(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0085879
(43) 공개일자 2021년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 3/00 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
C12N 11/14 (2020.01) *H01M 8/16* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12M 21/08 (2013.01)
C12M 43/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0179411
(22) 출원일자 2019년12월31일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
나성수
서울특별시 영등포구 당산로42길 13, 106동 802호(당산동5가, 당산동1차 효성아파트)
윤태영
서울특별시 동대문구 안암로26길 11 201호
(74) 대리인
박상열, 최내윤

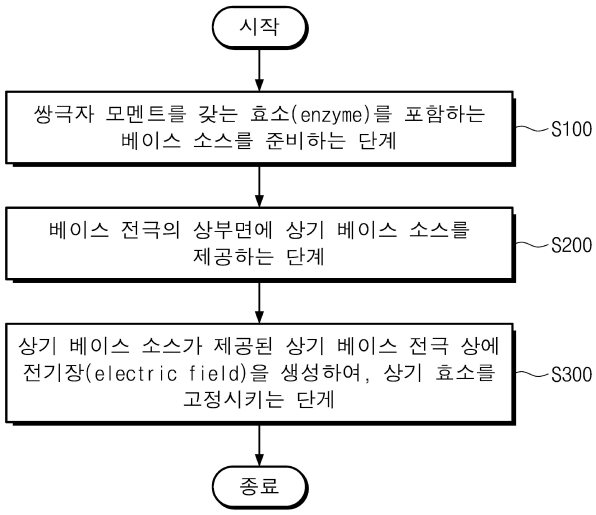
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **효소 고정 방법, 및 바이오 전극**

(57) 요 약

효소 고정 방법이 제공된다. 상기 효소 고정 방법은, 쌍극자 모멘트를 갖는 효소(enzyme)를 포함하는 베이스 소스를 준비하는 단, 베이스 전극의 상부면에 상기 베이스 소스를 제공하는 단계, 및 상기 베이스 소스가 제공된 상기 베이스 전극 상에 전기장(electric field)을 생성하여, 상기 효소를 고정시키는 단계를 포함할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 11/14 (2013.01)
H01M 8/16 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018H1A2A1062291
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 교육인력양성사업:글로벌박사펠로우십사업
연구과제명 전산 역학을 이용한 효소 기반 바이오 연료전지의 구조 해석 및 성능 향상 방법 연구
기 여 율 1/1
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2018.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

쌍극자 모멘트를 갖는 효소(enzyme)를 포함하는 베이스 소스를 준비하는 단계;

베이스 전극의 상부면에 상기 베이스 소스를 제공하는 단계; 및

상기 베이스 소스가 제공된 상기 베이스 전극 상에 전기장(electric field)을 생성하여, 상기 효소를 고정시키는 단계를 포함하되,

상기 전기장은 상기 효소가 고정되는 상기 베이스 전극의 상기 상부면과 평행한 방향으로 인가되는 것을 포함하는 효소 고정 방법.

청구항 2

제1 항에 있어서,

상기 효소를 고정시키는 단계에서,

상기 효소의 쌍극자 모멘트(dipole moment) 방향과 상기 전기장의 방향이 평행하도록, 상기 효소가 회전되는 것을 포함하는 효소 고정 방법.

청구항 3

제1 항에 있어서,

상기 효소를 고정시키는 단계에서,

상기 효소의 활성화 자리(active site)가 상기 베이스 전극의 상기 상부면과 인접하도록, 상기 효소가 회전되는 것을 포함하는 효소 고정 방법.

청구항 4

제1 항에 있어서,

상기 전기장이 인가된 후 상기 효소의 활성화 자리와 상기 베이스 전극 사이의 거리는, 상기 전기장이 인가되기 전 상기 효소의 활성화 자리와 상기 베이스 전극 사이의 거리 보다 가까운 것을 포함하는 효소 고정 방법.

청구항 5

제1 항에 있어서,

상기 전기장을 생성하는 전압은, 1.0V 이하인 것을 포함하는 효소 고정 방법.

청구항 6

제1 항에 있어서,

상기 전기장을 생성하는 전압은, 1mV 이하인 것을 포함하는 효소 고정 방법.

청구항 7

제1 항에 있어서,

상기 전기장이 인가되기 전 상기 효소의 수소 결합(H-bond) 개수와 상기 전기장이 인가된 후 상기 효소의 수소 결합 개수의 차이는 기준 범위 이하인 것을 포함하는 효소 고정 방법.

청구항 8

제1 항에 있어서,

상기 전기장이 인가되기 전 상기 효소의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)와 상기 전기장이 인가된 후 상기 효소의 평균 제곱근 편차(RMSD) 차이는 기준 범위 이하인 것을 포함하는 효소 고정 방법.

청구항 9

상부면을 갖는 베이스 전극; 및

상기 베이스 전극의 상기 상부면에 고정되고 쌍극자 모멘트를 갖는 복수의 효소(enzyme)를 포함하되,

복수의 상기 효소의 쌍극자 모멘트는, 상기 베이스 전극의 상기 상부면과 평행한 일 방향으로 정렬된 것을 포함하는 바이오 전극.

청구항 10

제9 항에 있어서,

상기 효소는, 상기 효소가 고정된 상기 베이스 전극의 상기 상부면과 평행한 방향으로 생성된 전기장(electric field)에 의하여 고정된 것을 포함하는 바이오 전극.

청구항 11

제9 항에 있어서,

상기 베이스 전극에 고정된 상기 효소의 수소 결합 개수는,

상기 효소 고유의 수소 결합 개수 보다 적은 것을 포함하는 바이오 전극.

청구항 12

제9 항에 있어서,

상기 베이스 전극에 고정된 상기 효소의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)는,

상기 효소 고유의 평균 제곱근 편차(RMSD) 보다 큰 것을 포함하는 바이오 전극.

청구항 13

제9 항에 있어서,

상기 효소는 Laccase, Bilirubin oxidase, Glucose oxidase, 또는 Glucose dehydrogenase 중 어느 하나를 포함

하는 바이오 전극.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 효소 고정 방법 및 바이오 전극에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, 베이스 전극 상에 효소를 고정시키는 효소 고정 방법 및 바이오 전극에 관련된 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이오 연료전지는 물질의 화학적 에너지를 전기 에너지 형태로 바꾸는 에너지 변환 장치의 일종이다. 일반적으로 통칭되는 전지와 마찬가지로 양극과 음극을 가지고 있으며, 각 전극에 있어서 에너지 전환의 촉매로서 미생물 또는 효소를 이용하는 것을 그 특징으로 한다. 바이오 연료전지의 구동원리는 전해질 내 에 존재하는 기질과, 효소에 의해 촉진되는 화학반응 에서 생성되는 전자를 전극을 통하여 외부로 끌어냄으로써 전력을 생산하게 된다.

[0003] 전자의 생성/소모는 효소 내에 존재하는 보조인자의 산화/환원을 직접 이용하는 경우와, 효소 반응의 생성물이 전자와 반응하는 경우가 있다. 바이오 연료전지의 성능은 이러한 과정에서 생성되는 전자의 수와 생성된 전자의 전달효율에 의해 결정된다. 생성 되는 전자의 양은 전극에 존재하는 효소의 양에 관련 되며, 전자전달능력은 효소와 전극간의 위치관계나 결합형태 등에 기인한다.

[0004] 이에 따라, 바이오 연료전지의 성능을 향상시키기 위하여, 전극에 존재하는 효소의 양을 향상시키거나, 효소와 전극간의 위치관계나 결합형태 등을 개선하는 기술과 관련하여 지속적인 연구 및 개발이 이루어지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명이 해결하고자 하는 일 기술적 과제는, 효소의 활성화 자리와 전극 사이의 거리가 감소된 효소 고정 방법 및 바이오 전극을 제공하는 데 있다.

[0006] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 기술적 과제는, 온도, pH, 용액 조건 등에 상관 없이 간편한 방법으로 효소를 고정하는 효소 고정 방법 및 바이오 전극을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 기술적 과제는, 대량생산이 용이한 효소 고정 방법 및 바이오 전극을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 상술된 것에 제한되지 않는다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 효소 고정 방법을 제공한다.

[0010] 일 실시 예에 따르면, 상기 효소 고정 방법은, 쌍극자 모멘트를 갖는 효소(enzyme)를 포함하는 베이스 소스를 준비하는 단계, 베이스 전극의 상부면에 상기 베이스 소스를 제공하는 단계, 및 상기 베이스 소스가 제공된 상기 베이스 전극 상에 전기장(electric field)을 생성하여, 상기 효소를 고정시키는 단계를 포함하되, 상기 전기장은 상기 효소가 고정되는 상기 베이스 전극의 상기 상부면과 평행한 방향으로 인가되는 것을 포함할 수 있다.

[0011] 일 실시 예에 따르면, 상기 효소를 고정시키는 단계에서, 상기 효소의 쌍극자 모멘트(dipole moment) 방향과 상기 전기장의 방향이 평행하도록, 상기 효소가 회전되는 것을 포함할 수 있다.

[0012] 일 실시 예에 따르면, 상기 효소를 고정시키는 단계에서, 상기 효소의 활성화 자리(active site)가 상기 베이스 전극의 상기 상부면과 인접하도록, 상기 효소가 회전되는 것을 포함할 수 있다.

[0013] 일 실시 예에 따르면, 상기 전기장이 인가된 후 상기 효소의 활성화 자리와 상기 베이스 전극 사이의 거리는, 상기 전기장이 인가되기 전 상기 효소의 활성화 자리와 상기 베이스 전극 사이의 거리 보다 가까운 것을 포함할 수 있다.

[0014] 일 실시 예에 따르면, 상기 전기장을 생성하는 전압은, 1.0V 이하인 것을 포함할 수 있다.

[0015] 일 실시 예에 따르면, 상기 전기장을 생성하는 전압은, 1mV 이하인 것을 포함할 수 있다.

[0016] 일 실시 예에 따르면, 상기 전기장이 인가되기 전 상기 효소의 수소 결합(H-bond) 개수와 상기 전기장이 인가된 후 상기 효소의 수소 결합 개수의 차이는 기준 범위 이하인 것을 포함할 수 있다.

[0017] 일 실시 예에 따르면, 상기 전기장이 인가되기 전 상기 효소의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)와 상기 전기장이 인가된 후 상기 효소의 평균 제곱근 편차(RMSD) 차이는 기준 범위 이하인 것을 포함할 수 있다.

[0019] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 바이오 전극을 제공한다.

[0020] 일 실시 예에 따르면, 상기 바이오 전극은 상부면을 갖는 베이스 전극, 및 상기 베이스 전극의 상기 상부면에 고정되고 쌍극자 모멘트를 갖는 복수의 효소(enzyme)를 포함하되, 복수의 상기 효소의 쌍극자 모멘트는, 상기 베이스 전극의 상기 상부면과 평행한 일 방향으로 정렬된 것을 포함할 수 있다.

[0021] 일 실시 예에 따르면, 상기 효소는, 상기 효소가 고정된 상기 베이스 전극의 상기 상부면과 평행한 방향으로 생성된 전기장(electric field)에 의하여 고정된 것을 포함할 수 있다.

[0022] 일 실시 예에 따르면, 상기 베이스 전극에 고정된 상기 효소의 수소 결합 개수는, 상기 효소 고유의 수소 결합 개수 보다 적은 것을 포함할 수 있다.

[0023] 일 실시 예에 따르면, 상기 베이스 전극에 고정된 상기 효소의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)는, 상기 효소 고유의 평균 제곱근 편차(RMSD) 보다 큰 것을 포함할 수 있다.

[0024] 일 실시 예에 따르면, 상기 효소는 Laccase, Bilirubin oxidase, Glucose oxidase, 또는 Glucose dehydrogenase 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 실시 예에 따른 효소 고정 방법은, 쌍극자 모멘트를 갖는 효소를 포함하는 베이스 소스를 준비하는 단계, 베이스 전극의 상부면에 상기 베이스 소스를 제공하는 단계, 및 상기 베이스 소스가 제공된 상기 베이스 전극 상에 전기장을 생성하여, 상기 효소를 고정시키는 단계를 포함하되, 상기 전기장은 상기 효소가 고정되는 상기 베이스 전극의 상기 상부면과 평행한 방향으로 인가되는 것을 포함할 수 있다.

[0026] 이에 따라, 상기 효소의 활성화 자리(active site)가 상기 베이스 전극과 인접하게 고정되므로, 상기 효소와 상기 베이스 전극 사이의 전자 교환 효율이 향상될 수 있다. 또한, 전극 내부의 온도, pH, 용액 조건에 상관없이 간편하게 적용 가능하며, 대량생산에 용이한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명의 실시 예에 따른 효소 고정 방법을 설명하는 순서도이다.

도 2는 본 발명의 실시 예에 따른 효소 고정 방법에 사용되는 효소를 나타내는 도면이다.

도 3 및 도 4는 본 발명의 실시 예에 따른 효소 고정 방법을 나타내는 도면이다.

도 5는 쌍극자 모멘트와 전기장의 관계를 나타내는 도면이다.

도 6 및 도 7은 복수의 효소들이 베이스 전극 상에 일 방향으로 정렬되는 모습을 나타내는 도면이다.

도 8 및 도 9는 전기장의 효과를 나타내는 시뮬레이션 결과들이다.

도 10은 본 발명의 실시 예 2, 실시 예 5, 실시 예 6 및 비교 예에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 수소 결합 개수를 나타내는 그래프이다.

도 11은 본 발명의 실시 예 2, 실시 예 5, 및 실시 예 6에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)를 나타내는 그래프이다.

도 12는 본 발명의 실시 예 7 및 비교 예에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 쌍극자 모멘트와 전기장의 각

도를 나타내는 그래프이다.

도 13은 본 발명의 실시 예 7 및 비교 예에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 수소 결합 개수를 나타내는 그래프이다.

도 14는 본 발명의 실시 예에 7 및 비교 예에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)를 나타내는 그래프이다.

도 15는 본 발명의 실시 예 1 내지 실시 예 4에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)를 나타내는 그래프이다.

도 16은 본 발명의 실시 예 1 내지 실시 예 4에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 수소 결합 개수를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시 예를 상세히 설명할 것이다. 그러나 본 발명의 기술적 사상은 여기서 설명되는 실시 예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화 될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 실시 예는 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[0029] 본 명세서에서, 어떤 구성요소가 다른 구성요소 상에 있다고 언급되는 경우에 그것은 다른 구성요소 상에 직접 형성될 수 있거나 또는 그들 사이에 제 3의 구성요소가 개재될 수도 있다는 것을 의미한다. 또한, 도면들에 있어서, 막 및 영역들의 두께는 기술적 내용의 효과적인 설명을 위해 과장된 것이다.

[0030] 또한, 본 명세서의 다양한 실시 예 들에서 제1, 제2, 제3 등의 용어가 다양한 구성요소들을 기술하기 위해서 사용되었지만, 이들 구성요소들이 이 같은 용어들에 의해서 한정되어서는 안 된다. 이들 용어들은 단지 어느 구성요소를 다른 구성요소와 구별시키기 위해서 사용되었을 뿐이다. 따라서, 어느 한 실시 예에 제 1 구성요소로 언급된 것이 다른 실시 예에서는 제 2 구성요소로 언급될 수도 있다. 여기에 설명되고 예시되는 각 실시 예는 그것의 상보적인 실시 예도 포함한다. 또한, 본 명세서에서 '및/또는'은 전후에 나열한 구성요소들 중 적어도 하나를 포함하는 의미로 사용되었다.

[0031] 명세서에서 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한 복수의 표현을 포함한다. 또한, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 구성요소 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징이나 숫자, 단계, 구성요소 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 배제하는 것으로 이해되어서는 안 된다. 또한, 본 명세서에서 "연결"은 복수의 구성 요소를 간접적으로 연결하는 것, 및 직접적으로 연결하는 것을 모두 포함하는 의미로 사용된다.

[0032] 또한, 하기에서 본 발명을 설명함에 있어 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략할 것이다.

[0034] 도 1은 본 발명의 실시 예에 따른 효소 고정 방법을 설명하는 순서도이고, 도 2는 본 발명의 실시 예에 따른 효소 고정 방법에 사용되는 효소를 나타내는 도면이고, 도 3 및 도 4는 본 발명의 실시 예에 따른 효소 고정 방법을 나타내는 도면이고, 도 5는 쌍극자 모멘트와 전기장의 관계를 나타내는 도면이고, 도 6 및 도 7은 복수의 효소들이 베이스 전극 상에 일 방향으로 정렬되는 모습을 나타내는 도면이다.

[0035] 도 1 및 도 2를 참조하면, 베이스 소스가 준비된다(S100). 일 실시 예에 따르면, 상기 베이스 소스는 효소(enzyme, 100) 및 용매가 혼합되어 제조될 수 있다. 일 실시 예에 따르면, 상기 용매는 DI water를 포함할 수 있다.

[0036] 일 실시 예에 따르면, 상기 효소(100)는 쌍극자 모멘트(dipole moment)를 포함할 수 있다. 또한, 상기 효소(100)는 쌍극자 모멘트의 방향(P)과 활성화 자리(active site, AS)의 방향(T)이 직각을 이룰 수 있다. 이와 달리, 다른 실시 예에 따르면, 상기 효소(100)는 상기 쌍극자 모멘트의 방향(P)과 상기 활성화 자리의 방향(T)이 다양한 각도를 이룰 수 있다. 즉, 상기 효소(100)의 상기 쌍극자 모멘트의 방향(P)과 상기 활성화 자리의 방향(T)의 각도는 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 효소(100)는, Laccase, Bilirubin oxidase, Glucose oxidase, 또는 Glucose dehydrogenase 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0037] 도 1, 도 3 및 도 4를 참조하면, 베이스 전극(200)의 상부면에 상기 베이스 소스가 제공될 수 있다(S200). 일 실시 예에 따르면, 상기 베이스 전극(200)은 표면이 평평할 수 있다. 예를 들어, 상기 베이스 전극(200)은 그래핀(graphene)을 포함할 수 있다. 이와 달리, 다른 예를 들어, 상기 베이스 전극(200)은 그라파이트(graphite), 그래핀 산화물(graphene oxide), 및 금(Gold, Au) 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 이와 달리, 또 다른 예를 들어, 상기 베이스 전극(200)은 구리(Cu), 아연(Zn), 철(Fe), 니켈(Ni), 코발트(Co), 망간(Mn), 은(Ag), 및 실리카(Silica) 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0038] 상기 베이스 소스가 제공된 상기 베이스 전극(200) 상에 전기장(electric field, EF)이 생성될 수 있다. 이에 따라, 상기 베이스 전극(200) 상에 상기 효소(100)가 고정될 수 있다(S300).

[0039] 일 실시 예에 따르면, 상기 전기장(EF)은 상기 베이스 전극(200)의 상기 상부면과 평행한 방향으로 인가될 수 있다. 예를 들어, 상기 전기장(EF)은 도 3의 X축 방향으로 인가될 수 있다.

[0040] 이 경우, 상기 효소(100)의 상기 쌍극자 모멘트 방향(P)과 상기 전기장(EF)의 방향이 평행하도록, 상기 효소(100)가 회전될 수 있다. 이에 따라, 상기 효소(100)의 활성화 자리(AS)가 상기 베이스 전극(100)의 상부면과 인접하도록 배치될 수 있다.

[0041] 보다 구체적으로, 도 5를 참조하면, 양전하 q와 음전하 -q로 이루어진 길이 d의 쌍극자가 균일한 전기장 E에 놓여있는 경우, 쌍극자 모멘트와 전기장 사이의 각도를 Θ라고 하면, 쌍극자의 각 전하가 받는 힘은 아래의 <수학식 1>과 같고, 이에 의해 쌍극자는 아래의 <수학식 2>로 표현되는 돌림힘을 받아 회전할 수 있다.

[0042] <수학식 1>

[0043] $$\mathbf{F} = q\mathbf{E}$$

[0044] (F: 쌍극자의 각 전하가 받는 힘, q: 양전하의 크기, E: 전기장의 크기)

[0045] <수학식 2>

[0046] $$\boldsymbol{\tau} = 2 \cdot (\mathbf{r} \times \mathbf{F}) = dF \sin\theta\hat{\boldsymbol{\tau}} = dqE \sin\theta\hat{\boldsymbol{\tau}}$$

[0047] (τ: 돌림힘, r: 반경, F: 쌍극자의 각 전하가 받는 힘, d: 양전하와 음전하 사이의 거리, Θ: 쌍극자 모멘트와 전기장 사이의 각도, q: 양전하의 크기)

[0048] 하지만, 전기 쌍극자 모멘트는 아래의 <수학식 3>으로 정의되므로, 돌림힘은 아래의 <수학식 4>로 표현될 수 있다.

[0049] <수학식 3>

[0050] $$\mathbf{p} = q\mathbf{d}.$$

[0051] (p: 쌍극자 모멘트, q: 양전하의 크기, d: 양전하와 음전하 사이의 거리)

[0052] <수학식 4>

[0053] $$\boldsymbol{\tau} = pE \sin\theta\hat{\boldsymbol{\tau}} = \mathbf{p} \times \mathbf{E}$$

[0054] (τ: 돌림힘, p: 쌍극자 모멘트, E: 전기장의 크기, Θ: 쌍극자 모멘트와 전기장 사이의 각도)

[0055] 또한, 상술된 돌림힘은, 아래의 <수학식 5>로 표현되는 위치 에너지로 나타낼 수 있다.

[0056] <수학식 5>

[0057] $$U = -\mathbf{p} \cdot \mathbf{E}.$$

[0058] (U: 위치 에너지, p: 쌍극자 모멘트, E: 전기장의 크기)

[0059] 결과적으로, 쌍극자 모멘트가 전기장과 같은 방향을 가리키는 경우 전기적 위치 에너지가 최소값을 갖는 반면, 쌍극자 모멘트가 전기자의 반대 방향을 가리키는 경우 전기적 위치 에너지가 최대값을 가지게 된다. 이에 따라,

다른 외부 힘이 없다면 쌍극자 모멘트는 전기장과 같은 방향으로 정렬되게 된다.

[0060] 이로 인해, 도 4에 도시된 바와 같이, 상기 전기장(EF)이 상기 베이스 전극(200)의 상부면과 평행한 방향으로 인가되는 경우, 상기 효소(100)의 상기 쌍극자 모멘트 방향(P)이 상기 베이스 전극(200)의 상부면과 평행한 방향으로 정렬되므로, 상기 효소(100)가 회전될 수 있다. 또한, 상기 효소(100)가 회전됨에 따라, 상기 효소(100)의 활성화 자리(AS)가 회전되므로, 상기 효소(100)의 활성화 자리(AS)와 상기 베이스 전극(200) 사이의 거리가 상대적으로 가까워 질 수 있다. 즉, 상기 전기장(EF)이 인가된 후 상기 효소(100)의 활성화 자리(AS)와 상기 베이스 전극(200) 사이의 거리(d_2)는, 상기 전기장(EF)이 인가되기 전 상기 효소(100)의 활성화 자리(AS)와 상기 베이스 전극(200) 사이의 거리(d_1)보다 가까울 수 있다.

[0061] 또한, 도 6 및 도 7에 도시된 바와 같이, 복수의 상기 효소(100)를 포함하는 베이스 소스를 상기 베이스 전극(200)에 제공한 후, 상기 전기장(EF)을 인가하는 경우, 상기 복수의 효소(100)들이 일 방향으로 정렬될 수 있다. 구체적으로, 상기 복수의 효소(100)들은, 각각의 상기 효소(100)들의 상기 쌍극자 모멘트 방향(P)이 상기 전기장(EF)의 방향과 같은 방향으로 정렬될 수 있다. 이에 따라, 상기 전기장(EF)이 상기 베이스 전극(200)의 상부면과 평행한 방향으로 인가되는 경우, 상기 복수의 효소(100)들이 포함하는 각각의 쌍극자 모멘트 방향(P) 또한 상기 베이스 전극(200)의 상부면과 평행한 방향으로 정렬될 수 있다. 이로 인해, 상기 복수의 효소(100)들이 포함하는 각각의 활성화 자리(AS)들이 모두, 상기 베이스 전극(200)의 상부면과 인접하도록 배치될 수 있다.

[0062] 상기 효소(100)의 활성화 자리(AS)와 상기 베이스 전극(200) 사이의 거리가 가까워 지는 경우, 상기 효소(100)와 상기 베이스 전극(200) 사이의 전자 교환 효율이 향상될 수 있다. 이에 따라, 상기 효소(100)가 고정된 상기 베이스 전극(200)이 바이오 연료전지 및 효소 기반 센서 등으로 사용되는 경우, 각 어플리케이션의 성능이 향상될 수 있다. 즉, 상기 효소(100)가 고정된 상기 베이스 전극(200)은 바이오 전극으로서 용이하게 사용될 수 있다.

[0063] 일 실시 예에 따르면, 상기 전기장(EF)을 생성하는 전압이 1.0V 이하로 제어될 수 있다. 이 경우, 상기 전기장(EF)이 인가되기 전 상기 효소(100)의 수소 결합(H-bond) 개수와 상기 전기장(EF)이 인가된 후 상기 효소(100)의 수소 결합 개수의 차이가 기준 범위 이하일 수 있다. 또한, 상기 전기장(EF)이 인가되기 전 상기 효소(100)의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)와 상기 전기장이 인가된 후 상기 효소의 평균 제곱근 편차의 차이가 기준 범위 이하일 수 있다.

[0064] 즉, 1.0V 이하의 전압으로 생성된 상기 전기장(EF)을 통해 상기 효소(100)가 상기 베이스 전극(200) 상에 고정되는 경우, 상기 효소(100)의 구조가 유지될 수 있다. 이와 달리, 1.0V 초과의 전압으로 생성된 상기 전기장(EF)을 통해 상기 효소(100)가 상기 베이스 전극(200) 상에 고정되는 경우, 상기 효소(100)의 구조가 붕괴되는 문제점이 발생될 수 있다. 이는, 상기 효소(100)의 수소 결합(H-bond) 개수가 현저하게 줄어들거나, 상기 효소(100)의 평균 제곱근 편차(RMSD)가 현저하게 증가되는 것으로서 판단될 수 있다.

[0065] 상술된 바와 달리, 다른 실시 예에 따르면, 상기 전기장(EF)을 생성하는 전압이 1mV 이하로 제어될 수 있다. 이에 따라, 상기 효소(100)의 고정 효율이 향상될 수 있다. 이와 달리, 상기 전기장(EF)을 생성하는 전압이 1 mV를 초과하는 경우, 상기 효소(100)가 상기 베이스 전극(200) 상에 고정되지 않는 문제점이 발생될 수 있다.

[0066] 다시 말해, 상기 전기장(EF)을 생성하는 전압을 제어함으로써, 상기 효소(100)의 구조를 유지한 상태로, 상기 베이스 전극(200) 상에 용이하게 고정될 수 있다.

[0067] 본 발명의 실시 예에 따른 효소 고정 방법은, 쌍극자 모멘트를 갖는 상기 효소(100)를 포함하는 상기 베이스 소스를 준비하는 단계, 상기 베이스 전극(200)의 상부면에 상기 베이스 소스를 제공하는 단계, 및 상기 베이스 소스가 제공된 상기 베이스 전극(200) 상에 상기 전기장(EF)을 생성하여, 상기 효소(100)를 고정시키는 단계를 포함하되, 상기 전기장(EF)은 상기 효소(100)가 고정되는 상기 베이스 전극(200)의 상기 상부면과 평행한 방향으로 인가되는 것을 포함할 수 있다.

[0068] 이에 따라, 상기 효소(100)의 활성화 자리(active site, AS)가 상기 베이스 전극(200)과 인접하게 고정되므로, 상기 효소(100)와 상기 베이스 전극(200) 사이의 전자 교환 효율이 향상될 수 있다. 또한, 전극 내부의 온도, pH, 용액 조건에 상관없이 간편하게 적용 가능하며, 대량생산에 용이한 장점이 있다.

[0070] 이상, 본 발명의 실시 예에 따른 효소 고정 방법 및 바이오 전극이 설명되었다. 이하, 본 발명의 실시 예에 따

른 효소 고정 방법 및 바이오 전극의 구체적인 실험 예 및 특성 평가 결과가 설명된다.

[0071] 실시 예 1에 따른 바이오 전극 제조

[0072] 효소가 제공된 그래핀 기판이 준비된다. 이후, 0.5V의 전압으로 생성된 전기장을 인가하여, 그래핀 기판 상에 효소를 고정시켰다. 이에 따라, 상기 실시 예 1에 따른 바이오 전극이 제조되었다.

[0074] 실시 예 2에 따른 바이오 전극 제조

[0075] 효소가 제공된 그래핀 기판이 준비된다. 이후, 1.0V의 전압으로 생성된 전기장을 인가하여, 그래핀 기판 상에 효소를 고정시켰다. 이에 따라, 상기 실시 예 2에 따른 바이오 전극이 제조되었다.

[0077] 실시 예 3에 따른 바이오 전극 제조

[0078] 효소가 제공된 그래핀 기판이 준비된다. 이후, 1.5V의 전압으로 생성된 전기장을 인가하여, 그래핀 기판 상에 효소를 고정시켰다. 이에 따라, 상기 실시 예 3에 따른 바이오 전극이 제조되었다.

[0080] 실시 예 4에 따른 바이오 전극 제조

[0081] 효소가 제공된 그래핀 기판이 준비된다. 이후, 2.0V의 전압으로 생성된 전기장을 인가하여, 그래핀 기판 상에 효소를 고정시켰다. 이에 따라, 상기 실시 예 4에 따른 바이오 전극이 제조되었다.

[0083] 실시 예 5에 따른 바이오 전극 제조

[0084] 효소가 제공된 그래핀 기판이 준비된다. 이후, 6.0V의 전압으로 생성된 전기장을 인가하여, 그래핀 기판 상에 효소를 고정시켰다. 이에 따라, 상기 실시 예 1에 따른 바이오 전극이 제조되었다.

[0086] 실시 예 6에 따른 바이오 전극 제조

[0087] 효소가 제공된 그래핀 기판이 준비된다. 이후, 10V의 전압으로 생성된 전기장을 인가하여, 그래핀 기판 상에 효소를 고정시켰다. 이에 따라, 상기 실시 예 1에 따른 바이오 전극이 제조되었다.

[0089] 실시 예 7에 따른 바이오 전극 제조

[0090] 효소가 제공된 그래핀 기판이 준비된다. 이후, 1mV의 전압으로 생성된 전기장을 인가하여, 그래핀 기판 상에 효소를 고정시켰다. 이에 따라, 상기 실시 예 1에 따른 바이오 전극이 제조되었다.

[0092] 비교 예에 따른 바이오 전극 제조

[0093] 그래핀 기판 상에 효소를 제공한 후, 전기장의 인가 없이 효소를 고정시켰다.

[0095] 상술된 실시 예 1 내지 실시 예 7 및 비교 예에 따른 바이오 전극의 제조 과정에서 전기장 생성에 사용된 전압의 크기가 아래의 <표 1>을 통해 정리된다.

표 1

[0096]

구분	전압
실시 예 1	0.5 V
실시 예 2	1.0 V
실시 예 3	1.5 V
실시 예 4	2.0 V

실시 예 5	6.0 V
실시 예 6	10 V
실시 예 7	1 mV
비교 예	-

[0097] 도 8 및 도 9는 전기장의 효과를 나타내는 시뮬레이션 결과들이다.

[0098] 도 8을 참조하면, 전기장의 인가 없이 그래핀 상에 효소를 고정시키는 과정에 대한 분자 동역학 시뮬레이션을 수행하여 나타내었고, 도 9를 참조하면, 전기장의 인가를 통해 그래핀 상에 효소를 고정시키는 과정에 대한 분자 동역학 시뮬레이션을 수행하여 나타내었다.

[0099] 도 8에서 확인할 수 있듯이, 전기장이 인가되지 않는 경우, 초기(Initial)에는 기판과 효소 사이의 거리가 10Å였지만, 25 ns 및 50 ns로 시간이 지남에 따라 23 Å 및 31 Å로 점점 거리가 멀어지는 것을 확인할 수 있었다.

[0100] 반면, 도 9에서 확인할 수 있듯이, 전기장이 인가되는 경우, 초기(Initial), 25 ns, 및 50 ns로 시간이 지남에 따라 10 Å, 0.3 Å, 및 0.25 Å로 점점 거리가 가까워지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 효소의 쌍극자 모멘트 방향(P) 및 활성화 자리 방향(T1 site)이 회전하는 것을 확인할 수 있었다.

[0101] 도 10은 본 발명의 실시 예 2, 실시 예 5, 실시 예 6 및 비교 예에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 수소 결합 개수를 나타내는 그래프이다.

[0102] 도 10을 참조하면, 상기 실시 예 2(1V), 실시 예 5(6V), 실시 예 6(10V) 및 비교 예(Non-EF)에 따른 바이오 전극을 준비하고, 효소 고정 시간에 따른 수소 결합(Hbonds)의 개수를 측정하여 나타내었다. 실시 예에 따른 바이오 전극의 효소 고정 시간은, 전기장 인가 시간으로 측정하였고, 비교 예에 따른 바이오 전극의 효소 고정 시간은, 효소를 포함하는 베이스 소스가 그래핀 기판 상에 제공되는 시간으로 측정하였다.

[0103] 도 10에서 확인할 수 있듯이, 상기 실시 예 2(1V)에 따른 바이오 전극 및 비교 예(Non-EF)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 경우, 수소 결합의 개수가 실질적으로 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 실시 예 5(6V) 및 실시 예 6(10V)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 경우, 효소 고정 시간이 지남에 따라, 수소 결합 개수가 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0104] 도 11은 본 발명의 실시 예 2, 실시 예 5, 및 실시 예 6에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)를 나타내는 그래프이다.

[0105] 도 11을 참조하면, 상기 실시 예 2(1V), 실시 예 5(6V), 및 실시 예 6(10V)에 따른 바이오 전극을 준비한 후, 각각이 포함하는 효소의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)를 측정하여 나타내었다.

[0106] 도 11에서 확인할 수 있듯이, 상기 실시 예 2(1V)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 경우, 효소 고정 시간이 지남에도 불구하고, 평균 제곱근 편차가 실질적으로 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 실시 예 5(6V) 및 실시 예 6(10V)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 경우, 효소 고정 시간이 지남에 따라, 평균 제곱근 편차가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0107] 도 12는 본 발명의 실시 예 7 및 비교 예에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 쌍극자 모멘트와 전기장의 각도를 나타내는 그래프이다.

[0108] 도 12를 참조하면, 상기 실시 예 7(1mV) 및 비교 예(w/o EF)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소를 준비한 후, 각각에 대해 쌍극자 모멘트와 전기장의 각도를 측정하여 나타내었다. 도 12에서 확인할 수 있듯이, 상기 실시 예 7에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 경우, 회전이 용이하게 이루어진 것을 확인할 수 있었다.

[0109] 도 13은 본 발명의 실시 예 7 및 비교 예에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 수소 결합 개수를 나타내는 그래프이다.

[0110] 도 13을 참조하면, 상기 실시 예 7(1mV) 및 비교 예(w/o EF)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소를 준비한 후, 각각에 대해 효소 고정 시간에 따른 수소 결합 개수 변화를 측정하여 나타내었다. 도 13에서 확인할 수 있듯이, 상기 실시 예 7(1mV)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소는, 효소 고정 시간이 지남에도 불구하고, 수소 결합 개수가 실질적으로 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

[0111] 도 14는 본 발명의 실시 예에 7 및 비교 예에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)를 나타내는 그래프이다.

[0112] 도 14를 참조하면, 상기 실시 예 7(1mV) 및 비교 예(w/o EF)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소를 준비한 후, 각각에 대해 효소 고정 시간에 따른 평균 제곱근 편차를 측정하여 나타내었다. 도 14에서 확인할 수 있듯이, 상기 실시 예 7에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소와 상기 비교 예에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 평균 제곱근 편차 변화가 비슷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0113] 도 12 내지 도 14에서 확인할 수 있듯이, 1 mV의 전압으로 생성된 전기장 인가를 통해 효소가 고정되는 경우, 효소의 구조가 유지되면서 그래핀 전극 상에 효과적으로 고정된 것을 확인할 수 있었다.

[0114] 도 15는 본 발명의 실시 예 1 내지 실시 예 4에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 평균 제곱근 편차(root mean square deviation, RMSD)를 나타내는 그래프이다.

[0115] 도 15를 참조하면, 상기 실시 예 1 내지 실시 예 4(0.5V, 1.0V, 1.5V, 2.0V)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소를 준비한 후, 각각에 대해 효소 고정 시간에 따른 평균 제곱근 편차를 측정하여 나타내었다.

[0116] 도 15에서 확인할 수 있듯이, 상기 실시 예 1 내지 실시 예 3(0.5V, 1.0V, 1.5V)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 경우, 효소 고정 시간이 지남에도 불구하고 평균 제곱근 편차가 실질적으로 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 실시 예 4(2.0V)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 경우, 시간이 지남에 따라, 평균 제곱근 편차가 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0117] 도 16은 본 발명의 실시 예 1 내지 실시 예 4에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 수소 결합 개수를 나타내는 그래프이다.

[0118] 도 16을 참조하면, 상기 실시 예 1 내지 실시 예 4(0.5V, 1.0V, 1.5V, 2.0V)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소를 준비한 후, 각각에 대해 수소 결합 개수를 측정하여 나타내었다.

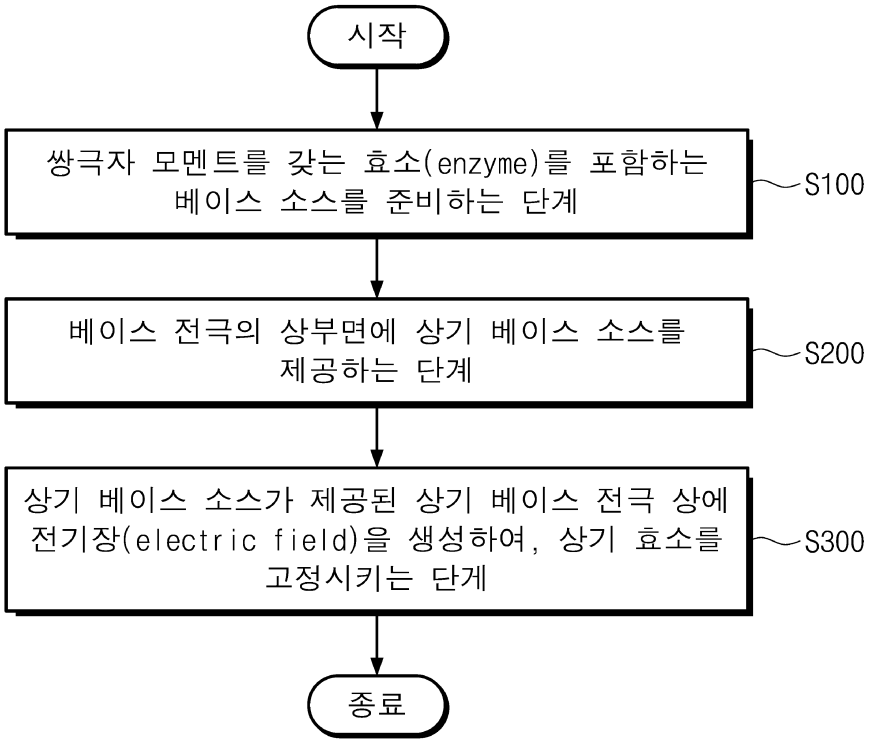
[0119] 도 16에서 확인할 수 있듯이, 전기장을 생성하는 전압의 크기가 증가됨에 따라, 효소의 수소 결합 개수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 실시 예 4(2.0V)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 수소 결합 개수는, 실시 예 1 내지 실시 예 3(0.5V, 1.0V, 1.5V)에 따른 바이오 전극이 포함하는 효소의 수소 결합 개수 보다 현저하게 적은 것을 확인할 수 있었다.

[0120] 결과적으로, 도 15 및 도 16을 통해 알 수 있듯이, 효소의 구조를 유지한 상태로 그래핀 기판 상에 고정시키기 위해서는, 전기장을 생성하는 전압의 크기가 1.0V 이하로 제어되어야 하는 것을 알 수 있었다.

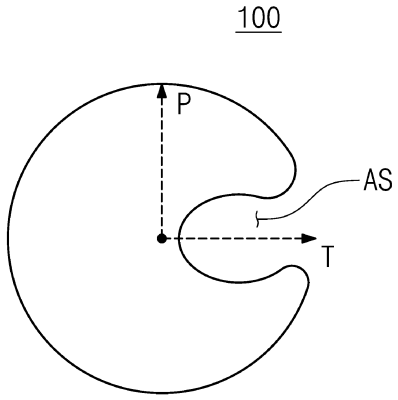
[0122] 이상, 본 발명을 바람직한 실시 예를 사용하여 상세히 설명하였으나, 본 발명의 범위는 특정 실시 예에 한정되는 것은 아니며, 첨부된 특허청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이다. 또한, 이 기술분야에서 통상의 지식을 습득한 자라면, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않으면서도 많은 수정과 변형이 가능함을 이해하여야 할 것이다.

도면

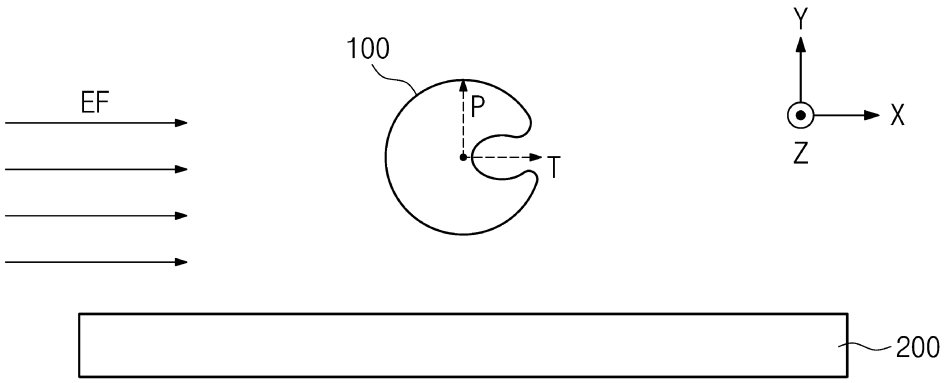
도면1


시작
쌍극자 모멘트를 갖는 효소(enzyme)를 포함하는 베이스 소스를 준비하는 단계
S100
베이스 전극의 상부면에 상기 베이스 소스를 제공하는 단계
S200
상기 베이스 소스가 제공된 상기 베이스 전극 상에 전기장(electric field)을 생성하여, 상기 효소를 고정시키는 단계
S300
종료

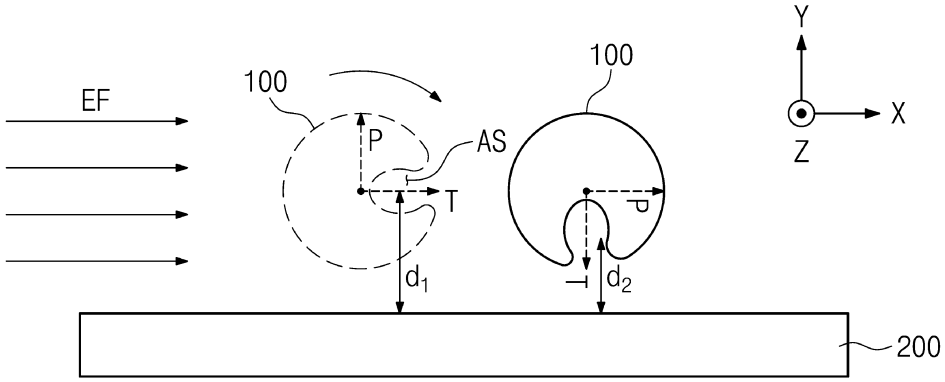
도면2


100
P
AS
T

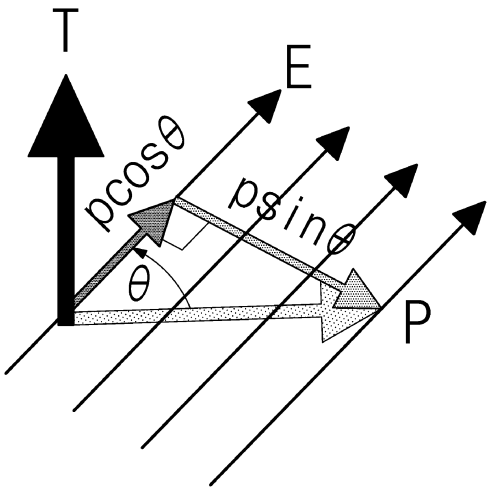
도면3


EF
100
P
T
Y
X
Z
200

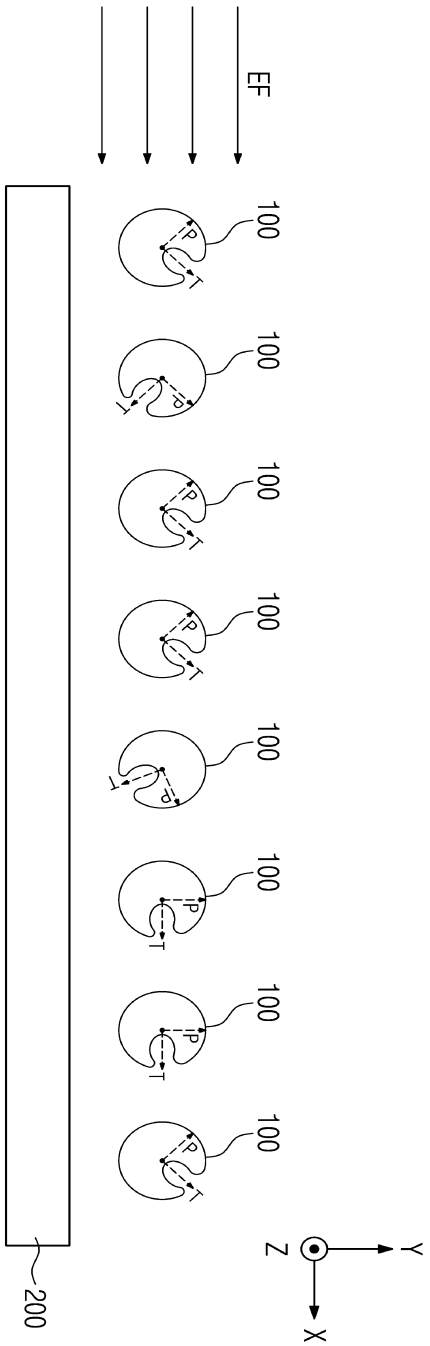
도면4


EF
100
P
AS
T
d1
100
P
d2
Y
X
Z
200

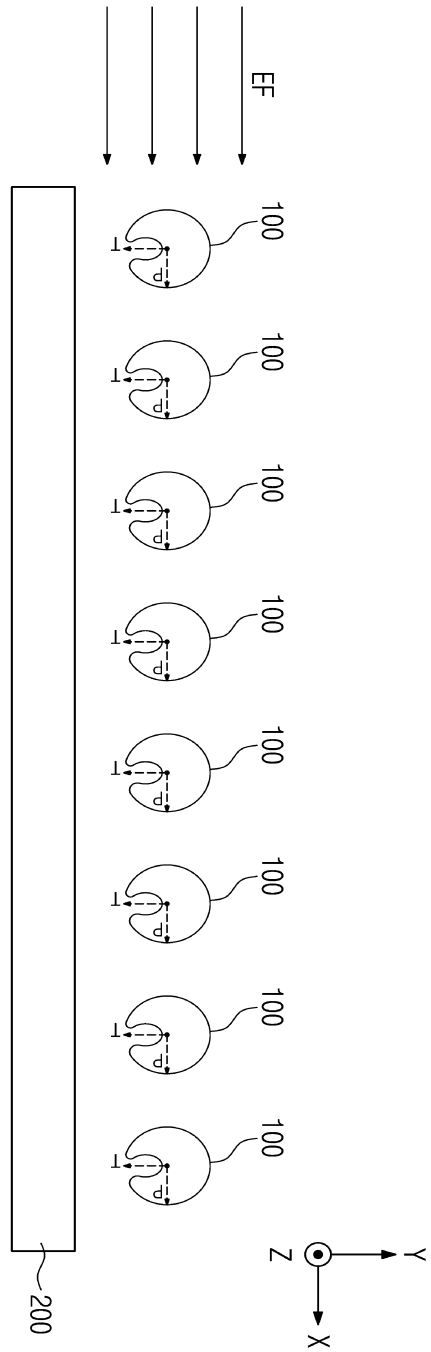
도면5


T
E
pcosθ
psinθ
θ
P

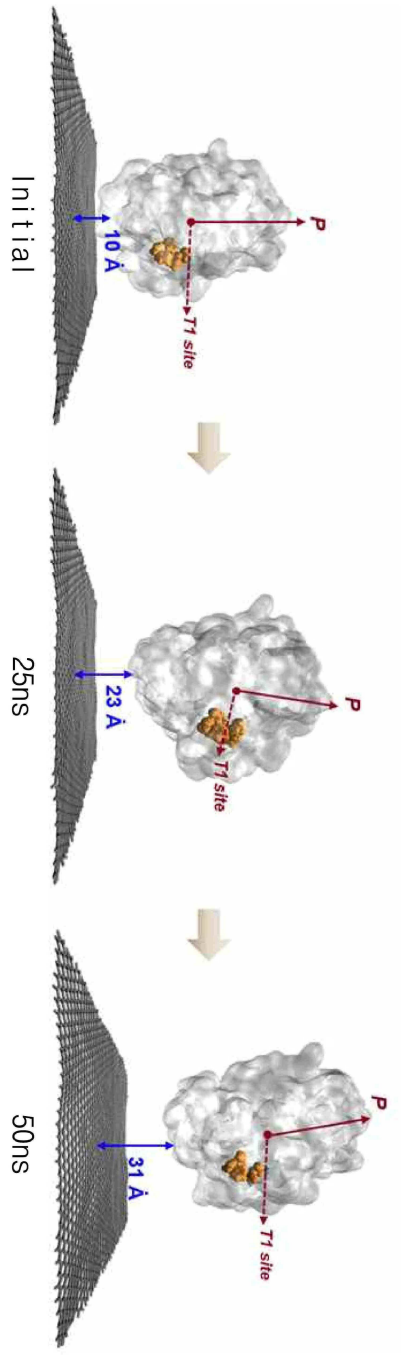
도면6


EF
100
R
T
100
R
T
100
R
T
100
R
T
100
R
T
100
IP
T
100
IP
T
100
R
T
200
Z
Y
X

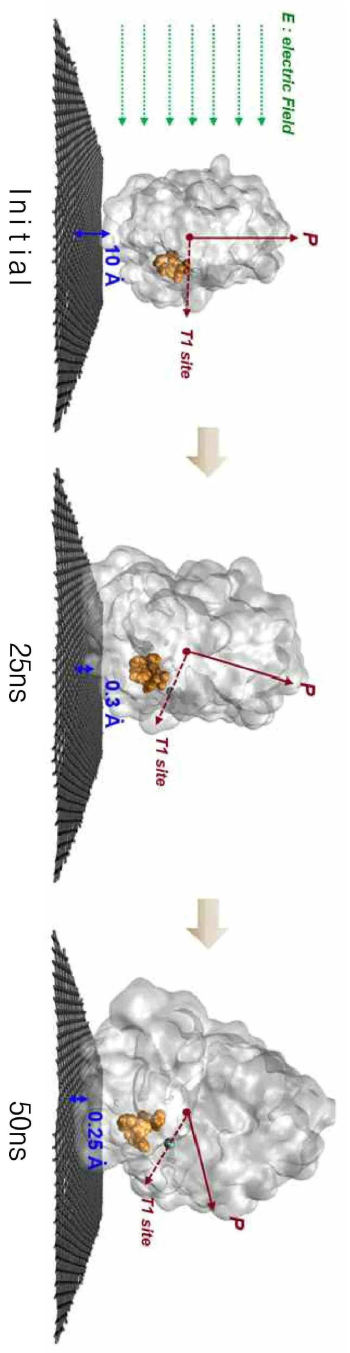
도면7



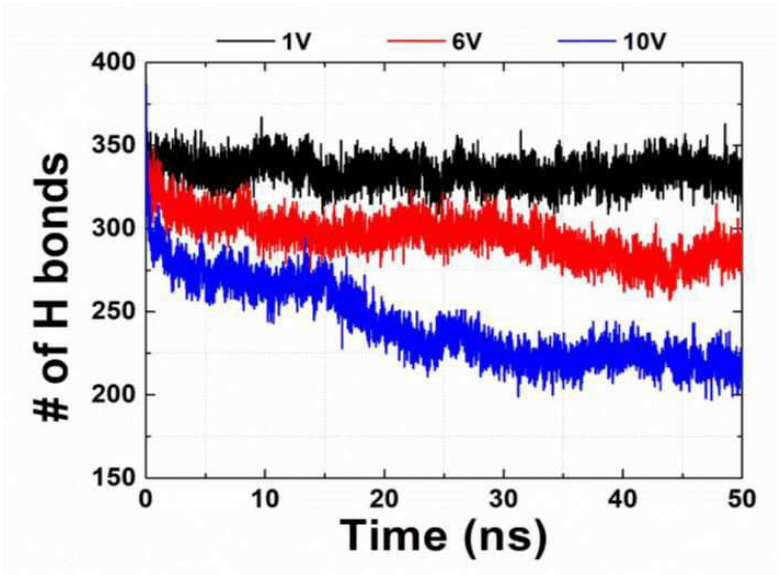
도면8



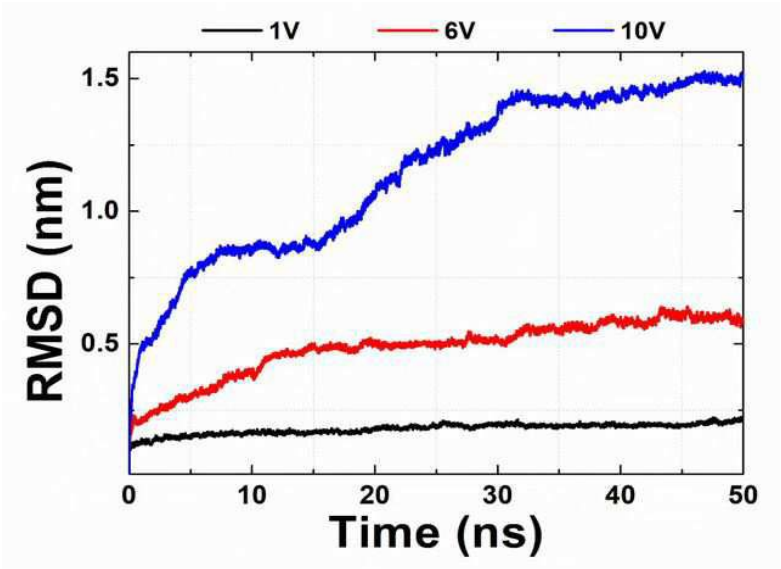
도면9


E : electric Field
Initial
10 Å
P
T1 site
25ns
0.3 Å
P
T1 site
50ns
0.25 Å
P
T1 site

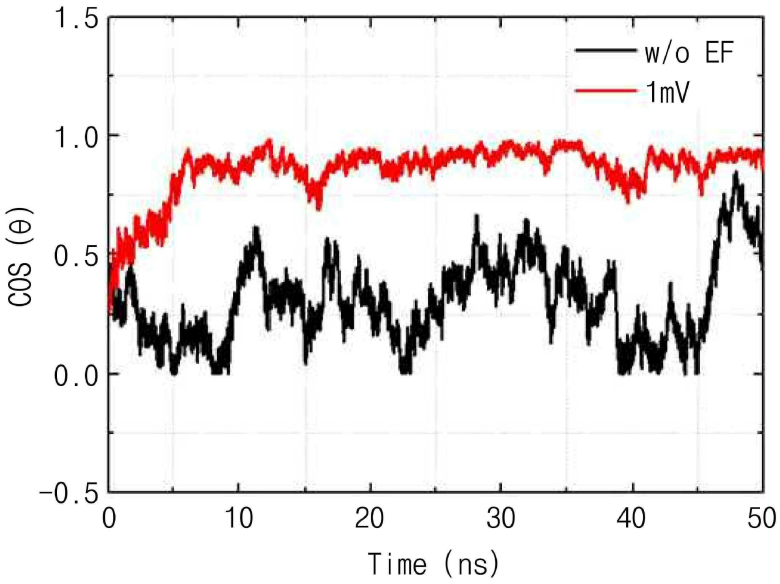
도면10


1V
6V
10V
# of H bonds
400
350
300
250
200
150
0
10
20
30
40
50
Time (ns)

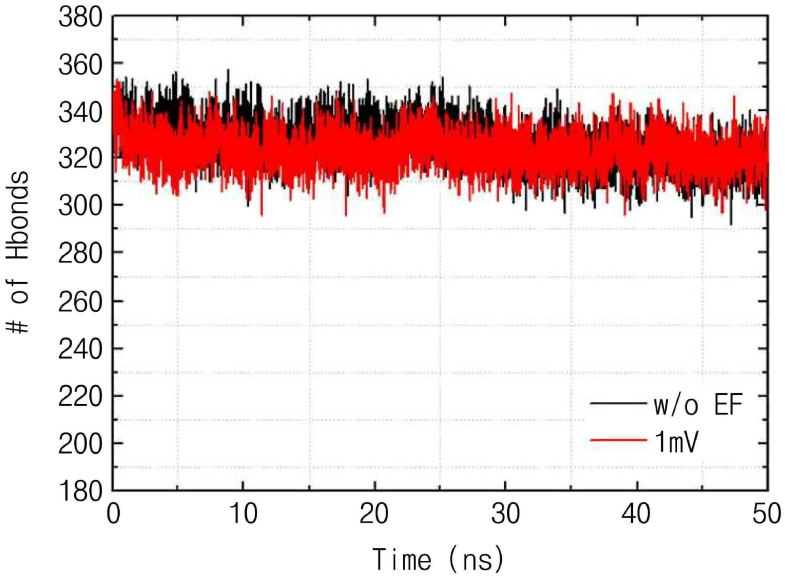
도면11


1V
6V
10V
RMSD (nm)
1.5
1.0
0.5
0
10
20
30
40
50
Time (ns)

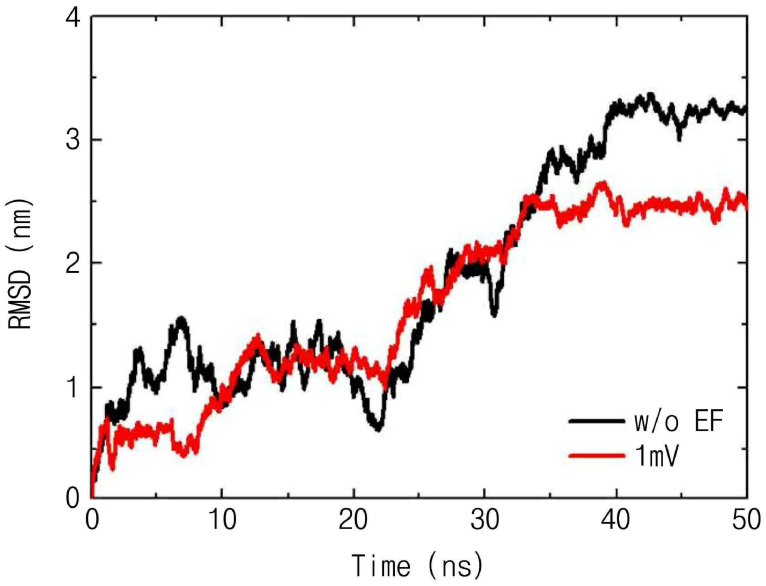
도면12


1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
COS (θ)
0
10
20
30
40
50
Time (ns)
w/o EF
1mV

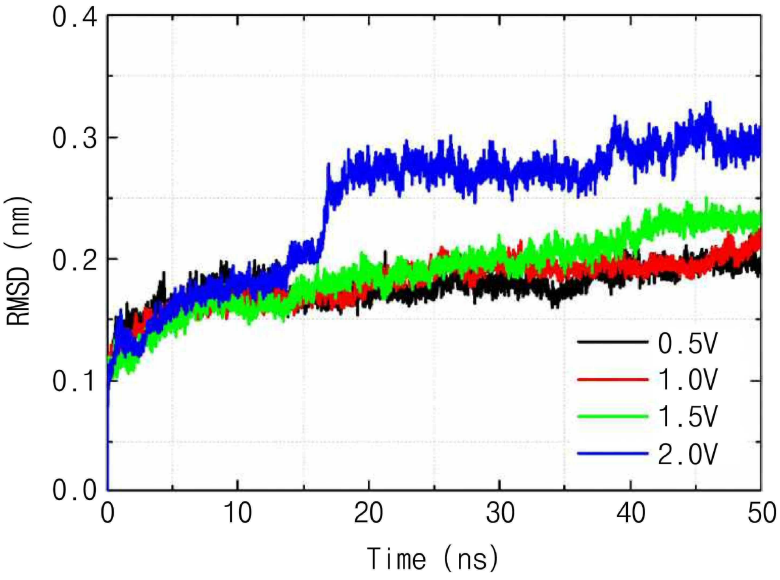
도면13


380
360
340
320
300
280
260
240
220
200
180
# of Hbonds
0
10
20
30
40
50
Time (ns)
w/o EF
1mV

도면14


RMSD (nm)
Time (ns)
w/o EF
1mV
0
1
2
3
4
0
10
20
30
40
50

도면15


RMSD (nm)
Time (ns)
0.5V
1.0V
1.5V
2.0V
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0
10
20
30
40
50

도면16

