

쑥을 이용한 과산화수소 정량 바이오센서의 전기화학적 성질

이범규 · 박성우¹ · 윤길중^{*}

조선대학교 자연과학대학 화학과,
¹충남대학교 평화안보대학원 과학수사과,
^{*}청주대학교 이공대학 응용과학부
(2005. 11. 1. 접수, 2006. 1. 10. 승인)

Electrochemical properties of the mugwort-embedded biosensor for the determination of hydrogen peroxide

Beom-Gyu Lee, Sung-Woo Park¹ and Kil-Joong Yoon^{*}

Department of Chemistry, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

¹*Department of Scientific Criminal Investigation, Graduate School of Peace and Security Studies, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*

^{*}*Division of Applied Sciences, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea*

(Received November 1, 2005, Accepted January 10, 2006)

요 약 : 탄소반죽에 쑥조직을 혼입시켜 과산화수소 정량 바이오센서를 제작하고 그것의 전기화학적 성질을 조사하였다. 다른 생체조직을 이용하여 제작한 센서와 비교할 때, 생촉매 안정성이 뛰어났으며, 보다 큰 감응신호를 보여주었다. 조직의 함량 변화에 따른 신호의 변화는 넓은 범위에 걸쳐 직선성을 보여 주었고, Lineweaver-Burk 도시의 직선성은 전극 감응이 효소 촉매작용에 의하여 조절되고 있음을 보였다. 또 감응전류의 pH 의존성 변화는 센서가 두 종류의 동위효소를 포함하고 있음을 암시하였다.

Abstract : A mugwort-tissue-based modified carbon paste electrode was constructed for the amperometric detection of hydrogen peroxide and its electrochemical properties are described. Especially the amperometric signal was very stable and bigger than any other enzyme electrode studied in this lab. The effect of tissue composition on the response was linear within the wide range of experiment and the linearity of Lineweaver-Burk plot showed that the sensing process of the biosensor is by enzymatic catalysis. And pH dependent current profile connoted that two isozymes are active in this system.

Key words : Hydrogen peroxide, Peroxidase, Biosensor, Isozyme, Optimum pH

1. 서 론

효소의 촉매작용이 기질과 효소의 산화-환원에 관련되어 있다면 전기화학적인 방법으로 반응전류를 측

정하여 효소의 열역학적 정보나 반응속도, 반응메커니즘 등, 여러 가지 특성에 관한 정보를 얻을 수 있다. 1962년 Clark와 Lyons¹, 1967년 Urdike와 Hicks² 등에 의하여 생체에 포함된 효소를 촉매로 사용하는 센서

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-229-8540 Fax : +82-(0)43-229-8535

E-mail: kjyoon@cju.ac.kr

제작 개념이 제안된 이후, 여러 가지 형태의 바이오센서들이 개발되었다. 특히 바이오센서에 순수한 추출효소를 고정하는 대신 동식물의 생체조직을 혼입시켜도 특정 기질에 대하여 잘 감응한다는 사실이 알려진 후, Ruiz³ 등과 Kano⁴ 등은 acetylcholine esterase와 choline oxidase를 매개체 hexacyanoferrate(III)이온과 함께 탄소 및 백금전극에 각각 고정시켜 choline, acetylcholine 및 arsenocholine을 정량하였으며, Rosa⁵ 등은 이 방법을 응용하여 갯벌이나 키위 속에 잔류하는 유기농약을 정량하였다. Bonakdar⁶ 등은 공업용 tyrosinase와 버섯에 포함된 tyrosinase를 매개체 hexacyanoferrate와 함께 사용하여 phenol 센서를 제작하였다. Wang과 Kwon⁷ 등은 phenol 유도체를 정량하기 위하여 효소원으로 버섯, 바나나, 고추냉이를 이용하기도 하였다. Messia⁸ 등은 malic 및 pyruvate oxidase를 고정시킨 이성분 전극을 이용하여 포도가 익어가는 과정에서 malate의 함량 변화를 추적하기도 하였으며, Conrath⁹ 등은 감자 속에 있는 acid phosphatase를 이용하여 무기인산을, Luque de Castro¹⁰는 sulphite oxidase를 이용하여 sulphite를 분석하였고, Lee¹¹ 등은 각각 미생물과 dithizone를 이용하여 cyanide와 납을 정량하였다. 한편 시료 중에 존재하는 용존산소의 영향 없이 당을 측정할 수 있는 전극이 Wang¹² 등에 의하여 개발되어 당뇨병 환자의 당 측정, 심장질환자의 젖산 및 콜레스테롤 측정 센서 개발에 새로운 장이 열리게 되었다.

과산화수소는 폐수처리나 소독에 사용되며, 표백 및 탈취제로도 사용되는 중요한 화학공업용 시약이다.^{13,14} 또 생유기체의 대사과정에서 생성되기도 하는데, 그 예로 glucose가 gluconic acid로 산화될 때 부산물로서 얻어진다. 따라서 과산화수소를 신속하고 정확하게 정량하는 일은 대단히 중요하다. 과산화수소의 정량에는 고전적인 적정법,¹⁵ 분광법¹⁶ 등, 여러 가지 방법¹⁷들이 다양하게 알려져 있다.

최근에 이루어지는 과산화수소의 미량분석에는 크게 나누어 두 방법이 주류를 이루는데, 화학발광¹⁸이나 형광 검출법¹⁹을 이용하는 발광법(luminescence)과 과산화수소 분해 효소를 전극에 고정시켜 바이오센서로 이용하는 전기화학적 방법²⁰이 대표적이다. 전자의 경우 $1.30 \times 10^{-9} \sim 1.25 \times 10^{-5}$ M에 이르는 넓은 검정곡선의 직선 영역^{19a}과 20~50 nM 수준의 탁월한 검출한계^{19d,e}를 보여준다. 그러나 분석시료의 합성과 전처리 과정이 매우 복잡하여 많은 시간이 걸리는 단점을 갖고 있으며, 분석 비용 면에서 불리한 점을 배제할 수 없다. 하지만 전기화학적 방법은 10초 이내의 빠른 감

응시간으로부터 시간당 60개 이상의 시료를 처리할 수 있는 능률성^{7b}과 효소의 기질에 대한 특이성으로부터 얻을 수 있는 분석물질에 대한 탁월한 선택성 때문에 5.0×10^{-5} M의 비교적 높은 검출한계^{21b}에도 불구하고 널리 연구되고 있다. 특히 전극에 혼입시키는 효소의 추출과정 없이 생체조직을 직접 전극에 고정시킬 수 있는 방법은 바이오센서 제작을 대단히 용이하게 한다. 본 실험실에서는 동식물이 포함하고 있는 과산화수소 분해효소를 추출하지 않고, 조직을 파쇄하여 탄소반죽에 혼입시켜 센서를 개발하고자 노력하고 있으며, 얻어진 결과들을 수차례 보고한 바 있다.²¹ 여기서 중요한 것은 신호의 크기와 안정성인데, 이 조건들을 충족시키는 물질을 색원하던 중, 숙이 바이오센서의 필요조건들을 상당히 충족시키는 것을 발견하고, 이를 이용한 효소전극을 제작하여 그것의 전기화학적 성질들을 살펴보았다. 여기에 그 결과들을 보고하고자 한다.

2. 실험

2.1. 기구 및 시약

순환전압-전류 그림을 얻기 위하여 BAS Model EPSILON(Bioanalytical System, Inc., U. S. A.) 전압전류계를 사용하였으며, 이외의 신호전류 측정에는 KIPP & ZONEN X-t(BD111, Holand) 기록계가 장착된 EG&G Model 362(Princeton Applied Reach, U. S. A.)를 이용하였다. 기준전극과 보조전극으로 Ag/AgCl(BAS MF2052)과 Pt 백금전극(BAS MW1032)을 각각 이용하였다. 실험용액의 pH측정은 Digital pH/mV/Temp meter(Suntex SP-701, Taiwan)가 이용되었으며, 이 기기는 Shinyo사의 pH 4, 7, 10 표준완충용액(Shinyo Pure Chemicals Co., Japan, S.P.C. GR Reagent)으로 검정되었다. 흑연가루와 미네랄오일은 각각 Fluka와 Sigma사 제품이었으며, 기질로 Junsei사의 과산화수소(EP, 35%)를 이용하였다. 전해질로는 Shinyo사의 NaCl(99.5%)을, 전해질 용액의 pH 조절은 묽은 NaOH(Shinyo Pure Chemicals Co., Japan) 및 HCl(Oriental Chem. Co. Korea)용액을 사용하였다.

2.2. 전극의 제조 와 전류측정

Ferrocene 0.09 g을 20 mL CHCl₃에 녹인 후, 흑연가루 0.91 g과 혼합하여 건조시킨 후 미네랄오일과 55:45(wt/wt)의 비율로 혼합하여 반죽을 만든다. 여기에 호모게나이저로 90분 이상 파쇄한 필요량의 숙 조

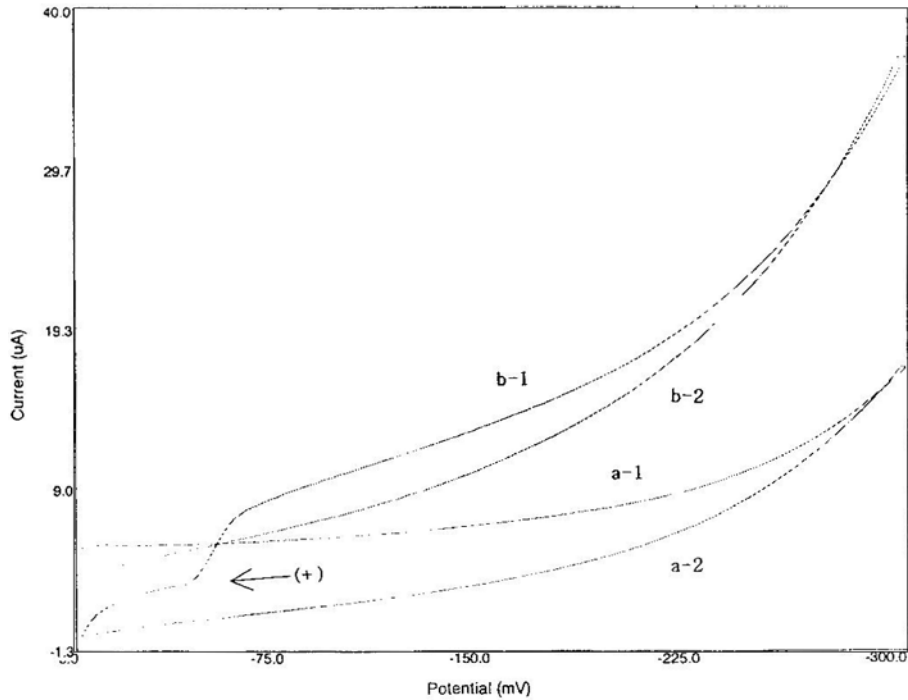


Fig. 1. Comparison of cyclic voltammograms of mugwort tissue modified enzyme electrode without(a) and with(b) adding 200 uL of 1.0 M H_2O_2 in 10.0 mL of 0.1 M NaCl solution. The (+) indicates the addition of H_2O_2 .

직을 완전 혼합하여 전극물질을 제조한다. 이 반죽을 오염 접촉이 있는 내경 6 mm의 폴리에틸렌 튜브에 충전시켜 전극을 성형한다. 전류측정은 pH가 조절된 10 mL 0.1M NaCl 용액에 작업전극을 위치시키고, 환류상태에서 충전전류가 바탕선에 도달하였을 때, 기질 용액 첨가 후 신호차를 과산화수소 분해전류로 간주하였다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1은 위와 같은 방법으로 제작한 작업전극의 전기화학적 거동을 보여주는 순환전압-전류 그림이다. 전극은 10%의 썩 조직을 포함하고 있으며, pH 6.60의 전해질 속에서 a-1, a-2, b-1, b-2의 연속된 순서로 측정된 전압-전류 그림이다. a-1, a-2는 전해질 용액에 기질을 가하기 전에 얻은 것이며, 곡선 b-1에서 (+)로 표시된 전류 계단은 1.0 M H_2O_2 200 uL의 첨가시점을 나타낸다. 기질 첨가 후, 곡선의 형태는 전류가 급격히 증가하는 것을 보여주고 있는데, 이는 기질인 과산화수소의 분해에 기인한 것이다. 썩 조직은 전기화학적으로 볼 때 매우 복잡한 혼합물이다. 따라서 확인

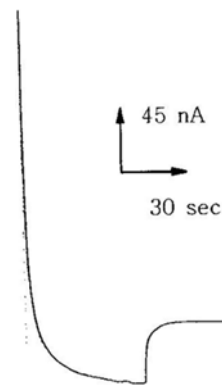


Fig. 2. Typical response curve of the biosensor. 0.1 M H_2O_2 , 100 uL was added to 10 mL electrolyte solution (pH 8.47) at -100 mV (vs. Ag/AgCl). The tissue composition of the electrode used was 5%.

하기 힘든 메커니즘의 여러 전기화학반응이 계 내부에서 일어날 수 있다. 그러나 본 계에서는 그 증가가 과산화수소의 첨가에 기인된 것이며, 기질 첨가 후, CV의 모양에 주목할 만한 변형이 없으므로, 신호전류의 증가는 과산화수소의 분해에 의하여 유발된, 즉 기

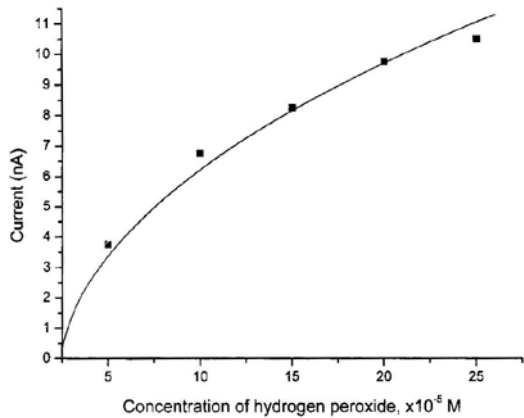


Fig. 3. Plot of amperometric response of the biosensor vs. concentration of hydrogen peroxide. Other conditions are the same as in Fig. 2.

질의 환원전류로 볼 수 있다. Fig. 2는 본 실험에서 신호를 얻는 전형적인 과정을 보여주고 있다. 교반중인 용액 중에서 전극전위 인가 시 급격하게 생성되는 컨덴서 전류는 약 40초 경과 시 바탕 수준으로 감소하며, 대략 1분이 경과하면 완전히 바탕선을 형성한다. 이 때 기질을 가하면 전류는 급격히 증가하는데, 15초 정도 지나면 기질의 환원전류는 포화되어 안정하고, 일정한 상태($t_{100\%}$)를 유지한다. Wang등^{7b}은 바나나 조직을 이용하여 탄소반죽 전극을 만들 경우 12 sec의 짧은 $t_{95\%}$ 을 얻어, 시간당 60개 이상의 시료를 처리할 수 있다고 주장하였다. 여기서 얻어진 $t_{100\%}=15$ sec는 위의 예와 비교할 때, 신호의 크기를 고려하면 대단히 우수한 값이다. 이 사실은 썩으로부터 추출된 효소를 이용하여 과산화수소 정량 전극을 제조할 때 신호크기의 적절성과 안정성을 예견할 수 있게 해 주는 것이다.

Fig. 3은 기질농도에 따른 신호의 크기가 직선성으로부터 쉽게 벗어나는 것을 보여주고 있다. 효소전극의 검정곡선은 작은 기질 농도에서 직선성을 보이지만, 농도가 조금만 증가하여도 이로부터 쉽게 벗어나는 경우를 흔히 볼 수 있다.²² 그 이유로는 과산화효소의 기질 분해반응이 다단계의 반응일 경우, 썩이 포함한 과산화효소는 전체 단계중의 특정 단계만을 촉매할 가능성이 있으며, 본 계에 존재 가능한 여러 종의 과산화효소들이 각기 다른 속도로 과산화수소의 분해에 참여할 수 있기 때문이다. 또 효소전극의 표면에 존재하는 활성자리의 수가 제한되어 있으며, 기질과 효소가 중간 복합체를 형성하여 전극 표면이 포화

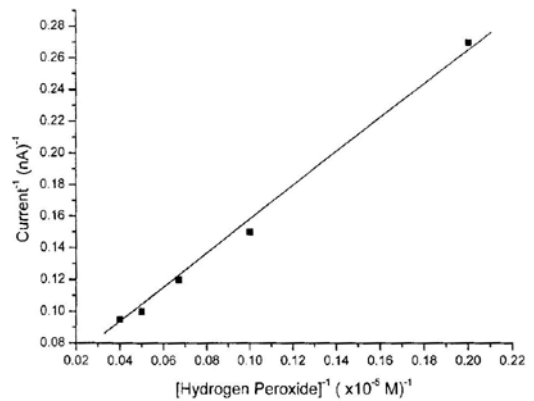


Fig. 4. Lineweaver-Burk plot from the data in Fig. 3.

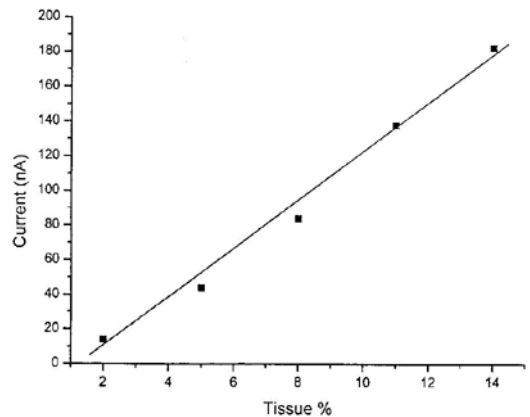


Fig. 5. The effect of the tissue composition on the response of the biosensor. Substrate concentration was 1.0×10^{-3} M and other conditions are the same as in Fig. 2.

되는 현상에 기인된 것으로 해석할 수도 있다. 동물의 경우 조직의 부위에 따라 효소의 활동도가 다른 것으로 알려져 있다.²³ 여기에 사용된 썩조직은 잎으로부터 채취한 것이다. 따라서 식물조직의 경우에 보다 향상된 검정곡선의 직선성을 얻고자 한다면 꽃, 뿌리, 줄기 등, 각 부위에 따른 효소활동도의 관찰도 병행되어야 할 것이다. Fig. 4는 Fig. 3의 데이터로부터 얻은 Lineweaver-Burk 도식이다. 실험의 전체 영역에서 직선 상관계수, 0.999의 좋은 직선성을 보이며, 이로부터 얻은 V_{\max} 와 K_M 값은 각각 20 nA와 2.11×10^{-4} M이었다. 기질의 농도변화에 대한 반응속도의 변화를 양역수 도식하는 Lineweaver-Burk 도식로부터 직선성이 얻어지면 그 반응은 효소의 촉매작용에 의하여 반응속도가 조절되는 반응이다. 따라서 Fig. 4로부터 얻어진 직선성은 전극반응이 효소에 의하여 조절되는

Table 1. pH effect on the response of the mugwort based working electrode

[S].mM	pH											
	3.25	3.69	4.14	4.55	4.93	5.38	5.72	6.14	6.58	7.04	7.42	7.73
8.4	345	420	675	923	675	478	600	840	668	525	503	412
9.9	413	465	750	1208	765	600	675	900	750	585	585	480
12.0	487	525	855	1125	863	675	788	975	840	795	690	638
15.0	600	660	1050	1275	975	840	975	1200	1050	893	863	750
20.1	788	885	1335	1463	1238	1125	1238	1575	1350	1125	1088	960 nA

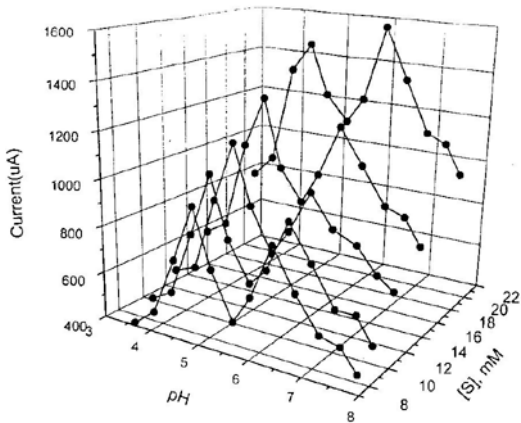


Fig. 6. pH-dependent current responses at the five different concentrations of substrate.

반응임을 말하여 주고 있다. 본 계의 촉매인 과산화효소는 추출된 상태가 아니므로, 전극의 과산화효소 농도 변화에 대한 신호의 함수관계를 관찰하고자 한다면 이는 축조직의 함량 변화에 의하여 조절될 수밖에 없다. 여기서 조직의 함량변화는 탄소반축의 전극표면에 위치할 활성자리의 밀도와 밀접한 관계가 있다. Fig. 5는 축조직의 함량 변화에 대한 감응전류의 변화를 관찰한 것이며, 조직의 함량변화와 감응전류가 직선관계를 보이고 있다. 일반적으로 생체조직을 포함한 전극의 신호는 조직 함량 증가에 따른 활성자리의 증가로 인하여 증가하며, 일정 수준이 지나면 전극의 전도도가 감소하므로 다시 감소하는 경향을 보여준다.^{21a} 그러나 여기서 보여주는 축조직의 경우 14%에 이르기까지 실험 범위 내에서 직선성을 보이는 것은 이상의 경우에도 직선성을 예측할 수 있는 것으로, 보다 크고 안정한 신호를 얻을 가능성을 말하여 준다. Table 1은 축의 함량이 15% 일 때, 여러 기질농도에서 전극의 감응전류가 pH에 따라 변화하는 결과를 얻은 것이며, 이들을 도시할 때 pH에 의한 변화 경향성을 쉽게 확인할 수 있다. 그 도시가 Fig. 6이다. 낮은

pH 영역과 높은 pH영역 즉, pH 4.50과 pH 6.60의 두 pH 값 부근에서 극대값을 보여주고 있다. 고추냉이로 부터 추출된 과산화효소가 두 동위효소로 구성되어 있음이 본 실험실에서 확인되었던 사실에 비추어^{21c,g}, 여기서 보여주는 경향성도 축의 생체조직에 두 동위 과산화효소가 존재하고 있음을 말하여 주고 있다.

효소 촉매작용의 두드러진 특징 중 하나는 기질에 대한 특이성, 즉 방해물질의 효과가 거의 없다는 것이다. 여기서 실험 결과에 영향을 미칠 수 있다고 생각되는 화학종, catechol, L-threonine, L-DOPA, L-ascorbic acid, L-histidine, Dopamine, L-aspartic acid의 7종을 선택하여 신호크기에 미치는 영향을 조사하였다. 이들의 대부분은 과산화수소의 구조에 포함된 -OH기를 모두 포함하고 있으며, 양성자 주계로 활동할 수 있는 것들이다. L-DOPA와 L-aspartic acid의 경우 용해도 관계상 포화용액으로, 그리고 이외의 화학종에 대하여는 0.1 M이 되도록 용해시킨 후 기질용액과 동일 농도가 되도록 투입하여, 투입한 경우와 그렇지 않은 경우의 용액에서 얻어진 신호의 크기를 비교하여 보았다. 실험조건은 Fig. 2의 경우와 동일하다. 대부분의 경우 신호크기에 어떤 영향도 주지 않았다. 그러나 catechol과 dopamine의 경우 신호크기에 영향이 없었으나, 상당히 큰 바탕선의 이동 현상을 보여주었다. 이 결과는 시금치 조직을 혼합한 경우^{21d}와 다소의 차이를 보이는 것이다. 따라서 동식물 조직을 이용하여 과산화수소 정량을 위한 바이오센서를 제작할 경우 각각에 대한 방해물질의 효과는 엄밀히 검토되어야 할 것이다.

4. 결 론

과산화수소의 정량을 위한 전극을 개발하기 위하여 축 조직을 탄소반축에 혼합시켜 전극을 만들고 그것의 전기화학적 특성을 살펴보았다. 생체 조직을 이용하는 효소전극은 신호 측정 시 다음과 같은 공통적

문제점을 지니고 있다. 우선 전극전위 인가 시 형성되는 충전전류가 매우 크며, 이것이 영점 수준으로 감소하기 까지 많은 시간이 걸린다. 이와 같은 현상은 조직이 건조되지 않았을 때 특히 심각한데, 썩 조직의 경우는 건조되지 않았음에도 불구하고 앞서 연구된 것들보다 상당히 짧은 안정화 시간을 보여 주었다. 조직함량 증가에 따른 신호의 경향성은 좋은 직선성을 보여주었다. 이는 전극에 포함되는 과산화효소의 양이 적절히 조절된다면 넓은 기질 농도 범위에 걸쳐 직선성을 보여주는 검정곡선이 얻어질 가능성을 보였다. 또 기질용액의 산성도 프로필은 썩의 과산화효소가 두 종류의 동위효소로 구성되어 있을 가능성을 암시하였다.

참고문헌

1. L. C. Clark, Jr. and C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962).
2. S. J. Updike and G. P. Hicks, *Nature*, **214**, 986 (1967).
3. B. L. Ruiz, E. Dempsey, C. Hua, M. R. Smyth and J. wang, *Anal. Chim. Acta*, **273**, 425-430 (1993).
4. H. Kano, K. Morikage, B. Uno, Y. Esaka and M. Goto, *Anal. Chim. Acta*, **299**, 69-74 (1994).
5. C. L. Rosa, F. Pariente, L. Hernandez and E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta*, **308**, 129-136 (1995).
6. M. Bonakdar, J. L. Vilchez and H. A. Mottola, *J. Electroanal. Chem.*, **266**, 47-55 (1989).
7. a) J. Wang, N. Naser, H. S. Kwon and M. Y. Cho, *Anal. Chim. Acta*, **264**, 7-12 (1992). b) J. Wang and M. S. Lin, *Anal. Chem*, **60**, 1545-1548 (1988).
8. M. C. Messia, D. Compagnone, M. Esti and G. Palleschi, *Anal. Chem.*, **68**, 360-365 (1996).
9. N. Conrath, B. Grundig, S. Huwel and K. Cammann, *Anal. Chim. Acta*, **309**, 47-52 (1995).
10. M. D. Luque de Castro and J. M. Fernandez-Romero, *Anal. Chim. Acta*, **311**, 281-287 (1995).
11. J. I. Lee and I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, **313**, 69-74 (1995).
12. J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1048-1050 (1998).
13. J. R. Kirchner, "Encyclopedia of Chemical Technology", Vol. 13, 12, Wiley-Interscience, New York, U. S. A., 1981.
14. N. Irving Sax, "Hawley's Condensed Chemical Dictionary", 618, Van Nostrand Reinhold, New York, U. S. A., 1987.
15. a) C. E. Huckaba and F. G. Keyes, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1640-1644 (1948). b) E. C. Hudris and H. Jr. Romeyn, *Anal. Chem.*, **26**, 320-325 (1954).
16. a) P. A. Clapp, D. F. Evans and T. S. S. Sheriff, *Anal. Chim. Acta*, **218**, 331-334 (1989). b) T. Nakano and A. Takahashi, *Anal. Sci.*, **6**, 823-826 (1990).
17. a) Y. Fang, R. Cai and J. Deng, *Electroanalysis*, **4**, 819-822 (1992). b) H. S. Kwon, K. K. Kim and C. G. Lee, *J. Kor. Chem. Soc.*, **40**, 4, 278-282 (1996).
18. a) A. Mansouri, D. P. Makris and P. Keflas, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**, 22-26 (2005). b) F. R. P. Rocha, E. R. Torralba, B. F. Reis, A. M. Rubio and M. Guardia, *Talanta*, **67**, 673-677 (2005). c) K. F. Fernandes, C. S. Lima, F. M. Lopes and C. H. Collins, *Process Biochem.*, **40**, 3441-3445 (2005). d) J. Wang, H. Ye, Z. Jiang, N. Chen and J. Huang, *Anal. Chim. Acta*, **508**, 171-176 (2004). e) A. Economou, P. D. Tzanavaras, M. Notou and D. G. Themelis, *Anal. Chim. Acta*, **505**, 129-133 (2004). f) C. Lau, J. Lu and M. Kai, *Anal. Chim. Acta*, **503**, 235-239 (2004).
19. a) B. Tang and Y. Wang, *Spectrochim. Acta, Part A*, **59**, 2867-2874 (2003), b) C. Q. Zhu, S. J. Zhuo, J. L. Chen, Y. Q. Wu, Y. X. Li, D. H. Li, H. Zheng and J. G. Xu, *Anal. Chim. Acta*, **514**, 247-252 (2004). c) M. Wu, Z. Lin, M. Schaferling, A. Durkop, and O. S. Wolfbeis, *Anal. Biochem.*, **340**, 66-73 (2005). d) S. Svensson, A. C. Olin, M. Larstad, G. Ljungkvist and K. Toren, *J. Chromatogr. B*, **809**, 199-203, (2004). e) W. J. Beurden, M. J. Bosch, W. C. Janssen, F. W. Smeenk, P. N. Dekhuijzen and G. A. Harff, *Clin. Lab.*, **49**, 637 (2003).
20. a) X. Wang, H. Zhang, E. Wang, Z. Han and C. Hu, *Mater. Lett.*, **58**, 1661-1664 (2004). b) Y. Li, W. Bu, L. Wu and C. Sun, *Sens. Actuators B*, **107**, 921-928 (2005), c) Y. Yang and S. Mu, *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 74-78 (2005), d) K. I. Ozoemena, Z. Zhao and Nyokong, *Electrochem. Comm.*, **7**, 679-684, (2005).
21. a) K. J. Yoon, S. Y. Pyun and H. S. Kwon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **41**, 7, 343-356 (1997). b) K. J. Yoon, K. J. Kim and H. S. Kwon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **43**, 3, 271-279 (1999). c) K. J. Yoon, B. G. Lee and H. S. Kwon, *Anal. Sci. Tech.*, **13**, 1, 41-48 (2000). d) B. G. Lee, K. J.

- Yoon and H. S. Kwon, *Anal. Sci. Tech.*, **13**, 3, 315-322 (2000). e) K. J. Yoon, *Anal. Sci. Tech.*, **16**, 6, 504-508 (2003). f) K. J. Yoon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **48**, 6, 654-658 (2004). g) *Bull. Korean Chem. Soc.*, **25**, 7, 997-1002 (2004). h) K. J. Yoon, H. S. Kwon and B. G. Lee, *J. Kor. Chem. Soc.*, **49**, 3, 325-328 (2005).
22. a) L. Coche-Guerente, *Anal. Chim. Acta*, **311**, 23-30 (1995). b) J. Wang, Z. Zhang and M. Prakash, *Anal. Chim. Acta*, **395**, 11-16 (1999). c) J. Wang, J. W. Mo, S. Li and J. Porter, *Anal. Chim. Acta*, **411**, 183-189 (2001). d) J. Wang, S. Li, J. W. Mo, J. Porter, M. M. Musameh and P. K. Dasgupta, *Biosensors & Bioelectronics*, **17**, 999-1003 (2002).
23. a) M. Dixon, C. W. Edwin, "Enzymes", 633, Academic Press Inc., New York, U. S. A., 1979. b) M. Mascini, M. Iannello and G. Palleschi, *Anal. Chim. Acta*, **138**, 65-69, (1982).