(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0048987
(43) 공개일자 2009년05월15일

(51) Int. Cl.
H01M 8/16 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0115130
(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 트럼프 월드 A동 2104호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 9 항

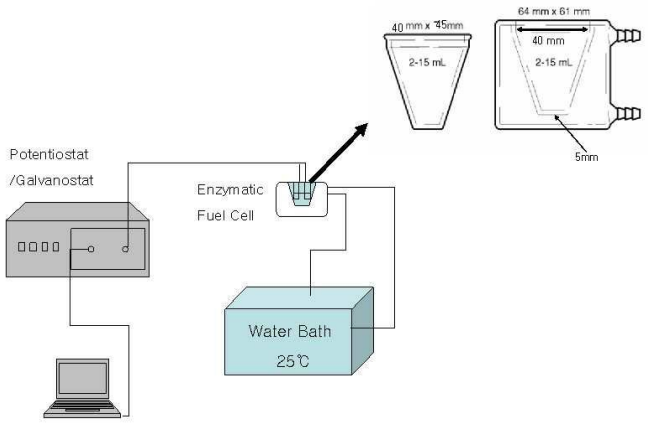
(54) 효소 연료전지

(57) 요 약

본 발명은 효소 연료전지에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 연료의 산화반응용 효소와 그 조효소가 고정화된 금으로 되어 있는 애노드, 백금으로 되어 있는 캐소드 및 상기 효소에 의해 산화 가능한 연료, 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD^+) 및 염화칼슘($CaCl_2$)을 포함하는 전해질로 구성되는 효소 연료전지 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 높은 파워생산이 가능한 효소 연료전지를 제조할 수 있으며, 본 발명에 사용될 수 있는 전해질의 구성물질들에 대한 농도를 통계학적 분석방법으로 결정하였다. 따라서 본 발명에서 제공하는 효소 연료전지는 향상된 파워덴시티(power density)를 가지며, 효소 연료전지 분야에서 다양하게 응용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

강성우

경기 구리시 토평동 961 한일아파트 204동 305호

이진영

서울 성북구 석관2동 337-31번지 다솜오피스텔 403호

이종호

경기 용인시 수지구 풍덕천2동 신정마을주공아파트 905동 1505호

전승우

경기 부천시 소사구 괴안동 118-33 302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R0700321
부처명	서울시
연구사업명	전략산업 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

연료의 산화반응용 효소와 퀴논계 전자전달 매개체가 고정화된 금으로 되어 있는 애노드(anode);

백금으로 되어 있는 캐소드(cathode); 및

상기 효소에 의해 산화 가능한 연료, 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD^+) 및 염화칼슘($CaCl_2$)을 포함하는 전해질을 포함하는 효소 연료전지.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 고정화는 상기 금으로 되어 있는 애노드를 시스타민(cystamine)으로 처리하여 아민기(NH_2)를 부착한 후, 상기 아민기와 퀴논계 전자전달 매개체를 아마이드 결합을 통해 고정화한 다음, 고정화된 퀴논계 전자전달 매개체에 상기 산화반응효소를 고정화하는 것을 특징으로 하는 효소 연료전지.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 애노드의 아민기와 퀴논계 전자전달 매개체의 아마이드 결합 및 퀴논계 전자전달 매개체와 산화반응효소의 고정화는 커플링제(coupling agent)에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 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 하는 효소 연료전지.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 전해질의 구성성분은 10-30 mM의 젖산, 10-30 mM의 NAD^+ 및 1-15 mM의 염화칼슘을 포함하는 것을 특징으로 하는 효소 연료전지.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 전해질의 구성성분의 함량은 통계학적 분석방법의 하나인 반응표면 분석방법에 의해 최적 농도를 결정하는 것을 특징으로 하는 효소 연료전지.

청구항 7

제 1항에 있어서, 온도를 유지하기 위한 워터재킷(water jacket)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 효소 연료전지.

청구항 8

젖산, 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드 및 염화칼슘을 포함하는 젖산 탈수소 효소를 이용한 효소 연료전지용 전해질 조성물.

청구항 9

하기 단계를 포함하는 효소 연료전지의 제조방법:

a) 금으로 된 애노드를 왕수처리한 후, 시스타민(cystamine)으로 처리하여 아민기(NH_2)를 부착하는 단계;

b) 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로클로라이드(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide hydrochloride)와 피콜로 퀴놀린 퀴논(pyrroloquinoline quinone)을 헤페스 버퍼(HEPES buffer) 용액에서 상기 아민기가 부착된 애노드와 반응시켜 피콜로퀴놀린 퀴논이 고정화된 애노드를 얻는 단계;

c) 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로클로라이드와 젖산 탈수소효소 용액을 인산 버퍼(phosphate buffer) 용액에서 상기 피콜로퀴놀린 퀴논이 고정화된 애노드와 반응시켜 피롤로퀴놀린 퀴논과 젖산 탈수소효소

가 고정화된 애노드를 얻는 단계; 및

d) 상기 피롤로퀴놀린 퀴논과 젖산 탈수소효소가 고정화된 애노드, 백금으로 된 캐소드, 그리고 젖산, 니코틴아마이드 아데닌 뉴클레오티드(NAD^+) 및 염화칼슘을 포함하는 전해질을 연료전지용 용기에 장착하는 단계.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 효소 연료전지에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 연료의 산화반응용 효소와 그 조효소가 고정화된 금으로 되어 있는 애노드(anode), 백금으로 되어 있는 캐소드(cathode), 그리고 상기 효소에 의해 산화 가능한 연료, 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD^+) 및 염화칼슘($CaCl_2$)을 포함하는 전해질을 포함하는 효소 연료전지 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 연료전지 (fuel cell)는 연료고갈과 환경문제가 부각되면서 대체에너지로서 많은 연구가 진행되고 있으며, 특히 효소 연료전지 (enzymatic fuel cell)는 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. 그리고 통계학적 분석방법(RSM)으로 구성 성분들을 최적화할 경우 각 성분들의 상호작용을 분석하여 최적화하는 것이 가능하다.

<3> 효소를 촉매로 사용하는 연료전지는 최근 많은 관심을 받고 연구가 진행되었다. 그러나 효소 연료전지는 낮은 파워생산(power production)에 많은 문제점들을 가지고 있다. 그 원인은 전자전달과 효소의 안정성, 및 효소의 낮은 활성을 들 수 있으며, 특히 전해질에 포함되어 있는 연료(substrate), 전자전달 매개체 (electron transfer mediator), 그리고 조효소 (cofactor)의 상호작용 때문이며, 이를 위해 많은 연구자들이 다양한 방법으로 이 문제들을 해결하고 노력하고 있다.

<4> 연료(substrate), 전자전달매개체(electron transfer mediator), 그리고 조효소(cofactor) 등의 연료전지를 구성하는 성분들의 적합한 상호작용에 관한 연구와 농도 최적화에 대한 연구는 아직 미비한 상태에 있으며, 따라서 본 발명의 목적은 금 (Au)으로 되어 있는 애노드(anode)에 전자전달 매개체와 효소를 고정화하여 온도유지를 위한 워터재킷(water jacket)으로 되어있는 효소 연료전지(enzymatic fuel cell)를 제작하고, 그 구성성분들인 연료, 전자전달매개체, 그리고 조효소 등의 농도를 통계학적 분석방법(RSM)으로 각 성분들의 상호작용을 분석하고 최적화하는 방법을 제공하는 것이다.

<5> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 효소를 전극에 고정화한 연료전지와 전해질 구성성분들을 최적화하여 파워덴시티가 높은 효소 연료전지를 개발할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 파워덴시티가 향상된 효소 연료전지 및 그 제조방법을 제공하는 데 있다.

<7> 본 발명의 다른 목적은 상기 효소 연료전지에 사용되는 전해질의 구성성분의 최적 농도를 결정하는 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

<8> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 연료의 산화반응용 효소와 퀴논계 전자전달 매개체가 고정화된 금으로 되어 있는 애노드(anode);

<9> 백금으로 되어 있는 캐소드(cathode); 및

<10> 상기 효소에 의해 산화 가능한 연료, 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD^+) 및 염화칼슘($CaCl_2$)을 포함하는 전해질을 포함하는 효소 연료전지를 제공한다.

<11> 본 발명의 효소 연료전지에서, 상기 고정화는 상기 금으로 되어 있는 애노드에 연료의 산화반응용 효소와 퀴논계 전자전달 매개체가 결합할 수 있도록 작용기를 부착시키는 단계, 즉 애노드에 작용기를 부착시키고 그 작용기에 퀴논계 전자전달 매개체를 고정화한 후, 그 퀴논계 전자전달 매개체와 효소의 결합을 유도하는 단계를 포함하여 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 상기 고정화는 상기 금으로 되어 있는 애노드를 시스타민(cystamine)으로 처리하여 아민기(NH_2)를 부착한 후, 상기 아민기와 퀴논계 전자전달 매개체를 아마이드 결합을 통해 고정화한 다음, 고정화된 조효소에 상기 산화반응효소를 고정화하는 것을 특징으로 한다.

<12> 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 전해조로 전달하는 전극을 의미한다.

<13> 본 발명에서, 상기 퀴논계 전자전달 매개체, NAD+ 및 염화칼슘은 연료의 산화반응효소의 효소반응의 속도를 조절하는 요소들로서, 이들의 농도에 따라 연료전지에서 생성되는 파워덴시티(power density)가 달라질 수 있다. 따라서 본 발명에서는 통계학적 분석방법을 이용하여 이들의 최적 조건을 확립하였으며, 본 발명의 효소 연료전지에 사용될 수 있는 최적 조건의 전해질을 완성할 수 있었다.

<14> 본 발명의 효소 연료전지에서, 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.

<15> 본 발명의 효소 연료전지에서, 상기 애노드에 고정화된 퀴논계 전자전달 매개체는 애노드에 부착된 작용기와 결합할 수 있고, 연료의 산화효소와도 결합할 수 있는 물질, 즉 퀴논계 고리형 화합물(불포화고리에 비닐렌기(C_2H_2)이나 카르보닐기(CO)가 결합되어 있음)들이 많은 데, 예를 들어 2,6-dichlorophenol-indophenol, Phenazine ethosulphate, Safranine-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.

<16> 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.

<17> (1) 젖산 탈수소효소에 의해서, 젖산(Lactate) → 피부르산(Pyruvate) + $2e^-$ + $2H^+$

<18> (2) NAD^+ + $2e^-$ + $2H^+$ → NADH + H^+

<19> (3) NADH + PQQ(피롤로퀴놀린 퀴논) H^+ → NAD^+ + $PQQH_2$

<20> (4) $PQQH_2$ → PQQ + $2H^+$ + $2e^-$

<21> 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 NH_2기가 결합하는 구성으로 이루어져 있다. 여기서, EDC는 coulpling agent로서 안정한 아미드 결합을 유도하는 촉매역할을 하는 물질이다. 따라서 피롤로퀴놀린 퀴논(PQQ)이 가지고 있는 여러 개(3개)의 카르복실기(COOH) 중에 하나와 효소의 NH_2가 결합하게 된다.

<22> 본 발명에 있어서, 상기 애노드의 아민기와 퀴논계 전자전달 매개체의 아마이드 결합 및 퀴논계 전자전달 매개체와 산화반응효소의 고정화는 커플링제(coupling agent), 예컨대 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로클로라이드(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide hydrochloride, EDC), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), diisopropylcarbodiimide (DIC) 등에 의해 유도될 수 있으나, 바람직하게는 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로클로라이드(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide

hydrochloride, EDC)에 의해 유도되는 것이 적당하다.

<23> 본 발명의 효소 연료전지에서, 상기 전해질의 구성성분은 목적으로 하는 파워덴시티 생성하기 위하여 적절히 조절될 수 있으나, 바람직하게는 10-30 mM의 젖산, 10-30 mM의 NAD^+ 및 1-15 mM의 염화칼슘을 포함하는 것을 특징으로 한다.

<24> 본 발명에 있어서, 상기 전해질의 구성성분의 함량은 통계학적 분석방법의 하나인 반응표면 분석방법(response surface methodology)에 의해 최적 농도를 결정하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서는 상기 전해질 성분들의 최적 농도조건을 결정하기 위하여 반응표면 분석방법을 도입하였고, 이러한 방법으로 결정된 최적조건은 실제 실험값에서 크게 벗어나지 않았다. 따라서 효소 연료전지 분야에서 전해질 농도의 조건을 결정하기 위하여 본 발명에서와 같이 통계학적 분석방법을 사용한다면 매우 효과적인 방법이 될 수 있을 것이다.

<25> 본 발명의 효소 연료전지에서, 온도를 유지하기 위한 워터재킷(water jacket)을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

<26> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 젖산, 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드 및 염화칼슘을 포함하는 젖산 탈수소효소를 이용한 효소 연료전지용 전해질 조성물을 제공한다:

<27> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 효소 연료전지의 제조방법을 제공한다:

<28> a) 금으로 된 애노드를 왕수처리한 후, 시스타민(cystamine)으로 처리하여 아민기(NH_2)를 부착하는 단계;

<29> b) 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로클로라이드(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide hydrochloride)와 피콜로 퀴놀린 퀴논(pyrroloquinoline quinone)을 헤페스 버퍼(HEPES buffer) 용액에서 상기 아민기가 부착된 애노드와 반응시켜 피콜로퀴놀린 퀴논이 고정화된 애노드를 얻는 단계;

<30> c) 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로클로라이드와 젖산 탈수소효소 용액을 인산 버퍼(phosphate buffer) 용액에서 상기 피콜로퀴놀린 퀴논이 고정화된 애노드와 반응시켜 피롤로퀴놀린 퀴논과 젖산 탈수소효소가 고정화된 애노드를 얻는 단계; 및

<31> d) 상기 피롤로퀴놀린 퀴논과 젖산 탈수소효소가 고정화된 애노드, 백금으로 된 캐소드, 그리고 젖산, 니코틴아마이드 아데닌 뉴클레오티드(NAD^+) 및 염화칼슘을 포함하는 연료전지용 용기에 장착하는 단계.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<32> 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.

<33> **실시예 1. 젖산 탈수소효소를 이용한 효소 연료전지의 제작**

<34> 애노드의 금 (Au) 표면에 아민기 (NH_2)를 부착하기 위해 먼저 왕수처리를 하고 0.02 몰(M)의 시스타민으로 4시간 동안 상온에서 반응시켰다. 세척 후 0.02몰 (M)의 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로클로라이드(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiamide hydrochloride, EDC)와 3 밀리 몰(mM)의 피롤로퀴놀린 퀴논 (pyrroloquinoline quinone, PQQ)을 pH 7인 0.01몰(M)의 헤페스 버퍼(HEPES buffer, Sigma) 용액에서 시스타민 처리된 금 전극과 상온에서 4시간 반응시켰다. 세척 후 0.05몰 (M)의 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로클로라이드와 8.76 mg/ml (783 U/mg)의 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase) 용액(Fluka)을 pH 7인 0.1몰(M)의 인산 버퍼(phosphate buffer) 용액에서 피롤로퀴놀린 퀴논이 고정화된 금 전극과 4℃에서 4시간 반응시켰다.

<35> 고정화 반응으로 제작된 애노드(modified Au anode)와 백금(Pt) 캐소드(cathod)를 워터 재킷 (water jacked cell)으로 제작한 전지에 삽입하고, 0.02 몰 (M)의 젖산(연료, lactate), 0.02 몰 (M)의 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드(전자전달매개체, NAD+), 그리고 1.5 mM의 염화칼슘 ($CaCl_2$)을 pH 7인 0.1몰(M)의 트리스 버퍼 (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(N_2) 가스를 충분히 충전시키면서 파워덴시티(Power density)를 측정하였다 (도 1).

<36> **실시예 2. 통계학적 분석방법을 통한 효소 연료전지에서 전해질 성분의 최적 농도조건 확립**

<37> 실시예 1과 같이 효소 연료전지를 제작하고, 전해질의 성분인 젖산, NAD+ 및 염화칼슘의 통계학적 분석방법을 통해 최적 농도조건을 확립하였다. 통계학적 실험설계(statistical experimental designs)를 이용하여 효소연료전지에서 전해질(electrolyte) 성분들의 최적 농도조건 확립하기 위하여, 실험설계는 17개 세트로 구성된 분류변수 설계를 실시하였고, 세포성장에 영향을 주는 가장 중요한 요소를 결정하는데 사용하였다. 각 변수는 하기 식에 따라 할당되었다.

<38> $xi = (X_i - X_0)/\Delta X_i$

<39> 여기서, xi는 독립변수의 코드화된 값(coded value), X_i는 독립변수의 실제값(real value), X_0은 중앙값(center point)에서 독립변수의 실제값(real value)이며, ΔX_i은 단계별 변화값(step change value)을 나타낸다. 본 발명에서 조사되는 변수들의 범위와 수치는 하기 표 1에 나타내었다. 실험데이터의 실험적 적합성은 분산분석(Analysis of variance)을 통하여 산출된 다항식 회귀 (polynomial regression)에 따랐다.

<40> [표 1]. 중앙 혼합 설계(central composite design)를 위한 각 변수의 범위

Factors	Symbol	Coded values				
		- 1.681	- 1	0	+ 1	+ 1.681
Lactate	X_1 (mM)	3.18	10	20	30	36.82
NAD^+	X_2 (mM)	6.59	10	15	20	20.34
$CaCl_2$	X_3 (mM)	1.59	5	10	15	18.41

<41>

<42> 2차 다항식 (empirical second-order polynomial model)을 적합화하기 위해, 5개의 코드화 수준을 가진 중앙 혼합설계 (central composite design)를 실시하였으며 통계적 실험설계의 거동은 다음과 같은 2차 다항식으로 설명되어질 수 있다.

<43> $$y = \beta_0 + \Sigma \beta_i x_i + \Sigma \beta_{ii} x_i^2 + \Sigma \beta_{ij} x_i x_j$$

<44> 단, y는 반응 변수이고, β는 회귀계수(regression coefficients), x는 독립변수의 코드화 수준(coded level)이다. 얻어진 실험값의 통계학적 분석을 위해 SAS 9.1.3 package를 사용하였다. 2차 다항식의 통계적 유의성은 F-값에 따라 결정하였으며, 상기 식에 따라 설명된 편차는 복합결정계수(multiple coefficient of determination), R^2에 따라 제공되었다.

<45> [표 2]. 중앙 혼합 설계(central composite design)의 실험 설계 및 그 결과

Runs	Coded values			
	X_1	X_2	X_3	Power density (W)
1	- 1	- 1	- 1	0.18
2	+ 1	- 1	- 1	0.16
3	- 1	+ 1	- 1	0.17
4	+ 1	+ 1	- 1	0.18
5	- 1	- 1	1	0.16
6	+ 1	- 1	1	0.15
7	- 1	+ 1	1	0.16
8	+ 1	+ 1	1	0.17
9	- 1.681	0	0	0.15
10	+ 1.681	0	0	0.17
11	0	-1.681	0	0.17
12	0	-1.681	0	0.18
13	0	0	-1.681	0.22
14	0	0	-1.681	0.15
15	0	0	0	0.17
16	0	0	0	0.17
17	0	0	0	0.18
25℃, pH 7				

<46>

<47> 표 2에서, 효소연료전지에서 전해질 성분들의 최적 농도조건을 결정하기 위해 반응표면분석방법(response surface methodology)을 도입하였다. 온도와 pH는 각각 25℃와 pH 7로 고정하였다. 실험은 중앙값에 4개의 스타 포인트(four star points, $\alpha = \pm 1.681$)와 중앙값의 4회 반복 (four replicates)을 포함하는 2^2 full factorial design experiment를 이용하여 세 개의 독립변수 젖산(x_1), 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD+, x_2), 및 염화칼슘(x_3)을 가지고 실시하였다.

<48> [표 3]. 효소 연료전지에서 파워덴시티 모델에 대한 통계학적 분석 결과

소스 (Source)	제곱합	자유도	평균제곱	F-값	P-값
모델	0.0044	9	0.0005	4.35	0.037
오차	0.0008	7	0.0001		
총	0.0053	16			
변동계수(CV) = 6.242 %, R^2 = 0.848					

<49>

<50> 표 3에 나타난 바와 같이, F-값과 P-값은 각각 4.35와 0.037이었다. 2차방정식의 통계적인 유의성을 점검하였고, 모델의 결정계수(R^2)는 0.848로 반응의 변이성의 84.8%는 모델에 의해 설명될 수 있음을 나타내었다. 변동계수(Coefficient of variation, CV)는 6.242로 비교적 낮은 수치를 나타내어 파워덴시티 값에 변수들의 독립적인 영향이 있을 뿐만 아니라 변수들의 상호작용도 높음을 나타내었다. 반응 방정식은 효소 연료전지에서의 파워덴시티 실험의 반응면에 적합한 모델을 제공하였으며, 다음과 같다.

<51> $Y = 0.172931 + 0.003874X_1 + 0.000663X_2 - 0.015714X_3 - 0.004745X_{11}(X_1^2) + 0.001575X_{21}(X_1X_2) -$

$0.001029X_{22}(X_2^2) - 0.000416X_{31}(X_1X_3) + 0.005948X_{32}(X_2X_3) + 0.003767X_{33}(X_3^2)$

<52> 단, x_1은 코드화된 젖산의 농도 값, x_2는 코드화된 NAD+의 농도 값, 그리고 x_3은 코드화된 염화칼슘의 농도 값을 나타낸다.

<53> (1) 젖산과 NAD+의 농도에 따른 파워덴시티의 변화

<54> 도 2는 효소 연료전지에서 젖산과 NAD+의 농도에 의한 파워덴시티 영향을 반응표면의 중앙혼합 설계 실험에 의해 최적화된 반응 등고선을 도시한 그래프이다. NAD+의 농도와 파워덴시티 만의 상호연관성을 없었으나, 젖산의 농도가 코드값 0.5 (24.33 mM)에 가까울수록 가장 높은 파워덴시티를 얻었다. 이 때 NAD+의 코드값은 약 1.0 (21.35 mM) 이었다. 따라서 직접적인 영향은 약하지만 젖산으로부터 전자 전달 효율은 NAD+가 존재할 때 증가하는 것을 알 수 있었다.

<55> (2) 젖산과 염화칼슘(CaCl2)의 농도에 따른 파워덴시티의 변화

<56> 효소 연료전지에서 젖산과 염화칼슘의 농도에 의한 파워덴시티 영향은 도 3에서 보여주고 있다. 칼슘의 농도가 증가할 때 파워덴시티가 줄어드는 것을 확인할 수 있었고, 젖산의 농도가 0.5 (24.33 mM)에 가까울수록 파워덴시티가 가장 높았다. 칼슘 이온은 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD+)와 젖산 탈수소효소 간의 다리 역할을 하는 데 도움을 주지만 농도가 높을 경우에는 오히려 피롤로퀴놀린 퀴논 (pyrroloquinoline quinone, PQQ)의 전기적인 표면활성화를 낮추는 결과를 초래하여 전자 전달을 저해하는 결과를 초래한 것으로 예상되었다.

<57> (3) NAD+와 염화칼슘의 농도에 의한 파워덴시티의 변화

<58> 도 4는 효소 연료전지에서 NAD+와 염화칼슘의 농도에 의한 파워덴시티 영향을 반응표면의 중앙혼합 설계 실험에 의해 최적화된 반응 등고선을 도시한 그래프이다. NAD+와 염화칼슘 사이의 상호관계는 서로 미비했으나 이 두 농도가 각각 낮을수록 파워덴시티의 결과가 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때, 전해질을 구성하는 성분들의 적당하지 못한 농도구배는 전자 전달을 방해하고 효소 연료전지의 불안정한 상태가 되는 것을 예상할 수 있었다.

<59> 따라서 통계학적 방법(RSM)에 의한 효소 연료전지에서 전해질 성분들의 최적 농도는 젖산(x_1), NAD+(x_2) 및 염화칼슘(x_3)의 최적값은 각각 24.43 밀리몰(mM), 21.35 밀리몰(mM) 및 11.65 밀리몰(mM)이었고, 통계학적 모델에 의하여 예측되는 파워덴시티 값은 0.172 W이었으며, 실험값 또한 0.167 W로서 크게 벗어나지 않았다 (표 4 참조).

<60> [표 4]. 효소 연료전지에서 최적화된 젖산, NAD+, 및 염화칼슘의 농도에 의한 파워덴시티의 통계학적 분석방법에 의한 이론값과 실질적인 실험값의 비교

Factor	The optimum point (Conc.)	The predicted value (Power Density)	The experimental value (Power Density)
X_1	24.43. mM		
X_2	21.35 mM	0.172 W	0.167 W
X_3	11.65 mM		

<61>

<62> 그러나 이것은 파워덴시티에 대한 칼슘이온(Ca^{2+})의 영향이 가미되지 않은 결과로서 칼슘이온의 농도에 따른 파워덴시티의 영향을 최적화된 젖산과 NAD+의 농도 하에서 실시하였다 (표 5 참조). 통계학적 방법으로 최적화된 수치는 전반적인 상호간의 영향력을 바탕으로 계산된 결과이며, 도 3과 도 4와 같이 특히 다른 인자들(젖산, NAD+)과 관계없이 칼슘이온이 낮은 농도로 갈수록 높은 수치를 나타내는 독립적인 결과가 나타났다. 따라서 보다 세밀한 최적화된 농도를 찾기 위해 두 인자 즉, 젖산과 NAD+의 수치를 최적화 값으로 고정해 놓고 독립적인 칼슘농도 영향만을 고려해 파워덴시티 값을 구하였다.

<63> [표 5]. 염화칼슘의 농도에 의한 파워덴시티의 실험값

염화칼슘 농도($CaCl_2$ Conc.,)	파워덴시티(Power Density) 실험치
1.5 mM	0.2105 W
5 mM	0.1872 W
10 mM	0.1938 W
11.65 mM	0.1667 W
15 mM	0.1681 W

<64>

<65> 그 결과, 칼슘이온의 농도가 1.5 밀리몰(mM)(칼슘이온을 첨가하기 위해 염화칼슘을 이용)일 때 0.2105 W로서 파워덴시티가 가장 높았으며, 이보다 낮은 농도인_경우에는 칼슘이온의 주역할인 NAD+와 젖산 탈수소효소간의 전자전달의 다리역할이 그만큼 부족하게 되기 때문에 효소의 안정성과 전자전달 능력이 급격히 떨어져, 파워덴시티 값은 칼슘이온의 농도가 1.5 mM 농도보다 낮은 농도, 더 구체적으로는 1 mM보다 낮은 농도에서는 불안정하게 나타났다. 따라서 칼슘의 이온의 영향을 고려하지 않은 통계학적인 방법에 의한 파워덴시티 보다 14.3% 증가한 것으로 확인하였다.

<66> 결론적으로 24.43 밀리몰 (mM)의 젖산, 21.35 밀리몰(mM)의 NAD+ 및 1.5 밀리몰(mM)의 염화칼슘이 최대(0.2105 W)의 파워덴시티를 생산하는데 있어서 효소 연료전지에서 전해질의 구성성분들의 최적 농도조건임을 확인하였다.

산업이용 가능성

<67> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명은 효소 연료전지 및 그 제작방법을 제공하고, 통계학적 최적화 방법을 사용하여 연료전지의 전해질 구성성분 간의 농도를 최적화하는 방법을 제공한다. 본 발명에서 제시하는 통계학적 실험설계(experimental design)를 통해 전해질의 구성성분들의 최적 농도조건을 확립할 수 있으며, 보다 높은 파워생산에 뛰어난 효과가 있다. 따라서 효소 연료전지(enzymatic fuel cell)에서 전해질을 구성하는 물질들의 농도를 본 발명에서 제공한 방법으로 결정한 효소 연료전지는 전해질에서 파워덴시티(power density)에 대한 연료(substrate), 조효소(cofactor), 및 전자전달 매개체(electron transfer mediator)들 간의 상호작용을 규명하여 향상된 파워덴시티를 가지는 효소 연료전지를 생산할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

<68> 도 1은 본 발명에 따른 효소 연료전지(enzymatic fuel cell)의 장치를 설명한 개략도이다.

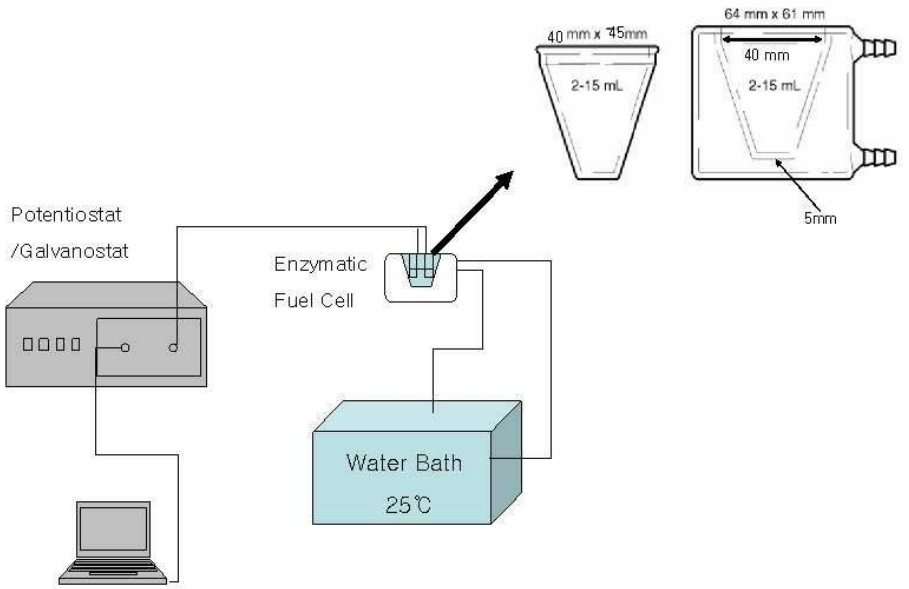
<69> 도 2는 본 발명에 따른 효소 연료전지에서 젖산과 NAD+의 농도에 의한 파워덴시티 영향을 반응표면의 중앙혼합 설계 실험에 의해 최적화된 반응 등고선을 도시한 그래프이다.

<70> 도 3은 본 발명에 따른 효소 연료전지에서 젖산과 염화칼슘의 농도에 의한 파워덴시티 영향을 반응표면의 중앙혼합 설계 실험에 의해 최적화된 반응 등고선을 도시한 그래프이다.

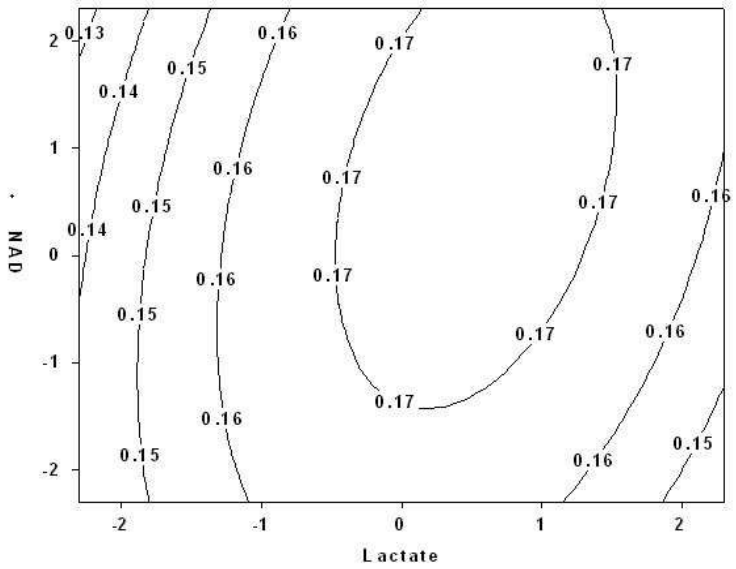
<71> 도 4는 본 발명에 따른 효소 연료전지에서 NAD+와 염화칼슘의 농도에 의한 파워덴시티 영향을 반응표면의 중앙혼합 설계 실험에 의해 최적화된 반응 등고선을 도시한 그래프이다.

도면

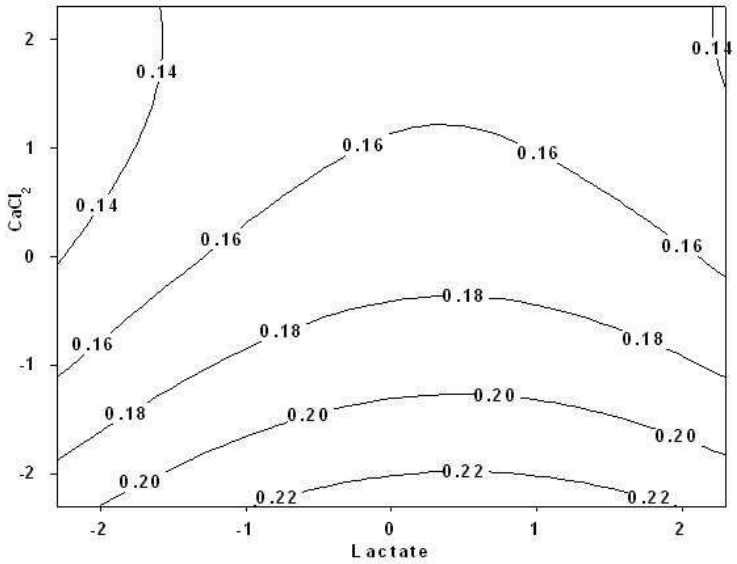
도면1


40 mm x 45mm
2-15 mL
64 mm x 61 mm
40 mm
2-15 mL
5mm
Potentiostat
/Galvanostat
Enzymatic
Fuel Cell
Water Bath
25℃

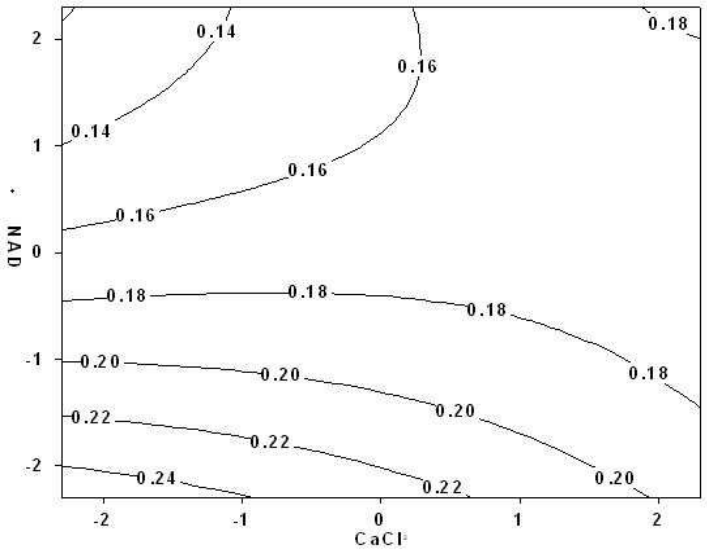
도면2


NAD
Lactate
2
1
0
-1
-2
0.13
0.14
0.15
0.16
0.17

도면3


0.14
0.16
0.18
0.20
0.22
0.24
CaCl2
Lactate
2
1
0
-1
-2

도면4


0.14
0.16
0.18
0.20
0.22
0.24
NAD
CaCl
2
1
0
-1
-2