

UDC 621.3

Beta-Lactoglobulin Sensor Based on ISFET with CeO₂ Gate Dielectric

O. Yu. Kutova^f, ORCID [0000-0003-1720-9700](https://orcid.org/0000-0003-1720-9700)
V. I. Tymofieiev^s, ORCID [0000-0003-0256-4179](https://orcid.org/0000-0003-0256-4179)

Electronic engineering department
National technical university of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”
Kyiv, Ukraine

M. H. Dusheiko^f, ORCID [0000-0003-2267-6637](https://orcid.org/0000-0003-2267-6637)
Microelectronic department
National technical university of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”
Kyiv, Ukraine

G. Brotons^s, PhD, ORCID [0000-0003-3832-3932](https://orcid.org/0000-0003-3832-3932)
Université du Maine Institut des Molécules et des Matériaux du Mans
Le Mans, France

Abstract—In this article sensor with improved measurement technique for the detection of milk allergens was developed. β -lactoglobulin (BLG) protein was used as the biomarker for cow milk detection. The structure of the sensor with nanocrystalline cerium oxide is proposed with an advanced measurement method, which consists of using a micro-flow system to provide a constant volume of the substance to be tested for the dynamic analysis of the beta-lactoglobulin protein, the major milk allergen. The influence of illumination on the experiment and the degree of cleaning of the sensor surface between each measurement are analyzed. Because the existing ELISA method is too long (1.5 hours), and the proposed method allows to identify the presence of beta-lactoglobulin in a few minutes.

Keywords — biosensor; β -Lactoglobulin (BLG); Ion-Sensitive Field-Effect Transistor (ISFET); Selectivity.

I. INTRODUCTION

Nowadays, the popularity for the manufacture of special functional products is increasing, cause of state-of-the-art technologies that make it possible to create a product with specific properties. Hypoallergenic products, especially dairy products, are the most popular in the functional food market [1].

Besides of beneficial trace elements and vitamins, milk contains a large amount of protein antigens that can cause an allergic reaction. Of the total protein diversity, only four can cause allergic reaction: casein (80%), serum albumin, alpha-lactoglobulin, and beta-lactoglobulin (β -lactoglobulin). β -lactoglobulin is the most popular allergen. But in most cases, the intolerance of this protein disappears independently after the first year of life of the child. Although it is absent in breast milk, still five percent of infants less than 1 year of age suffer from allergies, as it is one of the strongest allergens among all proteins in cow, sheep and even goat milk. However, you can get rid of this protein after 20 minutes of boiling [2, 3].

The average concentration of β -lactoglobulin in milk serum is 2-4 g/L [4]. Various physicochemical methods (high-performance liquid chromatography, electrophoresis [5]) and immunochemical methods are used to detect and quantify β -lactoglobulin content. The principle of these method is the specific binding of antibodies to the relevant protein determinants. The method of immunodetection differs relatively low cost of the necessary equipment, as well as high productivity due to the possibility of simultaneous work with series of samples [6].

Standard ELISA method to detect of β -lactoglobulin takes up to 3 hours, since incubation of immunoreagents requires at least 1 ÷ 1.5 hours [7]. Such type of test also requires incubation at elevated temperature (37°C) which is not convenient enough. Therefore, to develop a new method for detecting β -lactoglobulin under normal conditions and with relatively little time is still remains relevant. That is why the purpose of this work was to develop a portable, high-speed beta-lactoglobulin sensor for rapid analysis.



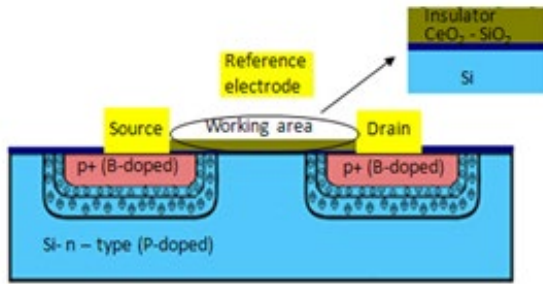


Fig.1. General sensor view.

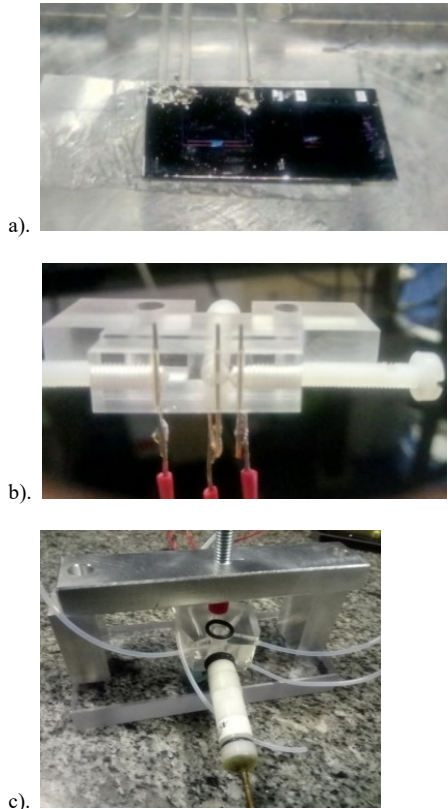


Fig. 2. Microfluidic system with sensor: a). chip; b). system of electrodes; c). working cell with reference electrode.

II. SENSOR DESIGN

The proposed sensor was made on the basis of an ion-selective field-effect transistor (ISFET) with a p-channel (Fig. 3.6). The transistor was directly produced on a silicon wafer doped with phosphorus (n-type) with a resistance of 4.5 Ohm/m², orientation (111) and 450 μm thick.

As a gate dielectric, the SiO₂ – CeO₂ complex (dSiO₂= 10 nm, dCeO₂=50 nm) was obtained, which was get by thermal oxidation at T=400°C and the method of “oxidation of a metal mirror”, respectively [8]. The ohmic contacts were made of Al [9]. The maximum thickness of the gate dielectric in these transistors was 1.5 ÷ 2 nm. The proposed thickness of the gate oxide is still far from the critical allowable value (Fig. 1).

In practical, sensors are often used not for static measurement, with alternate registration of the response of the sensor to individual test substances, but for dynamic ones. It base on the replacing one test solution with another, structurally identical, but with a different concentration.

For this reason, experiments were conducted for the beta-lactoglobulin sensor to change the response of the sensor to changes the composition (concentration, pH level) of the solution (Fig. 3-6).

The measurements were performed using an advanced measurement method with microfluidic system. Such system provides a fixed volume of the test solution at the sensitive area, and also eliminates heating and evaporation (Fig. 2).

III. RESULTS AND DISCUSSIONS

The measurement of the sensor response for a solution of β-lactoglobulin at pH showed that its value is different than for water, since the pI for beta-lactoglobulin is 5.2, then for lower pH of the solution, it becomes positively charged. And it caused a decrease in the potential drop at the interface of the "electrolyte-dielectric" (Fig. 3).

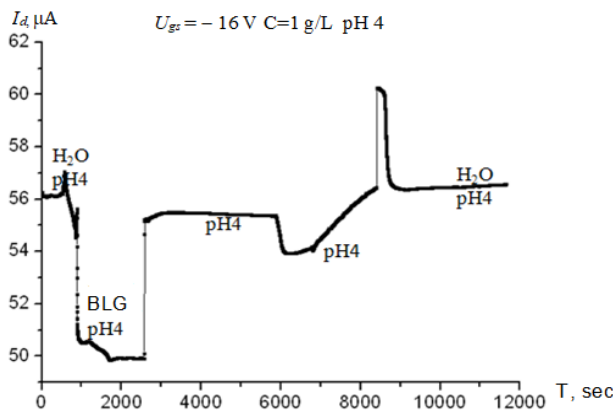


Fig. 3. Cyclic measurements for a solution of β-lactoglobulin with a concentration of 1 g/L and pH 4.

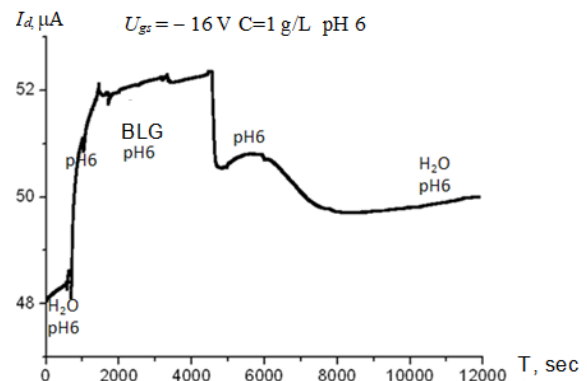


Fig. 4. Cyclic measurements for a solution of β-lactoglobulin with a concentration of 1 g/L and pH 6.



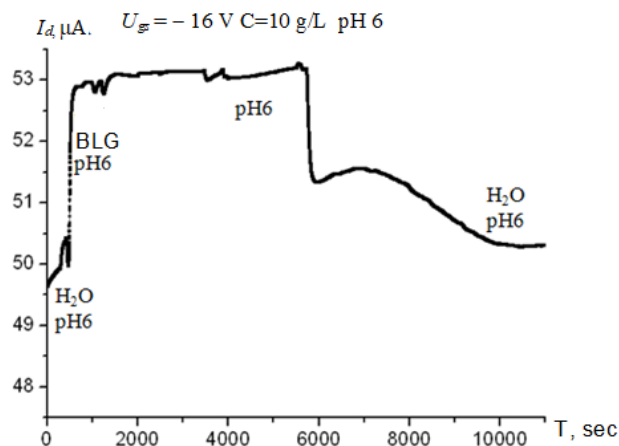


Fig. 5. Cyclic measurements for a solution of β -lactoglobulin with a concentration of 10 g/L and pH 6.

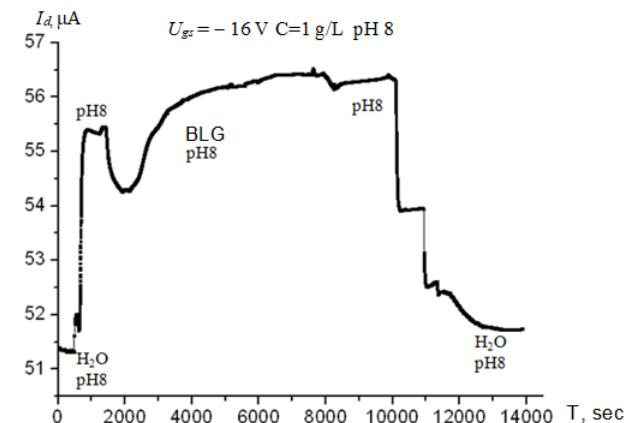


Fig. 6. Cyclic measurements for a solution of β -lactoglobulin with a concentration of 1 g/L and pH 8.

However, in the case of a solution with pH 6 and pH 8, an inverse dependence was observed. Since such solutions lead to a negative charge of the protein solution, which is equivalent to an additional negative electrical shift on the gate, it leads to increase the thickness of the conduction channel and to increase in the output current, respectively (fig.3 ÷ 5).

All experiments had special feature by the return of the ISFET signal after measurements to their original values. This makes it possible to assert the complete desorption of the protein from the surface and the possibility of its re-use.

The output current-voltage characteristics of this sensor before and after measurement of beta-lactoglobulin (Fig. 7) are almost identical, which is an excellent indicator of complete desorption of the protein in the process of cleaning its surface.

The influence of illumination on measurements shown in Fig. 7. As you can see on this figure the illumination increases the response of the sensor. And it means the need to ensure stable lighting conditions for the experiments, namely to place the sensor work area in a light-tight box.

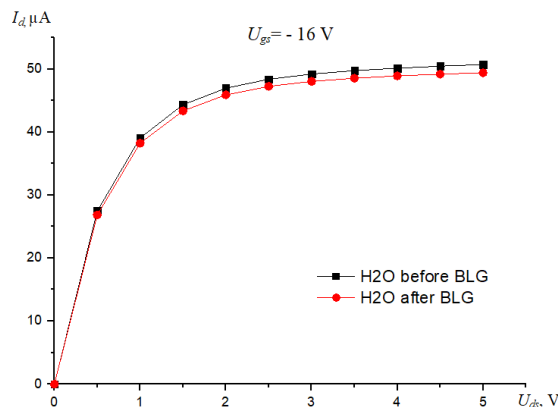


Fig. 7. Out-put characteristics before and after beta-lactoglobulin measurements.

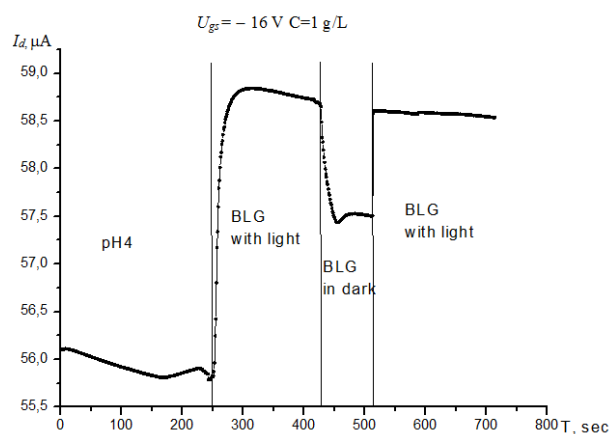


Fig. 8. Effect of illumination on the work of the beta-lactoglobulin sensor.

Thus, the results which were obtained in this work make it possible to state that sensors with gate dielectric CeO_2 can be used for the manufacture of a wide range of biosensors, in particular, the sensor C-reactive protein [10].

CONCLUSION

The proposed work develops a method of dynamic analysis of beta-lactoglobulin protein, using our previously proposed sensor based on a metal-oxide semiconductor transistor with a gate dielectric CeO_2 under conditions of providing a constant volume of analyte. The testing of transistor sensory structures based on ISFET was conducted to study the concentration of the main milk allergen — beta-lactoglobulin and the possibility of its practical application in the manufacture of food. This makes it possible to reduce the study time to 10-15 minutes. The obtained results open the prospects for the use of the proposed sensor and measurement methods in technologies for the production of dietary foods and rapid analysis.

ANKNOWLEDGEMENT

The work was done at the expense of the laboratory of Institut des Molécules et Matériaux du Mans. In addition, the authors thank the PhD Veyis Gunes (Department of



Physique-Mécanique-Acoustique) for the equipment and advice provided.

REFERENCES

- [1]. A. Goossens, "Allergy and hypoallergenic products" *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. 3rd edition. chapter 53. Informa Healthcare pp. 553–562, 2009.
DOI: [10.1155/2011/467071](https://doi.org/10.1155/2011/467071).
- [2]. P. Restani, A. Gaiaschi, A. Plebani, B. Beretta, G. Cavagni, A. Fiocchi, C. Poiesi, T. Velonà, A. G. Ugazio, C. L. Galli, "Cross-reactivity between milk proteins from different animal species" *Clinical Experimental Allergy*, vol. 29, no. 7, pp. 997–1004, 1999,
DOI: [10.1046/j.1365-2222.1999.00563.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1999.00563.x).
- [3]. A. Nowak-Węgrzyn, K. A. Bloom, S. H. Sicherer, W. G. Shreffler, S. Noone, N. Wanich, H. A. Sampson, "Tolerance to extensively heated milk in children with cow's milk allergy" *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 122, no. 2, pp. 342–347,
DOI: [10.1016/j.jaci.2008.05.043](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.05.043).
- [4]. J. Andersson, B. Mattiasson, "Simulated moving bed technology with a simplified approach for protein purification: separation of lactoperoxidase and lactoferrin from whey protein concentrate" *Journal of Chromatography A*. vol. 1107, no. 1–2, pp. 88–95, 2006
DOI: [10.1016/j.chroma.2005.12.018](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.018).
- [5]. V. Bonfatti, L. Grigoletto, A. Cecchinato, L. Gallo, P. Carnier, "Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants" *Journal of Chromatography A*. 2008. no. 1195, pp. 101–106,
DOI: [10.1016/j.chroma.2008.04.075](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.075).
- [6]. E. A. Zvereva, N. I. Smirnova, A. V. Zherdev, B. B. Dzantiev, E. A. Yurova, E. Y. Denisovich, N. A. Zhizhin, V. D. Kharitonov, E. Yu. Agarkova, S. G. Botina, N. V. Ponomareva, E. A. Melnikova, "Development of methods for determination of beta-lactoglobulin in milk and dairy products by immuno- energy analysis", *Rational nutrition, nutritional supplements and biostimulants*, no. 1, pp. 23–24, 2014
- [7]. F. Stumr, D. Gabrovska, J. Rysova, P. Hanak, J. Plicka, K. Tomkova, P. Cuhra, M. Kubik, S. Barsova, L. Karsulinovi, H. Bulawova, J. Brychta, "Enzyme-linked immunosorbent assay kit for beta-lactoglobulin determination: interlaboratory study", *Journal of AOAC International* vol. 92, no. 5, pp. 1519–1525, 2009
DOI: [10.1080/09540100802520755](https://doi.org/10.1080/09540100802520755).
- [8]. A. N. Shmyreva, A. V. Borisov, N. V. Maksimchuk, "Electronic Sensors Built on Nanostructured Cerium Oxide Films", *Nanotech in Russia* no. 5, pp. 382–389, 2010,
DOI: [10.1134/S1995078010050137](https://doi.org/10.1134/S1995078010050137)
- [9]. O. Kutova, M. Dusheiko, T. Obukhova, N. Maksimchuk, T. Borodinova, V. Tymofeev, "H₂O₂ sensor based on MOSFET with active layer in substrate area", *Sensor Electronics and Microsystem Technologies* vol. 14, no. 4, pp. 5–12, 2017,
DOI: [10.18524/1815-7459.2017.4.116007](https://doi.org/10.18524/1815-7459.2017.4.116007)
- [10]. O. Kutova, M. Dusheiko, N. I. Klyui, V. A. Skryshevsky, "C-reactive protein detection based on ISFET structure with gate dielectric SiO₂ - CeO₂", *Microelectronic Engineering*, vol. 215, no. 15, 110993, 2019 DOI: [10.1016/j.mee.2019.110993](https://doi.org/10.1016/j.mee.2019.110993).

Надійшла до редакції 17 червня 2019 р.

УДК 621.3

Сенсор бета-лактоглобуліну на основі ІСПТ з підзатворним діелектриком CeO₂

Кутова^f О. Ю., ORCID [0000-0003-1720-9700](https://orcid.org/0000-0003-1720-9700)

Тимофєєв^s В. І., ORCID [0000-0003-0256-4179](https://orcid.org/0000-0003-0256-4179)

Кафедра електронної інженерії

Національний технічний університет України

“Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського”

Київ, Україна

Душейко^f М. Г., ORCID [0000-0003-2267-6637](https://orcid.org/0000-0003-2267-6637)

Кафедра мікроелектроніки

Національний технічний університет України

“Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського”

Київ, Україна

Бротонс^s Г., к.т.н. ORCID [0000-0003-3832-3932](https://orcid.org/0000-0003-3832-3932)

Université du Maine Institut des Molécules et des Matériaux du Mans

Ле Ман, Франція

Анотація— В роботі розглянуто сенсор бета-лактоглобуліну з удосконаленою методикою вимірювання. Як основного алергену молока. Бета-лактоглобулін (БЛГ) використовується як основний біомаркер для аналізу коров'ячого молока. Запропоновано структуру сенсора з нанокристалічним оксидом церію в якості підзатворного діелектрика та удосконаленим методом вимірювання. Він полягає в використанні мікропоточної системи, що забезпечує постійний об'єм досліджуваної речовини для динамічного аналізу білка бета-лактоглобуліну - основного алергену молока. Запропонований сенсор був виготовлений на основі іон-селективного польового транзистора



з польовим ефектом (ІСПТ) з р-каналом. Транзистор був виготовлений на кремнієвій пластині, легованій фосфором (n-тип), питомий опір 4,5 Ом/м², орієнтацією (111) та товщиною 450 мкм. В роботі проаналізовано вплив освітленості на результати експерименту та ступінь очищення поверхні датчика між кожним вимірюванням. Оскільки існуючий метод ІФА занадто довгий (1,5 години), а запропонований спосіб дозволяє виявити наявність бета-лактоглобуліну протягом декількох хвилин. Отримані результати відкривають перспективи використання запропонованих сенсорних та методів у технологіях виробництва дієтичних продуктів та експрес-аналізу.

Запропонований підхід дозволяє аналізувати динамічні характеристики біосенсора з точки зору характерних рівнів сигналу ІСПТ на початку і у кінці часового інтервалу, що дає можливість оцінювати ступінь десорбції білка з поверхні. Це, у свою чергу, свідчить про властивості сенсора щодо відновлюваності та можливості його повторного використання. Отримані результати щодо впливу освітлення на відгук сенсора свідчать про необхідність поміщати робочу область сенсора у світлонепроникний бокс. Запропонована методика дозволяє здійснювати вимірювання рівнів бета-лактоглобуліну у широкому діапазоні змін рН розчину. Достатньо малий час детектування білка бета-лактоглобуліну і можливість динамічного аналізу білка на основі запропонованої структури біосенсора відкриває перспективи його використання у технологіях виготовлення дієтичних продуктів харчування та експрес-аналізу.

Ключові слова — біосенсор; бета-лактоглобулін (БЛГ); Іон-селективний польовий транзистор (ІСПТ); селективність.

УДК 621.3

Сенсор бета-лактоглобулина на базе ІСПТ с подзатворным диэлектриком CeO_2

Кутова^f О. Ю., ORCID [0000-0003-1720-9700](https://orcid.org/0000-0003-1720-9700)

Тимофеев^s В. І., ORCID [0000-0003-0256-4179](https://orcid.org/0000-0003-0256-4179)

Кафедра електронної інженерії
Національний технічний університет України
“Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сикорського”
Київ, Україна

Душейко^f М. Г., ORCID [0000-0003-2267-6637](https://orcid.org/0000-0003-2267-6637)

Кафедра мікроелектроніки
Національний технічний університет України
“Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сикорського”
Київ, Україна

Бротонс^s Г., к.т.н., ORCID [0000-0003-3832-3932](https://orcid.org/0000-0003-3832-3932)

Université du Maine Institut des Molécules et des Matériaux du Mans
Ле Ман, Франція

Аннотация— В работе рассмотрено сенсор бета-лактоглобулина с усовершенствованной методикой измерения как основного аллергена молока. Бета-лактоглобулин (БЛГ) используется в качестве основного биомаркера для анализа качества коровьего молока. Предложено структуру сенсора с нанокристаллическим оксидом церия в качестве подзатворного диэлектрика та усовершенствованным методом измерения. Этот метод состоит в использовании микропоточной системы для обеспечения постоянного объема исследуемого вещества для динамического анализа белка бета-лактоглобулина - основного аллергена молока. Также проведено исследования влияния уровня освещения на результаты эксперимента та степень очистки поверхности сенсора между каждым измерением. Существующий ИФА метод требует много времени для проведения одного эксперимента (1,5 час.), а предложена методика позволяет идентифицировать наличие бета-лактоглобулина всего лишь за несколько минут.

Ключевые слова — биосенсор; бета-лактоглобулин (БЛГ); Ион-селективный полевой транзистор (ИСПТ); селективность.

