



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0048986
(43) 공개일자 2009년05월15일

(51) Int. Cl.

H01M 8/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0115129

(22) 출원일자 2007년11월12일

심사청구일자 2007년11월12일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김승욱

서울 노원구 공릉2동 737번지 삼익아파트 104동 905호

이관영

서울시 영등포구 여의도동 55-1번지 대우 트림프 월드 A동 2104호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 7 항

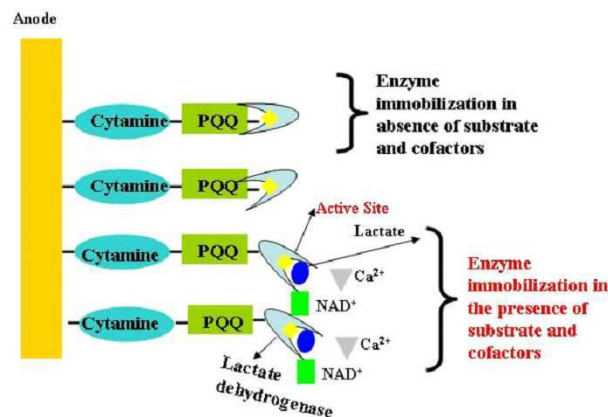
(54) 효소 연료전지용 전극에의 효소 고정화 방법

(57) 요약

본 발명은 효소 연료전지용 전극에의 효소 고정화 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 효소 연료전지용 전극을 시스타민으로 처리하여 아민기(NH₂)를 부착하고, 상기 애노드의 아민기와 퀴논계 전자전달 매개체의 카르복실기(COOH)를 아마이드 결합을 통해 고정화한 다음, 상기 고정화된 퀴논계 전자전달 매개체의 또 다른 카르복실기(COOH)와 효소 연료전지용 산화반응 효소의 아민기(NH₂)를 아마이드 결합을 통해 고정화하는 단계를 포함하는 효소 연료전지용 전극에의 효소 고정화 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 효소 연료전지의 제작 시 효소의 활성부위가 보호되면서 연료전지용 산화반응효소를 효과적으로 애노드에 고정화하는 방법을 제공하고, 이러한 방법으로 제작된 효소 연료전지가 기존의 효소 고정화 기술이 반영된 연료전지의 효소 활성과 안정성을 높여 향상된 파워덴시티를 얻는데 적합하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

강성우

경기 구리시 토평동 961 한일아파트 204동 305호

이진영

서울 성북구 석관2동 337-31번지 다솜오피스텔 40
3호

신현용

경기 군포시 재궁동 충무1차 아파트 208동 106호

전승우

경기 부천시 소사구 괴안동 118-33 302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0700321

부처명 서울시

연구사업명 전략사업 혁신 클러스터 육성 지원사업

연구과제명 고밀도 지역의 주거 및 상업용 신재생에너지 기술 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2005년 12월 01일 ~ 2010년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

하기 단계들을 포함하는 효소 연료전지용 전극에의 효소 고정화 방법:

- a) 효소 연료전지용 전극을 시스타민(cystamine)으로 처리하여 아민기(NH_2)를 부착하는 단계;
- b) 상기 전극의 아민기와 퀸계 전자전달 매개체의 카르복실기(COOH)를 아마이드 결합을 통해 고정화하는 단계; 및
- c) 상기 고정화된 퀸계 전자전달 매개체의 또 다른 카르복실기(COOH)와 효소 연료전지용 산화반응 효소의 아민기(NH_2)를 아마이드 결합을 통해 고정화하는 단계.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 c)단계 전에 상기 산화반응 효소의 활성부위를 연료기질, 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD^+) 및 염화칼슘(CaCl_2)으로 블로킹 시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 블로킹은 연료기질 20mM-10M, 니코틴아마이드 디뉴클레오티드(NAD^+) 10-60mM 및 염화칼슘 10-60 mM의 농도 하에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 b)단계 및 c)단계에서 아마이드 결합은 커플링제(coupling agent)에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 연료기질은 젖산(lactate)이고, 상기 산화반응 효소는 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase)이며, 상기 전극에 고정화된 퀸계 전자전달 매개체는 피롤로퀴놀린 퀸(pyrrroloquinoline quinone)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 전극은 금으로 된 전극인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 5항의 고정화 방법으로 효소가 고정화된 효소 연료전지용 전극.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 효소 연료전지용 전극에의 효소 고정화 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 효소 연료전지용 전극을 시스타민(cystamine)으로 처리하여 아민기(NH_2)를 부착하고, 상기 애노드의 아민기와 퀸계 전자전달 매개체의 카르복실기(COOH)를 아마이드 결합을 통해 고정화한 다음, 상기 고정화된 퀸계 전자전달 매개체의 또 다른 카르복실기(COOH)와 효소 연료전지용 산화반응 효소의 아민기(NH_2)를 아마이드 결합을 통해 고정화하는 단계를 포함하는 효소 연료전지용 전극에의 효소 고정화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 본 발명은 효소를 이용한 효소연료전지(enzymatic fuel cell)를 개발함에 있어서 파워덴시티(power density)를

증가시키기 위한 양극전극(anode)의 새로운 효소 고정화 기술에 해당하며, 효소 고정화시 구성성분들인 연료(substrate), 전달 매개체(니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드, NAD⁺), 그리고 염화칼슘(Ca²⁺, Calcium cation)의 농도를 최적화하는 것이다.

- <3> 연료전지(fuel cell)는 연료고갈과 환경문제가 부각되면서 대체에너지로서 많은 연구가 진행되고 있으며, 특히 효소 연료전지는 연료전지에서 화학촉매 대신 생물학적인 효소를 이용하여 상온과 상압에서 작동이 가능하고 인체에 무해한 물질을 이용할 뿐만 아니라 그 크기가 작기 때문에 인체의학, 바이오센서(biosensor), 소형 전자제품의 배터리 등 실생활에 많은 응용이 가능하다. 따라서 이러한 효소 연료전지의 상용화가 실현되기 위해서는 효소를 고정화 기술을 발전시켜 효소의 재활용 및 안정도를 높이는 것이 중요하다.
- <4> 효소를 촉매로 사용하는 연료전지는 최근 많은 관심을 받고 연구가 진행되었다. 그러나 기존의 효소 고정화 기술을 이용한 효소 연료전지(enzymatic fuel cell)는 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 문제들을 해결하고 노력하고 있다.
- <5> 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 있으며, 특히 배지(substrate) 및 각 조효소가 활성부위를 차단하여 전극에 고정화하는 기술은 아직 연구된 바가 없다. 따라서 본 발명의 목적은 금(Au)으로 되어 있는 양극의 전극(anode)에 전자 전달 매개체를 고정화 한 다음 새로운 고정화 기술을 도입하여 그 위에 효소를 고정화하는 방법을 제공하는 것이다.
- <6> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 효소 연료전지용 전극을 제작 시 전극에 사용되는 효소의 활성부위를 효소의 기질, NAD⁺ 및 염화칼슘으로 블로킹하는 경우 효소의 안정성과 활성이 증가되어 효소 연료전지의 파워덴시티가 향상됨을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <7> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 효소 연료전지용 전극에 효소를 고정화하는 새로운 방법을 제공하는 데 있다.
- <8> 본 발명의 다른 목적은 상기 효소 고정화 방법에 사용되는 구성성분들인 연료, NAD⁺ 및 염화칼슘의 농도를 최적화하는 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <9> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 효소 연료전지용 전극에의 효소 고정화 방법을 제공한다:
- <10> a) 효소 연료전지용 전극을 시스타민(cystamine)으로 처리하여 아민기(NH₂)를 부착하는 단계;
- <11> b) 상기 애노드의 아민기와 퀴논계 전자전달 매개체의 카르복실기(COOH)를 아마이드 결합을 통해 고정화하는 단계; 및
- <12> c) 상기 고정화된 퀴논계 전자전달 매개체의 또 다른 카르복실기(COOH)와 효소 연료전지용 산화반응 효소의 아민기(NH₂)를 아마이드 결합을 통해 고정화하는 단계.
- <13> 본 발명의 효소 고정화 방법에서, 바람직하게는 상기 c)단계 전에 상기 산화반응 효소의 활성부위를 기질, 니코틴아마이드 아마이드 디뉴클레오티드(NAD⁺) 및 염화칼슘(CaCl₂)으로 블로킹 시키는 것을 특징으로 한다.
- <14> 본 발명에서 효소 활성부위의 블로킹이란 효소 고정화 단계에서 퀴논계 전자전달 매개체의 카르복실기와 효소의 NH₂기가 결합할 때, 효소의 활성부위 이외에 존재하는 NH₂에 카르복실기가 결합하도록 유도하기 위하여 활성부위를 기질 등으로 먼저 결합시키는 것을 의미한다. 이러한 효소 활성부위의 블로킹은, 효소 활성부위의 3차원적 구조를 보존함으로써 효소 활성도를 유지하게 되고, 따라서 활성부위의 전자전달효율도 증대시킬 수 있는 장점이 있다.
- <15> 또한, 상기 블로킹에 사용되는 기질은 효소의 활성부위에 결합할 수 있는 어떠한 기질도 사용할 수 있으나, 바

람직하게는 최종제품인 효소 연료전지의 전해질 구성성분에 포함될 기질을 사용하는 것이 좋은데, 이런 경우 블로킹된 효소가 고정화된 애노드가 다시 연료전지에 사용될 때 이 물질의 오염가능성을 제거하고 효소 활성부위 블로킹의 효율을 높일 수 있다.

- <16> 본 발명의 기질 또는 연료기질은 효소 연료전지에 사용되는 연료인 동시에 효소의 기질로서 사용되는 동일한 것으로, 본 명세서에서는 용어 ‘기질’ 과 ‘연료기질’ 을 혼용하여 사용하였다.
- <17> 본 발명에서, 애노드(anode)는 일반적으로 전지(cell)에서의 양극 전극을 말하는 것으로 전자를 연료로부터 얻는 전극을 의미하며, 캐소드(cathode)는 전지에서의 음극 전극을 말하는 것으로 전자를 양극으로부터 받아서 전해제로 전달하는 전극을 의미한다.
- <18> 본 발명의 방법에서, 상기 c)단계에서 상기 연료와 연료의 산화반응용 효소는 사용되는 연료에 따라 그의 산화반응용 효소가 결정될 수 있으며, 본 발명에서처럼 젖산(lactate)을 연료로 하는 효소 연료전지의 경우, 그 산화반응용 효소는 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase)인 것이 바람직하다.
- <19> 본 발명의 방법에서, 상기 b)단계에서 애노드에 고정화된 퀴논계 전자전달 매개체는 애노드에 부착된 작용기와 결합할 수 있고 연료의 산화효소와도 결합할 수 있는 물질, 즉 퀴논계 고리형 화합물(불포화고리에 비닐렌기(C₂H₂)이나 카르보닐기(CO)가 결합되어 있음)들이 많은 데, 예를 들어 2,6-dichlorophenol-indophenol, Phenazine ethosulphate, Safranin-O, N,N-Dimethyl-disulphonated thionine 등이 사용가능하나, 이들 퀴논계 고리형 화합물 중 실제로 생물체 내에는 젖산 탈수소효소와 피롤로퀴놀린 퀴논의 전자전달 시스템이 존재하므로, 본 발명의 실시예에서와 같이 생물체 내 환경을 근거로 하였을 때, 바람직하게는 피롤로퀴놀린 퀴논(pyrroloquinoline quinone)인 것을 특징으로 한다.
- <20> 본 발명에서, 상기 피롤로퀴놀린 퀴논과 NAD⁺는 전자전달 개념에서 볼 때, 연료전지 내에서 일어나는 화학반응에서 전자 전달 매개체(electron transfer mediator)로 사용되었으며, 이들의 전자전달 메커니즘은 다음과 같다.
- <21> (1) 젖산 탈수소효소에 의해서, 젖산(Lactate) → 피루브산(Pyruvate) + 2e⁻ + 2H⁺
- <22> (2) NAD⁺ + 2e⁻ + 2H⁺ → NADH + H⁺
- <23> (3) NADH + PQQ(피롤로퀴놀린 퀴논) H⁺ → NAD⁺ + PQQH₂
- <24> (4) PQQH₂ → PQQ + 2H⁺ + 2e⁻
- <25> 본 발명의 연료의 산화반응용 효소와 퀴논계 전자전달 매개체가 고정화된 애노드의 구성은 상기 메커니즘을 이용하는 것으로, COOH group을 가지는 퀴논이 먼저 NH₂가 부착된 애노드에 결합하고, 여기에 EDC에 의하여 효소의 NH₂기가 결합하는 구성으로 이루어져 있다. 여기서, EDC는 coupling agent로서 안정한 아마이드 결합을 유도하는 촉매역할을 하는 물질이다. 따라서 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)이 가지고 있는 여러 개(3개)의 카르복실기(COOH) 중에 하나와 효소의 NH₂가 결합하게 된다.
- <26> 본 발명의 효소 고정화 방법에서, 상기 b)와 c)단계에서 아마이드 결합은 커플링제(coupling agent), 예컨대 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로클로라이드(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), diisopropylcarbodiimide (DIC) 등에 의해 유도될 수 있으나, 바람직하게는 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로클로라이드(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC)에 의해 유도되는 것이 적당하다.
- <27> 본 발명에 있어서, 상기 블로킹은 기질 20mM-10M, 니코틴아마이드 디뉴클레오티드(NAD⁺) 10-60mM 및 염화칼슘 10-60 mM의 농도 하에서 수행하는 것을 특징으로 한다.
- <28> 본 발명의 효소 고정화 방법에서, 상기 연료는 젖산(lactate)이고, 상기 산화반응용 효소는 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase)이며, 상기 애노드에 고정화된 퀴논계 전자전달 매개체는 피롤로퀴놀린 퀴논(pyrroloquinoline quinone)인 것을 특징으로 한다.
- <29> 본 발명의 효소 고정화 방법에서, 상기 전극은 연료전지의 전극으로 사용될 수 있는 한 어떠한 종류의 금속일 수 있으나, 상업적으로 많이 사용되고 있는 금, 백금, 니켈 또는 그들의 합금 형태일 수 있으나, 바람직하게는

금으로 된 전극인 것이 바람직하다.

- <30> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 고정화 방법으로 효소가 고정화된 효소 연료전지용 전극을 제공한다. 또한 본 발명에서 제공하는 고정화방법으로 제조된 애노드, 백금으로 된 캐소드 및 기질, NAD⁺, 그리고 염화칼슘을 포함하는 전해질을 연료전지용 용기에 장착하여 효소 연료전지를 제조할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <31> 이하, 실시예 및 그와 관련된 도면을 참조하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<32> 실시예 1. 효소 연료전지용 전극에서 활성부위가 보호된 효소 고정화 방법

- <33> 애노드의 금(Au) 표면에 아민기(NH₂)를 부착하기 위해 먼저 왕수처리를 하고 0.02 몰(M)의 시스타민(cystamine)으로 4시간 동안 상온에서 반응시킨다. 세척 후 0.02 몰(M)의 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로클로라이드(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide hydrochloride, EDC)와 3.0 밀리몰(mM)의 피롤로퀴놀린 퀴논(pyrroloquinoline quinone, PQQ)을 pH 7인 0.01 몰(M)의 헤페스 버퍼(HEPES buffer, Sigma) 용액에서 시스타민 처리된 금(Au) 전극과 상온에서 4시간 반응시킨다. 세척 후 0.05 몰(M)의 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로클로라이드(EDC)와 15 ml의 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 용액(LDH, 238 mg/U)을 각각 0.02 몰(M)의 젖산, 니코틴아마이드 뉴클레오티드(전자전달매개체, NAD⁺), 및 염화칼슘(CaCl₂) 등이 들어있는 pH 7인 0.1 몰(M)의 인산버퍼(phosphate buffer)용액에 넣어 1분 동안 젖산 탈수소효소(LDH)의 활성부위(active site) 블로킹(blocking) 반응을 실시한다. 여기서, 인산버퍼는 고정화시 효소 활성도와 안정도를 보다 더 확보하기 위해 사용되었다.

- <34> 상기 효소의 블로킹 반응이 완료된 용액에 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)이 고정화된 금(Au) 전극을 넣어 4℃에서 4시간 반응시킨다. 도 1은 효소적 연료전지에서 양극 전극(anode)에 젖산 탈수소효소를 효소의 활성부위를 보호하면서 고정화하는 방법을 설명한 개략도이다.

<35> 실시예 2. 새로운 효소 고정화를 이용한 효소 연료전지의 제조

- <36> 실시예 1의 고정화 반응으로 제작된 애노드(modified Au anode)과 백금(Pt) 전극을 워터재킷(water jacketed cell)으로 제작한 전지에 삽입하고, 각각 0.02 몰(M)의 젖산(연료, lactate), 니코틴아마이드 뉴클레오티드(전자전달매개체, NAD⁺), 그리고 염화칼슘(CaCl₂)을 pH 7인 0.1 몰(M)의 트리스버퍼(tris buffer) 용액에 넣어 전해질을 만든 다음 효소 연료전지(enzymatic fuel cell)를 제작하였다. 그리고 이 연료전지를 potentiostat/galvanostat(WPG100, WonATech 주식회사, 한국)에 연결하고 WPG 프로그램(WPG100, WonATech 주식회사, 한국)으로 25℃에서 질소(N₂) 가스를 충분히 충전시키면서 순환 전압전류값(cyclic voltammetry)과 파워덴시티(Power density)를 측정하였다.

<37> 실시예 3. 새로운 효소 고정화를 이용한 효소 연료전지의 효과 비교

- <38> 도 2는 본 발명의 효소 연료전지에서 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소가 순환 전압전류값에 미치는 영향을 도시한 그래프이다. 본 발명의 고정화방법으로 제조된 효소 연료전지의 애노드 전류 피크(anodic current peak)가 1.0V에 15 μA로서 고정화하지 않은 연료전지보다 높게 나타났다. 따라서 고정화한 효소 연료전지의 전자전달 능력이 고정화하지 않은 연료전지보다 우수했다는 것을 확인할 수 있었다.

- <39> 도 3은 효소 연료전지에서 각각 0.02몰(M)의 젖산, 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD⁺), 그리고 염화칼슘(CaCl₂)의 존재 하에서의 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소가 순환 전압전류값에 미치는 영향을 도시한 그래프이다. 이 실험은 실제적으로 본 발명의 새로운 고정화 방법의 효과를 보여주는 결과로서 새로운 효소 고정화가 도입된 연료전지는 효소의 활성부위(active site)를 고려하지 않은 연료전지인 컨트롤(control)의 애노드 전류 피크(anodic current peak)보다 우수하였다. 특히 젖산, NAD⁺ 및 염화칼슘 등 3가지 모두를 이용하여 효소를 고정화시킨 연료전지의 양극 전류 피크가 1.18V에 181 μA로서 가장 높았다. 따라서 상기 3 가지가 모두 포함된 효소 고정화 방법은 다른 포메이션(formation)보다 더 효과적으로 젖산 탈수소효소의 활성부위를 블로킹(blocking) 시킨다는 것을 확인하였다.

<40> **실시에 4. 효소 고정화 방법에 필요한 젖산, NAD^+ 및 염화칼슘의 농도 최적화**

<41> 실시예 1에서 수행한 효소의 활성부위가 보호된 고정화 방법에 필요한 성분 들인 젖산, NAD^+ 및 염화칼슘을 다양한 농도에서 실험하여 그들의 최적 농도조건을 확립하였다.

<42> 도 4는 연료기질인 젖산 농도에 따른 효소 고정화 영향을 조사하기 위해서 효소 연료전지에서 다양한 농도(0.02, 0.2, 1.0, 5.0, 8.0 몰(M), 및 포화용액)의 젖산의 존재 하에서의 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소가 순환 전압전류값에 미치는 영향을 도시한 그래프이다. 그 결과, 5 몰(M)의 높은 젖산의 농도에서 고정화한 젖산 탈수소효소 연료전지의 애노드 전류 피크가 1.21V에 375 μA 로 가장 높았다. 그러나 5 몰(M) 이상에서는 그 값이 떨어졌다. 왜냐하면 젖산 탈수소효소의 활성부위는 내부 깊숙이 존재하므로 과도한 농도의 젖산은 그 활성부위에 닿기가 어렵기 때문일 것이라고 예상되었다.

<43> 도 5는 효소 연료전지에서 다양한 농도(0.01, 0.02, 0.04 및 0.06 몰(M))의 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD^+)의 존재 하에서의 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소가 순환 전압전류값에 미치는 영향을 도시한 그래프이다. NAD^+ 의 농도 변화는 효소 연료전지의 순환 전압전류값에 크게는 영향을 미치지 못했다. 하지만 NAD^+ 의 농도가 높을수록 순환 전압전류값이 낮아졌으며 그 중에서 NAD^+ 의 농도가 0.01 몰(M)일 때 애노드 전류 피크가 1.18 V에 123 μA 로서 가장 높았다.

<44> 도 6은 효소 연료전지에서 다양한 농도(0.01, 0.02, 0.04 및 0.06 몰(M))의 염화칼슘(CaCl_2)의 존재 하에서의 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소가 순환 전압전류값에 미치는 영향을 도시한 그래프이다. NAD^+ 의 농도 변화에 대한 값과 같이 염화칼슘의 농도 변화는 효소 연료전지의 순환 전압전류값에 크게는 영향을 미치지 못했고, 염화칼슘의 농도가 높을수록 순환 전압전류값이 낮아졌으며, 그 중에서 염화칼슘의 농도가 0.01 몰(M)일 때 애노드 전류 피크가 1.20V에 237 μA 로서 가장 높았다. 따라서 NAD^+ 와 칼슘이온(Ca^{2+})은 전자전달 시스템과 젖산 탈수소효소의 활성부위를 블로킹(blocking)하는데 중요한 역할을 하지만, 높은 농도의 NAD^+ 와 칼슘이온은 젖산 탈수소효소의 활성부위 주위에 전단 응력(shear stress)을 발생하여 전자 전달에 악영향을 미치는 것을 확인하였다.

<45> 도 7은 효소 연료전지에서 최적화된 농도의 젖산, NAD^+ 및 염화칼슘의 존재 하에서의 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소가 파워덴시티(power density)에 미치는 영향을 도시한 그래프이다. 본 발명의 새로운 효소고정화 방법을 통하여 효소 연료전지의 파워덴시티의 초기값을 증가시켰고, 반응이 진행될수록 꾸준히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

<46> 도 8은 효소 연료전지에서 애노드에 3가지 타입의 젖산 탈수소효소 고정화 방법에 따른 파워덴시티에 미치는 영향을 나타낸 도표이다. 여기서, Type 1은 효소를 고정화하지 않은 효소 연료전지(control), Type 2는 효소 활성부위를 blocking 하지 않고 그냥 효소를 고정화한 효소 연료전지, 그리고 Type 3는 5 몰(M)의 젖산, 0.01 몰(M)의 NAD^+ 및 0.01 몰(M)의 염화칼슘의 존재 하에서의 효소를 고정화한 효소 연료전지를 말한다. 5 몰(M)의 젖산, 0.01 몰(M)의 NAD^+ 및 0.01 몰(M)의 염화칼슘의 존재 하에서의 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소 연료전지의 파워덴시티가 200 킬로옴($\text{k}\Omega$)에서 $2.17(\pm 0.09) \mu\text{W}$ ($69.1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$)로서 가장 높았다. 젖산 탈수소효소의 활성부위를 고려하지 않고 고정화한 효소 연료전지와 젖산 탈수소효소를 고정화하지 않은 효소 연료전지의 파워덴시티의 각각 125%와 241%로 증가시킨 값이었다.

<47> 결론적으로, 5 몰(M)의 젖산, 0.01 몰(M)의 NAD^+ 및 0.01 몰(M)의 염화칼슘이 최대($69.1 \mu\text{W}/\text{cm}^2$)의 파워덴시티를 생산하는데 효소 연료전지에서 활성부위를 보호하면서 애노드에 젖산 탈수소효소를 고정화할 때 필요한 구성성분들의 최적 농도조건임을 확인하였다.

산업이용 가능성

<48> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 효소 연료전지의 제작 시 효소의 활성부위가 보호되면서 연료전지용 산화반응효소를 효과적으로 애노드에 고정화하는 방법을 이용하여 연료전지의 효소 활성과 안정성을 높일 수 있으며, 이로 인하여 보다 향상된 파워덴시티를 얻을 수 있다. 따라서 본 발명의 방법으로 효소 고정화된 애노드를 이용하여 효소 연료전지를 제작할 수 있으며, 이러한 기술은 효소 연료전지 제조분야에 발전에 크게 기여

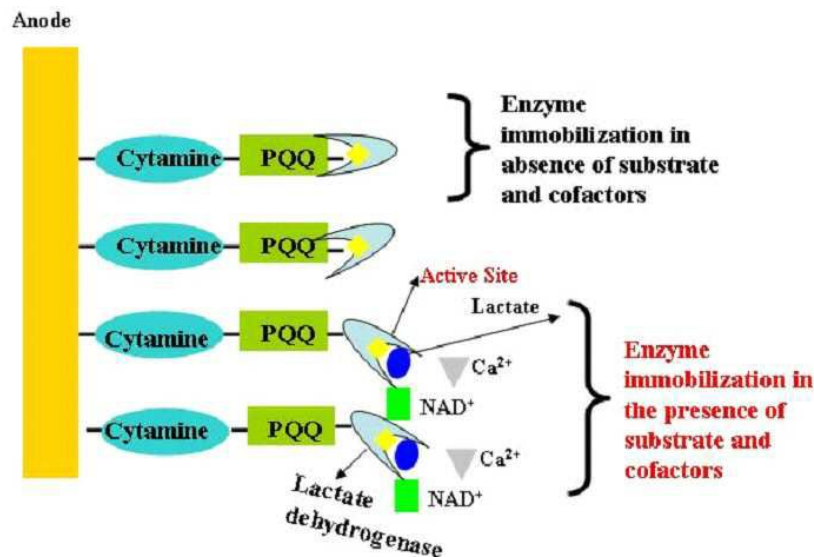
할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

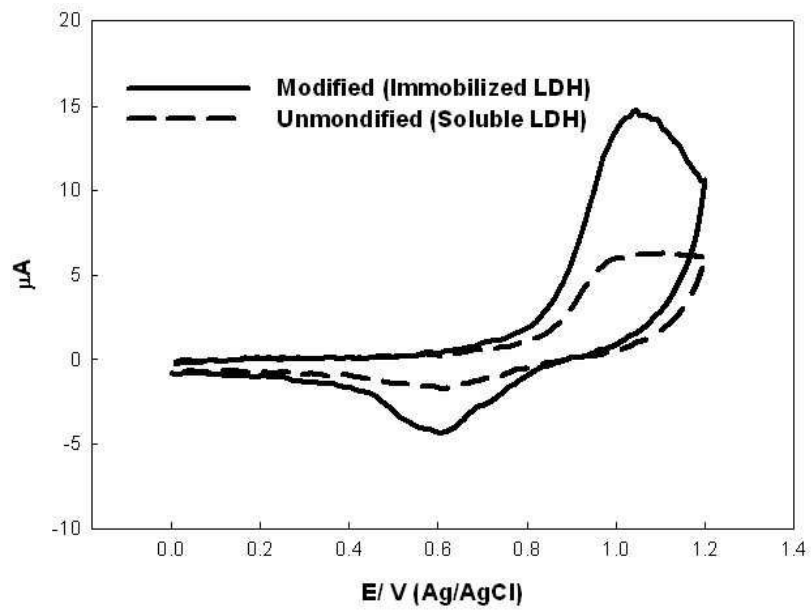
- <49> 도 1은 효소 연료전지에서 애노드(anode, Au)에 젖산 탈수소효소를 고정화하는 방법을 설명한 개략도이다.
- <50> 도 2는 효소 연료전지에서 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소가 순환 전압전류값에 미치는 영향을 도시한 그래프이다.
- <51> 도 3은 효소 연료전지에서 각각 0.02 몰(M)의 젖산, 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD^+) 및 염화칼슘(CaCl_2)의 존재 하에서의 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소가 순환 전압전류값에 미치는 영향을 도시한 그래프이다.
- <52> 도 4는 효소 연료전지에서 다양한 농도의 젖산의 존재 하에서의 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소가 순환 전압전류값에 미치는 영향을 도시한 그래프이다.
- <53> 도 5는 효소 연료전지에서 다양한 농도의 NAD^+ 의 존재 하에서의 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소가 순환 전압전류값에 미치는 영향을 도시한 그래프이다.
- <54> 도 6은 효소 연료전지에서 다양한 농도의 염화칼슘의 존재 하에서의 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소가 순환 전압전류값에 미치는 영향을 도시한 그래프이다.
- <55> 도 7은 효소 연료전지에서 최적화된 농도의 젖산, NAD^+ 및 염화칼슘의 존재 하에서의 애노드에 고정화한 젖산 탈수소효소가 파워덴시티(power density)에 미치는 영향을 도시한 그래프이다.
- <56> 도 8은 효소 연료전지에서 애노드에 3가지 타입의 젖산 탈수소효소의 고정화 방법에 따른 파워덴시티에 미치는 영향을 나타낸 도표이다.

도면

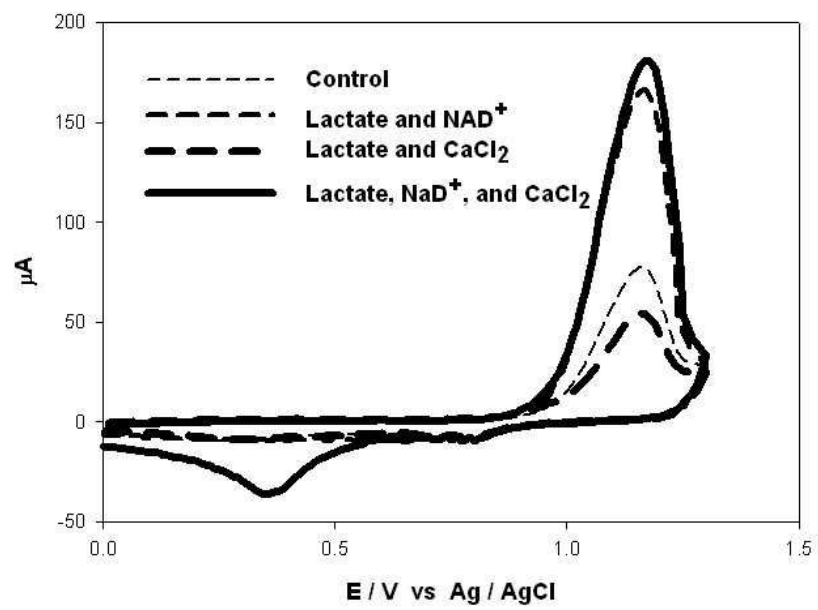
도면1



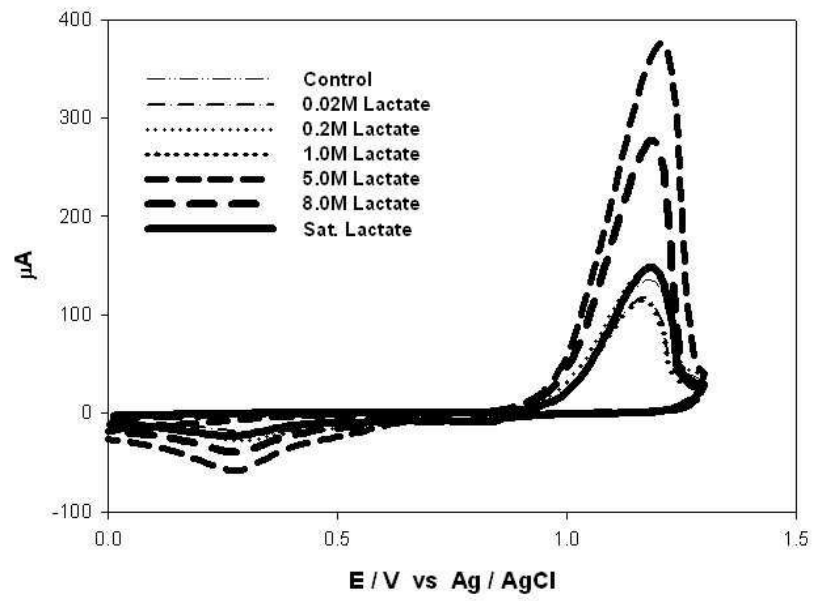
도면2



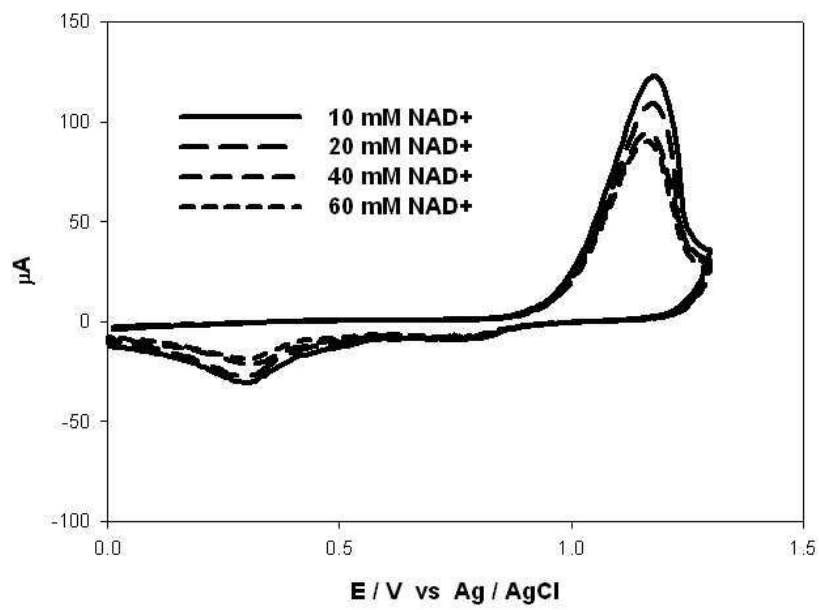
도면3



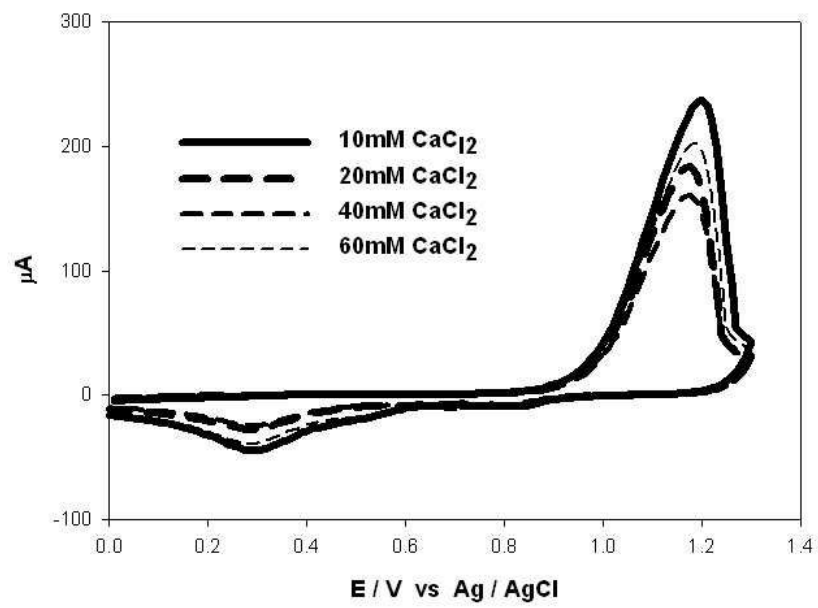
도면4



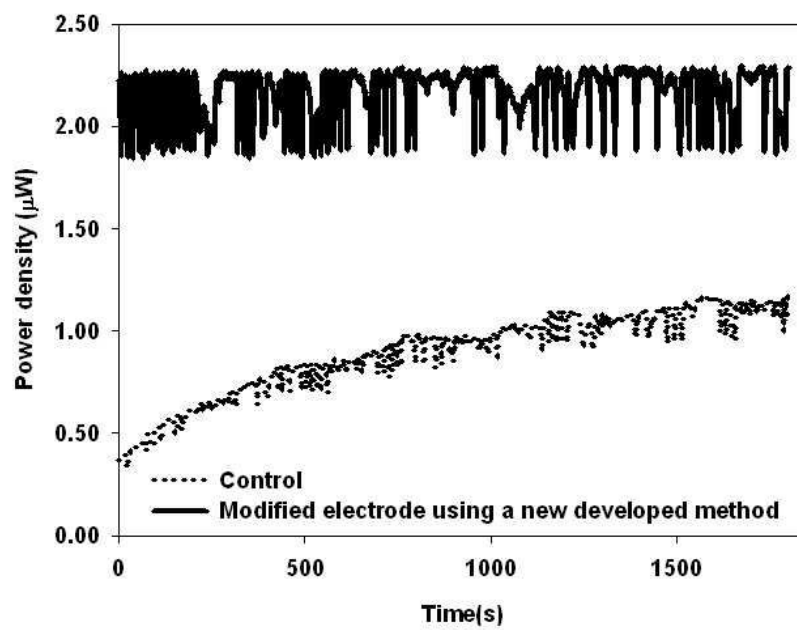
도면5



도면6



도면7



도면8

Components	The optimum point (Conc.)	Type 1	Type 2	Type 3
Lactate	5.0 M			
NAD ⁺	0.01 M	0.90 ± 0.17	1.73 ± 0.10	2.17 ± 0.09
CaCl ₂	0.01 M	μW	μW	μW