

## 부틸고무를 결합재로 사용한 바이오센서의 전기화학적 성질

최 세 영 · 윤 길 중<sup>†</sup>

청주대학교 응용과학부

(2006년 9월 19일 접수, 2006년 11월 16일 수정 및 채택)

## Electrochemical Properties of Biosensor with Butyl Rubber Binder

Sei-Young Choi and Kil-Joong Yoon<sup>†</sup>

Division of Applied Sciences, Cheongju University, Cheongju 360-764, Korea

(Received September 19, 2006, Revised & accepted November 16, 2006)

**요 약 :** 부틸고무를 결합재로 사용하여 과산화수소 정량 바이오센서를 제작하고, 그것의 전기화학적 특성과 실용화 가능성을 살펴보았다. 전극은 본 실험실에서 연구되었던 실리콘 오일을 결합재로 사용한 동식물조직 바이오센서보다 수백 배 이상 큰 신호를 보여주었으며, 0.0 ~ -1.00 V(vs. Ag/AgCl)의 넓은 퍼텐셜 영역에서 안정적으로 작동될 수 있었다. 또 신호전류는 실험 퍼텐셜 영역에서 전극전위에 따라 좋은 직선성을 보였다. 검출한계는  $3.0 \times 10^{-4}$  M 이었으며, Lineweaver-Burk 도식의 직선성은 효소가 전극 표면에 효과적으로 고정되어 있음을 확인시켜 주었다. 높은 감도에 의한 신호전류의 재현성과, 부틸고무의 결합력에 의한 전극물질의 기계적 안정성은 전극의 실용화 가능성을 보여 주었다.

**ABSTRACT :** An enzyme electrode bound by butyl rubber was newly constructed for the determination of hydrogen peroxide and for the practical application as a biosensor. Then its electrochemical properties were investigated. It produced a hundreds-fold increased signal compared to the plant or animal tissue based biosensor studied previously and could be run at between 0.0 ~ -1.0 V(vs. Ag/AgCl). The relationship between signal and electrode potential was linear in the experimental range of potential. It showed a detection limit of  $3.0 \times 10^{-4}$  M and a very good linearity of Lineweaver-Burk plot giving the proof of a good enzyme immobilization. Especially, both the reproducibility of signal current due to its high sensitivity and mechanical stability presented a new possibility for the practical use of biosensor bound with butyl rubber.

**Keywords :** butyl rubber, biosensor, enzyme electrode, hydrogen peroxide, horseradish peroxidase

### I. 서 론

바이오센서가 실용화되기 위하여 결합재가 가져야 할 조건은 기계적 및 화학적 안정성, 효소와의 상용성, 가공성, 전도성, 내마모성 등 이다.<sup>1,2</sup> 고성능센서를 산업적으로 실용화하고자 할 때 위와 같은 문제점들의 해결은 대단히 중요하다. 일반적으

로 사용되고 있는 효소 고정법에는 물리적 흡착, 기능성 분자와 공유결합, 고분자 필름의 이용, 그리고 전극물질 내에 혼합시켜 고정하는 방법 등<sup>3</sup>이 다양하게 이용되고 있다. 본 실험실에서는 동식물의 조직을 전극에 혼합시키는 방법<sup>4-6</sup> 들 중 탄소반죽을 이용하는 방법을 택하여 과산화수소 감응 효소전극을 제작하고, 그것들의 전기화학적 성질을 수 차례 발표한 바 있다.<sup>7,8</sup> 탄소반죽 전극의 최대 장점은 제작이 용이하고 감응시간이 짧은 것

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

을 그 특징으로 한다. 따라서 효소를 고정시킨 탄소반죽 전극은 단시간에 걸쳐 효소의 전기화학적 특성을 연구하기에 대단히 효율적이다. 그러나 비휘발성 실리콘 오일이 전극물질의 결합재(binder)로 사용되므로, 실용화는 절대적으로 불가능하다. 1958년 R. Adams 에 의하여 전기화학 분석에 도입된 탄소반죽전극은 지금도 효소의 특성 연구 분야에서 유용하게 이용되고 있다. 그러나 50여년이 지난 지금도 실용화되지 못하고 있는 것은 전극 물질이 앞서 언급된 전극으로서의 요건들을 충족시키지 못하고 있기 때문이다.<sup>9</sup> 본 실험실에서는 실용화가 가능한 전극 결합재를 탐색하던 중, SBR 등 몇 가지 합성고무의 물리적 특성이 바이오센서 실용화의 여러 필요조건을 상당히 충족시키는 것을 발견하고, SBR을 결합재로 사용하여 효소전극을 최초로 제작하였으며, 그것의 전기화학적 성질들을 고찰하여 보고한 바 있다.<sup>10</sup> 이로부터 합성고무가 탄소반죽 전극의 유용한 결합재임을 확인하였으며, 이제는 여러 종류의 고무를 활용하여 연구영역을 확장해 가고 있다. 여기에 발표되는 부틸고무는 isobutene과 isoprene의 공중합체로 화학적 활성이 적으며, 산이나 알칼리에 대하여 저항성이 큰 것으로 알려져 있다. 또 사슬 구조가 규칙적이어서 결정성이 크고 인장강도와 경도가 크다. 한편 주사슬 탄소 두 개에 두 개의 메틸기가 있어 입체장애가 크므로 기체의 투과성이 적고, 분자의 분절운동이 용이하지 않아 탄성이 적으므로 전극물질로서 기계적 안정성에 큰 장점을 갖는다. 이와 같은 부틸고무의 특성이 효소전극의 실용화 조건을 상당히 만족시킬 것을 예측하고, 이것을 결합재로 사용하여 효소전극을 제작하였다. 이것의 전기화학적 특성과 실용화의 가능성을 살펴 보고하고자 한다.

## II. 실험

### 1. 기구 및 시약

부틸고무(isobutene-isoprene rubber)는 Exxon Butyl 065(unsaturation avg. mole %, 0.7~1.0, Exxon Chem.)을 사용하였으며, 톨루엔은 Sigma-Aldrich(순도 99.9% 이상) 제품이었다. 흑연가루는 Fluka사 제품(≤

0.1 mm)이었으며, 기질(S로 약칭)로 Junsei사의 과산화수소(EP, 함량 35%)를 이용하였다. 전해질로는 Shinyo사의 NaCl(순도 99.5% 이상)을, 과산화효소(Horseradish peroxidase, HRP로 약칭)는 고추냉이로부터 추출한 Sigma사 제품(E.C.1.11.1.7)을 이용하였다. 매개체로 사용된 ferrocene은 Sigma사 제품을 사용하였다. 순환전압전류 그림을 얻기 위하여 BAS Model EPSILON(Bioanalytical System, Inc., U. S. A.) 전압전류계를 사용하였으며, 이외의 신호전류측정은 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. 전극물질의 전도도 측정에는 ALS 1116SLD(Japan) 전도도 측정기를 이용하였고, 모든 계산은 Origin 7을 사용하여 이루어졌다.

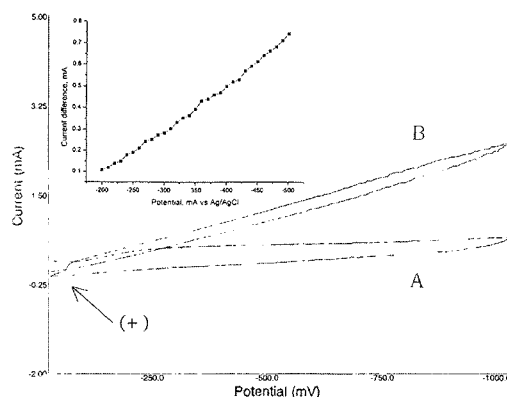
### 2. 전극의 제조

페로센(ferrocene) 0.09 g 을 2.0 ml  $\text{CHCl}_3$ 에 녹인 후, 흑연가루 0.91 g 과 혼합하여 건조시킨다. HRP 10.0 mg을 증류수 1.0 g에 녹인 후, 위 흑연가루 1.0 g 과 완전 혼합하여 수분을 증발시킨다. 톨루엔 19.0 g에 부틸고무 1.0 g 을 녹인 고무 용액과 위 흑연가루를 1.0:0.8(wt/wt)의 비율로 혼합하여 반죽을 만든다. 이 반죽을 오음 접촉이 있는 내경 6 mm, 길이 1 mm의 폴리에틸렌 튜브에 충전시켜 전극을 성형한다. 신호측정은 10 mL 0.1 M NaCl 용액에 작업전극을 위치시키고, 환류상태에서 전극을 켜 후, 충전전류가 바탕선에 도달하였을 때, 기질용액을 첨가하고, 첨가 전후의 신호차를 과산화수소 분해전류로 간주하였다.

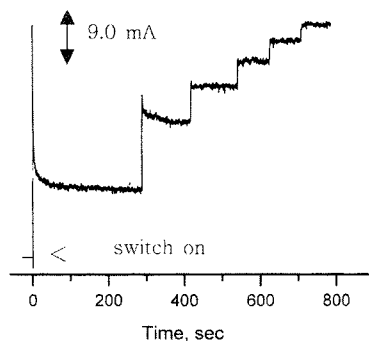
## III. 결과 및 고찰

Figure 1은 0.1 M NaCl 전해질 용액 중에서 효소전극의 전기화학적 거동을 보여주는 순환 전압전류 그림이다. A는 0.1 M NaCl 전해질 용액에 기질을 가하지 않았을 경우, 그리고 B는 전해질 용액 10 ml에 100  $\mu\text{l}$ 의 1.0 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  용액을 가했을

때 얻어진 것이다. 전자의 경우 실험 전위 영역에서 대체로 일정 크기의 환원전류가 흐르는 것을 볼 수 있다. 본 계는 물, 페로센 그리고 부틸고무 등 전기화학반응을 할 수 있는 여러 화학종을 포함하고 있다. 물은  $-0.828$  V의 표준환원전위에서 환원반응이 일어난다. 여기서 나타나는 전류가 물의 환원에 의한 것인지 확인하기 위하여 유리탄소 전극을 이용하여 물의 환원을 조사하였다. 이 때 측정된 전류는  $-940$  mV에서  $27 \mu\text{A}$ 의 전류를 보였고, 환원합수 꼬리는 대략  $-300$  mV까지 연결되어 있었다. 한편 Figure 1의 경우  $-940$  mV에서 측정된 전류는  $2.37$  mA이다.  $27 \mu\text{A}$ 은 이 값에 비하여 대략  $1.13\%$ 에 해당하며, 이는 무시할 수 있는 크기이다. 따라서 실험영역에서 나타나는 전류는 물의 환원에 의한 것이 아님을 알 수 있다. 한편 페리시늄(ferricinium) 이온의 표준환원전위는  $0.400$  V이다. Figure 1의 환원전류는 페리시늄 이온의 환원합수를 음의 방향으로  $0.60$  V 이상 확장하더라도 실험영역에 영향을 미치지 않는다. 따라서 실험영역에 나타나는 일정 크기의 환원전류는 페리시늄 이온의 환원에 의한 것이라 볼 수 없다. 합성고무를 결합제로 사용하여 만든 전극은 화학적 구성을 볼 때 불균일 혼합물이다. 따라서 여기서 나타나는 환원전류는 현 단계에서 메커니즘 확인이 어려운 여러 고무 구성 성분의 전기화학 반응이 계 내부에서 일어나고 있는 것으로 볼 수 있다. Figure 1의 B에서 (+)로 표시된 전류계단은 기질 용액의 첨가 시점을 나타낸다. 기질 첨가 후 전극 전위 변화에 따라 신호전류가 서서히 증가하는 것을 보여주고 있다. Figure 1의 창에 A와 B의 전류차를 전극 전위에 대하여 도시하였다. 대체로 직선성이다.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 표준환원전위는  $1.77$  V이므로 여기서 증가하는 전류는 효소가 관여하지 않는 과산화수소의 환원반응 전류라고 생각할 수 없다. 한편, 과산화수소는 순수한 물의 대략 50배에 해당하는 전도도 ( $2.0 \times 10^{-6}$  S, at  $20^\circ\text{C}$ )를 갖는다. 전류의 증가가 과산화수소의 첨가로 인한 용액의 전도도 증가에 기인한다고 볼 수 있다. 그러나 전류의 증가된 크기가 전극 전위에 적선적으로 의존하는 것을 볼 때, 전도도 증가가 이와 같은 신호의 변화를 가져온다



**Figure 1.** Cyclic voltammograms obtained with carbon paste electrode bound by butyl rubber before(A) and after(B) adding  $100 \mu\text{l}$  of  $1.0$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $0.1$  M NaCl  $10$  ml with  $10$  mV/s scan rate. The (+) indicates the addition of hydrogen peroxide solution. Inset: Current difference between A and B with electrode potential.



**Figure 2.** Typical time profile of the signal current caused by the successive increments of  $100 \mu\text{l}$  of  $1.0$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $0.1$  M NaCl at  $-400$  mV (pH 8.77).

고 할 수는 없을 것이다. Figure 1에서 전류가 변화한 것은 기질 첨가에 기인한 것이며, 첨가 전후 CV의 모양에 주목할 만한 변화가 없다. 그러므로 신호전류 증가는 효소의 촉매 작용에 의하여 유발된 기질의 환원전류라고 할 수 있을 것이다.

Figure 2는 신호가 얻어지는 전형적인 과정을 반복적으로 보여주고 있다.  $-0.40$  V의 전극전위에서 환류상태의  $10$  ml 전해질 용액에  $100 \mu\text{l}$ 의  $1.0$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$  용액을 연속적으로 추가하였을 때, 신호의 변화를 보여주는 amperogram이다. 이와 같은 방법은 전기화학적 활성을 갖는 화학종의 질량이동 속도

가 환류와 관련되어 있으므로 hydrodynamic amperometry라고도 한다. 이 방법은 질량 이동속도가 화학종의 확산속도보다 훨씬 크기 때문에 쉽게 정류 상태에 도달하는 이점을 가지고 있으며, 정류 상태에서 이중층의 충전전류는 최소화된다. Figure 2의 특징은 다음의 두 가지, 1) 신호 출현이 대단히 빠르고, 2) 신호 크기의 농도 의존도가 직선성으로부터 쉽게 벗어나는 것으로 요약될 수 있다 (Figure 3 참조). Wang 등<sup>11</sup>은 탄소가루를 결합하기 위하여 실리콘 졸-겔 법을 사용하였다. 이 때 매우 긴 감응 시간을 보였는데, 실리콘 그물 구조 안에서 기질의 확산 경로가 긴 우회 경로를 갖기 때문이라고 그 이유를 설명하고 있다. 그러나 부틸 고무를 결합재로 사용한 Figure 2의 경우 기질 추가 즉시 신호가 발생되어 포화에 이르는 것을 보여준다. 이는 전극의 활성 자리가 전극의 표면에 존재하기 때문이며, 부틸고무가 전극 표면에서 효소를 효과적으로 고정시켜 촉매력을 발휘하게 함으로서, 부틸고무가 결합재로 활용 가능함을 보여주는 것이다.

Figure 2로부터 도출된 신호의 크기를 첨가된 기질의 농도함수로 도시한 것이 Figure 3이다. 검정 곡선은 낮은 기질 농도에서 쉽게 직선성으로부터 벗어나는 것을 볼 수 있는데, 이와 같은 현상은 다음의 몇 가지로 설명될 수 있다. 우선 고정된 HRP가 다단계 반응으로 진행되는 과산화수소의 분해 반응 중 어느 특정단계 만을 촉매할 수 있다. 또 HRP에 포함된 여러 종류의 과산화효소가 서로 다른 속도로 과산화수소 분해 반응에 참여할 수도 있다. 또 전극 표면의 활성 자리 수가 제한되어 있으며, 반응 중간체가 전극 표면에 흡착하거나 포화되어 기질의 접근을 효과적으로 방해할 가능성도 한 이유가 될 수 있다. Figure 4는 Figure 3의 데이터로부터 계산된 Lineweaver-Burk 도시이다. 이 실험의 전체 영역에서 직선은  $R = 0.9988$ 의 상관계수를 가지며, 이로부터 얻은  $i_{max}$ 와  $K_M$ 은 각각 10.9 mA 과 0.33이었다. Lineweaver-Burk 도시로부터 직선성이 얻어지면 그 반응은 효소의 촉매작용에 의한 것이다. Figure 4로부터 얻어진 직선성은 전극 반응이 효소에 의하여 조절되고 있으며, 부틸고무가 전극 표면에서 효소를 효과적으로 고정시키고

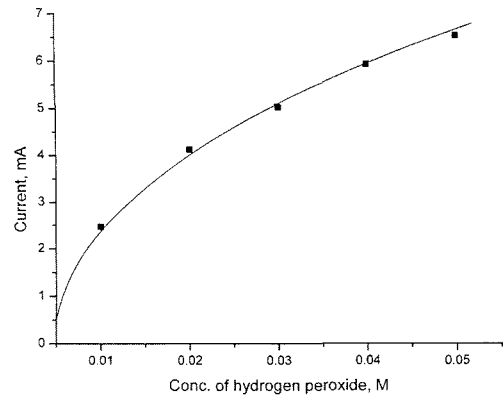


Figure 3. Variation of signal current with the hydrogen peroxide concentration.

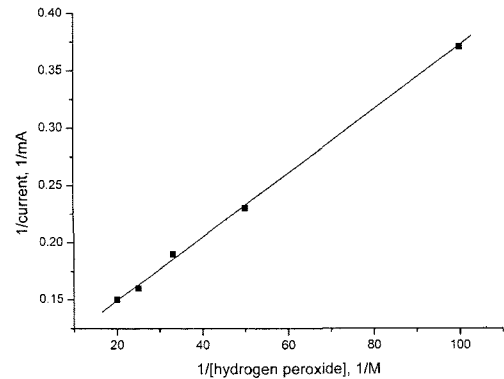
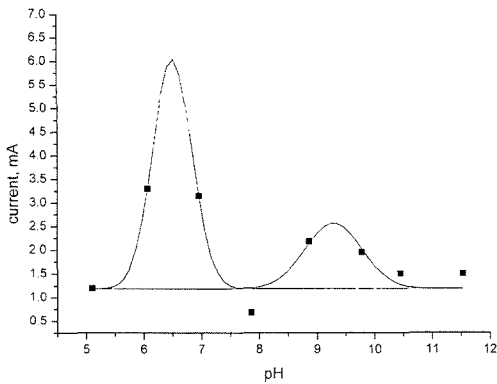


Figure 4. Lineweaver-Burk plot of the same data as in Fig. 3.

있다는 사실을 다시 한 번 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 변화시킴으로서 효소의 촉매력에 크게 영향을 미칠 수 있다. Figure 5는 전해질 용액의 pH에 따른 신호전류의 변화를 보여주고 있다. 두 pH 값에서 극대 값을 볼 수 있는데, 이는 전극에 고정된 효소와 기질의 입체적 결합을 최적화 시켜 촉매력을 최대화하는 pH가 존재하며, 고정된 HRP는 두 종류의 과산화효소로 구성되어 있음을 말하여 주는 것이다.<sup>12</sup> 여기서 과산화효소의 환원함수가 가우스분포를 이루



**Figure 5.** Variation in current with pH( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $1.50 \times 10^{-3}$  M; applied potential, - 400 mV vs. Ag/AgCl).

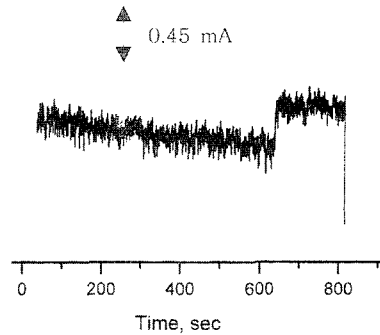
**Table 1. Constants for Two Gauss Functions**

$y_0$	1.19		
$xc_1$	6.50	$xc_2$	9.29
$w_1$	0.67	$w_2$	0.98
$A_1$	4.11	$A_2$	1.69

$$y=y_0+(A/(w*\sqrt{\pi/2}))*\exp(-2*((x-xc)/w)^2)$$

고, Figure 5가 보여주는 신호의 변화가 두 함수의 합이라는 가정 하에 각각의 기여를 프로그램, Origin 7을 이용하여 분해(실선)하였다. 낮은 pH와 높은 pH에서 얻어진 전류함수를 각각  $y_1$ ,  $y_2$ 라고 할 때, 두 함수와 관련된 파라미터들이 Table 1에 주어졌다. 두 극대값을 보여주는  $xc_1$ 과  $xc_2$ 는 극대 신호를 나타내는 용액의 pH로 각각 6.50과 9.29를 나타낸다. 이 값은 실리콘 오일을 결합제로 사용된 경우의 pH 5.0과 10.0에 비해 다소 차이를 보이는데, 실리콘 오일이 부틸고무로 교체되는 매트릭스의 변화에 기인한 것으로 볼 수 있다.

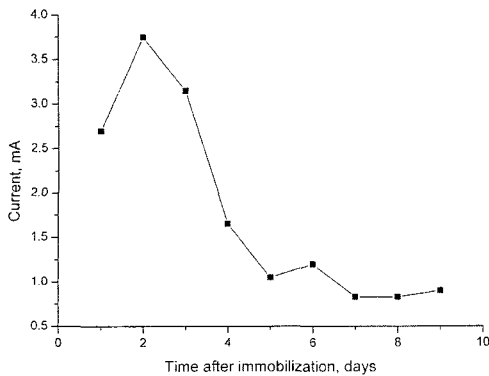
Figure 6은 사용 중인 전극의 검출 한계를 확인하고자 pH 8.86의 10 ml 전해질 용액에 30  $\mu\text{l}$ 의 0.1 M 기질 용액을 가했을 때, 신호가 변화하는 것을 보여주는 amperogram 이다. 여기서 얻어지는 검출한계는  $3.0 \times 10^{-4}$  M 이었다. A. N. Díaz<sup>13</sup>와 M. Y. Miao<sup>14</sup>은 줄-겔 법으로 HRP를 고정시켜 각각  $6.7 \times 10^{-4}$  M 과  $3.0 \times 10^{-6}$  M의 검출 한계를 얻었다. 신호의 크기에 영향을 주는 요인은 용액의 pH, 매개체, 결합제 그리고 효소의 함량 등이 있다. 최



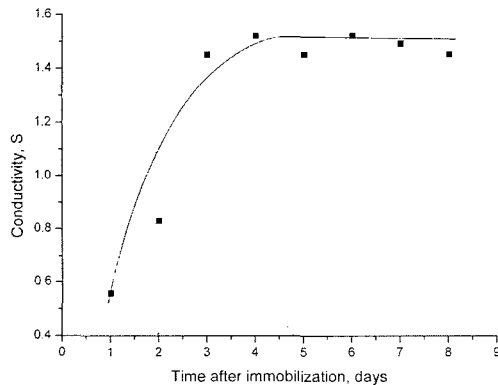
**Figure 6.** Time course of current signal for the determination of detection limit. 30  $\mu\text{l}$  of 0.10 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  was added in 0.1 M NaCl 10 ml at - 400 mV(vs. Ag/AgCl).

대의 신호를 얻기 위하여 이와 같은 요인들이 최적화 된다면 검출한계는 보다 향상될 것이다.

탄소반죽 전극이 실용화되기 위하여 전극의 작업 안정성은 필수적이다. 효소전극의 감응도는 제작 후 시간경과에 따라 단조 감소하는 경향을 보이는 것이 일반적이다. 그 요인은 다음과 같이 설명될 수 있다. 구조적으로 단백질인 효소의 삼차원 구조가 변형되는데 필요한 에너지는 15~60 kJ/mol로 대단히 작으나, 공기 중에 노출될 경우 그것이 변형될 수 있는 경우의 수는 많다. 우선 cystine 이 황화물 교차결합이 공기 중의 환원성 물질에 의하여 분해될 수 있으며, cysteine 잔기에 공기 중의 산소나 기질로 사용된 과산화수소가 산화제로 작용한다면 새로운 cystine을 형성할 수도 있다. 또 공기 중에 포함된 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 대단히 중요하다. Figure 7은 제작된 전극을 4  $^{\circ}\text{C}$ 의 냉장소에서 보관할 때 감응도가 시간에 따라 변화하는 것을 보여주고 있다. Figure 7은 예상한 것과 다른 경향성을 보여 주고 있는데, 저장시간 경과에 따라 신호가 증가하는 영역이 그것이다. 전



**Figure 7.** Stability of biosensor with butyl rubber binder. The sensor was stored at 4 °C in the dark between measurements and 100  $\mu$ l of 1.0 M  $H_2O_2$  was added in 0.1 M NaCl 10 ml at -0.20 V.



**Figure 8.** Conductivity change of electrode material with the storing time at 4 °C in the dark. Immobilization matrix: carbon powder, 50.6 %; ferrocene, 5 %; butyl rubber, 4.4 %; toluene, 40 %.

극 물질은 고무를 용해하는데 필요한 톨루엔을 포함하고 있다. 전극 표면이 공기 중에 노출 될 경우, 전극 물질로부터 톨루엔이 유출되는 것은 필수적이다. 유기물인 톨루엔이 전극 물질에서 제거되면 탄소반축의 전도도가 증가할 것이다. 이와 같은 현상은 Figure 8에서 확인될 수 있다. Figure 8은 탄소가루와 페로센, 그리고 부틸고무 용액을 포함하고 있는 전극 물질을 4 °C, 냉암소에서 공기 중에 노출시켜 보관하면서 전도도 변화를 측정하는 것이다. 제작 후 전도도의 증가는 2일이 경과하면 일정한 것을 볼 수 있는데, 이는 톨루엔 유출이 이

시점에서 완성되는 것으로 볼 수 있다. 따라서 Figure 7의 전류 증가는 효소 활동도의 증가가 아닌 전극 전도도 증가에 기인한 것으로 보아도 무방할 것이다. 그리고 2일 이후 감소하는 것은 위에서 언급한 단백질의 변성에 의한 것으로 볼 수 있다.

#### IV. 결 론

효소를 고정시킨 탄소반축 전극의 실용화를 목적으로 부틸고무를 결합재로 사용하여 바이오센서를 제작하고 그것의 전기화학적 성질을 살펴보았다. 기질 추가 즉시 신호가 발생하고, Lineweaver-Burk 도사가 직선성을 보여주는 것을 볼 때, 부틸고무가 효소를 효과적으로 고정하는 것으로 판단할 수 있다. 또 신호전류의 pH 의존성이 서로 다른 두 pH 값에서 극대값을 보이는 것은 앞서 본 실험실에서 연구된 결과와 일치하는 것으로 결합재를 부틸고무로 대체하여도 무방함을 확인시켜주는 것이다. 한편 부틸고무로 결합된 전극재료는 톨루엔이 제거되어 기계적 활성이 확보된 후에도 기질에 대하여 좋은 활성을 보여주었기 때문에, 부틸고무를 결합재로 대체한 실험적 사실은 탄소반축 전극의 실용화에 새로운 장을 열었다 할 것이다.

#### 참 고 문 헌

1. C. G. J. Koopal, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, B. de Ruiter, and R. B. M. Schasfoort, "Third-generation Amperometric Biosensor for Glucose. Polypyrrole Deposited within a Matrix of Uniform Latex Particles as Mediator", *Bioelectrochem. Bioenerg.* **29**, 159 (1992).
2. S. Cošnier, S. Szunerits, R. S. Marks, A. Novoa, L. Peuch, E. Perez, and I. Rico-Lattes, "A Rapid and Easy Procedure of Biosensor Fabrication by Microencapsulation of Enzyme in Hydrophilic Synthetic Latex Films. Application to the Amperometric Determination of Glucose", *Electrochem. Comm.* **2**, 851 (2000).
3. M. G. Roig, F. B. Estevez, F. G. Velasco, N. I. Ghais, and J. M. C. Silverio, "Biotechnology and Applied Biology Section, Methods for Immobilizing

- Enzymes", *Biochem. Educ.*, **14**, 180 (1986).
4. M. S. Lin, S. Y. Tham, and G. A. Rechnitz, "Pineapple-Tissue Based Bioelectrode for the Determination of Hydrogen Peroxide", *Electroanalysis*, **2**, 511 (1990).
  5. Y. Fang, R. Cai, J. Deng, and Z. Deng, "Lettuce Seed Meal Tissue-Based Membrane Electrode with High Biocatalytic Activity for Hydrogen Peroxide", *Electroanalysis*, **4**, 819 (1992).
  6. B. Li, Z. Zhang, and Y. Jin, "Plant Tissue Based Chemiluminescence Flow Biosensor for Determination of Unbound Dopamine in Rabbit Blood with On-line Microdialysis Sampling", *Biosensors & Bioelectronics*, **17**, 585 (2002).
  7. 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).
  8. 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).
  9. J. Wang, N. Naser, H. S. Kwon, and M. Y. Cho, "Tissue Bioelectrode for Organic-phase Enzymatic Assays", *Anal. Chim. Acta* **264**, 7 (1992).
  10. K. J. Yoon, "Development of Biosensor Utilizing Rubber", *Bull. Kor. Chem. Soc.* submitted (2006).
  11. B. Wang and S. Dong, "Organic-phase Enzyme Electrode for Phenolic Determination Based on a Functionalized Sol-gel Composite", *J. Electroanal. Chem.* **487**, 45 (2000).
  12. K. J. Yoon, "A New Strategy for Determining Optimum pH of Isozyme", *Bull. Kor. Chem. Soc.* **25**(7), 997 (2004).
  13. A. N. Díaz, M. C. R. Peinado, and M. C. T. Minguez, "Sol-gel Horseradish Peroxidase Biosensor for Hydrogen Peroxidase Detection by Chemiluminescence", *Anal. Chim. Acta*, **363**, 221 (1998).
  14. 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).