

CSM 고무로 결합된 담배 과산화효소 고정 효소전극의 전기화학적 특성

윤길중

청주대학교 이공대학 응용화학과
(2014년 4월 29일 접수, 2014년 7월 8일 심사, 2014년 7월 22일 채택)

Electrochemical Properties of Tobacco Peroxidase Incorporated Enzyme Electrode Bound with CSM Rubber

Kil Joong Yoon

Department of Applied Chemistry, Cheongju University, Cheongju 360-764, Republic of Korea
(Received April 29, 2014; Revised July 8, 2014; Accepted July 22, 2014)

초 록

시판 고추냉이 과산화효소를 대체하기 위하여 탄소반죽에 담배 잎을 고정시켜 과산화수소 감응 센서를 제작하고 그것의 감응성을 살펴보았다. 얻어진 10여 개 이상의 전극 파라미터는 효소전극이 실험 전위영역에서 정량적으로 특이성을 발휘하고 있음을 보여주었다. 특히 작은 대칭인자(α , 0.21)는 전극반응 속도가 전극전위의 변화에 매우 민감한 것을 보여주었다. 이런 실험적 사실들은 효소전극이 과산화수소 센서로서 정상적으로 기능을 발휘하고 있으며 담배 과산화효소가 시판 효소를 대체할 수 있음을 보여주는 것이었다.

Abstract

In order to substitute for the marketed horseradish peroxidase, a hydrogen peroxide sensor embedded with tobacco leaf in carbon pastes was constructed and its sensing ability was electrochemically evaluated. Ten and more electrode parameters obtained implied that the enzyme electrode exerts its remarkable specificity quantitatively in the experimental range of potential. Especially the small symmetry factor (α , 0.21) showed that the electrode kinetics is very sensitive to the change of electrode potential. The experimental facts above suggested that our enzyme electrode functions as a hydrogen peroxide sensor normally and tobacco peroxidase can be used in the place of the marketed one as an alternative to marketed ones.

Keywords: tobacco, peroxidase, hydrogen peroxide, biosensor, enzyme electrode

1. 서 론

효소의 촉매작용에 근거를 둔 바이오센서는 탁월한 기질 선택성으로 인하여 방해효과를 최소화할 수 있으며 막강한 촉매력을 갖고 있기 때문에 화학분석에 여러 가지 이점을 제공한다. 따라서 효소의 활동도가 변하지 않도록 전극에 고정하는 일은 대단히 중요하며 이를 위하여 지금까지 다양한 효소고정법이 시도되었다.

여기에는 백금이나 유리전극 등 적절한 전극에 효소를 고정시키거나 효소의 물리적 흡착특성을 이용하는 방법, 지지 매트릭스에 고정시키는 졸-겔법, 스크린 프린팅법, 전도성 고분자의 공중합 과정에서 고정시키는 방법, 지지 매트릭스에 흡입시키는 방법 등 다양하다.

E. Casero 등은 유리탄소전극에 *p*-benzoquinone과 과산화효소를 고정하여 과산화수소 센서로 사용하였고[1], B. Wang 등은 유리탄소전

극의 표면에 얇은 sol-gel 필름을 입히고 그 속에 tyrosinase를 고정하여 catechol, phenol 및 *p*-cresol에 감응하는 전극을 만들었다[2]. 한편 Y. C. Li 등은 TiO₂ sol-gel 매트릭스에 CoW₁₁Co와 PVP를 고정하고 BrO₃⁻ 및 IO₃⁻에 대하여 각각 -10⁻⁶ M 및 -10⁻⁷ M에 이르는 높은 검출한계를 얻었다[3]. 효소의 물리적 흡착 특성을 이용하는 방법으로 T. J. Cheng 등은 protamine의 친화도를 이용하여 heparin을 정량하였으며 무기물의 정량에도 활용하였다[4]. 스크린 프린팅법은 비교적 간단한 효소전극 제작법으로 H. Olschewski는 폴리우레탄에 L-lysine-(α)-oxidase를 녹여 L-lysine을 정량하였다[5]. 전도성 고분자를 전극 표면에 전기화학적으로 공중합시키는 과정에서 전해질 용액 중의 효소를 고정시키는 방법은 전극의 기하학적 형태 및 두께 조절에 효율적이다. 이 방법을 활용하여 S. Gaspar 등은 Os-pyrrole을 Pt 또는 탄소전극에 피복시키고 그 속에 HRP 및 tobacco peroxidase를 고정하였다[6].

본 연구실에서는 탄소반죽법의 결합제로 톨루엔 고무용액을 사용하여 반영구적으로 사용할 수 있는 전극 제작법을 개발한 바 있다 [7-9]. 이 방법은 용매가 증발된 후 반죽으로부터 견고한 기계적 물성을 얻을 수 있는 장점이 있으며, 제작 과정이 간편하고 비용이 저렴하여 경제적, 시간적으로 효율적이다.

† Corresponding Author: Cheongju University,
Department of Applied Chemistry, Cheongju 360-764, Republic of Korea
Tel: +82-43-229-8540 e-mail: kjyoon@cju.ac.kr

Table 1. Time Dependence of the Residual Current in NaCl Solution

Time, s	i, mA		
	0.1 M	0.01 M	0.001 M
0.02	0.1205	0.0846	0.0272
0.04	0.1203	0.0843	0.0272
0.06	0.1201	0.0841	0.0272
0.08	0.1196	0.0840	0.0271
0.10	0.1192	0.0837	0.0271
0.12	0.1187	0.0835	0.0270
0.14	0.1184	0.0831	0.0270
0.16	0.1183	0.0830	0.0270
0.18	0.1178	0.0829	0.0270
0.20	0.1173	0.0827	0.0270

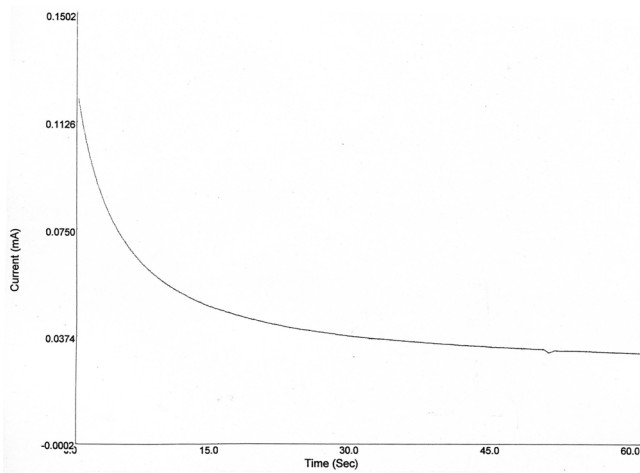


Figure 1. A typical current transient resulted from the single potential step experiment. [NaCl] : 0.1 M; step potential : -500 mV.

과산화수소는 인체 내에서 생성되는 물질이며 합성시약 및 산업분야에서 여러 용도로 사용되는 화합물이다[10]. 따라서 과산화수소를 신속하게 정량분석하는 일은 대단히 중요하다. 본 논문은 과산화수소 정량을 위한 범용 효소전극을 개발하기 위하여 고가로 시판되는 HRP (horseradish peroxidase)를 생활 주변에서 쉽게 얻을 수 있는 효소원으로 대치하고자 담배식물이 함유하고 있는 과산화효소를 활용하여 과산화수소 감응 효소전극을 제작하고 그것의 전기화학적 특성을 살펴본 것이다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기구

본 바이오센서는 담배 조직을 포함하고 있으므로 이후 담배전극으로 불릴 것이다. 호모게나이저로 완전히 파쇄된 담배잎을 효소원으로, 흑연가루(Fluka, Anal. N. 378326/1 21698, ≤ 0.1 mm)를 전극물질로, 클로로술폰화 폴리에틸렌 고무(chlorosulphonated polyethylene rubber, Denki Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha Mitsui C. abbr. CSM)를 결합제(binder)로 사용하였다. 기질로 과산화수소(Junsei Chem. Co. Ltd., 35%)를 사용하였고, 매개체로 페로센(dicyclopentadienyliron, Sigma,

F-3375)을, 전해질로 NaCl (Shinyo pure Chem. $\geq 95.5\%$)을 사용하였다. 고무의 용제는 톨루엔(Sigma-Aldrich, HPLC grade, $\geq 99.9\%$)이었다. CV 및 LSV는 Ag/AgCl (BAS MF 2052)와 Pt전극(BAS MW 1032)이 장착된 BAS Model EPSILON (Bioanalytical System, Inc., U. S. A.) potentiostat를 이용하여 얻었으며, 이외의 신호 측정은 Kipp & Zonen X-t 기록계가 연결된 EG&G Model 362 (Princeton Applied Research, U.S.A.)를 사용하였다. 데이터의 시뮬레이션은 Origin 7 (ExpDec 1 & Boltzmann fit)을 이용하였다.

2.2. 전극 제작

적당량의 CHCl_3 에 0.09 g의 페로센을 녹이고 여기에 0.91 g의 흑연 가루를 혼합하여 실온에서 건조시킨다. 이 가루와 1.5% CSM 고무용액을 1 : 1 (wt/wt)로 혼합하여 반죽을 만들고 이 반죽 1.0 g에 파쇄된 담배조직 0.2 g을 합하여 혼합시킨다. 오음 접촉을 갖춘 길이 1 mm, 직경 6.67 mm의 원형 폴리에틸렌 튜브에 반죽을 채우고 표면을 스페큘라를 이용하여 완전평면으로 성형한 후 작업전극으로 사용한다[11]. 사용하지 않을 때는 증류수에 담겨 4 °C의 냉장고에 보관한다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 전극의 계면특성

Grahame은 Stern 모델의 Helmholtz 평면을 내부 Helmholtz 평면(IHP)과 외부 Helmholtz 평면(OHP)의 둘로 나누었고, Bockris와 Devanathan, Müller 등은 이것을 수정하여 전극 표면으로부터 외부 Helmholtz 층까지를 내부 조밀 전기이중층(inner compact double layer), 그 밖의 층을 확산 전기이중층(diffuse double layer)으로 구분하였다.

여기서 사용되는 담배전극의 전기적 이중층이 갖는 특성을 살펴보기 위하여 0.1 M NaCl 전해질 용액 중에서 -500 mV의 계단전위를 인가하여 얻은 전류-시간 그림이 Figure 1에 주어졌다. 그림이 보여주듯 측정기는 0.005 s로 디지털화되어 있기 때문에 $t = 0$ (s)에서 전류를 측정하는 것은 불가능하다. 따라서 초기상태의 순간전류를 얻고자 한다면 전류의 경향성을 시뮬레이션하여 $t = 0$ (s)로 외삽하는 방법을 취하여야 한다. 이와 동일한 방법으로 0.01 및 0.001 M 전해질 용액에서 얻은 시간-전류가 함께 Table 1에 주어졌다. R_s 와 C 를 각각 용액의 저항 및 이중층의 합성 용량이라고 할 때 충전전류는 시간(t)에 대하여 $i = E/R_s \exp(-t/R_s C)$ 의 관계를 가지며 컨덴서가 충전되어 있지 않을 경우($t=0$) 위 식은 $i = E/R_s$ 의 관계가 성립한다. Table 2는 이 관계식들로부터 도출된 $i_{t=0}$, R_s , C , C_d , C_i 및 실측한 시간상수, τ 를 포함하고 있다. 시간상수는 전해질 농도가 감소함에 따라 증가하는 것을 볼 수 있는데 이것은 용액저항 증가에 따른 이중층의 형성 지연에 기인하는 것으로 볼 수 있다. 또 $\tau = R_s C$ 관계로부터 계산된 충전용량(C)은 전해질 농도가 묽어짐에 따라 증가하는 것을 보여주는데 전해질 이온의 농도 감소에 의한 용액의 유전율의 증가로 설명될 수 있다.

Gouy와 Chapmann은 이중층의 전해질 쪽 이온들이 불균일하게 분산된 전기이중층(diffuse double layer) 모형을 제안하였다. 그들의 이론에 의하면 확산 이중층의 커패시턴스, C_d 는 $T = 298$ K, $\epsilon = 78 \epsilon_0$, $\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12} \text{ J}^1 \text{C}^2 \text{m}^{-1}$ 인 경우 $228 \sqrt{c} \cosh(19.47z\phi)$ (μFcm^{-2})가 된다[12]. 담배전극으로부터 얻은 Table 2가 보여주는 C_d 값들은 수용액에서 일반적으로 얻어지는 값 10-30 μFcm^{-2} 보다 큰데, 이 증가는 흑연가루를 둘러싸고 있는 고무 결합제 CSM에 의한 유전상수 증

Table 2. Electrochemical Parameters of the Tobacco Electrode at Three Different Electrolyte Concentrations

log[NaCl]	$i_{t=0}$, mA	R_s , Ω	τ , s	C, F	C_d , F	C_c , F
-1	0.121	4.12×10^3	17.0	4.13×10^{-3}	0.609	$\approx 4.13 \times 10^{-3}$
-2	0.0848	5.90×10^3	38.9	6.59×10^{-3}	0.193	$\approx 6.59 \times 10^{-3}$
-3	0.0272	1.84×10^4	$60.0 \ll$	-	0.0609	-

$i_{t=0}$: condenser current at $t = 0$ (s);
 R_s : solution resistance;
 τ : time constant(obs);
 C: effective double layer capacitance;
 C_d : capacitance of the diffuse double layer;
 C_c : capacitance of the compact double layer.

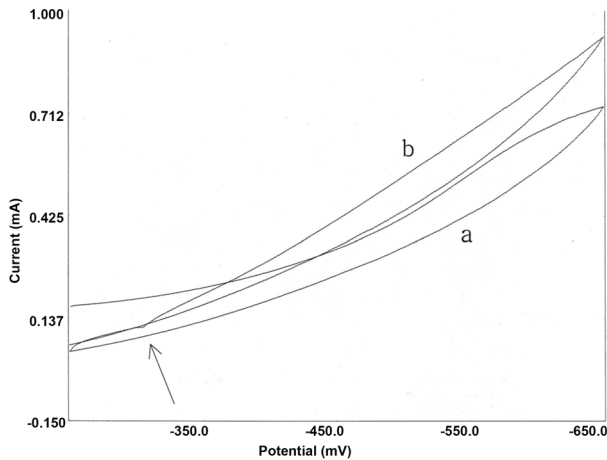


Figure 2. Cyclic voltammograms of the tobacco leaf embedded biosensor at a scan rate of 25 mV/s : (a) in the absence of H₂O₂; (b) in the presence of 0.01M of H₂O₂ in a stirred 0.1M NaCl solution. Arrow indicates the addition of H₂O₂.

가에 기인하는 것으로 보여진다. C_c 는 C_d 와 C_c 의 직류 등가회로 관계 식으로부터 얻은 값이다.

3.2. 전극의 촉매특성

전위주사(potential scan)를 일정한 속도로 하다 방향을 바꾸어서 반복하는 순환전압전류곡선은 전극표면에서 일어나는 전기화학 반응의 특성이나 계의 전기화학적 가역성을 파악할 수 있는 화학적 조기진단 방법으로 널리 활용된다. Figure 2는 수용액 중에서 담배전극의 기질분해 특성을 보여주는 순환전압전류곡선이다. 환류상태의 0.1 M NaCl 전해질 용액 중에서 얻은 이 그림은 a, b의 둘로 구성되어 있으며 a는 기질을 가하기 전, b는 기질을 가한 후에 얻은 것이다. -350 mV 이전의 화살표는 전해질에 기질을 가한 시점으로 기질을 추가함에 따라 잔류파로부터 신호파가 벗어나는 것을 보여주고 있다.

a는 전극전위가 증가함에 따라 기질의 환원과 무관한 바탕전류가 증가하는 것을 보여주고 있다. 전극은 매개체, 결합재(CSM) 및 담배 조직을 포함하고 있다. 실험 전위영역에서 매개체, 페로센은 이미 환원된 상태로 존재하기 때문에 도체로서 역할을 하게 되므로 이것의 환원은 실험 전위영역에서 문제되지 않는다. 즉 페로센의 환원현상은 여기서 나타나지 않고 환원전류는 여기에 포함되지 않는다. a의 바탕 전류를 생성하는 가능한 전류는 이중층 충전전류, 결합재로 사용된 고무 및 효소원으로 사용된 담배 조직이 포함하고 있는 물질의 산화-

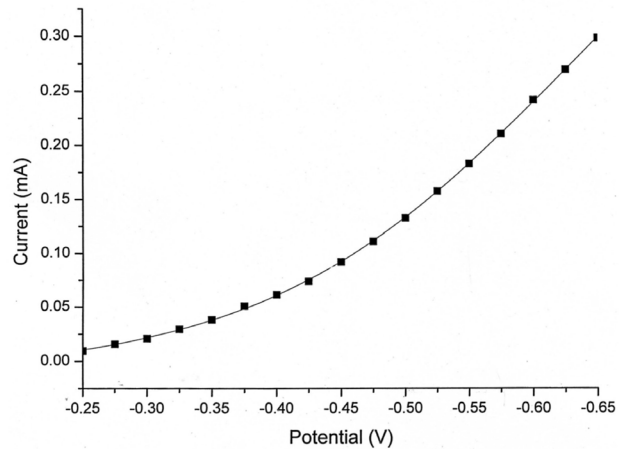


Figure 3. Current difference between (a) and (b) in a static solution. Other conditions are the same as in Figure 1.

환원 전류가 예상된다.

그러나 b는 a에 기질을 추가한 것 외에 실험 조건의 변화 없이 얻어진 것이므로 b와 a의 차이는 순수한 기질의 분해에 의한 전류로 보아도 무방할 것이다. 왜냐하면 Reed-Horn 반응의 혼합 생성물인 결합재 CSM 고무와[13] 담배 조직의 구성 성분의 전기화학적 거동은 충전전류와 더불어 a와 b에 공통적일 것이기 때문이다.

용액 중에서 기질의 확산거동은 정지된 용액 중에서 살펴보아야 한다. 정지 용액 중에서 Figure 2와 동일한 실험이 행하여졌고, 기질첨가 전후 전류차를 전극전위에 따라 도시한 것이 Figure 3이다. 확산파의 형태는 일반적으로 S자 형이지만 여기서 전체 파형을 확인할 수 없는 것은 실험 전극전위가 -0.65 V로 제한되어 있으므로 Figure 3은 그것의 일부분에 해당한다. 전류(mA)-전위(V) 관계를 시뮬레이션한 함수 관계는 다음과 같다.

$$i = -0.0122 + 0.558/[1 + \exp\{(E + 0.623)/0.118\}]$$

전류 i (mA)는 면적이 0.349 cm^2 인 탄소반죽 평판전극으로부터 얻은 것이다. 생체 내에서 Fe^{2+} 이온과 과산화수소의 반응은 일 전자 전이반응($n = 1$)으로 알려져 있다[14]. 위 식으로부터 음전위의 극한($E \rightarrow -\infty$)에서 0.546 mA 를 얻을 수 있으며 이것을 한계전류($i_{l,c}$)로 간주할 수 있다. 여기서 도출된 담배전극계의 기질 질량이동계수(mass transfer coefficient), m_0 와 질량이동저항(mass transfer resistance), R_{m0} 는 각각 $1.62 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ 와 $47.1 \text{ }\Omega$ 이다.

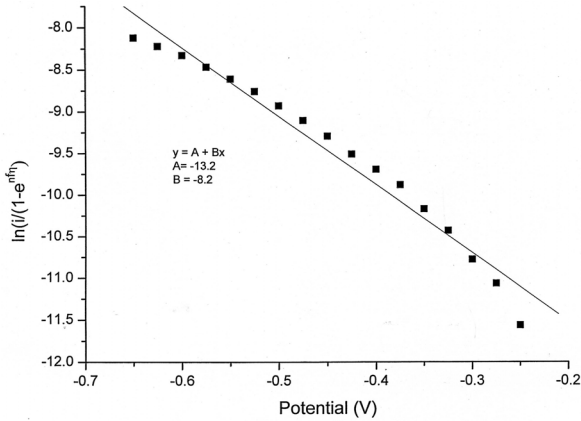


Figure 4. Linear plot of $\ln(i/(1-\exp(nf\eta)))$ vs. E.

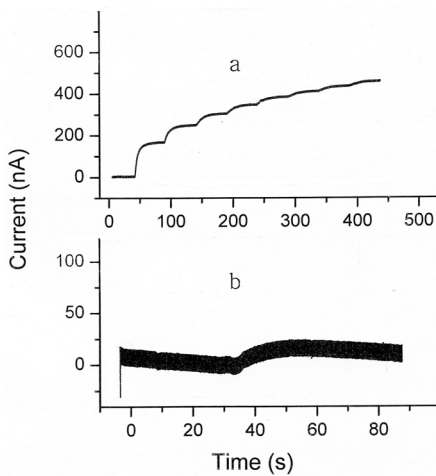


Figure 5. Current-time recording for successive 50 μL additions of 0.1 M hydrogen peroxide solution (a) and for the determination of detection limit (b) at -500 mV.

Figure 4는 Figure 3으로부터 도출한 Tafel 도식으로 대체로 직선성을 보여주고 있다. 기울기, $-13.2(-\alpha n f)$ 와 절편, $-8.2(\ln i_0)$ 로부터 얻어지는 대칭인자(α)와 교환전류밀도(i_0)는 각각 0.21 및 $1.85 \times 10^{-6} \text{ A/cm}^2$ 이다.

전극의 전위변화가 전기화학반응 속도에 미치는 영향은 이중층 사이에 존재하는 에너지 장벽높이의 변화와 관련이 있으며, 장벽높이의 유효 변화는 대칭인자의 크기에 의존한다. 즉 봉우리의 유효변화는 대칭인자의 크기가 0.5보다 작은 경우가 0.5보다 큰 경우에 비하여 더 민감하다. 식물조직 함유 효소전극의 대칭인자는 0.5보다 작은 경우가 일반적이다[15-17]. 여기서 담배전극이 0.21의 작은 값을 보여주는 것은 담배전극의 감응속도가 전극전위 변화에 크게 의존하는 것을 말하여 준다.

유체역학 전류법(hydrodynamic amperometry)은 확산층의 성장이 없고 화학종의 질량이동이 환류에 의존하므로 질량이동 속도가 화학종의 확산속도보다 훨씬 커서 정류상태에 도달하는 시간이 최소화된다. Figure 5(a)는 환류상태의 10 mL의 전해질 용액에 0.1 M H_2O_2 기질용액 50 μL 를 연속적으로 8회 가했을 때 신호전류가 증가하는 것을 보여주고 있으며 Figure 5(b)는 신호에 미치는 잡음의 효과를 보여주고 있다. 분광학적 방법에 의하면 $\sim 6.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ 정도의 검출한계를

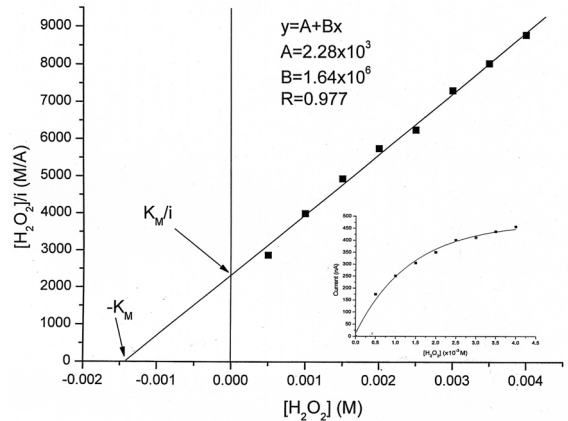


Figure 6. Hanes-Woolf plot of the signal current and the substrate concentration. $[\text{H}_2\text{O}_2]/i$'s were from the calibration curve (inset).

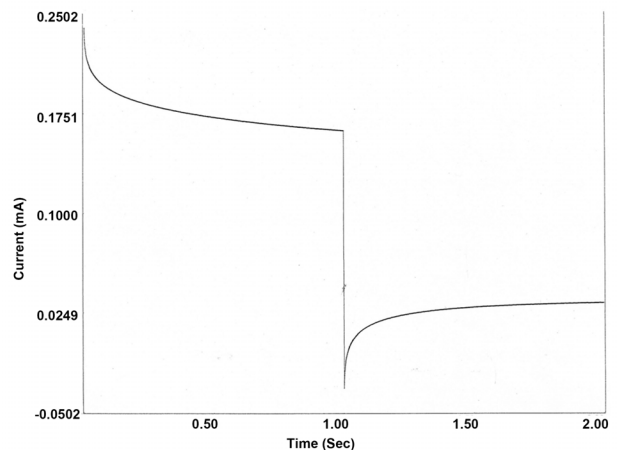


Figure 7. Current response resulting from the double step technique. Start potential : 0 (mV); first step E : -500 (mV); second step E : 0 (mV). $[\text{H}_2\text{O}_2]$: 0.001 M; $[\text{NaCl}]$: 0.001 M.

얻을 수 있다[18]. 그러나 전기화학적 방법은 원천적으로 잔류전류가 존재하기 때문에 분광학적 방법을 뛰어 넘기 힘들다. Figure 5(b)의 전류-시간 그림은 10 mL 전해질 용액에 $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ 의 기질용액 25 μL 를 추가할 때 얻어진 것으로 여기서 얻어진 검출 한계는 $S/N=2$ 인 경우 $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 의 검출한계를 얻는다. 검출한계만을 고려할 때 분광학적 방법보다 우수하지 못하나 측정 시 전압, 온도 등의 인자를 최적화하면 보다 향상될 것으로 보여진다. 분석의 효율성은 정확성, 경제적 및 시간적인 문제 등을 고려해야 하므로 후자들을 고려할 때 본 전기화학적 방법은 분광학적 방법보다 훨씬 우수한 종합평가를 받을 수 있다.

기질농도($[\text{H}_2\text{O}_2]$)에 대하여 반응속도 대 기질농도 비($[\text{H}_2\text{O}_2]/i$)를 도시한 것이 Hanes-Woolf 도식이며, 이것이 직선일 때 화학반응은 효소의 촉매작용에 의한 것이다. 이 도식은 기질농도의 전 범위에 걸쳐 오차범위가 대체로 일정한 장점이 있다. Figure 6의 상에 농도에 따른 신호의 크기를 도시한 검정곡선이 주어지고 이것으로부터 도출된 Hanes-Woolf 도식, Figure 6은 좋은 직선성을 보여주고 있다. 이와 같은 현상은 기질의 분해가 담배전극에 함유된 효소의 촉매작용에 의한 것임을 말하여 주고 있다. 여기서 얻은 최대전류(i_m)와 Michaelis 상수

Table 3. $-i_r/i_f$ as a Function of Time for Eight Values of t_f ($t_f = 1 + t_r$). $1-(1-\tau/t_f)^{1/2}$ is for the Totally Reversible System

time, s	i_f , mA	i_r , mA	$1-(1-\tau/t_f)^{1/2}$	$-i_r/i_f$
0.001	0.2386	-0.032	0.97	0.013
0.002	0.2315	-0.025	0.96	0.011
0.003	0.2283	-0.021	0.95	0.0092
0.004	0.2252	-0.016	0.94	0.0071
0.005	0.2244	-0.015	0.93	0.0067
0.006	0.2228	-0.014	0.92	0.0063
0.007	0.2205	-0.012	0.92	0.0054
0.008	0.2189	-0.011	0.91	0.0050

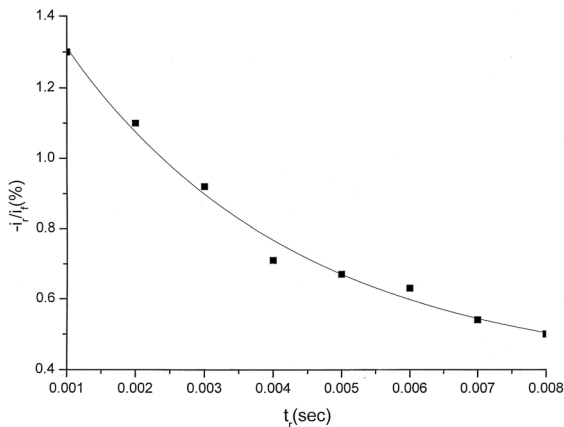


Figure 8. Working curve for $-i_r/i_f$ (%) from Figure 7.

(K_M)는 각각 7.50×10^{-7} A와 1.71×10^{-3} M이다.

앞서 Figure 2로부터 과산화수소의 분해반응이 비가역일 가능성을 정성적으로 예측할 수 있었으나 이것을 보다 정량적으로 판단하는 간단하고 효율적인 방법이 이중계단 시간-전류법(double step chronoamperometry)이다. Figure 7은 0.001 M 기질을 포함하고 있는 전해질 용액으로부터 이중계단기법으로 얻은 시간-전류 그림을 보여주고 있다. 제1계단 전위 -500 mV와 제2계단 전위 0 mV (vs. Ag/AgCl)는 Figure 2를 고려할 때 각각 기질의 환원과 산화가 일어날 수 있는 전위이다. 각 계단의 전류 채취시간 t_r 와 $t_f + \tau$ ($\tau = 1$ sec)에서 측정된 전류, i_r 와 i_f 가 Table 2에 함께 주어졌다. 계가 이상적인 완전가역계라면 $-i_r/i_f$ 은 $1-(1-\tau/t_f)^{1/2}$ 과 일치해야 하나 이들은 현격한 차이를 보여주고 있다. 우선 $t_f = 0.001$ sec에서 $-i_r/i_f$ 의 최대값은 1.3%이며 0.001-0.008 sec의 전 구간에서 이보다 작은 값을 보여주고 있다. 과산화수소의 환원 생성물이 전해질의 용매인 물이고 전압이 역전될 때 신호전류에 잔류전류와 충전전류가 포함되어 있을 것을 고려하면 실험전위 영역에서 물의 산화반응은 없는 것으로 볼 수 있다. 따라서 본 계에서 기질분해의 역반응은 완전 비가역이라 할 수 있다.

4. 결 론

과산화수소원으로 담배조직을 사용하여 과산화수소 감응 효소전극을 제작하고 그것의 전기화학적 거동을 살펴보았다. 담배전극을 이용하여 얻은 Hanes-Woolf 도시는 과산화수소의 분해가 전극에 포함된

과산화수소의 촉매작용에 의한 것임을 보여 주었으며, 얻어진 10여 개 이상의 전기화학적 파라미터들은 전극표면에서 일어나는 전극반응이 정량적으로 일어나고 있음을 보여주었다. 이 결과는 시판되는 고가의 과산화수소를 생활주변에서 쉽게 접할 수 있는 담배 잎으로 대체할 수 있음을 확신시켜주는 것으로 과산화수소 정량 효소전극의 범용 및 양산의 전망을 밝혀주는 것이다. 그러나 여기서 사용된 효소전극은 전극 제작 후 사용 시간 증가에 따라 감도가 서서히 감소하는데 이것은 모든 효소전극의 공통점으로 효소의 열역학적 변성에 기인하는 것으로 보여 진다. 따라서 실험실 조건에서 전극의 보관에 관한 연구가 추가적으로 이루어져야 완전한 실용화를 이룰 수 있을 것이다.

References

1. E. Casero, M. Darder, F. Pariente, and E. Lorenzo, Peroxidase enzyme electrodes as nitric oxide biosensors, *Anal. Chim. Acta*, **403**, 1-9 (2000).
2. B. Wang, J. Zhang, and S. Dong, Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor, *Biosen. Bioelectronics*, **15**, 397-402 (2000).
3. Y. C. Li, W. F. Bu, L. X. Wu, and C. Q. Sun, A new amperometric sensor for the determination of bromate, iodate and hydrogen peroxide based on titania sol-gel matrix for immobilization of cobalt substituted Keggin-type cobalttungstate anion by vapor deposition method, *Sens. Act. B*, **107**, 921-928 (2005).
4. T. J. Cheng, T. M. Lin, and H. C. Chang, Physical adsorption of protamine for heparin assay using a quartz crystal microbalance and electrochemical impedance spectroscopy, *Anal. Chim. Acta*, **462**, 261-273 (2002).
5. H. Olschewski, A. Erlenkötter, C. Zaborosch, and G. C. Chemnitz, Screen-printed enzyme sensors for L-lysine determination, *Em. Microbial Tech.*, **26**, 537-543 (2000).
6. S. Gaspar, I. C. Popescu, I. G. Gazaryan, A. G. Bautista, I. Y. Sakharov, B. Mattisson, and E. Csöregi, Biosensors based on novel plant peroxidase: a comparative study, *Electrochim. Acta*, **46**, 255-264 (2000).
7. K. J. Yoon, Electrochemical evaluation of a practical carbon paste electrode to determine hydrogen peroxide, *Kor. J. Sci. Crin. Invest.*, **7**, 195-200 (2013).
8. K. J. Yoon, Application of pine peroxidase th the amperometric determination of hydrogen peroxidase, *J. Kor. Chem. Soc.*, **57**, 329-334 (2013).
9. K. B. Rhyu, Electrochemical kinetic assessment of rose tissue immobilized biosensor for the determination of hydrogen peroxide, *Appl. Chem. Eng.*, **25**, 107-112 (2014).
10. J. R. Kirchner, *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 13, 12, Wiley-Interscience, NY, USA (1981).
11. K. J. Yoon, S. Y. Pyun, and H. S. Kwon, Chicken Liver Tissue-Based Amperometric Biosensor for the determination of Hydrogen peroxide, *J. Kor. Chem. Soc.*, **41**, 343-350 (1997).
12. W. Paik and S. M. Park, *Electrochemistry, Science and technology of electrode processes*, 1st ed., 52-55, Cheongmoongak, Korea (2001).
13. J. A. Brydson, *Rubbery Materials and their Compounds*, 291, Elsevier Applied Science, NY, USA (1988).
14. A. Mansouri, D. P. Makris, and P. Keflas, Determination of hydro-

- gen peroxide scavenging activity of cinnamic and benzoic acids employing a highly sensitive peroxyoxalate chemiluminescence-based assay, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**, 22-26 (2005).
15. K. B. Rhyu and K. J. Yoon, Amperometric Kinetics of Hydrogen Peroxide Biosensor Bound with Natural Rubber, *Appl. Chem. Eng.*, **21**, 689-693 (2010).
 16. K. B. Rhyu and K. J. Yoon, Electrochemical kinetic analysis of the carbon paste enzyme electrode bound with rubber, *Anal. Sci. & Tech.*, **24**, 113-118 (2011).
 17. K. B. Rhyu and K. J. Yoon, A new amperometric carbon paste biosensor Bound with chlorosulphonated polyethylene, *J. Kor. Chem. Soc.*, **55**, 323-327 (2011).
 18. C. W. Lau, J. Z. Lu, and M. Kai, Chemiluminescence determination of tetracycline based on radical production in a basic acetonitrile-hydrogen peroxide reaction, *Anal. Chim. Acta*, **503**, 235-239 (2004).