

## 현장에서 초음파 파쇄와 형광시약을 이용한 그람 음성균의 조기 탐지

† 하연철 · 최기봉 · <sup>1</sup>최정도  
국방과학연구소 1-2-1, <sup>1</sup>충북대학교 생화학과  
(접수 : 2006. 5. 23., 게재승인 : 2006. 10. 11.)

### The Early Detection of the Gram Negative Bacteria using Sonification and Fluorescent Dye in the Field

Yeon-chul Ha<sup>†</sup>, Ki-bong Choi, and Jung-do Choi<sup>1</sup>  
GSDC-2-1, Agency for Defense Development  
<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Chungbuk National University  
(Received : 2006. 5. 23., Accepted : 2006. 10. 11.)

This study was carried out to establish the optimum condition for cell disruption with a sonicator in the detection of the gram negative bacteria, *E. coli* for the purpose of developing automatic fluorometer. The efficiency of sonification on the *E. coli* disruption was greatly dependent on the diameter of sonicator probe tip. The larger sonicator probe diameter showed greater disruption effect. Sonicator probe of 13 mm diameter was the most efficient one for *E. coli* when sonificated for 20 seconds. The efficiency of the *E. coli* disruption differed greatly according to the depth of sonicator probe tip sank in the sample solution. The shorter the distance between probe tip end and the bottom of the container, the higher the disruption efficiency. The detection limit of *E. coli* was  $5 \times 10^5$  CFU/ml when sample was sonificated for 20 seconds with a sonicator probe of 13 mm diameter.

**Key Words** : Sonification, disruption, fluorometer, detection

#### 서론

생물학 작용제란 인체·동물·식물에 질병을 일으키거나 물질을 변질시키기 위해 군사작전에 사용되는 곰팡이·박테리아·바이러스 등의 미생물과 독소를 말한다. 생물무기는 은밀성과 잠재성이 매우 크다는 특징을 가지고 있어 에어로졸 상태로 살포할 경우 무색·무미·무취로 육안 식별이 불가능하며, 특히, 일부 균의 경우 수명의 한계가 없어 더 위협적이다. 또한 생산시설이 간단하고 저비용으로 쉽게 개발이 가능하며, 일단 살포되어 오염되면 스스로 번식, 확산하기 때문에 가장 위협적인 무기가 바로 생물학무기라고 할 수 있다. 생물학 작용제가 인체에 오염되면, 독성이 바로 나타나는 것이 아니고, 잠복기를 거쳐서 발병되고, 기하급수적으로 전염되기 때문에 조기 경보가 필수적이다. 조기 경보체계를 구축하기 위해서는, 먼저 이상 증후가 발견되면 에어로졸을 수집하고 수집된 시료를

가지고 단시간 내에 현장에서 미생물의 존재 유무를 탐지하는 것이 필요하다.

미생물의 존재 유무를 탐지하기 위해서는 DNA의 이중결합에 intercalating되어 일정 파장의 빛을 조사하면 좁더 긴 파장에서 형광을 발생시킬 수 있는 형광시약을 이용할 수 있다. 형광시약을 이용하여 미생물의 존재 유무를 확인하기 위해서는 먼저 세포를 파쇄해야 한다. 세포를 파쇄하기 위해서는 lysozyme, proteinase K, guanidium salt, detergent 처리 등의 화학적인 방법(1, 2)과 liquid nitrogen freeze-thaw, French press, 가열처리, sonification 등의 물리적인 방법(3-6)이 있다. Sonification은 실험실에서 가장 흔히 사용되며 산업적 목적으로는 사용하기 어렵지만(7) 세포를 파쇄하는 데 용이하고 간단하여 현장에서 단시간 내에 응용하기가 손쉬운 방법이다(8, 9).

Sonification은 고주파 에너지가 piezoelectric crystal에 인가되면 기계적 진동으로 변화되고, 이 진동이 compressions와 rarefactions로 이루어지는 ultrasonic wave로서 용액에 전달된다. Rarefactions 단계에서는 용액에서 음압이 형성되어 수백만개의 미세한 bubbles (cavities)을 형성하고, compressions 단계에서는 양압이 형성되어 불안정한 크기(직경 100 um)로 커지다가 bubbles이 파괴된다(10, 11). 이

† Corresponding Author : GSDC-2-1, Agency for Defense Development, Yuseong P. O. Box 35-1, Daejeon 305-600, Korea  
Tel : +82-42-821-4686, Fax : +82-42-821-2880  
E-mail : hyc0311@hanafos.com

때 충격파와 소용돌이가 발생되어 온도와 압력이 증가하게 되어 국부적으로는 온도가 2000~4000 K(12), 압력이 330 atm(13, 14)에 이른다는 보고가 있다. 이러한 압력의 fluctuation으로 미생물 구조의 물리적 파괴와 불활성화가 일어나게 된다. Sonification에 의해 효모(15), 그람양성균(16), 그람음성균(17, 18) 등을 파쇄하는 연구는 있으나 현장에서 DNA 탐지를 위한 체계적인 연구는 미약하여, 본 연구에서는 sonicator를 장착하여 세포막을 파쇄하고 현장에서 형광을 이용하여 조작이 간편하고 단시간에 DNA를 측정할 수 있는 자동화된 형광기를 개발하기 위하여 그람음성균인 *E. coli*를 대상으로 최적의 세포막 파쇄조건을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 재료

실험에 사용한 균주는 그람 음성균인 *Escherchia coli* (MC1061)이며, 배양은 LB배지 (Luria-Bertani ; tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, sodium chloride 5 g/L)를 사용하여 37°C 200 rpm의 교반배양기에서 4시간 배양하였다. 배양후 4°C에서 10분동안 2000 g에서 원심분리하고 PBS buffer로 3회 세척하여 수확하였다. SybrGreen Green 1 nucleic acid gel stain 형광시약은 Molecular Probes사 (S7563), BSA는 Molecular Probes사의 Quant-iT Protein Assay Kit (Q33210)의 standard, Lambda DNA-BstE II Digest는 BioLabs사 (N3014S), 2.7 kb pUC19 plasmid는 NEB사 (N3041S)의 제품을 *E. coli* (MC1061)에서 증폭하여 miniprep 후 사용하였다.

### 생균수 측정 및 기기분석

미생물의 생균수 측정은 LB agar 배지에 도말하여 37°C에서 16시간 배양한 후 형성된 colony를 계수하였다. 미생물 농도는 측정시료 950  $\mu$ l를 cuvette에 취한 후 Scinco사의 UV-visible spectrophotometer (S-3100)를 이용하여 600 nm에서의 Optical Density로 측정하였다. 용액 중의 미생물 입자 부피의 측정은 시료 100  $\mu$ l를 10 ml의 Diluent에 희석하여 20 ml의 sample cup에 넣고 Beckman사의 Multisizer-3 (Aperture size 30  $\mu$ m, 300 Size Bins)를 이용하여 측정하였다. DNA 형광 분석은 OptiPlate Black 96-Well plate (PerkinElmer사, 6005279)에 시료 180  $\mu$ l와 최종농도가 1 X가 되도록 형광시약 20  $\mu$ l를 혼합하여 200  $\mu$ l를 분주하고 1분동안 incubation을 시킨 후 PerkinElmer사의 1420 Multilabel Counter (Ex. 485 nm/Em. 535 nm, CW-Lamp Energy: 1548, counting time: 1 sec)를 이용하여 측정하였다. 시험에 사용된 20 kHz sonicator는 Sonic & Materials 사의 130 Watt Ultrasonic Processor (VCX 130)를 사용하였다.

### DNA의 sonification 효과

선형 DNA, 환형 DNA 및 단백질에 대하여 sonification 효과를 살펴보기 위하여 선형 DNA로는 500 ng/ml 농도의 Lambda DNA-BstE II Digest, 환형 DNA로는 250 ng/ml 농도의 pUC19 plasmid, 그리고 단백질은 1,000 ng/ml 농도의

BSA를 시료로 사용하여 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 직경이 6 mm인 probe를 사용하여 sonification 시킨 후 Sybrgreen의 최종 농도가 1 X가 되도록 시료에 첨가하고 각각 형광을 6회 측정하여 평균하였다.

### Incubation time 설정

$10^7$  CFU/ml의 *Escherchia coli* 시료 2 ml를 직경이 6 mm인 probe를 사용하여 30초 동안 sonification시킨 후 형광시약인 Sybrgreen의 최종 농도가 1 X가 되도록 시료에 첨가하고 최적 incubation 시간을 설정하기 위해 1분 간격으로 11분 동안 incubation시키면서 incubation 시간별로 한번씩 형광을 측정하였고, 다른 실험구는 빛에 의한 형광 손실을 측정하기 위해 계속 12번을 반복하여 형광을 측정하여 각각 6회 반복하여 평균하였다.

### 가열처리

가열처리에 의한 cell 파쇄 효과를 시험하기 위해서  $10^7$  CFU/ml의 *Escherchia coli* 1.5 ml를 microcentrifuge tube에 분주하고 98°C 끓는 물에 10초 간격으로 90초 동안 가열한 후 상온에서 냉각하였다. 각 시료에 Sybrgreen을 최종 농도가 1 X가 되도록 시료에 첨가하여 1분 동안 incubation 시킨 후 가열처리 시간에 따른 형광량의 변화를 측정하였으며 각각 6회 반복하여 평균하였다.

### 시료에 잠긴 Sonicator probe tip 길이

Sonicator probe가 시료 용액에 잠긴 길이에 따른 sonification 효과를 살펴보기 위하여,  $10^7$  CFU/ml의 *Escherchia coli* 2 ml를 15 ml의 disposable centrifuge tube에 주입하고 직경이 6 mm인 probe를 시료 표면에서 각각 4 mm, 11 mm, 18 mm 잠기게 한 후 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification을 시킨 후 용액 중의 미생물 입자 부피의 변화와 DNA의 형광량 변화를 각각 3회, 6회 측정하여 평균하였다.

### Sonicator probe 직경별 및 처리시간

$10^7$  CFU/ml의 *Escherchia coli* 2 ml를 15 ml의 disposable centrifuge tube에 주입하고 직경이 2 mm, 6 mm, 13 mm probe 별로 시료 표면에서 10 mm 잠기게 한 후, 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification시키고 시료 중의 미생물 입자의 부피와 DNA 형광량을 각각 3회, 6회 측정하여 평균하였다. Sonification시킨 시료 100  $\mu$ l를 3개로 분주하고 각각 colony counting하고 평균하여 생균수를 측정하였으며, 미생물 농도 (optical density)는  $10^8$  CFU/ml의 *Escherchia coli* 2 ml를 직경이 2 mm, 6 mm, 13 mm probe 별로 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification을 2회 시킨 후 Spectrometer로 4회 측정하여 평균하였다.

### 형광시약 농도별 탐지농도

Sonification에 의한 *Escherchia coli*에 대한 최소탐지능을 알아보기 위하여  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  CFU/ml의 *E. coli* 각각 2 ml를 15 ml의 disposable centrifuge tube에 주입하여 13 mm probe를 사용하여 20 kHz에서 20초 동안 sonification

하고, 형광시약 Sybrgreen의 농도를 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 X가 되도록 첨가하고 DNA의 형광량을 각각 6회 측정하여 평균하였다.

**결과 및 고찰**

**DNA의 sonification 효과**

선형 DNA, 환형 DNA 및 단백질에 대한 sonification의 영향을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 선형 DNA는 sonification의 영향으로 DNA 이중결합에 brake가 발생하여 sonification 시간에 따라 형광이 감소하였으며, 꼬임 환형 DNA는 sonification의 영향으로 초기에는 DNA 이중결합의 brake 발생으로 꼬임이 풀려 형광시약이 더 자유로히 결합할 수 있는 구조로 변화하여 형광이 증가하였으나 그 이후는 DNA 이중결합에 brake가 발생하여 sonification 시간에 따라 형광이 감소하는 결과를 나타냈으며 단백질에 대한 형광시약의 반응은 없는 것으로 나타났다.

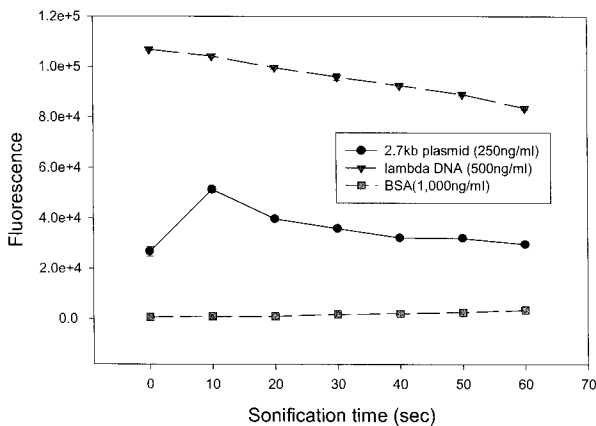


Figure 1. Fluorescence of DNAs and protein according to the sonification time.

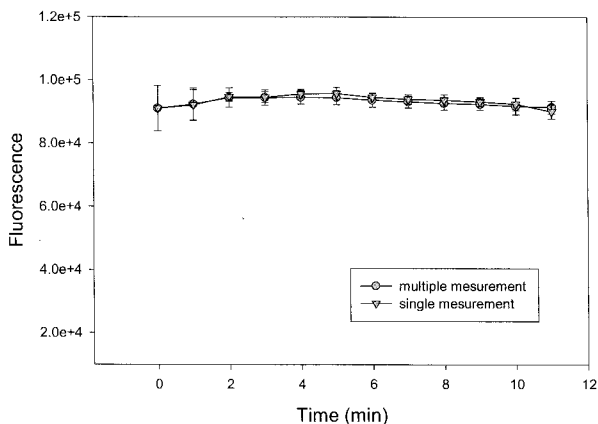


Figure 2. Fluorescence of *Escherichia coli* according to the incubation time.

**Incubation time 설정**

10<sup>7</sup> CFU/ml의 *Escherichia coli* 시료를 형광시약과 혼합한

후 incubation 시간에 따라 측정한 형광량의 변화와 반복된 빛에 의한 형광 손실을 측정한 형광량의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. Incubation time과 반복된 빛의 조사 모두 형광량의 변화에 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다.

**가열처리**

10<sup>7</sup> CFU/ml의 *Escherichia coli*를 가열 처리하고 형광시약을 첨가한 후 측정한 형광량의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 끓는 물에서 30초까지는 형광량이 미약하게 증가하며 50초까지 20초 동안은 변화를 보이지 않다가 50초 이후는 감소하는 경향을 나타내었다. 이것은 가열에 의해 세포막이 파괴되다가 30초부터는 DNA의 denaturation과 세포 파괴가 균형을 이루고 50초 이후에는 DNA의 denaturation이 더 크게 발생하여 형광량이 감소하는 것으로 판단되며, 가열처리 방법은 현장에서 세포를 파괴하는 방법으로는 파쇄효과가 미약하고 적합하지 않은 것으로 판단된다.

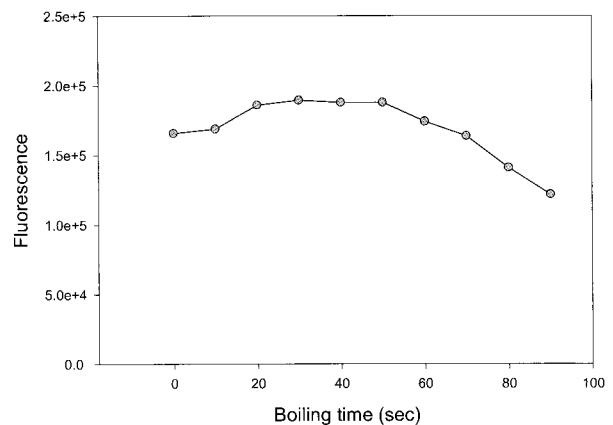


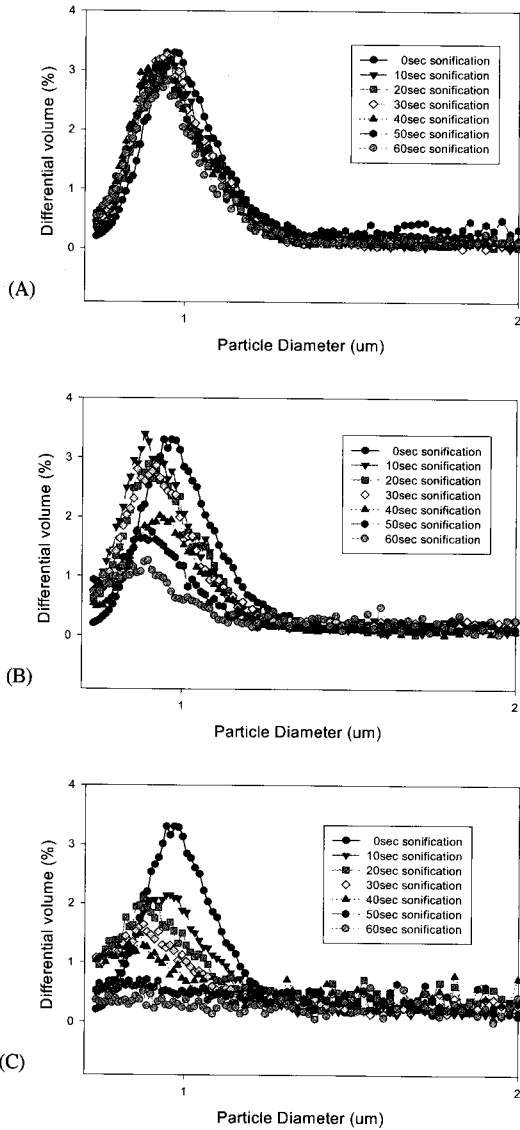
Figure 3. Fluorescence of *Escherichia coli* according to the boiling time.

**시료에 잠긴 Sonification probe tip 길이**

Sonicator probe가 10<sup>7</sup> CFU/ml의 *Escherichia coli* 2 ml 용액에 잠긴 깊이에 따른 sonification 후의 입자 분포 변화를 Fig. 4에, 그리고 형광량의 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 4 mm 깊이로 sonification한 시료에 가해진 에너지는 각각 78 J, 168 J, 256 J, 329 J, 453 J, 497 J이었고, 11 mm 깊이로 sonification한 시료에 가해진 에너지는 133 J, 228 J, 364 J, 508 J, 661 J, 768 J이였으며, 18 mm 깊이로 sonification한 시료에 가해진 에너지는 각각 230 J, 404 J, 644 J, 817 J, 988 J, 1102 J이었다. 18 mm 깊이로 sonification한 시료에 가해진 에너지가 4 mm 깊이로 sonification한 시료보다 2배 이상 높게 나타났으며, 시료에 잠긴 probe tip의 길이가 길수록 시료에 가해지는 에너지가 크며 세포의 파쇄 효과가 큰 것으로 나타났다. 또한 형광량의 변화도 시료에 잠긴 probe tip의 길이가 길수록 세포의 파쇄 효과가 큰 것으로 나타났으며, 18 mm 깊이로 60초 동안 sonification한 시료는 시료에 가해지는 에너지가 커서 열로 인한 DNA의 denaturation 이 발생되어 형광량이 감소하였다.

**Sonicator probe 직경 및 처리시간**

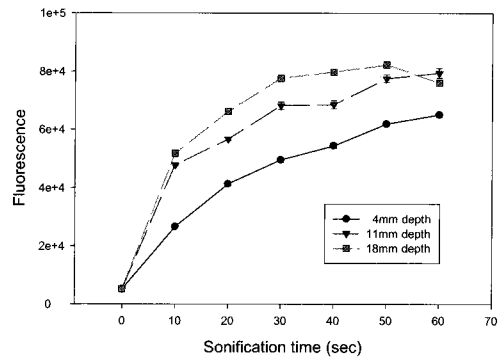
$10^7$  CFU/ml의 *Escherchia coli* 2 ml 용액에 직경이 2 mm, 6 mm, 13 mm인 probe 별로 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification시킨 후 측정된 미생물 입자의 파괴 변화를 Fig. 6에 나타내었다. Probe의 직경이 클수록 파쇄 효과가 큰 것으로 나타났으며, 13 mm probe를 사용한 시료는 10초만 sonification시켜도 원액 대비 급격한 감소를 나타냈다.



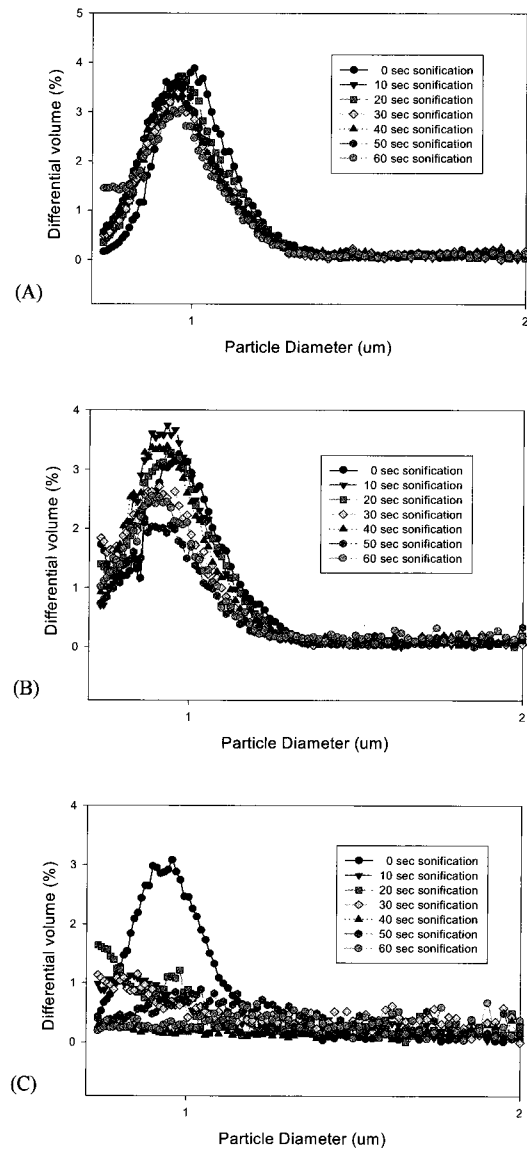
**Figure 4.** Differential volume of *Escherchia coli* according to the sonification with a probe of (A) 4 mm depth (B) 11 mm depth (C) 18 mm depth.

$10^7$  CFU/ml의 *Escherchia coli* 2 ml를 직경이 2 mm, 6 mm, 13 mm인 probe 별로 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification시키고 측정된 형광량을 Fig. 7에 나타내었다. 13 mm probe로 sonification한 시료는 10초 후에 형광량이 크게 상승하였으며 20초까지 증가되다가 40초까지는 크게 감소 후 일정하게 형광량이 나타났는데, 이것은 20초까지 cell의 파쇄 효과가 크며 그 이후는 열에 의한 DNA의 변성이 강하게 일어나 형광량이 크게 감소하다가 40초 이후

에는 평형을 유지하는 것으로 판단되며 13 mm probe로 20초동안 sonification시키는 것이 가장 효율적인 것으로 나타났다.



**Figure 5.** Fluorescence of *Escherchia coli* according to the probe depth and the sonification time.



**Figure 6.** Differential volume of *Escherchia coli* according to the sonification with (A) 2 mm probe (B) 6 mm probe (C) 13 mm probe.

10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification한 시료에 가해진 에너지는 2 mm probe 경우 각각 67 J, 141 J, 200 J, 269 J, 335 J, 389 J이었고, 6 mm probe 경우 125 J, 240 J, 384 J, 445 J, 583 J, 687 J이었으며, 13 mm probe 경우 각각 550 J, 951 J, 1243 J, 1489 J, 1723 J, 1785 J이었다. 13 mm probe로 10초 sonification한 시료에 가해진 에너지가 2 mm probe로 60초 sonification한 시료보다도 높게 나타났으며 sonicator의 probe 직경이 클수록 파쇄 효과가 높은 것으로 나타났다. 50초 이상의 sonification은 DNA 변성을 일으킨다는 보고(19)도 있지만 이것은 sonicator의 probe 직경, 용액에 잠긴 probe의 길이 및 용액량에 따라 큰 차이를 나타내는 것으로 판단된다.

$10^8$  CFU/ml와  $10^7$  CFU/ml의 *Escherichia coli* 2 ml를 직경이 2 mm, 6 mm, 13 mm probe 별로 각각 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60초 동안 sonification시키고 측정된 흡광도와 생균수의 변화를 Fig. 8, 9에 나타내었다. Probe의 직경이 클수록 흡광도의 감소가 뚜렷하였으며, 13 mm probe로 10초 동안 sonification시킨 시료의 흡광도는 급격히 감소하였다. 또한 13 mm probe로 10초 동안 sonification시켜도 생균수가 90% 이상 감소되었다.

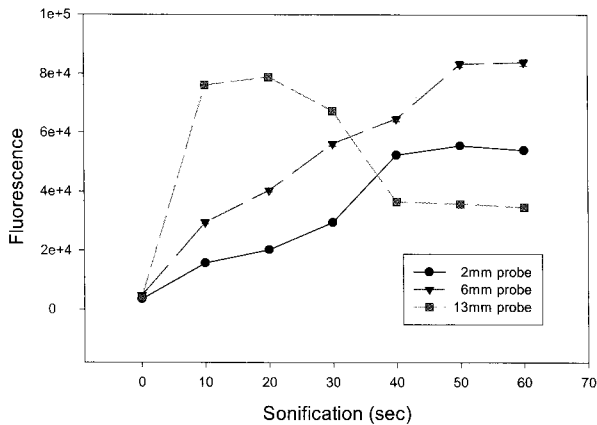


Figure 7. Fluorescence of *Escherichia coli* according to the probe diameter and the sonification time.

형광시약 농도별 탐지농도

Sonification에 의한 형광시약 농도 별로 *Escherichia coli*에 대한 탐지능을 측정된 결과를 Fig. 10에 나타냈다. 13 mm probe로 20초 동안 sonification을 시켜도 형광시약 Sybrgreen의 농도 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 X 모두  $5 \times 10^5$  CFU/ml의 *Escherichia coli*를 탐지 가능한 것으로 나타났으며,  $10^8$  CFU/ml의 고농도에서는 형광시약 Sybrgreen의 농도가 0.5 X 이상이 적합한 것으로 나타났다.

요약

본 연구에서는 sonicator를 장착하여 세포막을 파쇄하고 현장에서 형광을 이용하여 조작이 간편하고 단시간에 DNA를 측정할 수 있는 자동화된 형광기를 개발하기 위하여 그람 음성균인 *Escherichia coli*를 대상으로 최적의 세포 파쇄조건을 확립하고자 하였다.

Incubation time은 형광량에 크게 영향을 주지 못하는 것으로 나타났으며, 가열처리 방법은 현장에서 세포를 파괴하는 방법으로는 파쇄효과가 미약하고 적합하지 않은 것

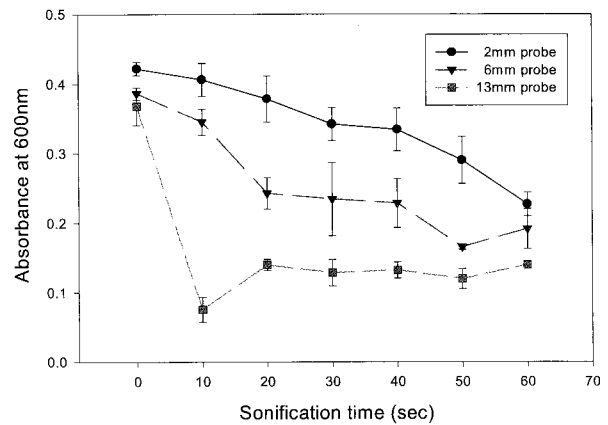


Figure 8. Absorbance of *Escherichia coli* according to the probe diameter and the sonification time.

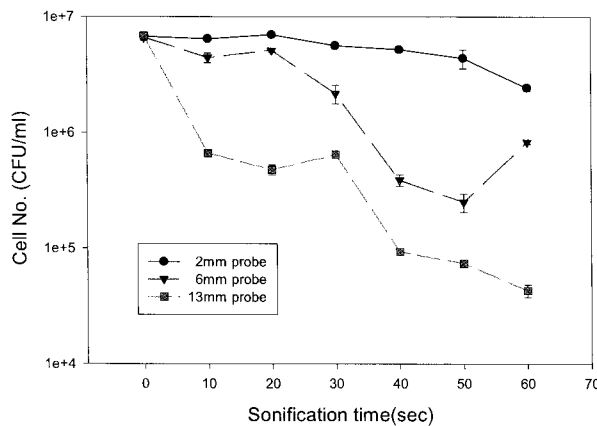


Figure 9. Live cell number of *Escherichia coli* according to the probe diameter and the sonification time.

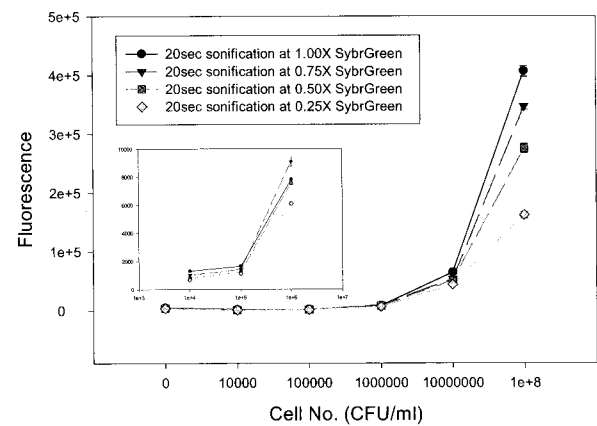


Figure 10. The detection profile of *Escherichia coli* with the different fluorescent dye concentrations.

으로 나타났다.

Sonificator probe 직경에 따라 세포의 파쇄 효과가 큰 차이를 보였으며 13 mm probe로 20초 동안 sonification시키는 것이 가장 효율적인 것으로 나타났다. 시료에 잠긴 Sonificator probe tip 깊이에 따라서도 세포의 파쇄 효과가 크게 나타났는데 시료에 잠긴 probe tip의 깊이가 깊을수록 큰 파쇄 효과를 발휘하였다. 선정된 최적의 파쇄 조건에서  $5 \times 10^5$  CFU/ml의 *Escherichia coli*를 탐지 가능한 것으로 나타났다.

## REFERENCES

- Abolmaaty, A., M. G. El-Shemy, M. F. Khallaf, and R. E. Levin (1998), Effect of lysing methods and their variables on the yield of *Escherichia coli* O157: H7 DNA its PCR amplification, *J. Microbiol. Methods* **34**, 133-141.
- Leuschner, R. G. K., J. Bew, P. Fourcassier, and G. Bertin (2004), Validation of the official control method based on polymerase chain reaction(PCR) for identification of authorised probiotic yeast in animal feed, *System. Appl. Microbiol.* **27**, 492-500.
- Mark, D. L., J. A. Vaughan, B. J. Shiell, G. J. Beddome, and W. P. Michalski (2004), Mycobacterial proteome extraction: Comparison of disruption methods, *Proteomics* **4**, 1094-1100.
- Aguilera, A., F. Gómez, E. Lospitao, and R. Amils (2006), A molecular approach to the characterization of the eukaryotic communities of an extreme acidic environment: Methods for DNA extraction and denaturing gradient gel electrophoresis analysis, *System. Appl. Microbiol.* In press, 1-13.
- Rantakokko-Jalava, K. and J. Jalava (2002), Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR, *J. Clin. Microbiol.* **40**(11), 4211-4217.
- Haugland, R. A., M. Varmar, L. J. Wyme, and S. J. Vesper (2004), Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* Species, *System. Appl. Microbiol.* **27**, 198-210.
- James, C. J., W. T. Coakley, and D. E. Hughes (1972), Kinetics of protein release from yeast sonicated in batch and flow systems at 20kHz, *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 33-42.
- Borthwick, K. A. J., W. T. Coakley, M. B. McDonnell, and H. Nowotny (2005), Development of a novel compact sonicator for cell disruption, *J. Microbiol. Methods* **60**, 207-216.
- Belgrader, P., D. Hansford, G. T. A. Kovacs, K. Vanketeswaran, R. Mariell, F. Milanovich, S. Nasarabadi, M. Okuzumi, F. Pourahmadi, and M. A. Northrup (1999), A minisonicator to rapidly disrupt bacterial spores for DNA analysis, *Anal. Chem.* **71**, 4232-4236.
- Furuta, M., M. Yamaguchi, T. Tsukamoto, B. Yim, C. E. Stavarache, K. Hasiba, and Y. Maeda (2004), Inactivation of *Escherichia coli* by ultrasonic irradiation, *Ultrasonics Sonochemistry* **11**, 57-60.
- Tsukamoto, I., B. Yim, C. E. Stavarache, M. Furuta, K. Hasiba, and Y. Maeda (2004), Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by ultrasonic irradiation, *Ultrasonics Sonochemistry* **11**, 61-65.
- Misik, V., N. Miyoshi, and P. Riesz (1995), EPR spin-trapping study of the sonolysis of H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O mixture : probing the temperature of cavitation regions, *J. Phys. Chem.* **99**, 3605-3611.
- Seghal, C., R. P. Steer, R. G. Sutherland, and R. E. Verrall (1979), Sonoluminescence of argon saturated alkali metal salt solutions as a probe of acoustic cavitation, *J. Chem. Phys.* **70**, 2242-2248.
- Inez, H. and J. E. Thompson (2000), Inactivation of *Escherichia coli* by sonification at discrete ultrasonic frequencies, *Wat. res.* **34**(15), 3888-3893.
- Blechl, A. E., K. S. Thrasher, W. H. Vensel, and F. C. Greene (1992), Purification and characterization of wheat  $\alpha$ -gliadin synthesized in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene.* **116**, 119-127.
- Calderira, J. C. G. and J. M. S. Cabral (1994), Extraction of a steroid 1,2-dehydrogenase by sonification of *Arthrobacter simplex* cells, *Bioseparation* **4**, 271-278.
- Kuboi, R., H. Umakoshi, N. Takagi, and I. Komasa (1995), Optimal disruption methods for the selective recovery of  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli*, *J. Ferment. Bioeng.* **79**, 335-341.
- Feliu, J. X., R. Cubarsi, and A. Villaverde (1998), Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of *E. coli* cells, *Biotechnology and Bioengineering* **58**(5), 536-540.
- Else, M. F., J. S. Olsen, and G. Skogan (2003), Application of sonification to lease DNA from *Bacillus cereus* for quantitative detection by real-time PCR, *J. Microbiol. Methods* **55**, 1-10.