

금속이 첨가된 탄소전극의 전기화학적 특성과 이를 이용한 L-lactate 바이오센서의 개발

윤 현 철,† 김 학 성
한국과학기술원 생물과학과

Electrocatalytic Properties of Metal-dispersed Carbon Paste Electrodes for Reagentless L-lactate Biosensors

Hyun C. Yoon and Hak-Sung Kim†

Dept. of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology,
Taejon 305-701, Korea

ABSTRACT

Metal dispersed carbon paste electrodes were fabricated, and their electrochemical properties were investigated. Among various metal dispersed carbons, platinum-dispersed carbon paste electrode showed most efficient electrocatalytic characteristics. The overpotential for the oxidation of NADH was significantly lowered in the platinum-dispersed carbon paste electrode, and catalytic current was also enhanced. Based on these electrocatalytic observations, L-lactate biosensor using L-lactate dehydrogenase was constructed to evaluate its performance in terms of sensitivity and stability.

서 론

NAD(P)⁺-dependent dehydrogenase는 산화환원 효소중 가장 광범위한 부분을 차지함에도 불구하고 바이오센서에의 응용은 제한되어 왔다(1). 그 이유는 크게 세 가지로 나누어 볼 수 있다. 첫째, dehydrogenase를 이용한 효소 전극은 그 반응에 수용성의 조효소가 필수적이기 때문에 이를 전극표면에 효소와 함께 부동화시킬 수 있어야 한다. 둘째로, NAD⁺/NADH 산화 환원 쌍의 낮은 redox potential(SCE 대비 pH 7.0에서 -560mV) (2)에 의하여 즉, NAD⁺의 낮은 산화능(oxidizing power)으로 인해 우리가 목적하는 반응의 반대방향으로 평형

이 기운다는 것이다. 따라서 생성되는 산물을 제거하거나(3) 또는 이차의 효소를 첨가하여 반응의 평형을 유지하여야 한다(4). 또한, NADH의 전기적 산화를 측정 시스템으로 이용하는 경우에는 효소 반응을 통하여 생성되는 NADH가 역반응에 이용되기 전에 산화될 수 있도록 전극물질과 효소간의 거리를 가깝게 유지함으로써 원하는 방향의 반응을 유도하여야 한다. 마지막으로, NAD⁺/NADH의 비가 역적인 전기 화학적 특성과 이에 따른 산화, 환원 시에 요구되는 높은 overpotential, 그리고 이러한 높은 전위에서 일어나는 전기화학적 부반응에 의한 문제점을 들 수 있다(5).

이러한 NAD⁺-dependent dehydrogenase를 이용한 바이오센서의 문제점을 해결하기 위해 탄소전극(carbon paste electrode)의 유용성이 제시되었

† Corresponding Author

다(6). Carbon paste electrode(CPE)는 탄소(graphite나 activated carbon)를 전극물질로서 뿐만 아니라 효소와 조효소의 고정화담체로써 이용하고 여기에 mineral oil, liquid paraffin 등의 결합제를 첨가하여 paste 형태로 만들어 이를 전극모양으로 압착한 것을 말한다. 이러한 형식의 전극을 통하여 조효소의 안정적인 공급이 가능하고, 효소와 전극물질과의 가까운 접촉에 의하여 생성된 NADH를 효과적으로 산화시켜 반응의 평형을 원하는 방향으로 할 수 있으며, 또한 전자전달 매개체(electron transfer mediator)나 효소 안정제 등을 도입하여 전극의 기능을 향상시킬 수 있다. 특히 최근에는 전자전달 매개체에 대한 연구가 활발히 수행되고 있는데(7, 8), 이러한 mediated electrode는 전자전달 매개체의 leakage로 인하여 바이오센서 응용에 중요한 요건인 안정성이 떨어지는 문제와 전자전달 매개체에 의한 독성이 해결해야 할 문제점으로 남아있다(9, 10).

본 연구에서는 위의 문제점들을 해결하고자 electrocatalytic activity를 갖는 금속이 분산되어 있는 carbon paste electrode에 대한 전기 화학적 연구를 수행하였고, 제작된 전극에서 NADH의 산화에 대한 전기 화학적 특성에 관한 연구를 수행하였다. 또한 임상진단과 스포츠 과학에서 중요성이 증가되고 있는 L-lactate의 측정을 위하여 L-lactate dehydrogenase를 이용한 바이오센서를 개발하고 제작된 바이오센서의 분석성능에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시약

L-lactate dehydrogenase(L-LDH, EC 1.1.1.27, Sigma type XI, from rabbit muscle, 850 Units/mg), L(+)-lactate(lithium salt), β -nicotinamide adenine dinucleotide(β -NAD, grade III)와 β -nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form(β -NADH, grade III)은 Sigma사로부터 구입하였으며 더이상의 정제과정 없이 사용하였다. Graphite, activated carbon, platinum dispersed carbon, ruthenium dispersed carbon, palladium dispersed carbon, mineral oil은 Aldrich에서 구입하여 이용하였다. 이외에 사용한 모든 시약은 analytical grade 이었으며, 실험에 이용된 모든 용액은 이차증류수를 사용하여 제조하였다. Supporting electrolyte로는 potassium phosphate buffer(0.05M pH 8.20)를 이용하였다.

실험 장치

Voltammetry 및 amperometry 실험은 EG & G Princeton Applied Research사의 Model 362 Potentiostat을 이용하여 수행하였다. Potentiostat 으로부터의 출력은 peripheral interface card(PC-LabCard, PCL 812, Advantech Co., Taiwan)를 장착한 IBM-PC compatible을 이용하여 얻을 수 있었으며, interface card는 -1V에서 +1V의 signal을 얻을 수 있는 16 channel A/D converter로 구성된다. 시스템의 구동은 연구실에서 C-언어로 직접 제작한 software를 이용하였다.

Carbon paste electrode의 제작

Carbon paste는 carbon과 mineral oil을 혼합하여 제작한다. 우선 carbon과 metal dispersed carbon을 각각 같은 metal 함량이 되도록 혼합하고 여기에 mineral oil을 첨가한 후 10분간 다시 혼합하여 균질의 paste를 조성하였다. 이를 내경 2 mm의 nylon 관에 채우고 그 표면을 emery paper로 연마하였다. Nylon 관의 한쪽 끝에는 외경 2 mm의 구리 막대를 삽입하여 이를 외부 회로와 연결하였다. Lactate 바이오센서의 제작을 위해서는 위의 전극 혼합물에 lactate dehydrogenase와 NAD^+ 를 첨가하였다. 각 구성성분의 조성은 다음과 같다. 우선 5 mg의 lactate dehydrogenase를 9 mg의 NAD^+ , 80 mg의 carbon과 잘 혼합한 후, 여기에 결합제로써 mineral oil을 90 μL 첨가한 후 다시 잘 혼합한다. CPE의 조립 및 연마는 위에 기술한 대로 수행하였으며, 준비된 바이오센서는 질소가스 하, 섭씨 4도에서 보관하였다.

Electrochemical measurements

Cyclovoltammetry와 amperometry는 3 mL volume의 실험실에서 제작된 electrochemical cell 내에서 수행되었다. 실험은 삼전극계를 이용하여 수행되었으며 기준전극으로는 BAS사(Bioanalytical system, USA)의 Ag/AgCl 기준전극(3M NaCl)을 이용하였고 counter electrode로는 백금선을 사용하였다. 모든 실험은 상온에서 수행되었고 supporting electrolyte로는 0.05 M potassium phosphate buffer(pH 8.2)를 이용하였다. Amperometry 실험을 위해서는 전극에 Ag/AgCl 대비 480 mV의 전압을 가하고 background current를 안정화시킨 후 표준 L-lactate 용액을 micropipette로 주입하고 교반한 후 이때 생성된 정상상태의 전류신호를 측정하였다.

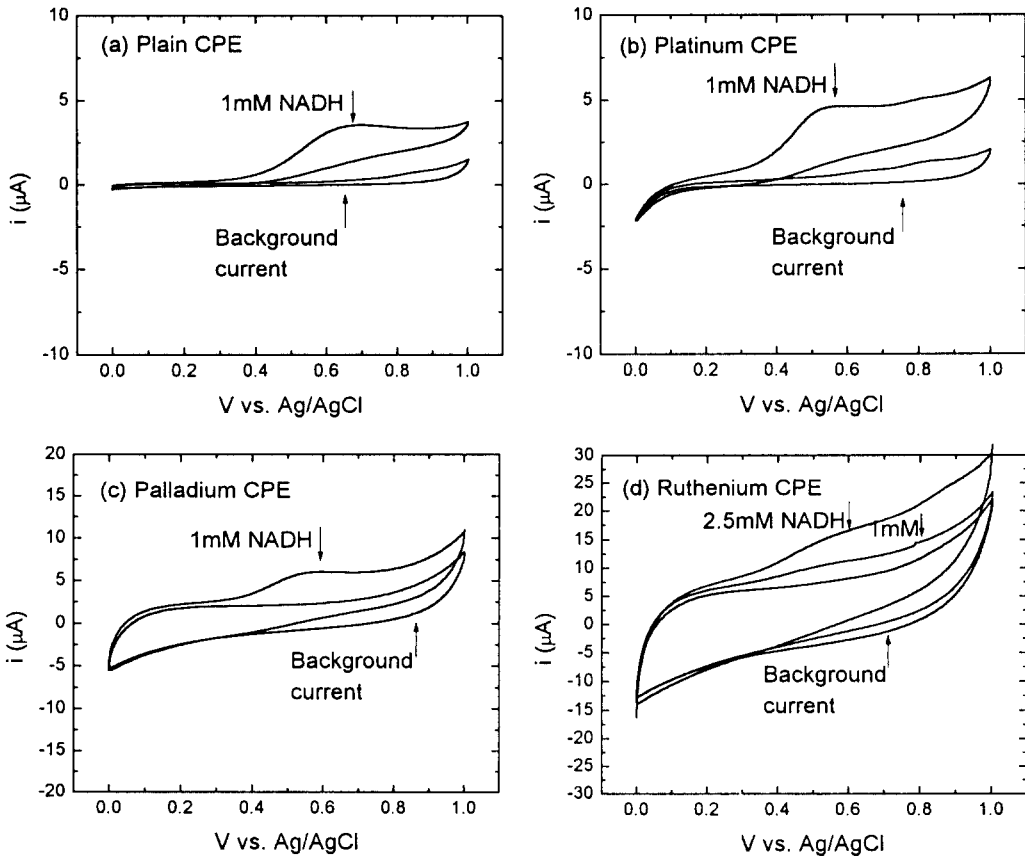
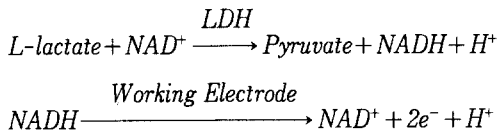


Fig. 1. Cyclovoltammograms for 1mM NADH recorded at the plain carbon paste electrode (a), platinum dispersed CPE (b), palladium dispersed CPE (c), and at the ruthenium dispersed CPE (d). Conditions: scan rate 5mV/sec, 0.05M potassium phosphate buffer of pH 8.25.

L-lactate dehydrogenase를 이용한 L-lactate 바이오센서의 측정반응은 다음과 같다.



Voltammetry 실험에서는 용액을 교반하지 않고 linear sweep의 조건으로 전류-전압 관계를 관찰하였다. 사용된 표준용액은 매일 새로 제조하여 이용하였다.

결과 및 고찰

금속이 첨가된 탄소전극의 전기화학적 특성

센서반응의 전기적 산화물질인 NADH에 대한 전기화학적 특성을 파악하기 위하여 금속이 첨가된 탄소전극과 금속이 첨가되지 않은 탄소전극에 대하여 cyclic voltammetry를 수행하였다. Fig. 1은 plain carbon paste electrode와 platinum, palladium, ruthenium이 각각 첨가된 carbon paste electrode의 NADH에 대한 cyclovoltammogram을 나타낸다. 각각의 metal dispersed carbon에서 금속의 함유율이 다르기 때문에 이를 동량이 되도록 plain carbon과 혼합하여 전극을 제작하였다. 실험에 이용된 NADH의 농도는 1 mM로 하였고 scan rate은 5 mV/s로 하였다. Plain CPE의 경우에는 NADH에 대한 산화전류는 Ag/AgCl 기준전극 대비로 300 mV에서부터 발달하기 시작하였으며, 최대 peak은 660 mV에서 검출되었고 1 mM NADH에

대한 peak의 크기는 약 $3 \mu\text{A}$ 였으며 이는 기존의 연구결과와 일치하는 것이다(11)(Fig. 1a). Platinum dispersed CPE의 경우, 산화전류는 100 mV에서부터 발달하기 시작하였고 peak는 520 mV에서 검출되었으며 peak 크기는 $4.5 \mu\text{A}$ 로써 plain CPE에 비하여 140 mV의 overvoltage lowering을 나타내었다. 또한 Platinum CPE에서는 plain CPE와 유사한 크기의 background current를 나타내었다(Fig. 1b). Palladium CPE의 경우에는 산화전류는 200 mV에서부터 발달하기 시작하였고 산화 peak는 550 mV에서 측정되었으며 peak current는 $6 \mu\text{A}$ 로써 plain CPE에 비하여 overvoltage가 110 mV 낮아졌다(Fig. 1c). 마지막으로 조성된 ruthenium 이 첨가된 CPE의 경우에는 산화전류가 100 mV의 낮은 전위에서부터 발달하기 시작하였고 산화 peak는 520 mV에서 검출되었으며 peak current는 $7 \mu\text{A}$ 로 가장 크게 나타났다. 또한 plain CPE에 대하여 overvoltage는 140 mV 정도 낮아지는 결과를 나타내었다(Fig. 1d). 그러나 ruthenium CPE에서는 background current가 $20 \mu\text{A}$ 로 크게 발달하여 NADH에 대한 산화 peak의 검출이 어렵고 chronoamperometry 실험에서 이러한 capacitive current를 안정화시키는 데 많은 시간이 소요되었으며, 또한 안정화된 background current의 크기도 상대적으로 크기 때문에 바이오센서의 적용에 어려움이 따르게 된다. 이러한 관점에서 overpotential의 감소가 크고 background current의 크기가 작은 platinum dispersed carbon을 lactate 바이오센서의 전극물질로써 채택하게 되었다. 금속이 첨가된 탄소전극에서 overpotential이 낮아지는 현상은 electrocatalytic한 활성을 갖고 있는 분산된 metal micro-particle에 기인한 것으로 생각된다.

Carbon paste electrode는 그 전극물질이 전체적으로 전기전도성을 지니게 되며 supporting electrolyte 내의 시료는 carbon paste를 통하여 전극의 표면에서부터 안쪽으로 확산되어 들어오게 되고 NAD⁺는 NADH로 환원된다. 이러한 관점에서 실제 바이오센서의 작용시 paste의 내부에서 생성될 수 있는 NADH의 전기적 산화를 관찰하기 위하여 목적 analyte인 NADH를 paste내부에 위치시킨 상태에서의 cyclic voltammetry를 수행하였다. Fig. 2와 같이 paste 내부에 위치한 NADH는 supporting electrolyte 내의 NADH와는 상이한 cyclovoltammogram을 나타내었다. Paste 내에 균일하게 분산된 NADH의 경우에서 NADH는 전극물질과

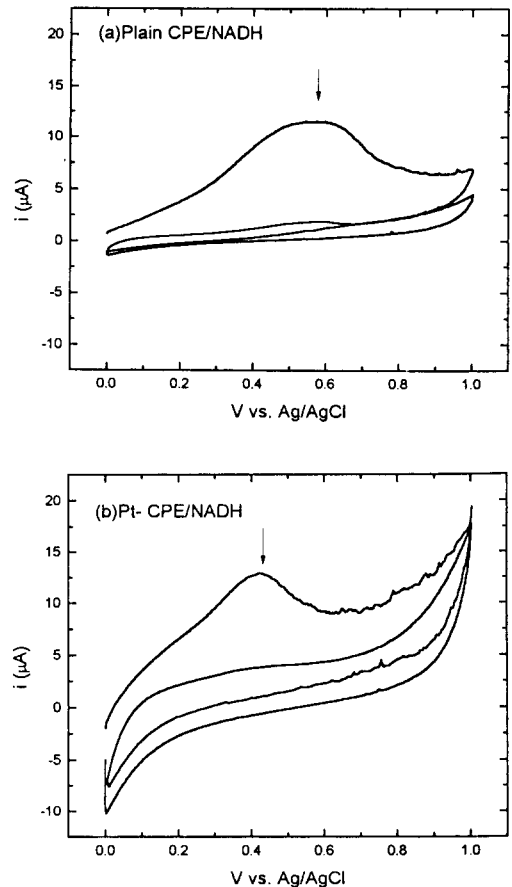


Fig. 2. Cyclovoltammograms for NADH incorporated in the paste (5.1% w/w) recorded at the plain CPE (a) and at the platinum dispersed CPE (b). Conditions: as in Fig. 1.

동시에 고정화담체로 이용되는 carbon이나 metal dispersed carbon에 상대적으로 가깝게 위치하게 된다. 따라서 도출되는 cyclovoltammogram은 수용액상의 NADH에 대한 cyclovoltammogram에 비하여 더욱 낮은 전위에서 산화 peak가 나타나며 더욱 좁은 peak의 형상을 나타낸다. Fig. 2에서와 같이 plain CPE의 경우에는 산화 peak potential이 Ag/AgCl 기준전극 대비로 550 mV에서 나타나며, platinum dispersed CPE의 경우에는 410 mV에서 peak가 발달하게 된다. 이와 같이 paste내에 위치하는 NADH의 경우에도 plain CPE와 platinum CPE의 간의 overpotential의 차이는 그대로 유지됨을 관찰할 수 있다. 또한 Fig. 2b에서는 분산되어있

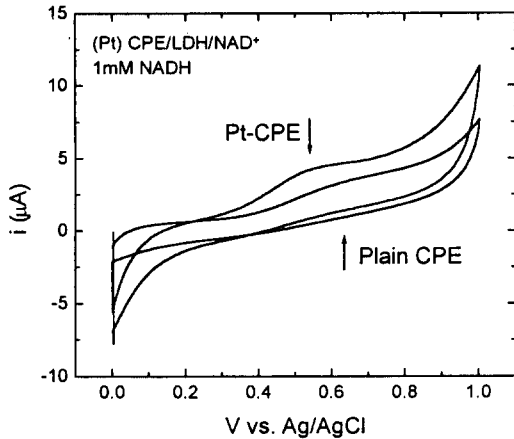


Fig. 3. Cyclic voltammograms for 1mM NADH obtained at the plain CPE/LDH/NAD⁺ and at the Pt-CPE/LDH/NAD⁺. Conditions: as in Fig. 1.

는 metal microparticle에 의한 background current의 증가를 관찰할 수 있었다. 실험의 결과로 나타난 cyclic voltammogram을 상세히 관찰하여 보면, 0 mV 부근에서부터 산화전류가 생성됨을 관찰할 수 있다.

마지막으로 실제 lactate 바이오센서와 같은 조성의 전극에서 NADH에 대한 cyclic voltammetry를 수행하였다. Plain CPE의 경우에는 1 mM NADH에 대한 산화 peak가 700 mV에서 검출되었으며 peak의 크기는 3 μA 였다. 또한 platinum dispersed CPE의 경우에서 산화 peak는 약 480 mV에서 검출되었고 peak의 크기는 4 μA 였다(Fig. 3). 이와 같은 결과를 토대로 할 때, platinum CPE를 채용할 경우 plain CPE보다 낮은 전위(480 mV)에서 바이오센서를 이용할 수 있고, 따라서 간섭물질의 영향을 어느 정도 배제할 수 있을 것이며, 또한 증가된 peak current에 의한 sensor sensitivity의 증가를 기대할 수 있기 때문에 platinum CPE를 L-lactate 바이오센서의 전극물질로 선정하였다.

L-lactate 바이오센서(Pt-CPE/LDH/NAD⁺)의 응답 특성

Operating potential

바이오센서의 운전전위(operating potential)에 따른 CPE와 Pt-CPE lactate 바이오센서의 신호양상은 Fig. 4와 같다. 전위에 따른 바이오센서 신

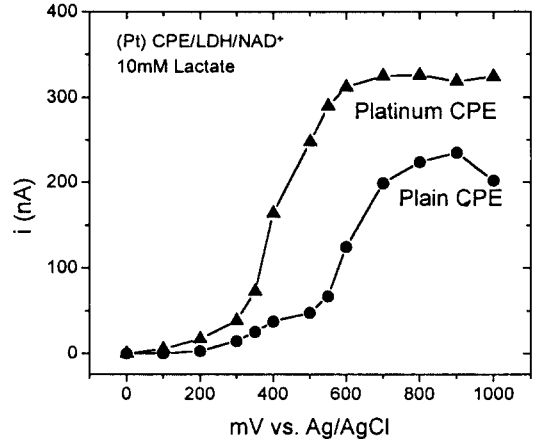


Fig. 4. Dependence of biosensor response to 10mM L-lactate on the applied potential at the plain CPE/LDH/NAD⁺ and at the Pt-CPE/LDH/NAD⁺. Each experiment was conducted with a freshly prepared biosensor. Other conditions as in Fig. 1, except the electrolyte temperature was 26°C.

호의 증가는 sigmoidal curve로 얻어졌으며 plain CPE를 이용한 L-lactate 바이오센서의 경우 신호는 Ag/AgCl 기준전극 대비 400 mV 수준에서부터 검출되기 시작하여 550 mV에서부터 급격히 증가하며 800 mV 이상에서는 포화상태에 이르는 패턴을 보였으며 platinum이 첨가된 lactate 바이오센서의 경우에는 10 mM lactate에 대한 신호가 200 mV에서부터 검출되기 시작하여 350 mV에서부터 급격히 증가하여 600 mV에서는 포화 상태에 이르렀다. 이는 용액상의 NADH에 대한 cyclic voltammetry와 유사한 양상을 나타내는 것이다. 개발된 바이오센서의 운전전위의 결정을 위한 위의 실험에서 신호의 크기 즉, 센서 sensitivity관점에서는 600 mV 이상에서의 operation이 유리하다. 그러나 바이오센서의 효율적인 이용을 위해 background current의 안정이 빠르며, cyclic voltammogram에서 NADH 산화의 peak potential인 480 mV를 운전전위로 결정하였다. Ag/AgCl 기준전극 대비 480 mV에서의 센서운용의 경우 charging current의 안정화와 시료의 주입, 센서신호의 안정과 측정에 소모되는 시간은 총 3분을 넘지 않도록 할 수 있었다.

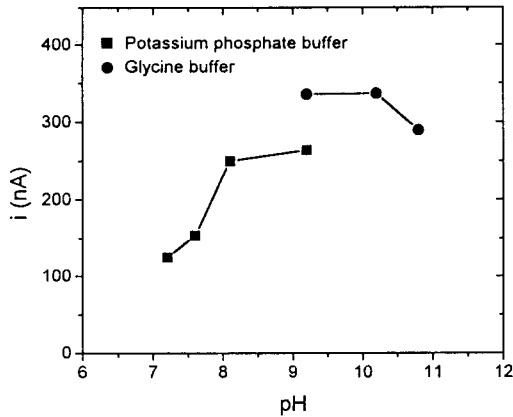


Fig. 5. Dependence of biosensor response to 10mM L-lactate on the solution pH. Conditions: as in Fig. 4.

전극제작의 최적화 및 측정조건

Pt-CPE의 전극물질인 platinum dispersed carbon의 전기전도성을 유지하고, 충분한 기계적 강도를 가지며, 효율적인 생체물질의 고정화를 위해서는 paste 조성시 결합제와 carbon의 비율이 중요하다. 결합제의 함량이 증가함에 따라 신호의 크기는 줄어드는 것이 관찰되었으며 이는 mineral oil의 dielectric 특성에 따른 확산 장벽의 형성에 기인하는 것으로 판단된다. 그리고 최적의 결합제의 함량은 46 % (w/w)으로 관찰되었으며 이 조건하에서 response surface analysis를 통하여 최적의 함량을 결정하였다. 결정된 조성은 platinum dispersed carbon(46 % w/w), mineral oil(46 %), lactate dehydrogenase (2.9 %), NAD^+ (5.1 %)였으며 이후의 실험은 이 조건에서 수행되었다. 이렇게 결정된 platinum CPE lactate 바이오센서의 조성과 운전전위(working potential, 480 mV vs Ag/AgCl)하에서 supporting electrolyte의 pH에 따른 센서신호의 변화를 살펴 보았다(Fig. 5). 고정화된 효소의 경우에는 이를 감싸고 있는 미세환경의 변화에 의해 효소반응이 영향을 받게 된다. 따라서 효과적인 바이오센서의 운용을 위하여 이러한 실험이 amperometry를 통하여 수행되었다. 반복적인 실험을 통해서 pH 7.2 ~ 10.8까지의 amperometry가 수행된 결과 넓은 pH 의존성이 나타났으며 바이오센서의 최대 sensitivity는 pH 9에서 검출되었다. 이는 수용액 내에서의 lactate dehydrogenase에 대한 최적 pH인 9.2

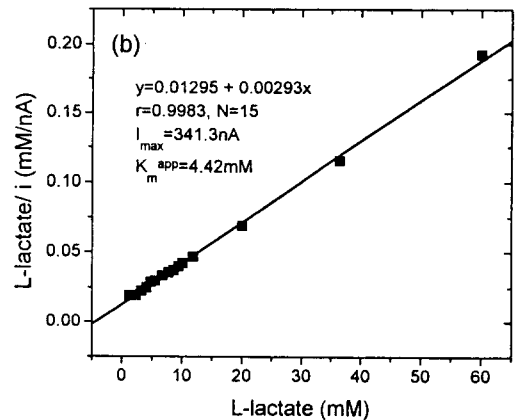
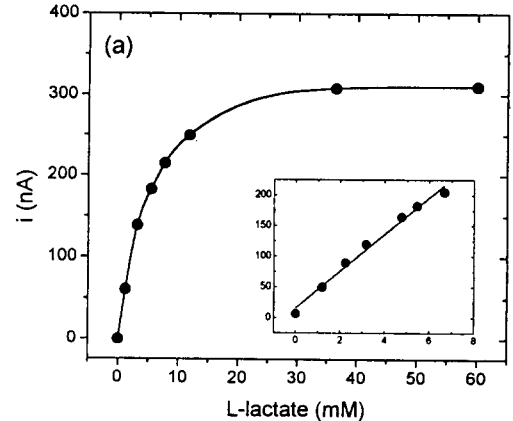


Fig. 6. (a) Typical calibration curve of the Pt-CPE/LDH/ NAD^+ for L-lactate. Conditions: applied potential, 480mV, temperature, 26°C, electrolyte, 0.05M potassium phosphate buffer (pH 8.2). (b) Hans-Woolf plot for the calibration data of the L-lactate biosensor.

와 유사한 결과이다(12). 관찰된 넓은 pH 의존성과 효소 안정성의 관점에서 바이오센서를 이용한 측정 은 pH 8.2에서 수행하였다.

L-Lactate 바이오센서의 성능

먼저 전극조성과 측정변수들이 최적화된 lactate 바이오센서를 이용한 calibration curve를 구하였다. Calibration은 0.9 mM에서 60 mM 범위의 L-lactate에 대하여 수행되었다. Fig. 6a와 같이 센서 신호는 시료의 농도에 따라 전형적인 Michaelis-

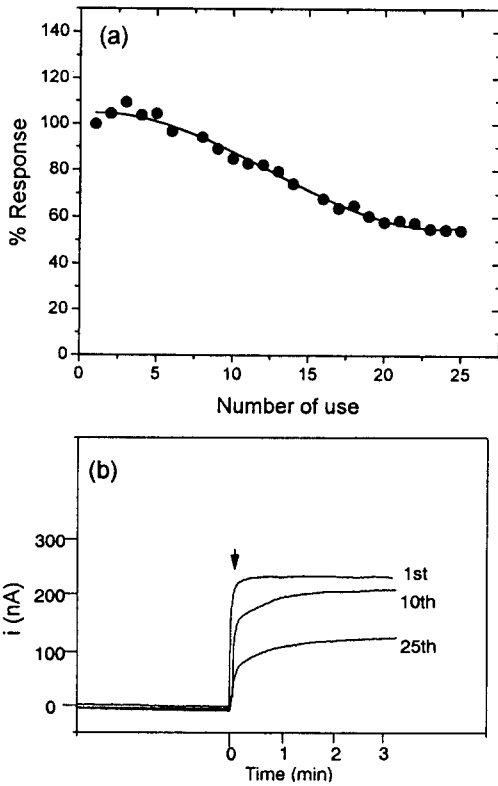


Fig. 7. Operational stability of the Pt-CPE/LDH/ NAD^+ (a) and the response patterns (b). Between each analysis, the biosensor was kept in buffer solution at room temperature.

Menten kinetics를 나타내었다. 효소반응이 율속단계인 조건에서 calibration curve는 Michaelis-Menten kinetics를 따르며, 선형응답 범위는 7 mM 까지 였다($r=0.995$)(Fig. 6a). 바이오센서의 측정 한계(detection limit)는 signal to noise ratio(S/N)를 3으로 할 때 91 μM 이었고 반응시간은 90 % 신호기준으로 9초 내외였다. 이와 같은 전극반응을 효소반응에 대한 식으로 나타내면 다음과 같다.

$$I_{SS} = I_{max} \frac{S}{K_m^{app} + S}$$

여기서 I_{max} 는 최대 전류신호의 크기, I_{SS} 는 정상상태의 전류신호의 크기, K_m^{app} 는 apparent Michaelis-Menten 상수, S 는 측정시료의 농도를 나타낸다. 이를 Hans-Woolf plot으로 바꾸어 나타내면 아래 식

과 같다(Fig. 6b).

$$\frac{S}{I_{SS}} = \frac{K_m^{app}}{I_{max}} + \frac{S}{I_{max}}$$

계산된 I_{max} 는 341.3 nA이었으며 K_m^{app} 는 4.42 mM 이었다.

개발된 바이오센서의 실제적인 이용을 위해서는 센서의 안정성이 중요하다. 따라서 lactate 바이오센서의 operational stability의 측정을 위하여 한 개의 센서를 연속적으로 이용하는 조건에서 10 mM lactate에 대한 신호의 변화를 관찰하였다. 실험은 상온에서 수행하였으며 각각의 측정사이에는 센서를 완충용액내에서 보관하였다. Fig. 7a와 같이 8회까지의 이용에서는 초기 신호의 90 % 수준의 신호를 얻을 수 있었으며 25회의 이용 후에도 55 %의 신호가 검출되었다. 첫번째, 10번째, 25번째의 바이오센서 신호패턴은 Fig. 7b와 같다. 첫번째의 이용에서의 반응시간은 5초이었으며 이후로 점점 늦어지는 양상을 보였다. 따라서 위의 전극을 연속적으로 사용할 경우 약 7~8회의 이용이 가능하였다. 특히 여러번 사용된 전극을 다시 emery paper로 연마한 경우 초기신호의 크기와 반응시간을 다시 회복하는 것으로 관찰되었다. 또한 장기간의 저장 안정성에 대한 실험을 수행한 결과, 섭씨 4도, 질소가스하에서는 4개월 이상 바이오센서의 신호가 90 % 이상 유지됨이 관찰되었다.

위와 같은 결과를 통하여 platinum이 첨가된 carbon paste electrode를 이용한 lactate 바이오센서를 개발하였으며 이와 같은 결과의 원리를 다른 dehydrogenase type의 바이오센서 개발에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

Carbon paste electrode를 채용함으로써 L-lactate 측정용의 전기화학식 바이오센서를 성공적으로 개발할 수 있었다. 특히 뛰어난 electrocatalytic activity를 갖는 platinum이 첨가된 platinum-CPE를 이용하여 낮은 전위에서의 NADH 의 전기적 산화가 가능하였다. Enzyme(lactate dehydrogenase)과 NAD^+ 를 carbon paste형식으로 직접 제조함으로써 L-lactate 측정을 위한 성공적인 바이오센서의 개발이 가능하였다. 위와 같은 개발연구를 통하여 다른 NAD^+ -dependent dehydrogenase를 채용한 바이오센서로의 적용이 기대된다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 '95 특정기초연구과제의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. L. Gorton, E. Csoregi, E. Dominguez, J. Emneus, G. Jonsson-Pettersson, and G. Marko-Varga(1991), *Anal. Chim. Acta*, **250**, 203.
2. W. M. Clark(1960), *Oxidation-Reduction Potentials of Organic Systems*, William and Wilkins, Baltimore.
3. F. Lazaro, M. D. Luque de Castro, and M. Valcarcel(1987), *Anal. Chem.*, **59**, 1859.
4. L. Gorton and A. Hedlund(1988), *Anal. Chim. Acta*, **213**, 91.
5. H. K. Chenault and G. M. Whitesides(1987), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **14**, 147.
6. J. Kulys and H. E. Hansen(1994), *Biosensors & Bioelectronics*, **9**, 491.
7. J. Kulys, H. E. Hansen, T. Buch-Rasmussen, J. Wang, and M. M. Ozsoz(1994), *Anal. Chim. Acta*, **288**, 193.
8. P. C. Pandey, A. M. Kayastha, and V. Pandey(1992), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **33**, 139.
9. L. Gorton, A. Torstensson, H. Jaegfeldt, and G. Johansson(1984), *J. Electroanal. Chem.*, **161**, 103.
10. P. N. Bartlett(1990), *Biosensor Technology Fundamentals and Applications*, (Buch et al, eds), Marcel Dekker Inc., New York, 95.
11. J. Moiroux and P. J. Elving(1978), *Anal. Chem.*, **50**, 1056.
12. J. J. Holbrook, A. Liljas, S. J. Steindel, and M. G. Rossmann(1975), eds, *The enzymes* Vol. 11, 3rd ed, Academic Press, 191.