

## EPDM으로 결합된 HRP 고정 바이오센서의 전기화학적 특성

윤길중<sup>†</sup>

청주대학교 이공대학 응용과학부  
(2007년 5월 17일 접수, 2007년 6월 12일 수정 및 채택)

### Electrochemical Properties of HRP Immobilized Biosensor bound with EPDM

Kil-joong Yoon<sup>†</sup>

Division of Applied Sciences, Cheongju University, Cheongju, 360-764, Korea  
(Received May 17, 2007, Revised & Accepted June 12, 2007)

**요약** : EPDM을 결합제로 사용하고, HRP를 고정시켜 과산화수소 정량을 위한 탄소반죽전극을 제작하고, 바이오센서로서 실용화 가능성을 살펴보기 위하여 전기화학적 특성을 고찰하였다. 실험 농도 영역에서 신호의 Lineweaver-Burk 도사가 보여준 좋은 직선성은 촉매력이 효과적으로 발휘될 수 있도록 EPDM이 전극 물질 속에서 HRP를 잘 고정하고 있음을 보여 주었으며, 이는 EPDM이 전극물질 결합제로 활용될 수 있음을 말하는 것이다. 전극은 낮은 전극전위(0.0 ~ -1.0 V vs. Ag/AgCl)에서 작동하였으며, 이 때 얻어진 신호는 높은 감도와 재현성을 보여 주었다. 특히 건조된 고무의 기계적 안정성은 탄소반죽 전극 실용화의 난제였던 실리콘 오일 결합제의 대체가능성을 열어주었다.

**ABSTRACT** : An HRP immobilized carbon paste electrode, which was bound by EPDM, was newly fabricated and its electrochemical properties were investigated for the purpose of validating the new possibility for the practical use of biosensor. In the experimental range of substrate concentration, Lineweaver-Burk plot of the signal showed a good linearity. This means that HRP was embedded effectively to preserve its identity in the bulk of composite electrode materials and EPDM is a recommendatory binder. When the electrode was run at low operating potential(0.0 ~ -1.0 V vs. Ag/AgCl), it showed a high sensitivity and a good reproducibility. Especially the mechanical stability of the dried rubber was a remarkable breakthrough to get over a difficulty in putting the carbon-paste electrode bound with silicon oil to real use.

**Keywords** : Biosensor, Enzyme electrode, Ethylene-propylene rubber, Hydrogen peroxide, Peroxidase.

<sup>†</sup> 대표저자(e-mail : kjyoon@cju.ac.kr)

## I. 서 론

바이오센서에 효소를 고정하는 방법은 센서 제작에 있어 가장 핵심적인 요소이다. 생화학적 과정에 의한 전극의 신호 생성과 친화력의 지속적 유지는 센서로서 전극의 재현성, 안정도 그리고 전극의 기계적 안정성에 결정적 영향을 미치기 때문이다. 제작이 간편하고 실용적인 전기화학적 바이오센서 개발을 위하여 지금까지 많은 노력이 경주되어 왔다.<sup>1</sup> 널리 사용되는 효소 고정법에는 물리적 흡착,<sup>2</sup> 기능성 고분자와 공유결합,<sup>3</sup> 전도성 고분자 필름의 이용<sup>4</sup> 그리고 전극물질에 혼합시켜 고정하는 방법<sup>5</sup> 등, 여러 가지 방법이 다양하게 알려져 있다. 산업, 생화학, 의학 및 환경화학의 분야에서 광범위하게 이용되고 있는 과산화수소를 정량하기 위하여 본 실험실에서는 동물이나 식물조직에 함유된 과산화효소를 추출과정 없이 조직을 파쇄하여 센서에 직접 혼입시키는 방법으로 전극을 제작하고, 그것들의 전기화학적 성질을 관찰하여 왔다.<sup>6-10</sup> 이 방법은 효소의 전기화학적 특성을 연구하기에 효과적인 방법이다. 그러나 이 전극의 결합재로 사용된 실리콘오일이 비휘발성이며, 기계적 강도를 갖지 못하기 때문에 실용화는 절대로 불가능하다. 이런 이유로 인하여 본 실험실에서는 센서의 실용화를 가능케 하는 전극 물질 결합재를 색인하던 중, 톨루엔에 녹인 ethylene propylene diene terpolymer(EPDM)이 결합재로서 전극 실용화의 여러 조건을 충족시키는 것을 발견하였다. EPDM은 여러 화학 물질에 대하여 안정하고, 특히 극성 용매에 대하여 대단히 안정한 것으로 알려져 있다. 또 디엔 고분자보다 훨씬 더 산화에 잘 견디며, 용매가 휘발된 뒤에도 좋은 기계적 안정성을 보인다.<sup>11</sup> EPDM을 탄소가루의 결합재로 사용하여 고무전극을 제작하고, 이것의 전기화학적 특성과 바이오센서로서의 활용 가능성을 살펴보았다.

## II. 실험

대부분의 신호전류 측정은 KIPP & ZONEN X-t (BD111, Holand) 기록계가 장착된 EG&G Model

362(Princeton Applied Reach, U. S. A.)를 이용하였다. 순환전압전류 그림은 BAS Model EPSILON (Bioanalytical System, Inc., U. S. A.) 전압전류계를 사용하여 얻었다. 기준전극과 보조전극으로 Ag/AgCl (BAS MF2052)과 백금전극(BAS MW1032)을 각각 이용하였다. 모든 계산은 Origin 7을 사용하여 이루어졌다. 과산화효소(Horseradish peroxidase, abbr. HRP)는 고추냉이로부터 추출된 Sigma 사 제품(E.C.1.11.1.7)을 이용하였다. EPDM은 금호폴리켄(KEP-350, 7~9 % diene)로부터 제공 받았으며, 톨루엔은 Sigma-Aldrich( $\geq 99.9\%$ ) 제품이였다. 흑연가루는 Fluka사 제품( $\leq 0.1$  mm)이었으며, 기질(abbr. S)로 Junsei사의 과산화수소(EP, 35%)를 이용하였다. 전해질로는 Shinyo사의 NaCl( $\geq 99.5\%$ )을, 매개체로 사용된 페로센(ferrocene)은 Sigma사 제품을 사용하였다. 전극 제조와 신호 측정은 다음과 같은 방법으로 이루어졌다. 0.09 g 페로센을 20 mL의  $\text{CHCl}_3$ 에 녹인 후, 흑연가루 0.91 g 과 혼합하여 건조시킨다. 이렇게 제조된 흑연가루 1.0 g 와 10.0 mg 의 HRP 를 포함하고 있는 증류수 1.0 g 을 혼합한 후, 수분을 증발시킨다. 7.0 % EPDM을 포함하는 톨루엔 용액과 위 흑연가루를 0.8 : 1.0(wt/wt)의 비율로 혼합하여 반죽을 만든다. 이 반죽을 오음 접착이 있는 내경 6 mm, 깊이 1 mm의 폴리에틸렌 튜브에 충전시키고 전극 표면을 완전한 평면으로 성형한다.<sup>6(a)</sup> 신호측정은 환류상태에서 10 mL 0.1 M NaCl 용액에 작업전극을 위치시키고, 전극 전위 인가 후, 시간 경과에 따른 충전전류의 감소 경향성이 수평직선에 도달하였을 때, 기질용액을 첨가한다. 첨가 전후 신호의 차를 과산화수소 분해전류로 간주하였다.

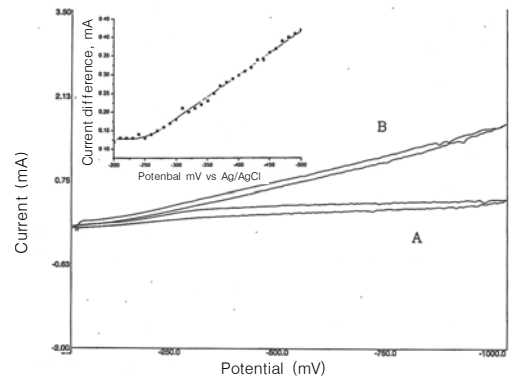
## III. 결과 및 고찰

0.1 M NaCl 전해질 용액 중에서 위 방법에 따라 제조된 효소전극의 전기화학적 거동을 보여주는 순환 전압전류 특성을 Figure 1에 나타내었다. A는 전해질 용액에 기질이 첨가되지 않은 순수 전해질로부터, B는 전해질 용액 10 mL에 100  $\mu\text{L}$ 의 1.0 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  기질을 가했을 때 얻어진 것이다. A의 경

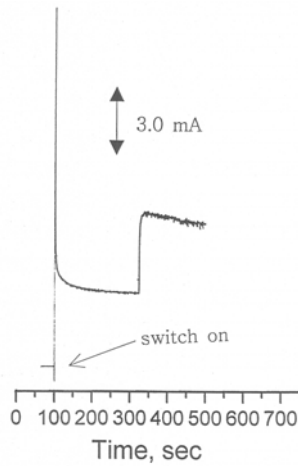
우 약간의 환원전류가 실험 전위 영역에서 대체로 일정하게 나타나는 것을 볼 수 있다. 본 계는 전기 화학반응이 가능한 여러 가지 화학종, 즉 물, 페로센, EPDM 등을 포함하고 있다. 여기에 나타나는 환원전류가 어떤 화학종에 의한 패러데이 전류인지를 확인하기 위하여 우선 유리탄소전극을 이용하여 물의 환원을 조사하였다. 물의 표준환원전위는  $-0.828\text{ V}$  이다. 여기서 측정된 물의 환원전류는  $-0.85\text{ V}(\text{Ag}/\text{AgCl})$ 에서  $27.3\text{ }\mu\text{L}$ 이었으며, 환원함수 꼬리가 대략  $-0.85 \pm 0.30\text{ V}$ 까지 연결된 가우스 곡선의 형태였다. 물의 환원 봉우리를 나타내는 전압은 대체로 일치한다고 볼 수 있다. 그러나 Figure 1의 실험 전 영역에 걸쳐 형성된 전류가 일정한 것은  $-0.85\text{ V}$ 에서 봉우리를 형성하는 물의 환원전류의 형태와 근본적으로 다르므로, A의 전 구간에서 나타나는 전류는 물의 환원에 무관한 것으로 볼 수 있다. 한편 전해질 용액  $10\text{ mL}$ 에  $100\text{ }\mu\text{L}$ 의  $1.0\text{ M H}_2\text{O}_2$  용액을 추가하였을 때  $-0.85\text{ V}$ 에서 전류는  $40.0\text{ }\mu\text{A}$ 로  $12.7\text{ }\mu\text{A}$ 가 증가하였으나 전압전류 그림의 형태에는 변화가 없었다.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 표준환원전위는  $1.77\text{ V}$ 이다. 그러므로 여기서 증가된 환원전류는 과산화수소의 환원전류라고 생각할 수 없다. 과산화수소는 순수한 물의 대략 50배에 해당하는 전도도( $2.0 \times 10^{-6}\text{ }\Omega/\text{cm}$ , at  $20\text{ }^\circ\text{C}$ )를 갖는다.  $12.7\text{ }\mu\text{A}$ 의 전류 증가는 과산화수소의 첨가로 인한 용액의 전도도 증가에 기인한 것으로 볼 수 있을 것이다. 페리시늄(ferrocinium) 이온의 표준환원전위는  $0.400\text{ V}$ 이다. Figure 1의 환원전류는 페리시늄 이온의 환원함수 꼬리를 음의 방향으로  $0.60\text{ V}$  이상 확장하더라도 본 실험의 전위영역에 영향을 미치지 않는다. 그러므로 여기서 나타나는 일정한 크기의 환원전류는 페리시늄 이온의 환원과 무관한 것이라 할 수 있다. 여기서 탄소가루의 결합재로 사용된 합성고무, EPDM은 화학적 구성을 볼 때 혼합물이다. Figure 1의 A에서 나타나는 환원전류는 현 단계에서 메커니즘 확인이 어려운, 여러 고무 구성 성분의 전기화학 반응에 의한 것이거나, 전극 계면변화로 인한 잔류전류가 나타나는 것으로 볼 수 있다. 기질 첨가 후 전극 전위 변화에 따라 신호전류가 전극전위에 대하여 서서히 증가하

는 것을 보여주고 있다(B). 전극 전위에 대하여 A와 B의 전류차를 Figure 1의 창에 도시하였다. 대체로 직선성이다. Figure 1의 B에서  $-0.85\text{ V}$ 에서 측정된 전류는  $1.38\text{ mA}$ 이다. 위에서 언급된  $12.7\text{ }\mu\text{A}$ 는 이 값의  $1.0\%$  이하에 해당하므로, 물의 환원에 의한 전류는 본 실험의 신호에 비하여 무시될 수 있는 크기이다. Figure 1에서 전류가 변화한 것은 기질 첨가에 기인한 것이며, 첨가 전후 잡음을 고려한다면 순환전압전류 그림의 모양에 주목할 만한 변화가 없다. 그리고 합성고무 구성 성분의 환원전류이든 충전전류이든 Figure 1의 A와 B에 공통적으로 적용되며, 반응 속도가 전극 전위에 직선적으로 의존하고, 기질첨가에 의하여 유발된 것이므로, A와 B의 전류차를 과산화수소의 신호전류로 간주해도 무방할 것이다.

Figure 2는 고무전극으로 신호를 얻는 전형적인 과정이다. 전압 인가 후 급격히 증가하는 전류는 전위스텝에 의한 전극표면의 콘덴서전류를 나타내는 것으로 대략 50 초 후면 바탕선에 도달한다. 이 과정에서 나타나는 신호의 진동은 기질의 질량 이동 시간을 단축하고 농도편극을 줄이기 위한 자석 것개의 회전에 기인 된 것이다. 전류 감응곡선은 기질 투입 후 대략 20초 지나면 극대치에 이르는 것을 보여주고 있다. 이후 신호는 서서히 감소하는



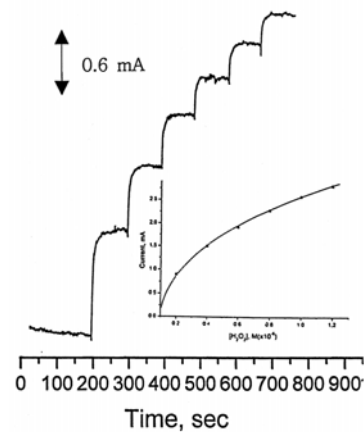
**Figure 1.** Electrochemical behaviors of horse-radish peroxidase immobilized rubber electrode bound by EPDM. A and B were obtained without and with addition of  $100\text{ }\mu\text{L}$  of  $1.0\text{ M H}_2\text{O}_2$  solution in  $0.1\text{ M NaCl}$  solution respectively. Scan rate,  $10\text{ mV/s}$ . Inset: calculated current difference between A and B.



**Figure 2.** Typical time course of current for the experimental determination of response signal. Electrode potential, - 0.15 V(vs. Ag/AgCl); [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], 1.0 x 10<sup>-2</sup> M.

데 이 경향성은 전류스텝과 기질 투입 사이의 감소 경향과 유사한 것으로 보아 콘덴서 전류가 완전히 제거되지 않은 탓으로 볼 수 있다. J. Wang<sup>12</sup> 등은 바나나 조직이 함유된 탄소반죽 전극을 이용하여  $t_{95\%}=12$  sec의 빠른 감응시간을 얻어, 시간당 60개 이상을 시료를 처리할 수 있다고 보고하였다. 반면에 B. Wang 등<sup>13</sup> 은 탄소가루를 결합하기 위하여 실리콘 졸-겔 법을 사용하였는데, 이 때 매우 긴 감응 시간을 보였다. 이는 실리콘 그물 구조 안에서 기질의 확산 경로가 긴 우회 경로를 갖기 때문이라고 그 이유를 설명하고 있다. 여기서 전극이 짧은 감응시간을 보여주지 못하는 것은 고분자 물질인 고무분자의 큰 분자량에 의한 우회경로 때문인 것으로 볼 수 있다. 그러나 EPDM을 결합재로 사용한 Figure 2의 경우, 기질 추가 시 비교적 단 시간 내에 신호가 발생되는 것으로 보아, EPDM이 전극 표면에서 효소를 효과적으로 고정시켜 촉매력을 발휘하게 함으로서, EPDM 전극이 결합재로 활용 가능성을 보여주는 것이다.

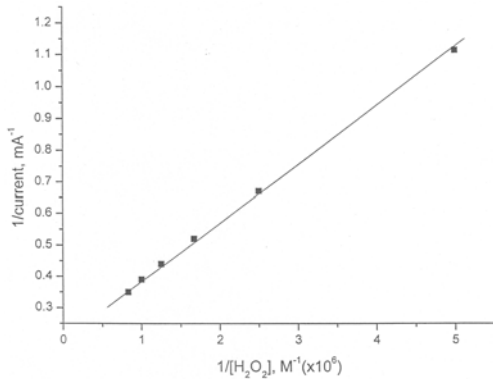
Figure 3은 - 0.15 V(Ag/AgCl)의 전극전위에서 환류상태의 10 mL 전해질 용액에 200  $\mu$ L의 0.10 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 연속적으로 추가하였을 때, 신호의 변화를 보여주는 amperogram이다. 이 방법은 전위계단(potential step) 상태에서 전류를 측정하는 방법으



**Figure 3.** Amperometric response for successive 200  $\mu$ L additions of 0.1 M hydrogen peroxide solution at - 0.15 V. Inset: resulting calibration plot from this amperogram.

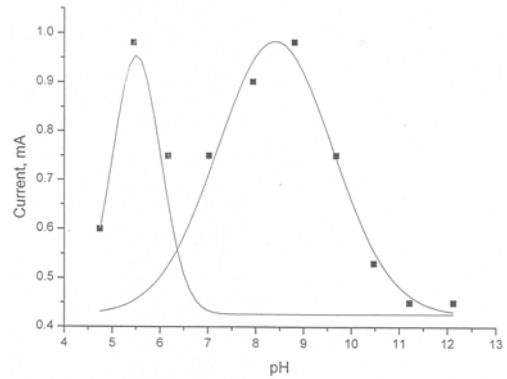
로, 전기화학적 활성을 갖는 화학종의 질량이동 속도가 환류와 관련되어 있으므로 hydrodynamic amperometry라고도 한다. 이것의 이점은 질량이동 속도가 화학종의 확산속도보다 훨씬 크기 때문에 쉽게 정류상태에 도달하며, 이중층의 콘덴서전류가 최소화된다는 점이다. Figure 3으로부터 도출된 신호의 크기를 첨가된 기질의 농도함수로 도시한 것이 Figure 3의 창에 도시되어 있다. 우선 두드러진 특징은 신호 크기의 농도 의존도가 직선성으로부터 쉽게 벗어나는 것인데, 그 이유는 다음과 같이 설명될 수 있다. 고정된 HRP에 의한 과산화효소의 분해반응이 단단계 반응으로 진행되는 반응일 수 있으며, HRP가 이들 단계 중 어느 특정단계만을 촉매할 수 있다. 또 고추냉이로부터 추출된 HRP에 여러 종류의 과산화효소가 포함되어<sup>9</sup> 이들이 서로 다른 속도로 과산화수소 분해 반응에 참여할 수도 있다. 그리고 전극 표면의 활성 자리 수가 제한되어 있어 반응 중간체가 전극 표면에 흡착하거나 포화될 경우 기질의 접근이 방해받을 가능성도 있기 때문이다.

Figure 4는 Figure 3의 데이터로부터 계산된 Lineweaver-Burk 도식이다. 이 실험의 전체 영역에서 직선은 R = 0.9997의 상관계수를 가지며, 이로부터 얻은  $i_{max}$  와  $K_M$  은 각각 4.74 mA 과 0.86이었다. Lineweaver-Burk 도식으로부터 직선성이 얻어지



**Figure 4.** A double-reciprocal plot of the same data as in Figure 3.

면 그 반응은 효소의 촉매작용에 의한 것이다. Figure 4로부터 얻어진 직선성은 전극 반응이 효소에 의하여 조절되고 있으며, EPDM이 전극 표면에서 효소를 효과적으로 고정하여 활성이 정상적으로 발휘되고 있음을 확인시켜 주는 것이다. 단백질로 구성된 효소의 활성자리는 용액 중에 존재하는 양성자의 탈착이 가능한 카르복시 말단과 아미노 말단으로 구성되어 있다. 그러므로 용액의 pH변화는 활성자리의 입체적 구조를 변화시킴으로써 효소의 촉매력에 크게 영향을 미칠 수 있다. Figure 5는 전해질 용액의 pH에 따른 신호전류의 변화를 보여주고 있는데, 두 pH값에서 극대값을 볼 수 있다. 이와 같은 결과는 실리콘 오일을 사용하여 만든 HRP전극의 pH의존성을 응용하여 효소 활동도의 최적 pH를 구하는 과정에서 이미 확인된 바 있다.<sup>9</sup> 이것은 전극에 고정된 효소와 용액 중에 있는 기질의 입체적 결합을 최적화 시켜 촉매력을 최대화하는 pH가 존재하며, 또 고정된 HRP가 두 종류의 과산화효소로 구성되어 있음을 말하여 주는 것이다. 여기서 과산화효소의 환원함수가 가우스분포를 이루고, Figure 5가 보여주는 신호의 변화가 두 함수의 합이라는 가정 하에 각각의 기여를 프로그램, Origin 7을 이용하여 분해하였다(실선). 낮은 pH와 높은 pH에서 얻어진 전류함수를 각각 y1, y2라고 할 때, 두 함수와 관련된 파라미터들이 Table 1에 주어졌다. 두 극대값을 보여주는 xc1과 xc2는 극대 신호를 나타내는 용액의 pH로 각각 5.51과



**Figure 5.** Effect of the hydrogen ion concentration on the electrode response. Electrode potential, - 0.20 V; hydrogen peroxide conc.,  $1.5 \times 10^{-3}$  M.

**Table 1. Gathering of constants for Gauss functions.**

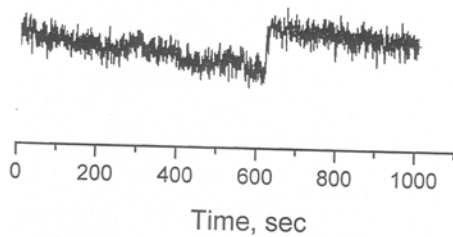
y0	0.43 (±0.04)	xc2	5.51 (±0.06)
xc1	8.40 (±0.09)	w2	1.02 (±0.10)
w1	2.41 (±0.26)	A2	0.08 (±0.08)
A1	1.68 (±0.24)		

$$y = y0 + (A / (w * \sqrt{\pi / 2})) * \exp(-2 * ((x - xc) / w)^2)$$

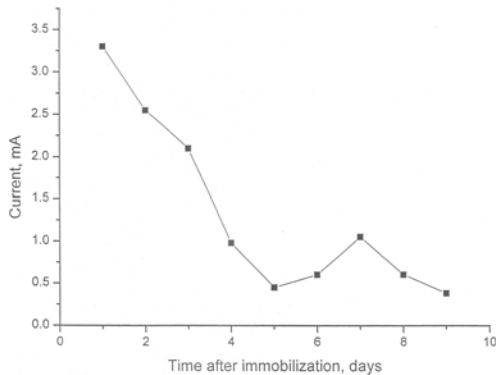
8.40을 나타낸다. 이 값은 실리콘 오일이나 부틸 고무를 결합재로 사용한 경우와 비교하여 다소 차이를 보이는데, 교체된 매트릭스의 변화에 기인한 것으로 볼 수 있다.

Figure 6은 사용 중인 전극의 검출 한계를 확인하고자 pH 8.80의 10 mL 전해질 용액에 15.0 uL의 0.1 M 기질 용액을 가했을 때, 신호가 변화하는 것을 보여주는 amperogram이다. 여기서 얻어지는 검출한계는  $1.5 \times 10^{-4}$  M 이었다. A. N. Díaz<sup>14</sup>와 Y. Miao<sup>15</sup>은 겔-졸 법으로 HRP를 고정시켜 각각  $6.7 \times 10^{-4}$  M 과  $3.0 \times 10^{-6}$  M의 검출 한계를 얻었다. 신호의 크기에 영향을 주는 요인은 용액의 pH, 매개체, 결합재 그리고 효소의 함량 등이 있다. 최대의 신호를 얻기 위하여 이와 같은 요인들이 최적화 된다면 검출한계는 보다 향상될 것이다.

바이오센서로 사용되는 전극이 실용화되고자 한다면 전극의 작업 안정성은 필수적이다. 효소전극의 감응도는 제작 후 시간경과에 따라 단조 감소하는 경향을 보이는 것이 일반적이다. Figure 7은



**Figure 6.** Amperogram for the determination of detection limit. 15  $\mu$ L of 0.1 M substrate solution was added at - 0.35 V(vs. Ag/AgCl).



**Figure 7.** Long term stability of the biosensor used in this work. It was stored at 4 °C in the dark between measurements and other conditions are the same as in Figure 5.

제작된 전극을 4 °C의 냉암소에서 보관할 때 감응도가 시간에 따라 변화하는 것을 보여주고 있다. 효소가 공기 중에 노출될 경우 그것이 변성될 수 있는 경우의 수는 많다. 삼차원의 단백질 구조가 변형되는데 필요한 에너지는 15~60 kJ/mol로 대단히 작기 때문에 온도의 변화가 첫째 원인이 될 수 있다. cystine 이황화물 교차결합은 공기 중의 환원성 물질에 의하여 분해될 수 있으며, cysteine잔기에 공기 중의 산소나 기질로 사용된 과산화수소가 산화제로 작용한다면 새로운 cystine을 형성할 수도 있다. 만약 미생물의 protease가 전극 표면에서 활성을 갖는다면 효소 단백질을 분해하여 활성자리의 구조가 변형될 수 있다. 이와 같은 요인들은 효소전극을 공기 중에 노출시켜 보관할 경우 효소의 변성을 가져와 전극의 감응능력을 약화시키는 요인이 된다. 따라서 효소전극의 보관 방법은 대단

히 중요하며, 이에 대한 별도의 연구가 있어야 할 것이다.

#### IV. 결 론

EPDM을 결합제로 사용하여 탄소가루에 HRP를 고정시킨 고무전극을 제작하고 그것의 전기화학적 거동과 실용화 가능성을 살펴보았다. 전극은 낮은 전극전위(0.0 ~ -1.0 V vs. Ag/AgCl)에서 신호를 얻을 수 있었으며,  $1.5 \times 10^{-4}$  M의 검출한계를 보였다. 실험 농도 영역에서 신호전류의 농도-신호 양역수 도시는 직선이었으며, 이는 효소가 전극에 효과적으로 고정되어 촉매력을 발휘하고 있음을 보여주었다. 전극으로부터 얻은 신호의 재현성과 높은 감도 그리고 전극물질의 기계적 안정성은 고무가 전극 재료로서 활용될 가능성을 보여주었으며, 이는 효소전극의 실용화를 위한 새로운 방법을 제시한 것이다.

#### 참 고 문 헌

- (a) R. D. Schmid and F. Scheller, "Biosensors Applications in Medicine, Environmental Protection and Process Control", Vol. 13, p. 4. Weinheim Germany, 1989. (b) R. P. Buck, W. E. Hatfield, M. Umaña, and E. F. Bowden, "Biosensor Technology", p. 3, Marcel Dekker, Inc. U.S.A. 1990.
- A. N. Reshetilov, M. V. Donova, D. V. Dovbnya and A. M. Boronin, "FET-microbial Sensor for Xylose detection based on Gluconobacter oxydans Cells", *Biosensors & Bioelectronics*, **11**, 401 (1996).
- V. C. Sanz, M. L. Mena, A. G. Cortés, P. Yáñez-Sedeño and J. M. Pingarrón, "Development of a Tyrosinase biosensor based on Gold nanoparticles-modified Glassy carbon electrodes Application to the Measurement of a Bioelectrochemical polyphenols Index in Wines", *Anal. Chim. Acta*, **528**, 1 (2005).
- (a) P. Mailley, E. A. Cummings, S. Mailley, S. Cosnier, B. R. Eggins and E. McAdams, "Amperometric detection of Phenolic compounds by Polypyrrole-based composite Carbon paste Electrodes", *Biochemistry*, **63**, 291 (2004). (b) I. Vostiar, J. Tkac,

- E. Sturdik and P. Gemeiner, "Amperometric urea biosensor based on Urea and Electropolymerized Toluidine blue dye as a pH-sensitive Redox probe", *Biochemistry*, **56**, 113 (2002).
5. E. Crouch, D. C. Cowell, S. Hoskins, R. W. Pittson and J. P. Hart, "Amperometric, Screen-printed, Glucose biosensor for Analysis of human plasma samples using a Biocomposite water-based Carbon ink incorporating Glucose oxidase", *Anal. Biochem.* **347**, 17 (2005).
  6. (a) K. J. Yoon, K. J. Kim, and H. S. Kwon, "Electrochemical Properties of the Chicken Small Intestinal Tissue based Enzyme Electrode for the Determination of Hydrogen Peroxide", *J. Kor. Chem. Soc.* **43**(3), 271 (1999).  
(b) K. J. Yoon, H. S. Kwon, and B. G. Lee, "Electrochemical Determination of pH-Stability Curve of Enzyme", *J. Kor. Chem. Soc.* **49**(3), 325 (2005).
  7. H. S. Kwon, E. H. Jin, K. J. Yoon and Y. N. Pak, "Mushroom-juice based Gold Electrode for the Determination of Phenols", *J. Kor. Chem. Soc.* **49**(2), 224 (2005).
  8. K. J. Yoon, "Optimum pH of the Reduction of Hydrogen peroxide at a Tobacco plant Tissue based Amperometric Biosensor", *J. Kor. Chem. Soc.* **48**(6), 654 (2004).
  9. K. J. Yoon, "A New Strategy for Determining Optimum pH of Isozymes", *Bull. Kor. Chem. Soc.* **25**(7), 997 (2004).
  10. K. J. Yoon, "Electrochemical Determination of the Optimum pH of HRP", *Anal. Sci. Tech.* **16**(6), 504 (2003).
  11. J. A. Brydson, "Rubbery Materials and Their Compounds", p. 147, Elsevier Applied Science, London and New York, 1988.
  12. J. Wang, N. Naser, H. S. Kwon, and M. Y. Cho, "Tissue bioelectrode for Organic-phase Enzymatic Assays", *Anal. Chim. Acta*, **264**, 7 (1992).
  13. B. Wang and S. Dong, "Sol-gel-derived Amperometric Biosensor for Hydrogen peroxide based on Methylene green Incorporated in Nafion film", *J. Electroanal. Chem.* **487**, 45 (2000).
  14. A. N. Díaz, M. C. R. Peinado and M. C. T. Minguez, "Sol-gel Horseradish Peroxidase Biosensor for Hydrogen peroxide Detection by Chemiluminescence", *Anal. Chim. Acta*, **363**, 221 (1998).
  15. Y. Miao and S. N. Tan, "Amperometric Hydrogen peroxide Biosensor with Silica sol-gel/chitosan Film as Immobilization Matrix", *Anal. Chim. Acta*, **437**, 87 (2001).