참값과 비교할 때 정확하게 나타났다. 이것은 현재의 우리 연구의 수 작업 분석 결과(Jenkins et al., 2000)와 일치하는 것이며, 연구의 목표($\pm 1.0\text{mg/dl}$)에서 정한 정밀도($\pm 0.7\text{mg/dl}$) 범위를 만족하였다.

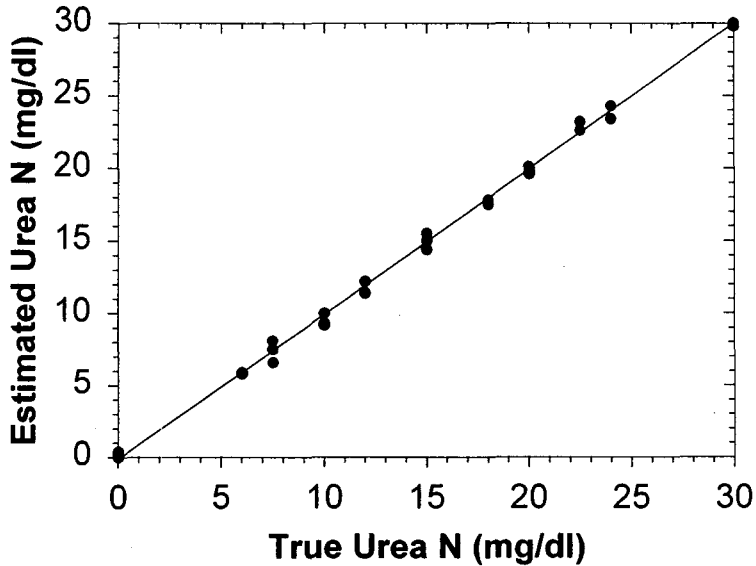


Figure 4. Calibration of the sensor with urea N in standards prepared in EDTA buffer.

싹의 박테리아 병원균에 대한 DNA 센서

살모넬라와 대장균 *E. coli* O157:H7은 1995년 이래로 적어도 11개의 싹의 발아와 관련되어왔다. 싹의 생산은 다른 신선한 생산물들과 비교할 때 드문 일인데, 이유는 종자의 발아와 성장을 촉진하는 같은 조건(온도, 가능 습도, 영양분)에서 또한 박테리아 병원균의 성장이 촉진되기 때문이다(United States Food and Drug Administration, 1999). 알파파, 브로콜리 및 무와 같은 녹색의 잎을 갖는 식물의 싹에, 오염된 종자로부터의 박테리아는 발아 후 처음 며칠동안 몇 배의 크기로 증식되었다. 이러한 싹들은 보통 먹기 전에 요리되지 않고, 물에 세척하게 되면 박테리아 오염을 감소시키지만, 그것들은 음식을 통한 병원체의 좋은 매체이다(Andrews et al., 1982).

미국 식품 의약청(FDA)은 싹 생산자에게 살모넬라와 대장균 *E. coli*를 신속하게 가려내고 정식으로 확인하는 방법에 대한 지침을 제공하고 있다. 그렇지만 값이 비싸고 시간이 많이 소모된다; 심지어 신속한 점검에도 48시간 이상을 필요로 한다(United States Food and Drug Administration, 1999). 생산 과정을 좀더 효율적으로 바꾸기 위해 산업 분야에서는 생산물에 있는 병원균을 빠르고 민감하게 검출하기 위해 바이오센서로 전환하고 있다. 유전학을 바탕으로 한 센서는 9분 내에 5개 이상의 집락(colony forming units : CFU)을 검출할 수 있으므로, 산업체의 문제에 대한 답이 될 것이다(Belgrader et al., 1999). 유전학에 기초를 둔 센서의 요점은 DNA를 증폭하는 중합효소연쇄반응(PCR)이다. 뿐만 아니라 분자 신호는 PCR의 실시간 분석을 가능하게 한다.

PCR을 이용한 DNA 분석은 표준화된 유전학적 도구가 되었다. PCR은 양이 너무 적어 직접적으로는 검출할 수 없는 시료의 DNA 양을 검출 가능하도록 해주기 때문에 바이오

센서와 결합이 잘 된다. PCR은 시료를 3단계의 온도변화를 반복시킴으로서 DNA의 특정 일부를 증폭시키고, 증폭과정에 있어서 각 반응조건을 최적화해 준다(그림 5). DNA는 처음 94°C에서 30초 동안에 변성(denaturation)되어 두 가닥의 DNA가 분리되어 각각 하나의 가닥으로 된다. 프라이머는 그후 DNA와 annealing(primer와 결합) 되어 진다. Primer는 10-30 뉴클레오티드의 짝으로 되어 있으며 호환영역의 처음과 끝 부분을 서로 보충하도록 되어 있다. 이 반응의 최적 시간과 온도는 프라이머의 설계에 따라 다르지만 대개 54°C에서 30초간 이루어진다. PCR의 마지막 단계는 DNA 합성(extension)으로서 효소 DNA 폴리메라아제가 용액으로부터 자유로운 뉴클레오티드를 이용하여 새로운 가닥으로 완성시킨다. 이것은 일반적으로 72°C에서 1분간 이루어진다. PCR의 한 사이클 결과 DNA 양은 처음의 두 배가된다. PCR의 일반적인 시간은 30-40 사이클 동안 1-2시간이 소요되며, 이론적으로 10억개의 목표 DNA 사본을 생산한다.

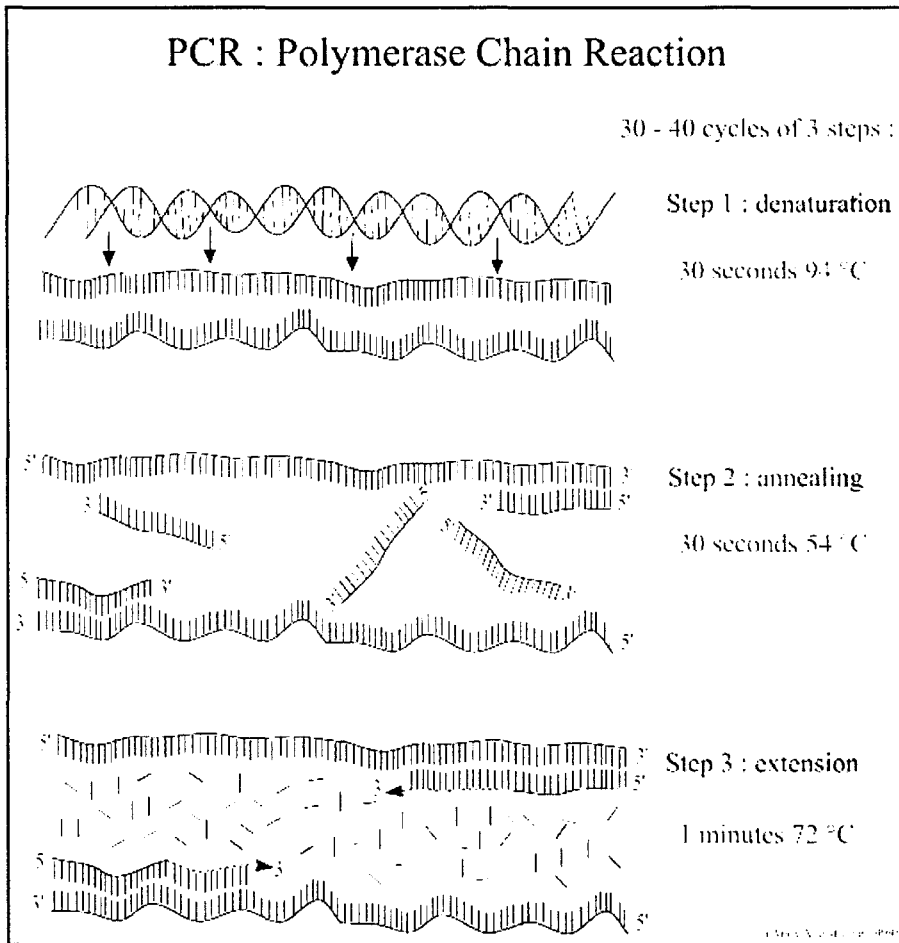


Figure 5. Diagram of a typical PCR (A. Vierstraete, 1999, RUG, Belgium).

증폭시킬 DNA의 영역을 선택할 때, 프라이머는 검출될 필요가 있는 모든 유기체에 공통된 것이어야 하며 원하지 않는 유기체의 DNA와는 반응하지 않아야 한다. 검출을 위해서는 좀더 작은 PCR 산물이 바람직하다. 더 작은 PCR 산물은 반응시간을 단축시킬 수 있으며, 큰 PCR 산물보다 안정적일 것이다.

PCR의 방해인자(택 포리메라제의 주 방해인자) 때문에 DNA는 가끔 주위(세포와 주변 요소)로부터 추출된다. 박테리아 DNA는 세포를 파괴하여 원심분리로 추출된다. 이 과정은 상품이 개발되어 있어 쉽게 이용 할 수 있다. 박테리아로부터 DNA를 추출하지 않고도 PCR은 수행될 수 있으나 이것은 시료의 여건에 달려 있다(Belgrader et al., 1999).

PCR 생성물의 검출은 일반적으로 젤 전기영동으로 할 수 있으며 크기에 따라 DNA 조각으로 분리된다. DNA는 폴리아크릴아미드 홈 안에 놓고, 전기영동을 실시한다. DNA는 음의 전하를 가지며 양의 전기장 쪽으로 이동한다. 다른 크기의 조각은 홈으로부터 다른 비율로 이동하며 표준 크기의 조각(표준마커)의 홈에 위치한 것과 비교한다. 젤에 있는 DNA는 에디디움 브로마이드(ethidium bromide)와 같은 물질로 염색하여 UV 램프 위에 올려놓고 보면 확인 할 수 있다.

최근 분자표지(molecular beacons)들은 전기영동 방법을 사용하지 않고 PCR을 실시간으로 모니터링하게 해준다. 분자표지들은 DNA의 염기순서에 맞게 붙을 수 있도록 주문 제작된 15-33개의 염기서열이다(Tyagi and Framer, 1996; Chen et al., 2000). 그것들은 각각의 끝에 형광성과 비형광성 분자가 붙어있다. 이 끝은 자유로운 용액 상태일 때 상호보완적으로 설계되어 있고 U자형 구조를 가졌으며, 형광성은 quencher 분자에 의해 억제된다. 분자표지가 그것의 표적에 붙게되면 형광은 quencher 분자로부터 분리되어 형광을 발휘한다. 각각의 사이클동안 분자표지는 증폭산물에 붙어 형광을 나타내고, 그 결과를 실시간으로 모니터 할 수 있다. 실시간으로 검출하는 것 이외에 분자표지는 2차 특이성을 제공한다. 만약 PCR이 잘못된 DNA를 증폭한다면 분자표지는 표적에 붙지 않을 것이며 형광도 검출되지 않을 것이다.

PCR과 분자표지들을 이용하는 바이오 센서는 현재 설계되어지고 있다. 이 센서는 열적으로 사이클화 되어 있고 형광을 광학적으로 모니터 할 수 있는 시료 반응조로 구성되어 있다. 액체 샘플은 소형 펌프와 밸브에 의해 이동되며 생산처리 유출로부터 PCR에 적합한 시료 용량(50 μ l)이 만들어져야 할 것이다. 여과(Waage et al., 1999) 또는 면역자기입자(Cudjoe et al., 1995)들이 전처리로 이용될 수 있다. 또한 그것들은 필요한 경우 DNA 분리를 위한 기반이 될 수 있을 것이다.

결 론

지금까지 바이오 센서 시스템의 연구와 상업적 개발은 대부분 건강관리 분야에서 이루어졌다. 가장 두드러진 예는 아마도 혈당의 끊임없는 모니터링과 당뇨병을 치료하는 인슐린 주입 조절에 관한 센서일 것이다. 지난 30년 이상의 현저한 연구 활동에도 불구하고 가능한 분야가 많이 다루어지지 않았다. 센서에 남아있는 문제는 정확도, 장기간의 안정성, 그리고 시스템의 견고성이다. 건강관리 분야와 비교할 때 농업과 농업생명 기술분야에서의

바이오 센서의 개발과 적용에 관해서는 매우 적게 연구되어왔다. 식품의 품질, 세균에 대한 안전성, 생산제어, 공정제어, 폐기처리 그리고 환경 모니터링은 적은 분야이지만 주요 화학적 성분을 직접 측정하는 센서 기술로부터 혜택을 받을 것이다. 반면에 위에서 언급한 문제 때문에 농업과 농업생물공학에의 바이오 센서 적용은 저 비용에 대한 요구로 제한을 받게 될 것이다.

참 고 문 헌

- Andrews, W.H., P.B. Mislivec, C.R. Wilson, V.R. Bruce, P.L. Poelma, R. Gibson, M.W. Trucksees, and K. Young. 1982. Microbial hazards associated with bean sprouting. *J. Assoc. Of Anal. Chem* 65(2):241-8.
- Baker, L. D., J. D. Ferguson, and W. Chalupa. 1995. Responses in urea and true protein of milk to different feeding schemes for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:2424-2434.
- Belgrader, P., W. Bennett, D. Hadley, J. Richards, P. Stratton, R. Mariella Jr., and F. Milanovich. 1999. PCR detection of bacteria in seven minutes. *Science*, 284:449-450
- Biosensors 2000. The Sixth World Congress on Biosensors, May 24-26, 2000, San Diego, California, Elsevier Science, Oxford, UK.
- Broderick, G. A. and M. K. Clayton. 1997. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *J. Dairy Sci.* 80:2964-2971.
- Butler, W. R., J. J. Calaman, and S. W. Beam. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:858-865.
- Chen, W., G. Martinez, and A. Mulchandani. 2000. Molecular Beacons: A real-time polymerase chain reaction assay for detecting Salmonella. *Analytical Biochemistry*, 280:166-172.
- Claycomb, R. W. 1997. Biosensor for On-Line Measurement of Bovine Progesterone During Milking. PhD Thesis, University of California, Davis, CA.
- Claycomb, R. W., M. J. Delwiche, C. J. Munro, and R. H. BonDurant. 1996. Enzyme immunoassay for on-line sensing of milk progesterone. *Trans. ASAE*, 39(2):729-734.
- Claycomb, R. W., M. J. Delwiche, C. J. Munro, and R. H. BonDurant. 1998. Rapid enzyme immunoassay for measurement of bovine progesterone. *Biosensors and Bioelectron.*, 13:1165-1171.
- Claycomb, R. W., and M. J. Delwiche. 1998. Biosensor for on-line measurement of bovine progesterone during milking. *Biosensors and Bioelectron.*, 13:1173-1180.
- Delwiche, M., E. Cox, B. Goddeeris, C. Van Dorpe, J. De Baerdemaeker, E. Decuypere, and W. Sansen. 2000. A biosensor to detect penicillin residues in food. *Trans. ASAE*, 43(1):153-159.
- Cudjoe, K.S., T. Hagtvedt, and R. Dainty. 1995. Immunomagnetic separation of Salmonella from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP)-ELISA. *International Journal of Food Microbiology*, 27:11-25.
- Doebelin, E. O. 1990. *Measurement Systems* 4th ed. McGraw Hill Pub. Co., New York, NY.

- Hall, E. A. H. 1990. Biosensors. Open University Press, Buckingham, UK.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. Antibodies A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY.
- Hof, G., M. D. Vervoorn, P. J. Lenaers, and S. Tamminga. 1997. Milk urea nitrogen as a tool to monitor the protein nutrition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:3333-3340.
- Hopkins, S. M. 1986. Bovine anestrus. In: *Current Therapy in Theriogenology*, 2nd ed., D. Morrow, editor, pp 247-250. W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA.
- Jenkins, D. M., M. J. Delwiche, E. J. DePeters, and R. H. BonDurant. 1999. Chemical assay of urea for automated sensing in milk. *J. Dairy Sci.* 82:1999-2004.
- Jenkins, D. M., M. J. Delwiche, E. J. DePeters, and R. H. BonDurant. 2000. Refinement of the pressure assay for milk urea nitrogen. *J. Dairy Sci.* (In Press).
- Josephy, P. D., T. Eling, and R. Mason. 1982. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3,5-tetramethylbenzidine. *J. of Bio. Chem.*, 3669-3675.
- Laing, J. A., and R. B. Heap. 1971. The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. *Br. vet. J.*, 127(8):xix-xxii.
- Larson, S. F., W. R. Butler, and W. B. Currie. 1997. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:1288-1295.
- Marsh, W. H., B. Fingerhut, and E. Kirsch. 1957. Determination of urea nitrogen with the diacetyl method and an automatic dialyzing apparatus. *Am. J. Clin. Pathol.* 28:681-688.
- Munro, C., and G. Stabenfeldt. 1984. Development of a microtitre plate enzyme immuno-assay for determination of progesterone. *J. Endocr.*, 101:41-49.
- Nebel, R. L. 1988. On-farm milk progesterone tests. *J. Dairy Sci.*, 71(6):1682-1690.
- Nebel, R. L., W. D. Whittier, B. G. Cassell, and J. H. Britt. 1987. Comparison of on-farm and laboratory milk progesterone assays for identifying errors in detection of estrus and diagnosis of pregnancy. *J. Dairy Sci.*, 70(7):1471-1476.
- Pope, G. S., I. Majzlik, P. J. H. Ball, and J. D. Leaver. 1976. Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Br. vet. J.*, 132:497-506.
- Schepers, A. J. and R. G. M. Meijer. 1998. Evaluation of the utilization of dietary nitrogen by dairy cows based on urea concentration in milk. *J. Dairy Sci.* 81:579-584.
- Tyagi, S. and F.R. Framer. 1996. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 14:303-308.
- United States Food and Drug Administration. 1999. Guidance for industry: reducing microbial food safety hazards for sprouted seeds and guidance for industry: sampling and microbial testing of spent irrigation water during sprout production. *Federal Register* 64(207):57893-57902).
- Waage, A.S., T. Vardund, V. Lund, and G. Kapperud. 1999. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *Journal of Applied Microbiology*, 87:418-428.