

전기화학적 방법을 이용한 다중 효소 전극 제작 및 글루코스 검출 특성에 관한 연구

한경호¹ · 신인성² · 윤도영^{1*}

¹광운대학교 공과대학 화학공학과

²지앤지인텍 중앙연구개발센터

(2020년 4월 22일 접수 : 2020년 5월 25일 수정 : 2020년 6월 12일 채택)

A Study on the Detection Characteristics in Glucose and Fabrication of Bi-Enzyme Electrode using Electrochemical Method

Kyoung Ho Han¹, In Seong Shin², and Do-Young Yoon^{1*}

¹Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul 01897, Korea

²G&G InTech Co. Ltd., Central R&D Center, Gyeonggi-do 16950, Korea

(Received April 22, 2020 : Revised May 25, 2020 : Accepted June 12, 2020)

요 약

본 연구에서는 글루코스 검출을 위한 HRP (horseradish peroxidase)와 GOD (glucose oxidase)를 혼합한 형태의 다중 효소 반응 바이오센서 개발연구를 수행하였다. 바이오센서는 제작 시간 단축을 위하여 전기전착법을 이용하여 제작하였으며, 경제적인 센서 제작을 위하여 SPE (screen printed electrode)를 사용하였다. 다중 효소 바이오센서의 효과를 확인하기 위하여 단일 효소 바이오센서를 제작하여 비교 및 분석하였다. 센서의 특성을 평가하기 위해서 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM), 순환전위법(cyclic voltammetry, CV), 전기화학적 임피던스 분광법 (electrochemical impedance spectroscopy, EIS), 시간대전류법(chronoamperometry, CA), 흐름 주입 분석법(flow injection analysis, FIA)를 수행하였다. SEM, CV, EIS의 분석결과로부터 효소가 전극 표면에 고정화가 잘 된 것을 확인하였고, CA로부터 제작된 다중 효소 바이오센서가 단일 효소 바이오센서에 비해 신호성능이 200% 향상된 것을 확인하였다. 이로부터 HRP와 GOD가 서로 촉매적으로 반응한다는 것을 설명할 수 있었다. 또한, FIA의 결과에서 동일한 농도의 글루코스 용액을 4회 나누어 주입하였을 때, 전류신호량이 일정함을 확인하였고, 농도에 따른 전류신호량을 분석하여 신호민감성, 재현성, 안정성 등이 우수함을 설명할 수 있었다.

Abstract : In this study, the development of biosensors capable of bi-enzyme reactions by including Horseradish peroxidase and glucose oxidase was carried out for detection of glucose. The sensors were manufactured using electro deposition method to reduce production time, and screen printed electrodes (SPE) were used to produce economical sensors. To check the bi-enzyme effect, the sensor was compared and analyzed with single enzyme biosensor. The characteristics of the sensor were evaluated using scanning electron microscopy(SEM), cyclic voltammetry(CV), electrochemical impedance spectroscopy(EIS), chronoamperometry(CA), and flow injection analysis(FIA). Analysis results from SEM, CV and EIS confirmed that the enzymes are well fixed to the electrode surface. In addition, it was confirmed that bi-enzyme biosensors manufactured from the CA method improved signal performance by 200% compared

*E-mail: yoondy@kw.ac.kr

to single enzyme biosensors. From this results, we were able to explain that HRP and GOD react catalyzed to each other. And the results of FIA showed that the intensity of each current signal was constant when the same concentration of glucose was injected four times. In addition, by analyzing the intensity of current signals for glucose concentrations, the biosensors manufactured in this study showed excellent trends in signal sensitivity, reproducibility and stability.

Keywords : Bi-enzyme, Screen printed electrode, Glucose detection, Horseradish peroxidase, Glucose oxidase, Electro deposition

1. 서 론

의학 기술이 발달함에 따라 인류는 고령화 사회에 급격히 진입하고 있으며, 건강에 대한 관심도가 점차 증가하는 추세다. 또한, 건강 관리 및 검진을 받는 이용자수는 매년 증가하고 있으나, 검사 결과를 받기까지 비교적 긴 시간과 불편함을 가지고 있는 문제점이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 최근 바이오센서에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 바이오센서는 글루코스(glucose), 바이러스, 세포, 호르몬 등의 표지 물질을 단백질, DNA, antibody, enzyme 등의 bio receptor를 통하여 전기화학 및 분광학적 신호를 감지하는 장치이며 정량적, 정성적 분석이 용이하다는 장점이 있다¹⁻⁴). 또한 표지 물질을 선택적으로 감지할 수 있으며, 반응속도가 빠르고, 감지능이 뛰어나다는 장점을 가지고 있다. 이러한 장점으로 인해 연구실, POC (point of care)산업, 자가진단(home diagnostics)산업, 산업공정(industrial processes), 환경 모니터링(environment monitoring) 산업 등에서 활발히 개발되고 있다⁵). 그러나 반응 조건의 최적화 및 비교적 높은 가격 문제 등 해결해야 할 과제가 남아 있다.

바이오센서의 제조 방법에는 크게 drop-coating, SAM (self-assembled monolayer), 전기전착법(electrodeposition) 등이 있다. Drop-coating은 bio receptor를 용액 상태로 제조하여 전극 표면에 직접 떨어뜨려 말리는 방법으로서 제작이 편한 장점이 있지만 제조 시간이 보통 6시간에서 12시간정도 소요되며, 전극두께를 조절할 수 없고, 전해질에 고정화된 bio receptor가 씻겨 나갈 수 있다는 단점이 있다⁴). SAM은 작용기(functional group)를 가진 고분자물질을 이용하여 효소를 전극에 고정화 하는 방법으로서 안정적인 바이오센서 제작이 가능하나 전극의 두께를 조절할 수 없으며, 고정화되는 효소의 양을 조절할 수 없다는 단점이 있다. 또한 전극 제조 시간이 12시간에서 24시간정도로 비교적 오랜 제조 시간을 요구한다^{1,2}). 전기전착법은 전기화학적 반응을 이용하여 효소를 전극 표면에 고정화 하는 방법으로서 전류의 인가로 인해 효소의 활성이 저하될 수 있다는 단점이 있지만

비교적 실험 방법이 간단하고, 전극의 두께 조절이 가능하며, 전극 제조 시간이 60~300초 정도로 다른 방법들에 비하여 매우 짧아 현재 활발히 연구되고 있다^{1,5}).

한편, 바이오센서 개발에 있어서 다양한 전극에 대한 연구의 필요성이 부각되고 있다. 대표적으로 금 전극, ITO (Indium tin oxide)전극, GCE (Glassy carbon electrode), SPE (Screen printed electrode) 등이 있으며, 해당 전극들에 나노 입자, 고분자, bio components 등을 이용하여 전극으로 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다.⁶⁻⁸) 특히, SPE 전극은 소형화, 다기능성, 저렴한 비용, 대량 생산이 가능하다는 점에서 바이오센서 시장에서 매우 유망한 전극 중 하나이다.⁹⁻¹¹) 금속 입자, mediators, biocomponents 등의 물질을 이용하여 흡착, 전기전착, electro-polymerization 등의 방법으로 전극 표면을 개질 하기 용이하다는 장점 때문에 현재 SPE 전극을 이용한 바이오센서 개발 연구가 활발하다.^{11,12}) SPE 전극은 작업전극(working electrode), 상대전극(counter electrode), 기준전극(reference electrode)이 모두 포함된 하나의 칩 형태로 구성되어서 사용이 편리하고, 전극 면적이 고정되어 있어 전류 신호 분석이 용이하다. 그러나 작업전극이 탄소 성분으로 구성되어 전극저항이 매우 큰 편이며, 전기화학 반응 속도가 다소 낮다는 단점이 있다. 이에 미세 전류 신호를 감지하기 위한 센서로서 사용하기에는 어려움이 있으므로 전기전착법을 이용하여 전극을 개질 하여 전기화학적 성능을 향상시키고자 하였다.

본 연구에서 제조한 bi-enzyme센서는 한 가지의 bio receptor가 아닌 HRP (horseradish peroxidase) 효소와 GOD (glucose oxidase) 효소의 복합적인 반응을 이용한 다중 바이오 센서이다. 이러한 bi-enzyme 센서는 각 효소가 서로에게 촉매적으로 반응하여 그 성능을 향상시키며, HRP 효소를 통한 과산화수소 제거로 인하여 GOD 효소의 활성 저하를 막는 장점을 가지고 있다¹³⁻¹⁶). 이에 본 연구에서는 HRP 효소와 GOD 효소가 혼합된 형태의 bi-enzyme 센서를 drop-coating 방법과 전기전착법으로 제조하여 GOD의 글루코스분해 반응과 이 때 발생하는 과산화수소의 HRP 효소에 의한 분해 반응을 전기화학적 방법으로

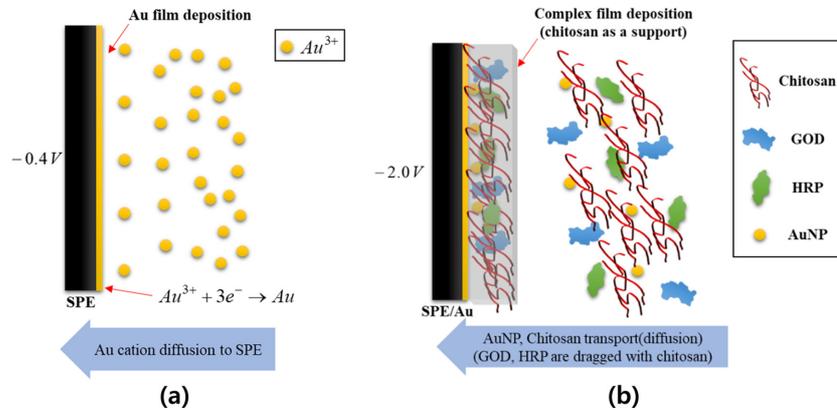


Fig. 1. Electrodeposition mechanism of : (a) step 1; (b) step 2.

분석하는 실험을 수행하였다. 또한, 순환전위법(cyclic voltammetry, CV), 전기화학적 임피던스 분광법(electrochemical impedance spectroscopy, EIS), 시간대전류법(chronoamperometry, CA), 흐름 주입 분석법(flow injection analysis, FIA)을 통하여 제조된 센서의 성능을 평가하였다.

2. 실험

2.1 시약

Horseshoe peroxidase (type I, 59 units/mg), glucose oxidase (type X-S, 138.8 units/mg), D-glucose, chitosan, potassium ferricyanide (<math><10 \mu\text{m}</math>, 99%), potassium chloride는 Sigma-Aldrich에서 구매하였으며, hydrogen tetrachloroaurate (III) hydrate는 Kojima에서 구매하여 사용하였다. 또한, SPE는 Pine research instrument 사의 제품을 사용하였다.

2.2 실험 방법

2.2.1 키토산(chitosan) 용액 제조

1% 키토산 용액에 아세트산을 첨가하여 pH 4로 조정된 뒤 상온에서 24시간동안 300 rpm의 속도로 교반하여 용해시켰다. 이후, 1 M의 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 6.8까지 적정한 뒤에 밀봉하여 4°C에서 보관하였다.

2.2.2 금 나노입자(AuNP) 합성

1 mM의 HAuCl₄ 용액 20 mL를 교반하면서 끓는점까지 가열한다. 이 때 1% 농도의 구연산소다(trisodium citrate) 2 mL를 주입하고, 3분간 추가로 가열하면 용액의 색은 노란색에서 자주색으로 변한다. 완성된 AuNP는 상온에서 식힌 뒤 4°C에서 보관하였다. 이

때 측정된 AuNP의 크기는 18.6±3 nm로 확인되었다.

2.2.3 bi-enzyme 전극 제조

본 실험에서는 GOD, HRP 두 가지 효소를 키토산 용액과 AuNP를 이용하여 전기전착법으로 전극 표면에 고정하였다. 효소 용액은 앞서 제조된 키토산 용액 2.5 mL와 AuNP용액 2.5 mL에 5 mg의 GOD와 5 mg의 HRP를 혼합하여 제조하였다. Bi-enzyme 전극은 다음과 같이 2 step으로 제조하였고 해당 step에서의 전착 원리를 Fig. 1에 보였다.

Step 1. 전극의 지름이 2 mm인 SPE를 증류수에 세척한 뒤, HAuCl₄ 용액에 담그고 -0.4 V에서 5분간 전착을 진행하였다.

Step 2. 제조된 gold/SPE 전극을 효소 용액에 담그고 -2 V에서 5분간 전착한 뒤 밀봉하여 4°C에서 보관하였다.

3. 결과 및 검토

3.1 전극 표면의 SEM 분석

SPE 전극 표면에 키토산, 금나노입자, GOD, HRP 등이 제대로 전착되었는지 확인하기 위해 SEM 분석을 수행하였다. Fig. 2(a)는 SPE 전극의 표면 사진이다. Fig. 2(b)의 매끄럽게 코팅된 표면으로부터 AuNP와 키토산이 SPE 전극 표면에 제대로 전착되었음을 알 수 있다. Fig. 2(c)는 SPE에 AuNP, 키토산, GOD가 SPE 전극표면에 고정화 되어 매끄러운 표면 위에 GOD가 전착되어 있음을 확인할 수 있으며, Fig. 2(d)는 SPE 전극 표면에 AuNP, 키토산과 함께 GOD, HRP가 고정화되어, Fig. 2(c)에 비해 좀 더 표면이 거칠어지고 큰 입자를 형성하며 전착되었음을 알 수 있다. SEM 분석결과로부터 전기전착법이 키토산, Au-

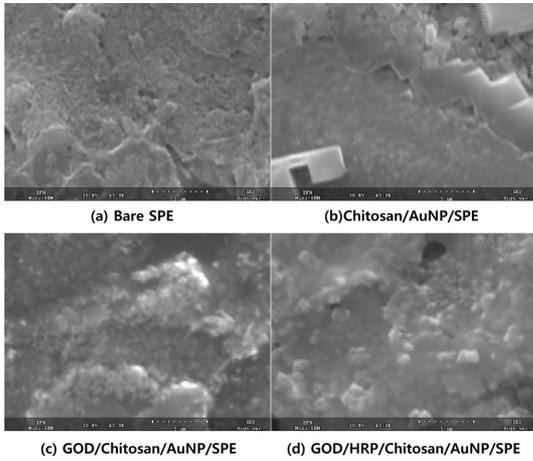


Fig. 2. SEM images of SPE

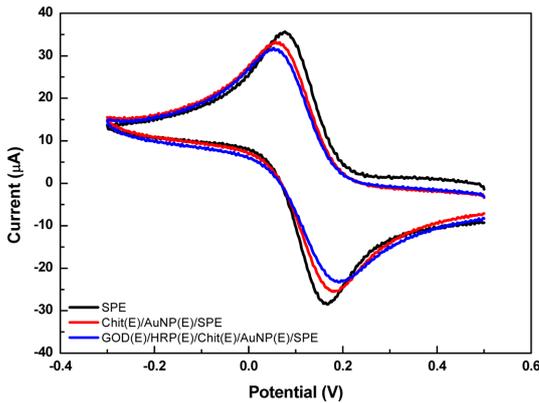
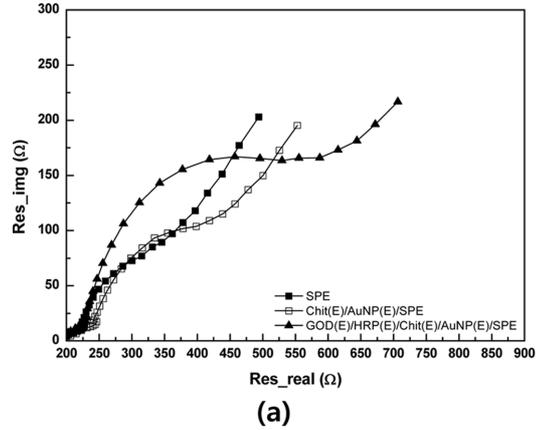


Fig. 3. Cyclic voltammetry graph of the modified electrode in electrodeposition

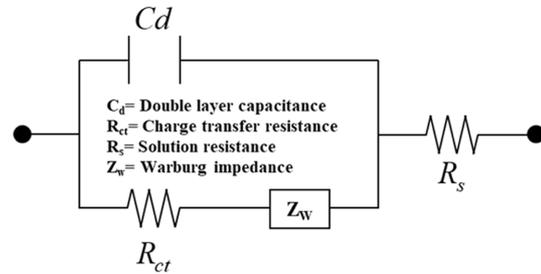
NP, GOD, HRP를 전극에 고정시킬 때 충분히 효과적인 방법을 확인하였다.

3.2 전극개질 특성 평가

전극 표면의 전기화학적 특성을 평가하기 위해 CV 및 EIS 분석을 수행하였다. Fig. 3은 SPE, Chitosan/AuNP/SPE, 그리고 GOD/HRP/Chitosan/AuNP/SPE 작업전극을 이용하여 전기화학적 특성을 평가한 CV 결과이다. 0.1 M 염화칼륨(KCl)과 5 mM 페리시안화칼륨($K_3[Fe(CN)_6]$)이 혼합된 용액을 전해질로 사용하여 실험을 진행하였으며, 주사속도(scan rate)는 100 mV/s로 고정하였다. CV 분석 결과는 SPE 전극의 환원peak전압(E_{pc_SPE})은 0.0772 V, 산화peak전압(E_{pa_SPE})은 0.1668 V로 나타났다. 이에 따른 산화-환원peak전



(a)



(b)

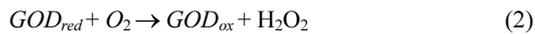
Fig. 4. (a) Nyquist plot of the modified electrode in electrodeposition; (b) equivalent circuit of the impedance spectroscopy

압차(ΔE)는 0.0896 V의 값을 갖는다. 이에 비해 Chitosan/AuNP/SPE 전극의 E_{pc_SPE} 는 0.05677 V, E_{pa_SPE} 는 0.1778 V로 나타났으며, 이에 따른 ΔE 는 0.12103 V로 peak 전위의 차가 SPE 전극에 비해 증가하였으며, peak 전류 값은 감소하였음을 확인하였다. GOD, HRP 효소 모두 전기전착법을 이용하여 전극표면에 고정화하였을 때 ΔE 는 더욱 증가하며, peak 전류 값 또한 감소함을 확인하였다.

Fig. 4는 각 전극의 표면 저항을 측정하기 위한 나이퀴스트(nyquist) 선도(a)와 이에 대한 등가회로(b)이다. 0.1 M 염화칼륨(KCl)과 5 mM 페리시안화칼륨($K_3[Fe(CN)_6]$)이 혼합된 용액을 전해질로 사용하여 실험을 진행하였으며, 주파수는 10 Hz ~ 100 kHz, 작동전위는 0.1 V, 진폭은 10 mV로 설정하여 임피던스 측정을 수행하였다. 선도에서 나타난 반원의 지름으로 전자 전달 저항인 R_{ct} 를 평가할 수 있다. SPE 전극의 R_{ct} 는 250 Ω으로 측정되었다. Chitosan/AuNP/SPE 전극의 R_{ct} 는 325 Ω으로 SPE 전극보다 다소 증가하였으며, GOD, HRP를 전극 표면에 고정화 하였을 때 측정된

R_{ct} 값은 475 Ω 으로 크게 증가함을 확인할 수 있다.

전극 표면에 효소가 성공적으로 고정화 되었다면 전극 표면에서의 전기화학 반응은 다음과 같이 일어난다^{3,5,14}.



위 반응과 같이 글루코스가 GOD에 의해 분해되는 과정에서 H_2O_2 가 발생하게 되고, H_2O_2 가 HRP에 의해 물이 되는 과정에서 전자가 발생하게 된다. 이 때 발생된 전자가 전극 표면에 반응함으로써 전류 신호가 발생한다.

글루코스 탐지를 위한 작동 전압을 결정하기 위하여 CV측정을 수행하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같다. 0 V에서 0.6 V의 전압 범위에서 0.1 M, pH 6.8의 인산완충생리식염수(phosphate buffer saline, PBS)를 전해질로 하여 실험을 진행하였으며, 주사속도를 100 mV/s로 고정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 전기화학계에 0.7 mM의 글루코스를 공급하였을 때 전기화학 반응이 일어남을 명백히 알 수 있다. 이는 고정화된 GOD와 HRP가 활성을 갖고 있으며 두 효소의 복합적인 화학반응으로 전류가 증폭됨을 확인할 수 있다.

제조된 enzyme 센서의 글루코스 농도에 따른 전류 응답 및 bi-enzyme 센서의 특성을 평가하기 위하여 CA 분석을 실시하였다. 작동 전위는 0.5 V로 설정하였으며, 0.1 M, pH 6.8의 PBS 용액에서 글루코스를

적정 하였을 때의 전류 응답을 확인하였다. Fig. 6은 글루코스 농도 변화에 따른 전형적인 전류-시간 그래프를 나타낸다. 교반되고 있는 PBS 용액에 글루코스 용액을 주입하였을 때, 산화 전류는 가파르게 증가하며 약 200초 이내에 안정적인 전류를 형성함을 확인하였다. 본 연구에서 제안된 바이오센서는 0.005 mM에서 0.08 mM까지 글루코스의 농도에 대하여 선형적인 반응을 나타낸다. 이러한 글루코스검출에 대한 높은 민감성은 키토산과 AuNP가 bi-enzyme 효소반응과정에 효과적인 물질임을 나타낸다. 또한, GOD만 고정하였을 때보다 GOD와 HRP를 함께 고정하였을 때 전류응답이 더 큼을 확인할 수 있다. 이는 bi-enzyme 센서에서 각 효소가 서로 촉매적으로 반응하고 GOD의 활성 저하를 막는다는 이론에 잘 부합함을 보여준

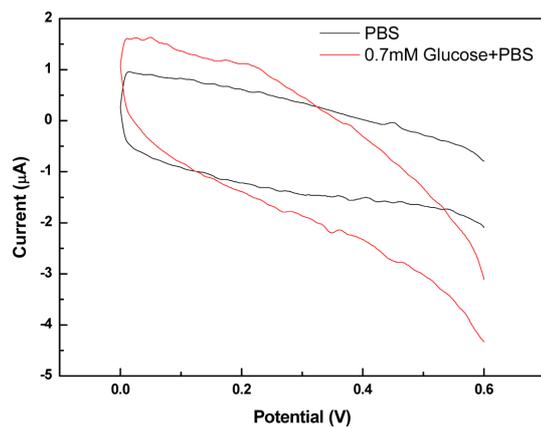


Fig. 5. Cyclic voltammetry graph of the modified electrode in PBS buffer

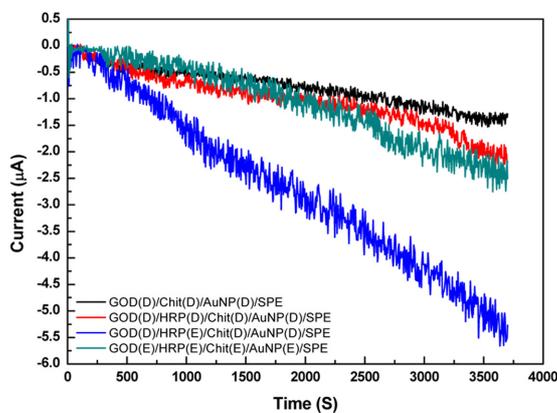
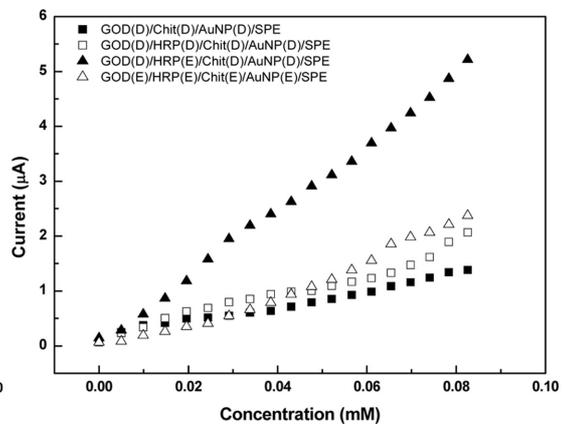


Fig. 6. Current response by the glucose reaction of enzyme sensor



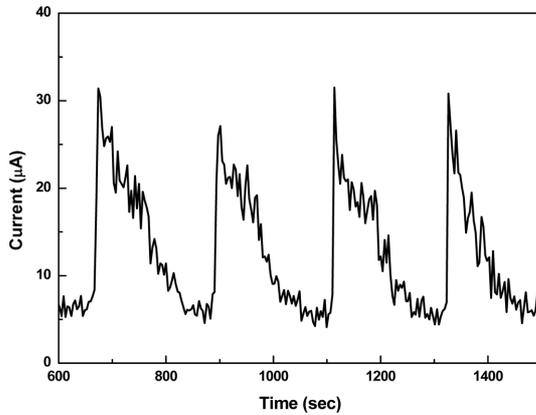


Fig. 7. FIA Current response by 1 M glucose injection

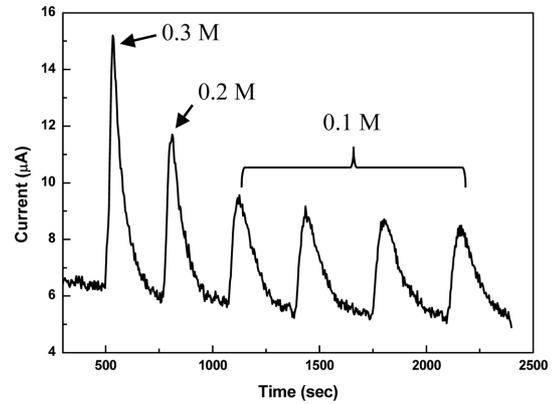


Fig. 8. FIA Current response by glucose concentration

다¹³⁻¹⁶). Drop-coating 방법(D)으로 제작한 bi-enzyme 센서보다 전기전착법(E)으로 제작한 bi-enzyme 센서가 전류응답이 더 크음을 확인할 수 있으며, 이는 전기전착법이 기존의 바이오센서 제작 방식인 drop-coating 방법을 대체할 수 있음을 알 수 있다.

3.4 FIA 방법을 이용한 enzyme 센서의 안정성 평가

본 연구에서는 enzyme 센서의 안정성 평가를 위해 FIA 방법을 도입하였다. FIA 방법은 전기화학cell 내부에 일정한 흐름을 계속 주어 전극 표면에 반응하는 전류 신호 응답을 확인하는 방법으로서 유량 조절이 편리하고, 분석 물질의 농도 변화가 편리하며, 센서로서의 민감성, 안정성, 재현성을 모두 확인할 수 있다는 장점이 있다. 시스템 구성은 연동펌프로는 Cole-Parmer instrument사의 제품을 사용하였으며 control valve는 Diba industries사의 PEEK distribution and loop injection valve를 사용하였다. 전류 신호 응답을 위하여 CA를 실시하였으며, 작동 전압은 0.5 V, flow rate는 2 mL/min, 전해질은 0.1 M, pH 6.8의 PBS를 사용하였다.

전기전착법으로 제작한 bi-enzyme 센서를 1 M의 글루코스를 분석물질로 4회 연속 측정된 결과는 Fig. 7과 같은 농도에서 전류 peak가 4회 연속 일정함을 나타내었다. 이에 본 연구에서 제작한 bi-enzyme 센서가 신호 재현성 및 안정성을 갖는 것을 확인할 수 있다. 또한, Fig. 8과 같이 글루코스의 농도를 0.3 M에서 0.1 M까지 변화를 주어 글루코스 용액을 2 mL씩 주입하였을 때, 전류 peak가 농도에 따라 선형적으로 증가함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 제작한 bi-enzyme 센서가 민감성, 안정성, 재현성 모두 만족스러운 결과를 보인 것을 확인하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 GOD, HRP 효소간의 촉매적 역할을 이용한 bi-enzyme 센서를 개발하여 그 특성을 전기화학적, 분광학적 방법으로 확인하였다. 전극 개질 방법으로는 전기전착법과 drop-coating 두 가지 방법으로 개질하여 비교 분석하였다. 전위주사법과 임피던스 분광법을 통하여 전극 표면에 AuNP, 키토산, 효소가 고정되었을 때의 표면 저항을 확인하고 불균일 반응속도상수를 구하여 전극 표면이 실험에서 의도한 바대로 개질되었음을 확인하였으며, 고정화된 효소의 신호 민감성 평가를 위하여 CA를 수행하였고, 분석물질인 글루코스의 농도에 따라 전류신호가 선형적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 single enzyme sensor보다 bi-enzyme 센서가 신호민감성이 뛰어난 것을 확인하였으며, 특히 HRP를 전기전착법으로 고정화 하고, GOD를 drop-coating 방법으로 고정화 하였을 때 신호민감성이 약 400% 증가하는 것을 확인하였다. 또한 전기전착법으로 제작된 bi-enzyme 센서의 안정성을 확인하기 위하여 FIA 방법을 수행하였다. 2 mL/min의 유량에서 4회 연속 전류 peak가 같음을 확인하였고, 글루코스의 농도를 조절하였을 때 전류 peak가 선형적으로 증가하는 것을 확인하였다. 이와 같은 실험 방법을 통해 신호 재현성을 확인함에 따라 본 연구에서 제작된 bi-enzyme 센서의 안정성을 입증하였다. 본 연구는 enzyme센서 제작에 있어서 기존의 단일 효소 반응이 아닌 이중효소의 복합적인 반응을 이용함으로써 각 효소가 서로 효과적으로 반응함을 확인하였고, 기존의 제작 방식인 drop-coating이 아닌 전기전착방법을 사용함으로써 더욱 효과적인 방법론을 제시하였다. 이러한 결과는 전기화학반응계의 구성 및 바이오센서 개발, 분석 연구에 있어서 도움이 될 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2018년 광운대학교 교내 학술연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. X. Luo, J. Xu, Y. Du, H. Chen, 'A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition', *Analytical Biochemistry*, **334**, 284 (2004).
2. B.W. Park, D.S. Kim, and D.Y. Yoon, 'Surface modification of gold electrode with gold nanoparticles and mixed self-assembled monolayers for enzyme biosensors', *Korean J. Chem. Eng.*, **28**, 64 (2011).
3. C.X. Lei, S.Q. Hu, G.L. Shen, R.Q. Yu, 'Immobilization of horseradish peroxidase to a nano-Au monolayer modified chitosan-entrapped carbon paste electrode for the detection of hydrogen peroxide', *Talanta*, **59**, 981 (2003).
4. X. Kang, J. Wang, H. Wu, I. A. Aksay, J. Liu, Y. Lin, 'Glucose Oxidase-graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing', *Biosensors and Bioelectronics*, **25**, 901 (2009).
5. S. Yang, Z. Lu, S. Luo, C. Liu, Y. Tang, 'Direct electrodeposition of a biocomposite consisting of reduced graphene oxide, chitosan and glucose oxidase on a glassy carbon electrode for direct sensing of glucose', *Microchim Acta*, **180**, 127 (2013).
6. H.S. Wang, Q.X. Pan and G.X. Wang, 'A biosensor based on immobilization of horseradish peroxidase in chitosan matrix cross-linked with glyoxal for amperometric determination of hydrogen peroxide', *Sensors*, **5**, 266 (2005).
7. S. Chairam, P. Buddhalee and M. Amatongchai, 'A novel hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on poly(aniline-co-o-aminobenzoic acid) modified glassy carbon electrode coated with chitosan film', *Int. J. Electrochem. Sci.*, **8**, 10250 (2013).
8. L. Wang, E. Wang, 'A novel hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on colloidal Au modified ITO electrode', *Electrochemistry communications*, **6**, 225 (2004).
9. M. A. Sirvent, A. Merkoci, S. Alegret, 'Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review', *Sensors and Actuators B*, **69**, 153 (2000).
10. K. Grennan, A. J. Killard, and M. R. Smyth, 'Physical characterizations of a screen-printed for use in an amperometric biosensor system', *Electroanalysis*, **13**, 745 (2001).
11. S. Andreescu, L. Barthelmebs, J. Marty, 'Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides', *Analytica Chimica Acta*, **464**, 171 (2002).
12. M. P. O'Halloran, M. Pravda, G. G. Guilbault, 'Prussian Blue bulk modified screen-printed electrodes for H₂O₂ detection and for biosensors', *Talanta*, **55**, 605 (2001).
13. F. Li, Z. Wang, W. Chen, S. Zhang, 'A simple strategy for one-step construction of bienzyme biosensor by in-situ formation of biocomposite film through electrodeposition', *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 3030 (2009).
14. P. Yang, L. Wang, Q. Wu, Z. Chen, X. Lin, 'A method for determination of glucose by an amperometric bienzyme biosensor based on silver nanocubes modified Au electrode', *Sensors and Actuators B*, **194**, 71 (2014).
15. X. Chen, J. Zhu, Z. Chen, C. Xu, Y. Wang, C. Yao, 'A novel bienzyme glucose biosensor based on three-layer Au-Fe₃O₄@SiO₂ magnetic nanocomposite', *Sensors and Actuators B*, **159**, 220 (2011).
16. M. Gu, J. Wang, Y. Tu, J. Di, 'Fabrication of reagentless glucose biosensors: A comparison of mono-enzyme GOD and bienzyme GOD-HRP systems', *Sensors and Actuators B*, **148**, 486 (2010).