



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0129506
(43) 공개일자 2010년12월09일

(51) Int. Cl.

H01M 8/16 (2006.01) H01M 8/04 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0048100

(22) 출원일자 2009년06월01일

심사청구일자 2009년06월01일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김승욱

서울 노원구 공릉2동 737번지 삼익아파트 104동 905호

이진영

서울특별시 동대문구 제기1동 122-512 18/3

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 7 항

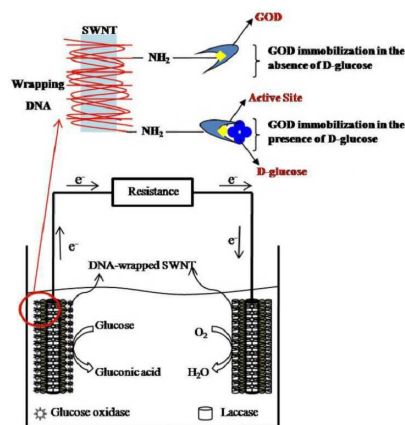
(54) DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 연료전지용 전극에 효소를 고정화하는 방법

(57) 요약

본 발명은 DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 연료전지용 전극에 효소를 고정화하는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 연료전지용 전극에 활성부위가 보호된 효소를 고정화하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, DNA와 탄소나노튜브를 이용한 전극을 적용하여 효소 연료전지를 제작할 때 전극에 고정화되는 효소의 활성부위를 보호하고 연료의 산화반응효소를 효과적으로 애노드에 고정화하는 방법을 제공한다. 이러한 방법으로 제작된 효소 연료전지는 기존의 효소 고정화 기술이 적용된 연료전지의 효소 활성 및 안정성을 높여 향상된 파워생산량을 나타내게 된다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

신현용

서울특별시 관악구 신림4동 503-7호

강성우

경기 구리시 토평동 961 한일아파트 204동 305호

특허청구의 범위

청구항 1

하기 단계들을 포함하는 DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 연료전지용 전극에 효소를 고정화하는 방법:

- DNA-감긴 탄소나노튜브를 준비하는 단계;
- 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브를 전기적 포텐셜 과정을 이용하여 전극에 흡착시키는 단계;
- 산화반응용 효소의 활성부위를 기질로 블로킹하는 단계; 및
- 상기 b)단계의 DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 전극에 상기 c)단계의 효소를 스위핑 전압 과정을 이용하여 고정화하는 단계.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 a)단계의 DNA는 20 내지 40개의 염기로 구성되며, 구아닌(G)과 티민(T)이 1개씩 반복적으로 연결된 단일가닥 DNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 a)단계의 DNA-감긴 탄소나노튜브는 단일가닥 DNA의 5'과 3' 말단에 아미노기(amino group)를 부착한 후, 상기 DNA와 탄소나노튜브를 증류수에 넣고 반응시켜 DNA-감긴 탄소나노튜브를 제조하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 b)단계에서 전기적 포텐셜 과정은 전압 20-80 V 하에서 0.5-2분간 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 c)단계의 산화반응용 효소는 포도당 산화효소(glucose oxidase)이고 기질은 포도당(D-glucose)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 d)단계의 스위핑 전압 과정은 0.01 내지 10 M의 인산버퍼 하에서 전압 -1.0 ~ 1.0 V 및 스캔 속도 20 ~ 200 mV/s로 4~5 사이클로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 d)단계에서 상기 고정화 반응용액에 EDC(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride)를 추가하는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 DNA-감진 탄소나노튜브가 흡착된 연료전지용 전극에 효소를 고정화하는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 DNA-감진 탄소나노튜브가 흡착된 연료전지용 전극에 활성부위가 보호된 효소를 고정화하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 연료전지(fuel cell)는 연료고갈과 환경문제가 부각되면서 대체에너지로서 많은 연구가 진행되고 있으며, 특히 효소 연료전지(enzymatic fuel cell, EFC)는 연료전지에서 화학촉매 대신 생물학적인 효소를 이용하여 상온과 상압에서 작동이 가능하고 인체에 무해한 물질을 이용할 뿐만 아니라 그 크기가 작기 때문에 인체의학, 바이오 센서(biosensor), 소형 전자제품의 배터리 등 실생활에 많은 응용이 가능하다. 따라서 이러한 효소적 연료전지의 상용화가 실현되기 위해서는 효소의 안정도와 활성도를 높이고 최적화된 전자전달 환경을 만들어주는 것이 무엇보다 중요하다.

[0003] 또한, 탄소나노튜브(carbon nanotube, CNT)는 1991년 일본의 스미모 리지마 박사에 의해 발견된 이후 빠른 속도로 발전하고 있으며, 다양한 응용 가능성을 갖고 있는 획기적인 신소재이다. 구리의 1000배나 되는 우수한 전기 전도도, 강철의 100배 수준인 뛰어난 역학적 강도 등 물리적·화학적·구조적 특징으로 21세기를 이끌어갈 첨단 신소재로 각광을 받고 있다. 이러한 탄소나노튜브의 종류는 벽을 이루고 있는 탄소원자의 결합수에 따라 구분한다. 우선 단일벽 나노튜브(Single-wall Nanotube)는 탄소원자로 구성된 벽이 하나인 튜브 형태로 전기전도성, 열전도성이 가장 우수하다. 탄소원자로 구성된 벽이 두개인 이중벽 나노튜브(Double-wall Nanotube)는 전기전도성과 기계적 특성이 뛰어나다. 다중벽 나노튜브(Multi-wall Nanotube)는 하나의 튜브에 탄소원자로 구성된 벽이 여러 겹인 튜브 형태로 전기 및 열적 특성은 다소 떨어지나 기계적 특성이 우수하고 제조가 용이해 응용 범위가 넓다. 이밖에 단일벽 나노튜브가 여러 개 붙어서 다발을 이룬 튜브 형태인 다발형 나노튜브(Rope Nanotube)가 있다.

[0004] 탄소나노튜브는 또한 탄성이 좋고 화학적 안정성이 뛰어나며 바이오연료 물질과 친화성이 강하다. 이러한 특성으로 인해 각종 디스플레이기기, 램프, 바이오연료전지, 2차 전지, 반도체 등의 소재로 다양한 활용이 가능하다. 현재 CNT 관련 시장은 초기 단계이나 앞으로 3~5년 후에는 CNT 소재 관련 응용산업과 장치산업이 크게 활성화 될 것으로 예상된다.

[0005] 한편, 효소를 촉매로 사용하는 연료전지는 최근 많은 관심을 받고 연구가 진행되었다. 그러나 기존의 효소 고정화 기술을 이용한 효소 연료전지는 낮은 파워생산(power production)에 많은 문제점들을 가지고 있다. 그 중 하나의 원인은 고정화된 효소의 안정성과 낮은 활성을 들 수 있다. 따라서 이를 위해 각국의 많은 연구자들이 다양한 방법으로 이 문제를 해결하려고 노력하고 있다. 현재 효소 연료전지에 양극 전극(anode)의 효소 고정화 기술은 많이 연구되고 있으나 효소의 활성부위(active site)를 보호하면서 효소를 고정화하는 기술은 아직 미비한 상태에 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 기존의 효소 연료전지에서 효소의 안정성과 활성도를 향상시키기 위하여 다양한 연구를 수행하였고 2009년 2월 24일에는 "DNA-감진 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지 및 그 제조방법"을 특허출원(10-2009-0015311)한 바 있다. DNA-감진 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지는 기존의 효소 연료전지와 비교하여 향상된 전류와 파워덴시티를 갖게 되었다. 또한 본 발명자들은 효소 고정화시 효소 활성부위의 보호를 통한 효소의 안정성과 활성도를 향상시킬 수 있는 방법을 지속적으로 연구하여, 이를 DNA-감진 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지에 적용할 경우 전류와 파워생산량(power output)이 현저히 향상됨을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 효소 고정화시 효소 활성부위의 보호를 통하여 효소의 안정성과 활성도를 향상시킬 수 있는, DNA-감진 탄소나노튜브가 흡착된 연료전지용 전극에 효소를 고정화하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

- [0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 연료전지용 전극에 효소를 고정화하는 방법을 제공한다:
- [0009] a) DNA-감긴 탄소나노튜브를 준비하는 단계;
- [0010] b) 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브를 전기적 포텐셜 과정을 이용하여 전극에 흡착시키는 단계;
- [0011] c) 산화반응물 효소의 활성부위를 기질로 블로킹하는 단계; 및
- [0012] d) 상기 b)단계의 DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 전극에 상기 c)단계의 효소를 스위핑 전압 과정을 이용하여 고정화하는 단계.
- [0013] 본 발명의 방법에서, 상기 a)단계의 DNA는 구아닌(G)과 티민(T)이 1개씩 반복적으로 연결된 단일가닥 DNA인 것을 특징으로 하는데, 사용되는 탄소나노튜브의 전장에 따라 구성되는 염기의 개수를 적절하게 조절할 수 있으며 합성되는 DNA 올리고머의 특성상 바람직하게는 20 내지 40개의 염기로 구성되는 것이 적당하며, DNA의 길이가 상기 범위보다 길거나 짧게 되면 감기는 형태가 안정하지 못하여 쉽게 풀려버리게 된다.
- [0014] 본 발명의 방법에서, 상기 a)단계의 DNA-감긴 탄소나노튜브는 단일가닥 DNA의 5'과 3' 말단에 아미노기(-NH₂, amino group)를 부착한 후, 상기 DNA와 탄소나노튜브를 증류수에 넣고 반응시켜 DNA-감긴 탄소나노튜브를 제조하는 것을 특징으로 한다. 상기 아미노기는 당업계에 공지된 화학 합성방법으로 DNA에 부착되며 아미노기가 부착된 DNA는 상술한 방법에 의해 탄소나노튜브에 감긴 후, 효소의 고정화를 위해 사용된다. 본 발명의 실시예에 사용된 DNA는 본 발명자들이 직접 디자인하고 상업적 회사에 DNA 합성을 의뢰하여 아미노기가 부착된 상태로 입수하였다.
- [0015] 본 발명에서, 상기 a)단계의 탄소나노튜브는 단일벽 탄소나노튜브(single walled carbon nanotube), 이중벽 탄소나노튜브(double walled carbon nanotube), 다중벽 탄소나노튜브(multi-walled carbon nanotube) 및 다발형 탄소나노튜브(bundle of carbon nanotube)로 이루어진 군에서 선택하여 사용할 수 있으나, 바람직하게는 이중형, 다중형, 다발형 탄소나노튜브와 비교하여 상대적으로 부피가 크지 않고 DNA가 균일하게 감길 수 있는 내부 및 외부적으로 겹쳐져 있지 않는 단일벽 탄소나노튜브를 사용하는 것이 적당하다.
- [0016] 본 발명의 방법에서, 상기 b)단계에서 전기적 포텐셜 과정은 전압 20-80 V 하에서 0.5-2분간 수행되는 것을 특징으로 하는 한다. 여기서, 전기적 포텐셜 과정이란 파워 서플라이(power supply)라는 장치에서 일정한 전압을 일정 시간동안 적용시키는 반응을 말하는 것으로, 구체적으로 DNA-감긴 탄소나노튜브가 있는 TAE 버퍼에서 일정한 전압을 걸어주면 +극에 (-)전하를 띠는 DNA-감긴 탄소나노튜브가 전기적 흡착에 의해 고정화된다.
- [0017] 본 발명에서, 상기 "DNA-감긴 탄소나노튜브"는 DNA와 탄소나노튜브를 증류수에서 초음파 처리(sonicate)를 수행하면 DNA의 감싸기(wrapping) 현상, 즉 DNA가 탄소나노튜브를 물리적으로 나사선 형태로 둘러싸게 되는 현상이 일어나는데 이러한 현상을 이용하여 제조될 수 있다. 'DNA-감긴 탄소나노튜브'는 Johnson, R. R. et al., NanoLett. 2008, 8, 69-75에 실제 나사선 형태로 감기는 현상이 개시되어 있으며, 효소 연료전지에 적용한 예는, 본 발명자들의 특허출원 10-2009-0015311에 구체적으로 개시되어 있다.
- [0018] 상기 특허에 기술된 'DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 연료전지용 전극'에 대한 제조방법을 설명하면 다음과 같다.
- [0019] 단일가닥 DNA의 5'과 3'말단에 아미노기(amino group)를 부착하고; 상기 DNA와 탄소나노튜브를 증류수에 넣고 반응시켜 DNA-감긴 탄소나노튜브를 획득하고; 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브를 전기적 포텐셜 과정을 이용하여 전극에 고정화한 다음; 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브가 고정화된 전극에 산화반응물 효소 또는 환원반응물 효소를 순환 전압전류 과정을 이용하여 고정화하여 제조될 수 있다.
- [0020] 또한 본 발명의 방법에서, 상기 전극은 연료전지의 전극으로 사용될 수 있는 어떠한 종류의 금속일 수 있으나,

바람직하게는 금(Au), 백금(Pt), 니켈(Ni) 또는 그들의 합금 형태, 더욱 바람직하게는 금으로 된 전극이 적당하다.

[0021] 본 발명에 사용된 ‘연료전지’는 효소 연료전지를 말하는 것으로, 상기 용어 ‘효소 연료전지(enzymatic fuel cell, EFC)’는 기존의 바이오 연료전지의 촉매를 생체촉매인 효소로 대체하고 수소보다는 비용이 저렴하고 다루기가 편한 일반 알코올이나 젖산, 또는 포도당을 연료로 한 새로운 개념의 연료전지를 말한다. 여러 가지 생물체내에 존재하는 산화/환원 효소만을 이용하여 바이오 연료물질로부터 전자가 발생하여 전극을 통하여 이동할 수 있는 원리를 이용하여 다양한 효소 연료전지를 구현할 수 있다. 이러한 생물학적 효소를 이용한 연료전지는 친환경적인 전지로서 생체 효소를 이용하기 때문에 상온에서 수행할 수 있으며 미생물을 이용한 연료전지와 달리 값싼 바이오 연료를 계속적으로 넣어줌으로써 연속적인 전기에너지 발생장치가 용이하고 미생물의 성장패턴과 이차대사물의 영향을 고려하지 않아도 되는 장점을 가지고 있다.

[0022] 본 발명의 방법에서, 상기 c)단계의 산화반응 효소는 효소 연료전지에 사용되는 연료와 이를 산화시키는 효소가 서로 대응되도록 선택하여 사용되는데, 예를 들어, 연료로서 포도당(D-glucose)을 사용하는 경우 산화반응 효소는 포도당 산화효소(glucose oxidase)를 사용될 수 있고, 효소 연료전지에 사용되는 산화반응 효소가 포도당 산화효소이면 효소의 활성부위를 블로킹(blocking)하기 위한 기질은 포도당을 사용하는 것이 바람직하다.

[0023] 본 발명에서, ‘효소의 활성부위를 블로킹’ 또는 ‘효소의 활성부위를 보호’ 하는 것이란, 효소가 전극에 고정화될 때 효소의 활성부위 이외에 존재하는 COOH기가 전극에 부착되어 있는 NH₂기와 결합하도록 유도하기 위하여 활성부위를 기질로 먼저 결합시키는 것을 의미한다. 만일, 효소의 활성부위에 존재하는 COOH기가 전극의 NH₂기와 결합을 해 버리면 그만큼 효소 활성부위의 활성도가 떨어지게 된다. 따라서, 포도당 산화효소의 활성부위에 존재하는 COOH기를 제외한 나머지 부분의 COOH기에 결합하도록 하기 위하여 활성부위를 기질로 먼저 결합시키는 것이다. 이러한 효소 활성부위의 블로킹에 의해 효소 활성부위의 3차원적 구조가 보존되어 효소 활성도를 유지하게 되고 따라서 활성부위의 전자전달효율도 증가되는 효과를 발휘하게 된다.

[0024] 본 발명의 방법에서, 상기 d)단계의 스위핑 전압 과정은 potentiostat/galvanostat라는 장치에서 어느 특정 전압 범위에서 주어지는 스캔 전압속도에서 연속적으로 전압을 증가시키고 하강시키는 과정을 말하는 것으로, 상기 일정한 범위는 효소 연료전지에서 사용 가능한 전압 범위에서 적절히 선택하여 실시될 수 있으며, 바람직하게는 0.01 내지 1.0 M의 인산버퍼 하에서 전압 -1.0 ~ 1.0 V 및 스캔 속도 20 ~ 200 mV/s로 4~5 사이클로 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0025] 또한, 상기 스위핑 전압 과정인 스위핑 포텐셜 사이클(sweeping potential cycle) 반응을 실시하면 전극에서 효소의 흡착과정이 일어나게 된다. 이러한 전기적 흡착을 수행하는 이유는 보다 더 높은 농도의 효소가 전극에 고정화하기 위해서 실시한 것으로, 일단 전기적으로 흡착이 된 효소의 카르복실기(COOH)는 화학적으로 탄소나노튜브에 감겨있는 DNA의 아미노기(NH₂)와 아마이드 결합이 이루어져 최종적으로 고정화된다.

[0026] 이와 같은 결합에 있어서, 상기와 같이 스위핑 전압 과정으로만 수행될 수 있으나, 효소의 카르복실기와 전극의 아미노기의 아마이드 결합을 인위적으로 더욱 잘 유도하기 위하여 커플링제(coupling agent), 예컨대 EDC(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride), DCC(dicyclohexylcarbodiimide), DIC(diisopropylcarbodiimide) 등을 이용할 수도 있다. 본 발명의 실시예에서는 상기 EDC를 이용하여 추가적으로 효소의 카르복실기와 전극의 아미노기의 아마이드 결합을 유도함으로써 효소와 전극의 결합을 더욱 강력하게 하였다.

[0027] 본 발명에 있어서, 디옥시리보핵산 (DNA)이 감겨있는 탄소나노튜브 (CNT) 시스템이 적용된 효소 연료전지에서 효소 고정화 시 그 효소의 활성부위를 보호하면서 고정화하는 방법을 도입하면 양극에서의 포도당 산화효소 (glucose oxidase, GOD)와 음극에서의 라케이즈 (laccase)의 전자전달 능력과 효소 활성도 및 안정도를 높이는 기능을 복합적으로 적용하여 결론적으로 효소연료전지 (EFC)의 파워생산량(power output)을 증가시킬 수 있다.

[0028] 본 발명의 구체적인 구현 예에서, 본 발명의 방법으로 제조된 전극을 포함하는 효소 연료전지는, 상기 양극(anode)과 음극(cathode) 연료로서 각각 포도당(glucose)과 산소(O_2)를 사용하고, 상기 산화환원반응용 효소로서 각각 포도당 산화효소(GOD)와 라케이즈(laccase)를 사용하며, 상기 양극과 음극의 전자전달 매개체로서 DNA-감긴 탄소나노튜브를 사용한다 (도 4 참조). 또한 양극과 음극의 전해질은 막이 없는 통합된 전해질을 이용하며 두 극의 기질인 포도당(glucose)과 산소(O_2)가 포함된 기존의 인산버퍼(phosphate buffer)를 이용한다.

[0029] 또한 본 발명의 방법으로 제조된 전극을 포함하는 효소 연료전지는, 본 발명의 실시예 2 및 도 5에서와 볼 수 있듯이, 최고 파워생산량(power output)이 약 $760 \mu W/cm^2$ 로서, 효소 활성부위를 블로킹하여 보호하지 않은 효소 연료전지의 파워생산량 $433.5 \mu W/cm^2$ 와 비교하여 약 73%가 증가됨을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 도 6에서는 1주일 동안 약 $730 \sim 760 \mu W/cm^2$ 의 파워생산량이 유지되는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 효소 연료 전지에서 효소 활성부위를 보호하는 본 발명의 방법을 이용했을 때 전자전달 능력과 효소 활성도 및 안정도에 효과가 크다는 것을 의미한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0031] 실시예 1. DNA-감긴 탄소나노튜브(DNA-wrapped CNT)의 제조

[0032] 먼저, DNA-감긴 탄소나노튜브를 만들기 위해, 구아닌(guanine, G)과 티민(Thimine, T) 염기서열이 30 base가 되는 단일가닥 DNA ((GT)₁₅)의 5'과 3'에 아미노기(amino group)가 있는 것으로 디자인하고 상업적 회사에 DNA 합성을 의뢰하여 아미노기가 부착된 상태로 입수하였다.

[0033] 제작된 DNA (40 mg/mL 증류수)와 단일벽 탄소나노튜브(single walled carbon nanotube, SWNT; Sigma-Eldritch)(40 mg/mL)를 3차 증류수에서 10분 동안 초음파 처리(sonicate)를 실시하여 단일벽 탄소나노튜브에 DNA가 감기도록 유도시켰다. 이는 DNA가 나사선으로 감기려는 성질과 CNT의 π - π stacking interaction이 조화가 되는 반응을 이용한 것이다. 이 용액에 0.2 mM의 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)를 넣고 4℃, 8W에서 2시간 동안 초음파 처리(sonicate)를 실시하고 13,000g에서 30분간 원심분리한 다음, 묻쳐있는 것을 제거하고 DNA이 기능화된 탄소나노튜브를 완성하였다.

[0034] 실시예 2. DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 전극의 제조

[0035] 실시예 1에서 제조된 DNA-감긴 탄소나노튜브를 전극에 고정화하기 위해, 먼저 금(Au)으로 된 전극 표면을 물리적으로 흡착이 되어 있는 물질을 제거하기 위한 용도로서 $0.3 \mu m Al_2O_3$ 분말과 $0.05 \mu m Al_2O_3$ 분말을 이용하여 닦아 내고, 화학적으로 단백질을 같은 물질은 분해시키기 위한 용도로서 피란하 용액 (piranha solution; $H_2SO_4:H_2O_2 = 3:1$)에 20분간 반응시켰다. 그리고 초음파 처리한 후 물로 깨끗이 닦아내고 3분간 100% 에탄올에 담근 다음, 꺼내어 순환전류전압 과정(CV cycle)을 0.1 M H_2SO_4 용액에서 포텐셜 범위 0.4 ~ 1.2 V로 실시하여 나머지 잔류 이물질을 전극에서 제거하였다.

[0036] 상기 클리닝(cleaning) 처리가 완료된 전극은 파워 서플라이(power supply)의 전압 50V에서 백금 전극을 이용하여 1분간 실시하여 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브를 전극에 고정화시켰다. 즉, DNA-감긴 탄소나노튜브가 분산되어 있는 TAE 버퍼에 분산되어 있고, 그 용액 내에서 백금전극을 음극으로 하고 상기 클리닝 처리된 전극을 양극으로 하여 파워 서플라이에 연결 후, 전압을 50V로 1분간 반응시키면 DNA-감긴 탄소나노튜브가 양극 전극에 흡착하게 된다.

- [0037] 실시예 3. DNA-감긴 탄소나노튜브가 고정화된 전극에 활성부위가 보호된 포도당 산화효소를 고정화한 전극의 제작
- [0038] 실시예 2에서 제조된 DNA-감긴 탄소나노튜브(DNA-wrapped CNT)가 흡착되어 있는 전극을, 5 mM의 EDC(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide hydrochloride)가 존재하는 인산버퍼에 넣음으로서 전극에 EDC를 먼저 고정화시키고, 다른 튜브에서는 포도당을 포함하는 인산버퍼에 포도당 산화효소를 넣어 10분간 반응시켜 효소의 활성부위를 보호한 다음, 이 효소가 포함된 용액에 상기 EDC가 고정화된 전극을 넣었다. 이 때 전극에 효소를 고정화하는 방법은 다음과 같다.
- [0039] 전압 범위를 -1.0 ~ 1.0 V와 스캔 속도(scan rate)를 20 ~ 200 mV/s로 하여 0.1 M 인산버퍼에 각각 포도당 산화효소(glucose oxidase, GOD; Bio Basic Inc.)와 라케이즈(Laccase, LAC; Fluka)를 넣어 스위핑 전압 과정(sweeping voltammetry)을 4~5 사이클 정도 실시하고 4℃에서 6시간 반응시킴으로써, 각각의 효소가 고정화된 포도당 산화효소 전극(GOD-anode)과 라케이즈 전극(Lac-cathode)을 제조하였다.
- [0040] 도 1에서, A는 DNA-감긴 탄소나노튜브가 고정화된 전극에 활성부위를 보호하지 않은 포도당 산화효소를 고정화한 연료전지용 전극의 전자현미경 사진(FE-SEM)이고, B는 활성부위를 보호한 포도당 산화효소를 고정화한 연료전지용 전극의 전자현미경 사진이다.
- [0041] 도 1에서, A와 B에 나타난 전극은 모두 DNA-감긴 탄소나노튜브로 인해 전반적으로 다공성이 풍부한 표면이 된 것을 확인할 수 있었다. 또한 활성부위를 보호한 포도당 산화효소를 고정화한 전극은 상대적으로 검은 반점들이 적은 것으로 나타나, 전극에 고정화된 포도당 산화효소의 양이 더 많은 것으로 판단되었다.
- [0042] 여기서, '검은 반점'의 의미는 DNA-감긴 탄소나노튜브가 전극에 흡착이 되어 다공성(porous)을 갖는데 그 다공성의 부분에서 사이사이의 공간이 검은 점으로 보이고 있다. 따라서 정확하게 전극의 DNA-감긴 탄소나노튜브에 효소가 고정화가 되면 그만큼 공간이 줄어들게 되므로 검은 부분이 적어질 것으로 예상하였고, 그만큼 DNA-감긴 탄소나노튜브들의 사이즈도 어느 정도 굵어진 것도 판단할 수 있다.
- [0043] 상기 도 1의 결과, 전극에 고정화될 수 있는 효소의 여러 표면 중 효소의 활성부위가 보호된 쪽으로는 고정화가 되지 않기 때문에 일정한 고정화 방향을 제공해줄 수 있는 것으로 보이며, 이로 인해 어느 정도 한 방향으로 고정화가 되어 고정화되는 양이 증가한 것으로 예측되었다. 즉, 효소의 활성부위를 블로킹하게 되면 그만큼 고정화되는 3차원적 모양이 어느 정도 일정하게 될 것으로 예측이 되고, 그러한 결과로 가지런히 표면에 고정화가 되면서 그만큼 고정화되는 효소의 양이 증가했을 것이라고 예측할 수 있다.
- [0044] 도 2는 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호하는 것이 전극의 순환 전압전류 값(CV cycle)에 미치는 영향을 도시한 그래프이다.
- [0045] 도 2에서, 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호하는 것이 전극의 양극 전류 피크(anodic current peak)가 1.0 V에 668 μ A로서 고정화하지 않는 연료전지보다 높게 나타났으며, 전체적인 산화면적(redox area)도 크게 나타났다. 따라서 효소 연료전지에서 효소 활성부위가 보호된 전극이 그렇지 않은 것보다 전기적인 특성이 우수하였다.
- [0046] 도 3은 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호하는데 사용되는 포도당(D-glucose)의 양에 따른 순환 전압전류 값을 도시한 그래프이다.
- [0047] 도 3에서, 사용된 포도당의 양이 0.1 M일 때 순환 전압전류 값이 가장 우수한 것으로 확인되었고, 0.1 M 이하 또는 0.2 M 이상 사용될 때에는 전체적인 산화 면적과 양극 전류 피크가 상대적으로 낮게 나타났다. 따라서 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호할 때 사용되는 포도당의 양은 0.1 M이 가장 적합한 것으로 확인되었다.
- [0048] 실시예 4. DDNA-감긴 탄소나노튜브가 고정화된 전극에 활성부위가 보호된 포도당 산화효소를 고정화한 전극을 이용한 효소 연료전지의 제작
- [0049] 상기 실시예 3에서 제작된 포도당 산화효소 전극(GOD-anode)과 라케이즈 전극(Lac-cathode)을 서로 연결하고,

연료가 되는 20 mM의 포도당과 O_2 가 포함된 인산버퍼(phosphate buffer; pH 7, 0.1M)를 이용하여 전해질(electrolyte)을 제조하고 이온막이 없는 효소 연료전지를 제작하였다 (도 4 참조). 제작 후, 연료전지를 potentiostat/galvanostat(WPG100, WonATech사, 한국)에 연결하고 WPG 프로그램(WPG100, WonATech사, 한국)으로 25°C에서 전압(V)-전류(I) 및 파워덴시티(Power output)를 측정하였다.

[0050] 도 4는 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소 연료전지의 설계에서, 효소 활성부위를 보호한 포도당 산화효소를 전극에 고정화하는 방법을 설명하는 개략도이다.

[0051] 도 5는 효소 활성부위를 보호한 상태에서 포도당 산화효소를 전극에 고정화(□, power output; ○, cell potential), 및 효소 활성부위를 보호하지 않은 상태에서 포도당 산화효소를 전극에 고정화(■, power output; ●, cell potential)한 DNA-감긴 탄소나노튜브가 포함된 효소 연료전지에서의 생산되는 전압(cell potential), 전류(current density) 및 파워생산량(power output)을 도시한 그래프이다.

[0052] 도 5에서, 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호한 상태에서 고정화한 전극이 결합되어 있는 효소 연료전지의 최고 파워생산량(power output)은 약 $760 \mu W/cm^2$ 로 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 활성부위를 보호하지 않은 포도당 산화효소를 고정화한 효소 연료전지의 파워생산량 약 $433.5 \mu W/cm^2$ 보다 약 73% 증가시킨 값이었다.

[0053] 또한, 도 6은 효소 활성부위를 보호한 상태에서 포도당 산화효소를 고정화한 DNA-감긴 탄소나노튜브를 포함하는 효소 연료전지가 1주일 동안 생산하는 파워생산량(power output)을 도시한 그래프이다.

[0054] 도 6에서, 1주일 동안 약 $730 \sim 760 \mu W/cm^2$ 의 파워생산량이 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 효소 활성부위를 보호한 상태에서 포도당 산화효소를 고정화한 DNA-감긴 탄소나노튜브를 포함하는 효소 연료전지에서 최대 $760 \mu W/cm^2$ 의 파워생산량이 생산되었고, 이는 효소 연료전지에서 효소 활성부위를 보호하는 효소고정화 방법을 이용했을 때 전자전달 능력과 효소 활성도 및 안정도에 효과가 크다는 것을 의미한다.

산업이용 가능성

[0055] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소 연료전지의 제작 시 효소의 활성부위를 보호하면서 효소 고정화를 실시하면 효소의 활성도를 높이고 전해질 내에서 전자전달 능력을 높일 수 있어 기존의 효소 활성부위를 보호하지 않은 것보다 향상된 파워생산량(power output)을 얻을 수 있다. 따라서 본 발명의 효소 고정화 방법은 효소 연료전지에서 효소 활성도 및 안정성 향상 뿐만 아니라 파워생산량을 향상시킬 수 있어 효소 연료전지 제조분야에서 매우 유용한 기술로 판단된다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 DNA-감긴 탄소나노튜브가 고정화된 전극에 활성부위를 보호하지 않거나(A), 활성부위를 보호한(B) 포도당 산화효소를 고정화한 연료전지용 전극의 전자현미경 사진(B)이다.

[0057] 도 2는 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호하는 것이 전극의 순환 전압전류 값(CV cycle)에 미치는 영향을 도시한 그래프이다.

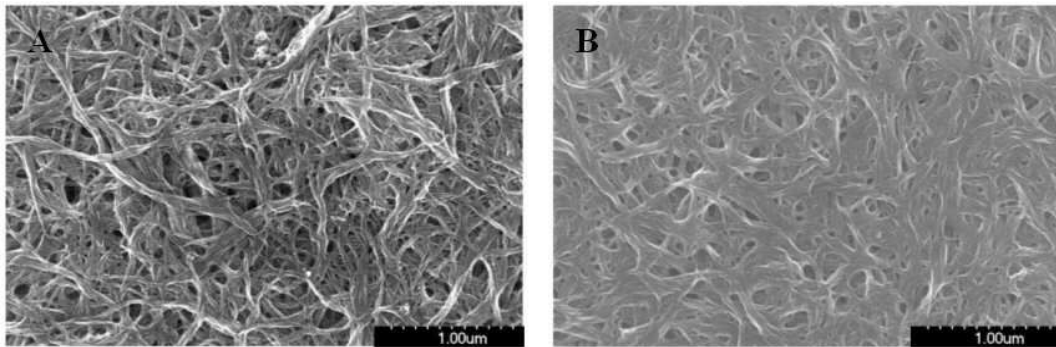
[0058] 도 3은 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호하는데 사용되는 포도당(D-glucose)의 양에 따른 순환 전압전류 값을 도시한 그래프이다.

[0059] 도 4는 효소 활성부위를 보호한 포도당 산화효소를 전극에 고정화하는 방법을 설명하는 개략도이다.

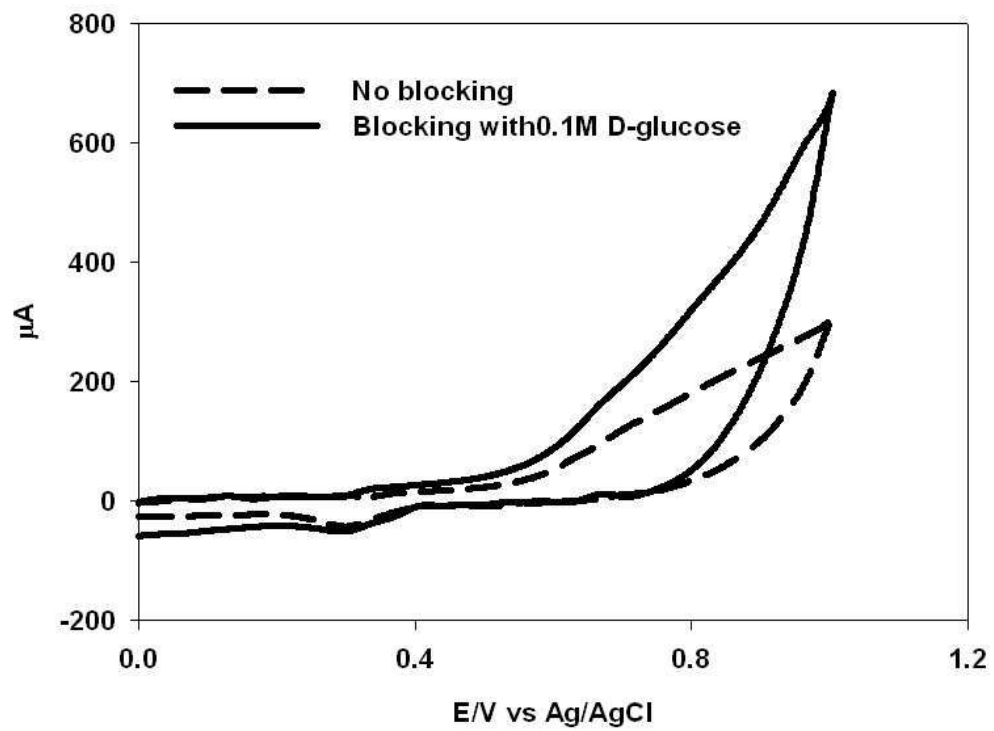
[0060] 도 5는 효소 활성부위를 보호한 상태에서 포도당 산화효소를 전극에 고정화(□, power output; ○, cell potential), 및 효소 활성부위를 보호하지 않은 상태에서 포도당 산화효소를 전극에 고정화(■, power output; ●, cell potential)한 DNA-감긴 탄소나노튜브가 포함된 효소 연료전지에서의 생산되는 전압(cell potential), 전류(current density) 및 파워생산량(power output)을 도시한 그래프이다.

도면

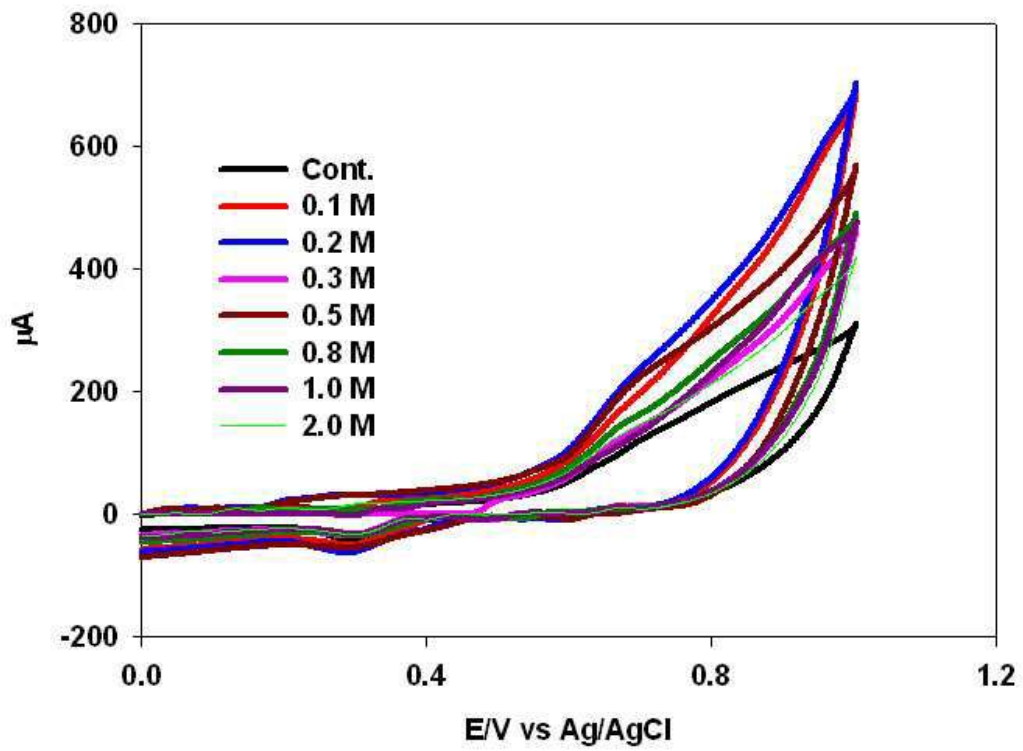
도면1



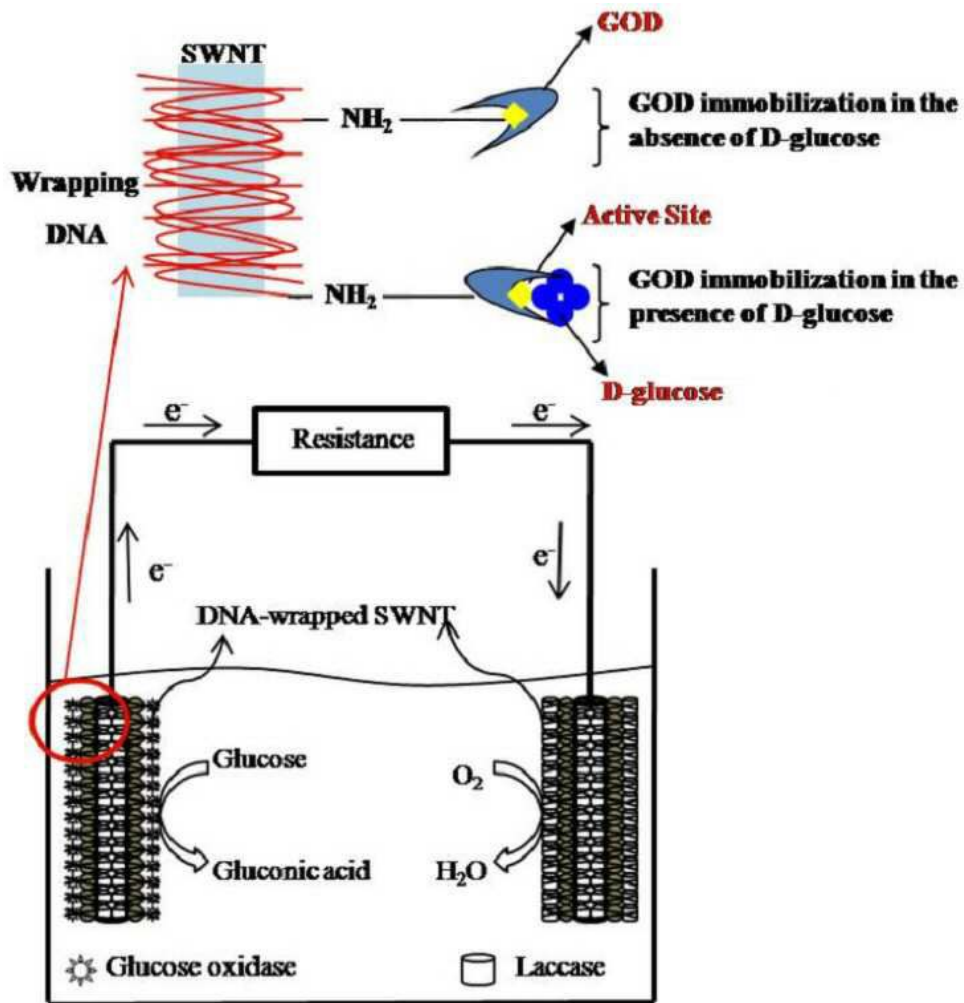
도면2



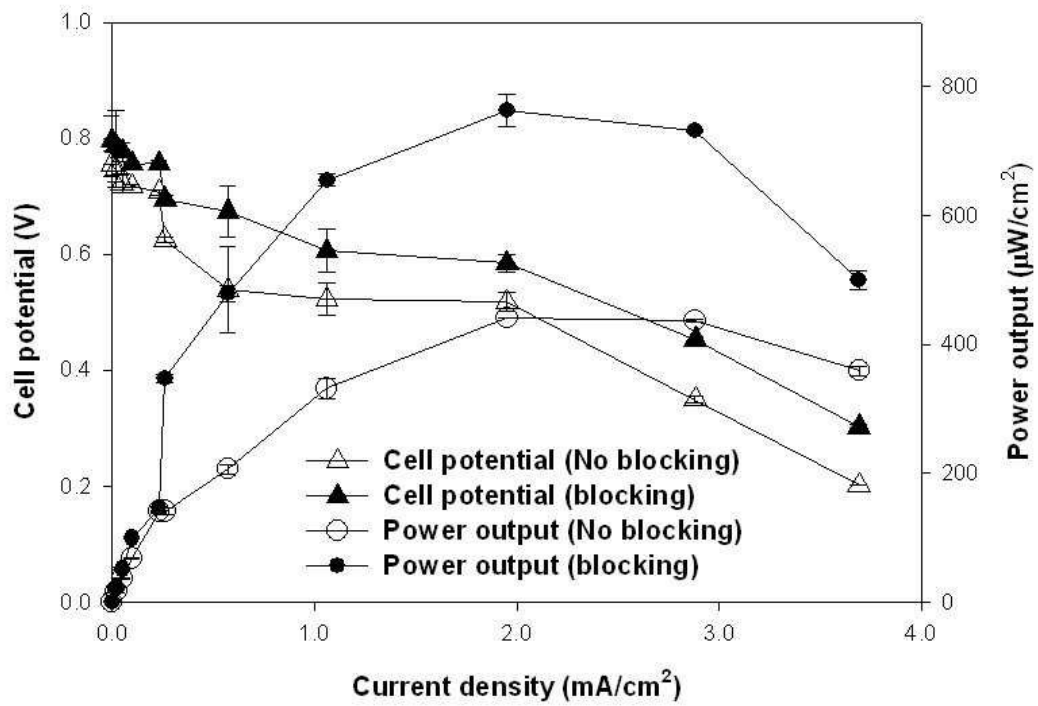
도면3



도면4



도면5



도면6

