

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2019년 11월 14일 (14.11.2019) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2019/216674 A2

(51) 국제특허분류:

H01M 8/16 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2019/005585

(22) 국제출원일:

2019년 5월 9일 (09.05.2019)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2018-0053083 2018년 5월 9일 (09.05.2018) KR

(71) 출원인: 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동), Gwangju (KR). 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, (안암동5가), Seoul (KR).

(72) 발명자: 장인섭 (CHANG, In Seop); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동), Gwangju (KR). 이유석 (LEE, Yoo Seok); 61005 광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동), Gwangju (KR). 최인걸 (CHOI, In Geol); 07016 서울특별시 동작구 남부순환로 263길 34, 201호, Seoul (KR). 백승우 (BAEK, Seung Woo); 02843 서울특별시 성북구 고려대로 17가길 49-3, Seoul (KR).

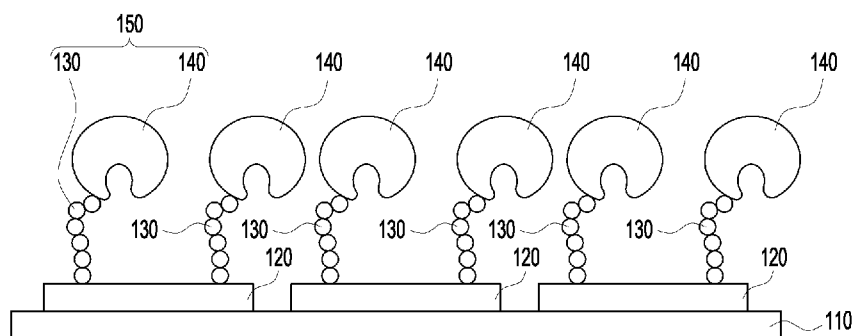
(74) 대리인: 한상수 (HAN, Sang Soo); 06721 서울특별시 서초구 효령로 60길 13, 6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: ELECTRODE FOR BIOELECTRONICS USING METAL-IMMOBILIZED PEPTIDE EXPRESSING ENZYME

(54) 발명의 명칭: 금속 고정화 펩타이드 발현 효소를 이용한 바이오일렉트로닉스용 전극



(57) Abstract: To solve the technical problem, an embodiment of the present invention provides an electrode for an enzyme fuel cell. The electrode for an enzyme fuel cell may comprise: a substrate; an electrode disposed on the substrate; and an enzyme pattern disposed on the electrode and comprising an enzyme in which a metal-immobilized peptide is expressed. The metal-immobilized peptide expressed in the enzyme is characterized by being immobilized onto the electrode. Therefore, the immobilization is made such that the distance between an active site of the enzyme and the electrode is close, and thus efficiency of the electrode can be improved.

(57) 요약서: 본 발명의 일 실시예는 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예는 효소 연료전지용 전극을 제공한다. 이때, 상기 효소 연료전지용 전극은 기재, 상기 기재 상에 위치하는 전극 및 상기 전극 상에 위치하는 금속 고정화 펩타이드가 발현된 효소를 포함하는 효소패턴을 포함할 수 있다. 이때, 상기 효소에 발현된 금속 고정화 펩타이드가 상기 전극에 고정된 것을 특징으로 한다. 이를 통해 상기 효소의 활성자리와 전극 사이의 거리를 가깝게 고정하여 전극의 효율을 향상시킬 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2019/216674 A2

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 금속 고정화 펩타이드 발현 효소를 이용한 바이오일렉트로닉스용 전극

기술분야

- [1] 본 발명은 생촉매 기반 바이오일렉트로닉스용 전극에 관한 것으로, 보다 상세하게는 금속 고정화 펩타이드를 발현한 효소를 이용한 것을 특징으로 하는 바이오일렉트로닉스용 전극에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 효소는 생명체 내부의 화학 반응을 매개하는 촉매이다. 효소는 기질과 결합하여 효소-기질 복합체를 형성함으로써 반응의 활성화에너지를 낮추는 촉매 역할을 한다. 통상의 촉매가 촉매로서 역할을 하기 위해 고온이나 강산 또는 강염기 등의 환경이 필요한 반면에 효소는 상온이나 보통의 pH에서도 작동할 수 있다. 또한 생명체 내부라는 복잡한 환경에서 촉매 역할을 수행하므로 기질 선택성을 가지고, 따라서 반응물을 미리 정제하거나 할 필요성이 줄어든다.
- [4] 효소의 이러한 특성 때문에 효소를 상용 촉매로 사용하는 기술들이 연구되고 있으며, 효소 연료전지는 그 대표적인 예이다. 효소 연료전지는 인체 이식형 의료기기의 전원으로 사용 가능성이 있어 많은 관심을 받고 있으나 이로부터 발생하는 전력량이 낮은 문제점이 있다. 특히, 이를 인체 이식형 전원으로 사용하기 위해서는 효소 연료전지의 크기를 수 센치 미터 이하로 줄여야 하는데, 이 경우, 발생 전력량이 더욱 감소되어 인체 이식형 의료기기에 충분한 전원을 공급하는데 어려움이 있다.
- [5] 효소 연료전지의 성능을 향상시키기 위해서는 이의 핵심 요소인 효소 전극의 성능을 향상시켜야 한다. 효소 전극은 전기가 잘 통하는 전극에 효소를 고정화하여 제조되는데, 효소의 고정화 단계가 매우 중요하다. 효소를 전극 물질에 고정화하는데 있어서, 성능을 향상시키기 위하여 고려해야 할 몇 가지 사항들이 있다. 첫째, 일반적으로 효소는 물리적 흡착 또는 화학적 결합에 의해 전극 물질에 고정화될 수 있는데, 장기간 부착이 가능해야 한다. 둘째, 효소 고정화 단계에서 기질과 반응하여 산화환원 반응이 발생하는 활성자리가 용액에 존재하는 기질과 쉽게 접촉할 수 있어야 성능이 제한되지 않는다. 셋째, 효소 고정화 단계에서 기질 산화환원반응으로 생성된 전자를 효소 외부로 전달하는 최종전자제공 활성자리가 전도성이 높은 전극등의 물질표면에 수십 나노미터 내외의 거리를 유지하며 고정화되어야 한다.
- [6] 효소 연료전지용 전극 등에 있어서, 효소를 전극 표면에 고정시 전극-효소간 전자전달이 가능하도록 전도성이 높은 금나노입자 또는 산화환원 매개체를 효소 표면 또는 전극표면에 합성하며 반응성이 높은 관능기 즉, 아미노기,

- 카르복실기, 티올기 및 방향족 히드록시기 등의 결합을 이용하고 있다.
- [7] 이러한 화학적 합성에 의한 효소 고정 방법은 효소 내 예상하지 않은 화학결합발생으로 효소의 반응성이 감소할 수 있으며, 용액상에서 효소와 매개체, 매개체와 전극 간의 결합이 비특이적으로 일어날 수 있고, 따라서 효소의 산화환원 활성자리가 보호되지 않을 수 있으며, 효소가 전극 표면에 고르게 분포하지 못하고, 효소의 전자전달 활성자리-전극간 최소거리가 확보되지 않는 문제가 발생하여 전극 효율이 감소할 수 있다.
- [8] <선행기술문헌> 대한민국공개특허 제10-2012-0113085
- [9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 상기한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 효소의 전자전달 활성자리와 전극 표면 사이의 거리를 짧게 제어하여 직접 전자전달이 가능한 효소 연료전지용 전극을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 전극 표면에 효소의 위상을 조절하며 고정화하는 것이며 효소 간 뭉치지 않고 전극과 특이적 결합력으로 표면상 단층으로 배열될 수 있어 효율이 향상된 효소 연료전지용 전극을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예는 효소 연료전지용 전극을 제공한다.
- [15] 이때, 상기 효소 연료전지용 전극은 기재, 상기 기재 상에 위치하는 전극 및 상기 전극 상에 위치하는 금속 고정화 펩타이드가 발현된 효소를 포함하는 효소패턴을 포함할 수 있다.
- [16] 이때, 상기 효소에 발현된 금속 고정화 펩타이드가 상기 전극에 고정된 것을 특징으로 한다.
- [17] 이때, 상기 효소 연료전지용 전극은 상기 효소의 전자전달 활성자리와 상기 전극패턴 표면의 거리가 2nm 이하인 것을 특징으로 한다.
- [18] 이때, 상기 기재는 실리콘 웨이퍼, 전도성 고분자, 탄소 천, 탄소 종이 또는 그래핀을 포함할 수 있다.
- [19] 이때, 상기 전극은 실리카, Cu, Zn, Fe, Ni, Co, Mn, Au 또는 Ag를 포함할 수 있다.

- [20] 이때, 상기 효소는 활성자리가 위치하는 α 단위 및 상기 α 단위와 연결된 γ 단위를 포함하고, 상기 펩타이드는 상기 α 단위 또는 γ 단위 중 어느 하나에 발현되는 것을 특징으로 한다.
- [21] 이때, 상기 펩타이드는 상기 전극과 특이적으로 결합하며, 나선형 구조를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [22] 이때, 상기 펩타이드는 아미노산 12개 내지 60개로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [23] 이때, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 10 중 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [24] 이때, 상기 효소는 글루코오스 탈수소효소, 글루코오스 산화효소, 알칼리성 인산가수 분해효소 또는 일산화탄소 탈수소효소를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [25] 이때, 상기 효소는 보조인자를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [26] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 실시예는 상기 효소 연료전지용 전극을 포함하는 효소 연료전지를 제공한다.

[27]

발명의 효과

- [28] 본 발명의 실시예에 따르면, 효소의 활성자리와 전극 표면 사이의 거리를 짧게 제어하여 직접 전자전달이 가능한 효소 연료전지용 전극을 제공할 수 있다.
- [29] 본 발명의 실시예에 따르면, 효소가 전극 표면에 묻치지 않고 일정 간격으로 배열되거나 패턴을 형성하며 배열될 수 있어 효율이 향상된 효소 연료전지용 전극을 제공할 수 있다.
- [30] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[31]

도면의 간단한 설명

- [32] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 금속고정화 펩타이드가 발현된 효소를 나노미터크기로 개질된 상기 패턴 전극상 나노패터닝 고정화한 효소전극 모식도이다
- [33] 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 금속 고정화 펩타이드가 발현된 효소의 시퀀스 및 SDS 젤 사진이다.
- [34] 도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극을 나타낸 모식도이다.
- [35] 도 4는 종래 효소 연료전지용 전극을 나타낸 모식도이다.
- [36] 도 5는 본 발명에 따른 제조예와 비교예의 AFM 측정 그래프이다.
- [37] 도 6은 본 발명의 따른 제조예와 비교예의 순환 전압-전류 그래프이다.
- [38] 도 7은 본 발명의 따른 제조예의 스캔 속도에 따른 순환 전압-전류 그래프이다.

[39]

발명의 실시를 위한 형태

[40]

이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[41]

명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결(접속, 접촉, 결합)"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[42]

본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[43]

이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[44]

[45]

이하, 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 연료전지용 전극에 대하여 설명한다.

[46]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 연료전지용 전극을 나타낸 모식도이다.

[47]

도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 연료전지용 전극(100)은 이때, 상기 효소 연료전지용 전극은 기재(110), 상기 기재(110) 상에 위치하는 전극(120) 및 상기 전극(120) 상에 위치하는 금속 고정화 펩타이드(130)가 발현된 효소(140)를 포함하는 효소패턴(150)을 포함할 수 있다.

[48]

이때, 상기 효소(140)에 발현된 금속 고정화 펩타이드가(130) 상기 전극(120)에 고정된 것을 특징으로 한다.

[49]

이때, 상기 효소 연료전지용 전극은 상기 효소의 전자전달 활성자리와 상기 전극표면의 거리가 2nm 이하인 것을 특징으로 한다.

[50]

이때, 상기 전자전달 활성자리와 상기 전극표면의 거리가 2nm 초과일 경우, 전자전달 저항이 증가하여 전자가 전달되지 않을 수 있다.

[51]

[52]

상기 기재(110)는 전자를 전달받아 확산하여 연료전지의 다른 부분으로 전자를

전달하는 역할을 수행하는 것을 특징으로 한다.

- [53] 또한, 전극의 형태를 잡아주는 역할을 하므로 연료전지의 목적에 맞는 가공성을 지니고 있어야 한다. 효소 연료전지는 통상의 연료전지와 같이 대형화하는 것이 최종적인 목표이나, 연료의 한계상 아직까지는 생체 이식형 의료기기의 전원을 목적으로 주로 연구되고 있다. 따라서 연료전지 자체를 소형화, 나노화 하기 위한 기술이 필요하며, 상기 기재는 그에 맞게 소형화할 수 있는 소재일 필요가 있다.
- [54] 예를 들어, 상기 기재(110)는 실리콘 웨이퍼, 전도성 고분자, 탄소 천, 탄소 종이 또는 그래핀을 포함할 수 있다.
- [55] 이때, 실리콘 웨이퍼는 오랫동안 사용되어 왔던 도전성 소재로 반도체에 주로 사용되는 등 높은 신뢰성과 정밀 가공성이 우수하다. 한편, 전도성 고분자는 단위 부피에 비해 도전성이 높고 원하는 형태로 가공할 수 있다는 장점이 있다. 또한, 탄소 천, 탄소 종이 및 그래핀 등은 탄소소재에 의해 매우 높은 도전성을 가진다. 이때, 상기 기재를 형성하는 소재는 상술한 것에 한정되지 않으며, 목적하는 효소 연료전지의 크기 및 종류에 따라 다양하게 선택될 수 있다.
- [56] 예를 들어, 상기 전극(120)은 실리카, Cu, Zn, Fe, Ni, Co, Mn, Au 또는 Ag를 포함할 수 있다.
- [57] 예를 들어, 상기 전극(120)은 패턴이 형성된 전극일 수 있다. 이때, 상기 패턴이 형성된 전극은 상기 기재 표면에 패턴이 형성될 부분을 제외한 나머지 부분에 용해 가능한 고분자 등으로 몰드를 만들고, 상기 몰드에 금속을 채운 다음 몰드만 용해시키는 방법을 이용할 수 있다. 용액 공정이 어려운 경우 레이저 식각이나 플라즈마 식각을 이용할 수도 있으며, 기재 상에 금속이 일정한 패턴을 형성하여 남아 있으면 된다.
- [58] 본 발명의 실시예에 따른 효소 연료전지용 전극은 상기 효소(140)가 상기 기재(110)에는 고정되지 않고, 상기 금속 고정화 펩타이드(130)에 의해 상기 효소(140)가 상기 전극(120)에만 선택적으로 고정될 수 있다.
- [59] 따라서 본 발명의 실시예에 따른 효소 연료전지용 전극은 상기 패턴 상에 효소에 발현된 금속 고정화 펩타이드가 고정되면 전극 패턴의 모양을 따라 효소 패턴을 형성할 수 있다.
- [60] 금속은 생체 내에서 여러 기능을 하며, 약 30%의 단백질은 금속이온을 가진 상태로 발견되었다. 특히 Mg, Zn, Fe, Mn 등이 단백질과 결합된 상태로 많이 발견되었다. 헤모글로빈이나 질소고정효소에 존재하는 Fe은 잘 알려져 있으며, 그 밖에도 금속이온은 단백질의 자기조립에 매개체로서 역할을 하기도 한다.
- [61] 본 발명에서는 금속과 펩타이드간 결합을 이용하여 금속 고정화 펩타이드(130)가 발현된 효소(140)를 전극(120)에 고정하는 것을 특징으로 한다.
- [62] 이때, 상기 효소(140)는 활성자리가 위치하는 α 서브유닛 및 상기 α 서브유닛과 연결된 γ 서브유닛을 포함하고, 상기 펩타이드는 상기 α 서브유닛 또는 γ 서브유닛 중 어느 하나에 발현되는 것을 특징으로 한다.

- [63] 이때, 상기 펩타이드(130)를 상기 α 서브유닛 또는 γ 서브유닛에 발현함으로써, 효소의 활성자리를 전극과 가깝게 고정할 수 있다.
- [64] 이때, 상기 펩타이드(130)는 상기 전극(120)과 특이적으로 결합하며, 0.1nm내외의 길이를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [65] 이때, 상기 효소(140)는 효소내 상기 펩타이드(130)의 상기 전극(120)표면상 마이크로일렉트로닉, 마이크로마그네틱 필름 형성을 통한 결합으로 고정되는 것을 특징으로 한다.
- [66] 이때, 상기 펩타이드(130)는 아미노산 12개 내지 60개로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [67] 이때, 상기 펩타이드(130)가 아미노산 12개 미만으로 구성될 경우, 펩타이드와 금속간 결합력 약화로 인해 전자전달 활성자리와 전극간 전자전달에 필요한 거리가 확보되지 않는 문제점이 발생할 수 있다.
- [68] 이때, 상기 펩타이드(130)가 아미노산 60개 초과로 구성될 경우, 펩타이드의 길이 및 부피 증가로 전자전달 활성자리와 전극간 거리가 증가로 인해 전자전달 효율이 저하될 수 있다.
- [69] 이때, 상기 펩타이드(130)가 아미노산 60개 초과로 구성될 경우, 펩타이드의 길이 및 부피 증가로 펩타이드가 전자전달 활성자리를 가려 전자전달 전자전달 저항증가로 인한 효소전극의 효율 저하가 유발될 수 있다.
- [70] 바람직하게는, 이때, 상기 펩타이드(130)는 아미노산 12개 내지 24개로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [71] 이때, 상기 펩타이드(130)가 아미노산 12개 미만으로 구성될 경우, 펩타이드와 금속간 결합력 약화로 인해 전자전달 활성자리와 전극간 전자전달에 필요한 거리가 확보되지 않는 문제점이 발생할 수 있다.
- [72] 이때, 상기 펩타이드(130)가 아미노산 24개 초과로 구성될 경우, 펩타이드의 길이 및 부피 증가로 전자전달 활성자리와 전극간 거리가 증가로 인해 전자전달 효율이 저하될 수 있다.
- [73] 이때, 상기 펩타이드(130)가 아미노산 24개 초과로 구성될 경우, 펩타이드의 길이 및 부피 증가로 펩타이드가 전자전달 활성자리를 가려 전자전달 전자전달 저항증가로 인한 효소전극의 효율 저하가 유발될 수 있다.
- [74]
- [75] 이때, 상기 금속 고정화 펩타이드(130)는 서열번호 1 내지 서열번호 10 중 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [76] 한편, 종래 효소 연료전지용 전극에서는 효소 지지체에서 효소와 지지체의 결합 위치가 비특이적으로 형성되어 효소의 산화환원 활성자리 및 전자전달 활성자리의 위상이 조절되지 않는 제1문제점 및 전자전달 활성자리와 전극간의 거리가 2nm이하로 접촉하지 않는다는 제2문제점 그리고 효소와 전극간의 결합력이 비특이적으로 형성되어 전극표면상 효소가 고르게 분포되지 않는 제3문제점이 있었다.

- [77] 그러나, 본 발명의 일실시예에 따른 상기 금속 고정화 펩타이드는 효소의 특정위치에 선택적으로 발현하는 것이 가능하며, 금속-펩타이드간 결합에 의해 결합 위치에 있어서 금속 선택성을 가지므로 상기 문제점들을 해결할 수 있다.
- [78] 예를 들어, 상기 금속 고정화 펩타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 10 중 어느 하나 이상의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [79]
- [80] (서열번호 1) LKAHLPPSRLPS (금)
- [81] (서열번호 2) MHGKTQATSGTIQS (금)
- [82] (서열번호 3) AYSSGAPPMPPF (은)
- [83] (서열번호 4) IRPAIHIIPIH (은)
- [84] (서열번호 5) MSPHPHPRHHHT (실리카)
- [85] (서열번호 6) RKLPDAPGMHTW (티타늄)
- [86] (서열번호 7) KLHSSPHTLPVQ (코발트)
- [87] (서열번호 8) HSVRWLLPGAHP (코발트)
- [88] (서열번호 9) CTLHVSSYC (백금)
- [89] (서열번호 10) CPTSTGQAC (백금)
- [90]
- [91] 이때, 상기 효소는 글루코오스 탈수소효소, 글루코오스 산화효소, 알칼리성 인산가수 분해효소 또는 일산화탄소 탈수소효소를 포함할 수 있다..
- [92] 이때, 상기 효소는 보조인자를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [93] 이때, 상기 보조인자는 상기 효소의 촉매활성을 향상시키기 위해 추가될 수 있다.
- [94] 예를 들어, 상기 보조인자는 FAD(Flavin Adenine Dinucleotide) 또는 NAD(Nicotinamide Adenine Dinucleotide)를 포함할 수 있다. 그러나 이에 한정하는 것은 아니며 경우에 따라 적절한 보조인자를 포함할 수 있다.
- [95]
- [96] **제조예 1**
- [97] 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극을 제조하기 위해 금속 고정화 펩타이드가 발현된 *Burkholderia cepacia* (Genbank ID: AF430844.1) 유래 FAD-GDH(GDH, Glucose dehydrogenase)를 제조하였다.
- [98] 상기 FAD-GDH 는 pET21a 플라스미드를 이용한 통상의 PCR(polymerase chain reaction)법을 통해 제조하였다.
- [99] 이때, 상기 pET21a 플라스미드는 6개의 히스티딘 태그를 가지고 있으며 효소 제조 후 효소의 분리를 위해 상기 히스티딘 태그의 C-말단에 MBP(maltose binding protein)이 삽입되어있다. 또한, PCR 수행 후 효소를 분리하기 위해 GDH 유전자와 MBP 사이에 TEV(Robacco Etch Virus) 유전자를 삽입하였다.
- [100] 이때, 금속 고정화 펩타이드로 골드 바인딩 펩타이드(GBP, gold binding peptide)는 GDH 효소의 α 단위의 N-말단, α 단위의 C-말단, γ 단위의 N-말단 또는

γ 단위의 C-말단에 삽입되었으며 이를 도 2에 나타내었다.

[101] 이때, 상기 GBP의 아미노산서열은 LKAHLPPSRLPS이었으며, 1.78kDa 및 0.1nm의 길이를 가졌다.

[102]

[103] 도 2의 a는 제조예 1에서 이용된 플라스미드를 도시한 모식도이다.

[104] 도 2의 b는 제조예 1에서 제조된 효소를 전기영동한 12% SDS젤 사진이다.

[105] 도 2를 참조하면, 금속 고정화 펩타이드를 발현시키지 않은 α 단위열 및 γ 단위열에 비교했을 때, α 단위의 C-말단에 금속 고정화 펩타이드를 발현시킨 경우인 α C, α 단위의 N-말단에 금속 고정화 펩타이드를 발현시킨 경우인 α N, γ 단위의 C-말단에 금속 고정화 펩타이드를 발현시킨 경우인 γ C 및 γ 단위의 N-말단에 금속 고정화 펩타이드를 발현시킨 경우인 γ N열의 밴드가 더 큰 질량을 가진 것을 알 수 있다. 또한, α C와 α N 및 γ C와 γ N열의 밴드 위치가 같음을 확인할 수 있으며, 이는 제조예 1에 따른 효소 제조가 제대로 이루어진 것을 의미한다.

[106]

[107] 제조예 2

[108] 먼저, 실리콘 웨이퍼 기재 위에 금(Au)을 1cm²크기로 코팅하였다.

[109] 다음, GBP가 발현된 FAD-GDH 0.5uM 용액을 제조하였다.

[110] 다음, 상기 용액에 Au가 코팅된 기재를 20분간 침지시켜 GBP를 Au 표면에 고정시켜 효소 연료전지용 전극을 제조하였다.

[111]

[112] 비교예 1

[113] GBP를 발현시키지 않은 것을 제외하고는 상기 제조예 2과 동일하게 효소 연료전지용 전극을 제조하였다.

[114]

[115] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 연료전지용 전극을 나타낸 모식도이다.

[116] 도 3을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 연료전지는 기재(110), 상기 기재(110) 상에 위치하는 전극(120), 상기 전극(120)에 고정된 금속 고정화 펩타이드(130), 상기 펩타이드(130)가 발현된 글루코오스 탈수소효소의 α 단위(141), 상기 글루코오스 탈수소효소의 α 단위(141)와 연결된 글루코오스 탈수소효소의 γ 단위(142) 및 상기 글루코오스 탈수소효소의 α 단위(141)와 연결된 글루코오스 탈수소효소의 보조인자(143)를 포함할 수 있다.

[117] 도 4는 종래 효소 연료전지용 전극을 나타낸 모식도이다.

[118] 도 4를 참조하면, 종래의 연료전지는 기재(110), 상기 기재(110) 상에 위치하는 전극(120), 상기 전극(120) 상에 위치하는 글루코오스 탈수소효소의 α 단위(141), 상기 글루코오스 탈수소효소의 α 단위(141)와 연결된 글루코오스 탈수소효소의 γ 단위(142) 및 상기 글루코오스 탈수소효소의 α 단위(141)와 연결된 글루코오스 탈수소효소의 보조인자(143)를 포함할 수 있다.

[119] 도 3 내지 도 4를 참조하면, 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극은 상기 금속 고정화 펩타이드(130)에 의해 상기 글루코오스 탈수소효소의 α 단위(141)에 존재하는 활성자리(active site)가 상기 전극(120)과 가까이 고정된 것을 알 수 있다. 반면, 종래의 효소 연료전지용 전극은 상기 글루코오스 탈수소효소의 α 단위(141)가 상기 금속 고정화 펩타이드(130)에 의해 고정되지 못한 관계로, 상기 α 단위(141)에 존재하는 활성자리(active site)와 상기 전극(120)과의 거리가 일정하지 못하며, 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극의 경우보다 먼 경우가 발생함을 알 수 있다.

[120]

[121] 효소 연료전지는 효소의 활성자리에서 일어나는 화학반응에 의해 발생하는 수소이온 또는 전자를 이용하여 기전력을 발생시킨다. 이때, 효소 연료전지의 성능을 향상시키기 위해서는 상기 효소의 활성자리에서 발생한 전자를 전극에 효과적으로 전달하는 것이 중요하다. 이때, 상기 효소의 활성자리에서 생성된 전자를 효과적으로 전극에 전달하기 위해서는 상기 효소의 활성자리와 전극 사이의 거리를 단축하는 것이 중요하다.

[122] 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극은 상기 효소의 활성자리가 위치하는 α 단위(141) 또는 상기 α 단위(141)와 가까운 γ 단위(142)단위에 상기 금속 고정화 펩타이드(130)을 발현시켜 전극에 직접 고정함으로써, 상기 활성자리와 전극의 거리를 가깝게 고정하였다.

[123] 따라서, 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극은 효소를 효소에 발현된 펩타이드를 이용하여 전극에 직접 고정함으로써, 상기 효소의 활성자리와 전극 간의 거리를 단축하여 상기 효소 연료전지의 성능을 향상시킬 수 있다.

[124]

[125] 또한, 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극은 패턴을 형성한 전극을 제공할 수 있다. 이는 상기 금속 고정화 펩타이드가 금속과 특이적으로 결합하기 때문이다. 따라서 패턴이 형성된 전극 상에 금속 고정화 펩타이드를 고정하여 패턴이 형성된 효소연료전지용 전극을 형성할 수 있다. 따라서 상기 전극은 금속을 나노입자로 형성하여 기재 상에 고정시켜 형성하는 형태도 가능하다.

[126]

[127] 상기 글루코오스 탈수소효소는 FAD(Flavin Adenine Dinucleotide)와 결합하는 α 단위, 시토크롬c인 β 단위 및 사페론 유사체인 γ 단위를 포함한다. FAD는 생체 내에서 주로 글루코오스 산화효소 또는 글루코오스 탈수소 효소에 결합하여 전자 전달을 매개하는 역할을 한다. 상기 효소들의 작용에 필수적이기 때문에 FAD와 효소를 일체로 보기도 하며, FAD와 글루코오스 탈수소 효소가 결합된 형태를 FAD-GDH로 표기하여 하나의 효소로 본다. 시토크롬c는 생물종에 넓게 걸쳐 존재하는 단백질로, 식물, 동물 그리고 많은 단세포동물에서 찾아볼 수

있다. 헴분자를 가진 작은 단백질로 100여개의 아미노산으로 이루어져 있고 분자량은 약 12,000이다. 생체 내 전자전달계의 복합체Ⅲ과 복합체Ⅳ사이에서 전자를 전달하는 역할을 하며, 아포토시스(apoptosis)를 조절하기도 한다. 사파론은 단백질의 접힘과 변형에 관여하며, 효소에서는 기질의 결합과 생성물의 방출에 영향을 미친다.

- [128] 상기 글루코오스 탈수소효소는 상기 펩타이드가 발현되도록 합성된 것이다. 상기 펩타이드는 상기 α 단위 또는 γ 단위 중 어느 하나에 발현된다. 상기 펩타이드는 상기 탈수소효소 유전자 중 α 단위 또는 γ 단위의 N-말단 또는 C-말단에 삽입되어 발현된다. 이때, 상기 α 단위 또는 γ 단위, 상기 단위 중 N-말단 또는 C-말단의 선택에 따라 펩타이드가 금속에 고정될 때 상기 글루코오스 탈수소효소와 금속간의 거리를 제어할 수 있는 것이다.
- [129] 상기 글루코오스 탈수소효소에 상기 펩타이드가 발현되고, 상기 펩타이드가 상기 전극에 고정되면, 글루코오스 탈수소효소는 전극으로 직접 전자를 전달할 수 있다.
- [130] 효소가 전극으로 전자를 전달하는 방식은 MET(Mediated electron transfer)와 DET(Direct electron transfer)로 나눌 수 있는데, MET에서는 중간 매개체로 인하여 전자 포텐셜이 낮아지는 문제가 발생한다. 효율적인 전자 전달을 위해서는 전자 전달 거리가 매우 중요한데, MET에서는 중간 매개체로 인하여 전자 전달 거리가 멀어지기 때문에 발생하는 문제이다. 본 발명에서는 글루코오스 탈수소효소에 발현된 펩타이드를 직접 전극에 고정시키므로 글루코오스 탈수소효소가 전극에 매우 가깝게 고정될 수 있고, 따라서 DET가 가능해지며, 전자 포텐셜을 높게 유지할 수 있다. 전자 전달 거리에 따른 전자 전달 효율은 하기 식 (1)에 의해 정해질 수 있다.

$$K_{et} = 10^{13} e^{-0.91(d-3)} e^{\left[\frac{-(\Delta G + \lambda)}{4RT\lambda} \right]} \quad (1)$$

- [132] (상기 식 (1)에서 K_{et} 는 전자 전달을 상수, d는 실제 전자 전달 거리, G는 자유에너지, λ 는 재구성 에너지이다.)

- [133] 따라서, 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극은 금속 고정화 펩타이드를 통해 효소의 활성자리와 전극을 가깝게 고정함으로써, 전자 전달 효율을 향상시킬 수 있다.

[134]

[135] **실험예 1**

- [136] 125um 실리콘/알루미늄 켄틸레버, 공진 주파수 200 내지 400kHz, 공칭 힘 상수 42N/m, 최대 스캔속도 0.2Hz 조건에서 상기 제조예 2 및 비교예 1에서 제조된 전극의 표면을 AFM 분석하여 도 5에 나타내었다.

[137]

- [138] 도 5는 본 발명에 따른 제조예와 비교예의 AFM 측정 그래프이다.

- [139] 도 5의 a는 상기 제조예 2에 의해 제조된 효소 연료전지용 전극의 AFM측정 그래프이고, b는 도 5의 a에서 붉은 상자 안 부분의 AFM 그래프 및 붉은 선으로 나타난 선상의 전극 높이 편차를 나타낸 그래프이고, c는 상기 비교예 1에 의해 제조된 효소 연료전지용 전극의 AFM측정 그래프이고, d는 도 5의 c에서 붉은 상자 안 부분의 AFM 그래프 및 붉은 선으로 나타난 선상의 전극 높이 편차를 나타낸 그래프이다.
- [140] 도 5를 참조하면, 비교예 1에 비하여 제조예 2의 표면 높이 편차가 더 적은 것을 알 수 있다. 이는 제조예 2는 금속 고정화 펩타이드인 GBP가 발생되어 FAD-GDH가 전극 표면에 묻치지 않고 더 고르게 고정되어 있어 높이 편차가 적은 반면에, 비교예 1은 GBP가 발생되지 않아 FAD-GDH가 전극 표면에 고르게 분포하지 않고, 따라서 측면 거리에 따라 높이 편차가 큰 것으로 판단된다.
- [141]
- [142] **실험예 2**
- [143] 상기 제조예 2 및 비교예 1에서 제조된 전극을 각각 활성전극으로 하고, Pt 와이어를 상대전극, Ag/AgCl을 참조전극으로 하는 3전극계 시스템을 각각 구성하여, 100mM 글루코오스를 포함하는 버퍼에서 순환 전압-전류를 측정하여 도 6에 나타내었다.
- [144]
- [145] 도 6은 본 발명의 따른 제조예와 비교예의 순환 전압-전류 그래프이다.
- [146] 도 6을 참조하면, 비교예 1에 비하여 제조예 2의 전류값이 훨씬 큰 것을 알 수 있다. 이는 GBP 발현으로 FAD-GDH의 활성자리와 전극 표면간의 거리가 줄어들어 FAD-GDH가 직접 전자를 전달할 수 있고, 이로 인하여 전극 효율이 향상되기 때문이다.
- [147]
- [148] **실험예 3**
- [149] 상기 제조예 2에서 제조된 전극을 활성전극, Pt 와이어를 상대전극, Ag/AgCl을 참조전극으로 하는 3전극계 시스템을 구성하고, 100mM 글루코오스를 포함하는 버퍼에서 스캔 속도를 1mV/s, 20 mV/s, 40 mV/s, 60 mV/s, 80 mV/s, 100 mV/s로 변화시켜가면서 순환 전압-전류를 측정하여 도 7에 나타내었다.
- [150]
- [151] 도 7은 본 발명의 따른 제조예의 스캔 속도에 따른 순환 전압-전류 그래프이다.
- [152] 도 7을 참조하면, 스캔 속도가 증가할수록 제조예 2의 전류값이 증가하는 것을 볼 수 있다. 이는 스캔 속도가 증가할수록 FAD-GDH에서 전극으로의 직접 전자 전달이 증가하는 것을 보여준다.
- [153]
- [154] 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극은 효소의 활성자리와 전극 사이의 거리를 줄임으로써, 상기 활성자리에서 생성된 전자를 효과적으로 전극에 전달하여 효소 연료전지의 효율을 향상시킬 수 있다.

- [155] 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극은 금속에 특이적으로 고정되는 금속 고정화 펩타이드를 효소 고정수단으로 이용함으로써, 효소를 금속전극에만 선택적으로 고정할 수 있다.
- [156] 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극은 금속에 특이적으로 고정되는 금속 고정화 펩타이드를 효소 고정수단으로 이용함으로써, 효소 전극을 패터닝할 수 있다.
- [157] 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극은 효소에 발현된 금속 고정화 펩타이드를 효소 고정수단으로 이용함으로써, 상기 효소가 전극의 어느 한 부분에 묻치는 일 없이 고르게 고정할 수 있다.
- [158]
- [159] 이하, 본 발명의 다른 실시예에 따른 효소 연료전지에 대하여 설명한다.
- [160] 이때, 상기 효소 연료전지는 상기 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지용 전극을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [161] 이때, 상기 효소 연료전지는 애노드 전극, 상기 애노드 전극 상에 위치하는 전해질층 및 상기 전해질층 상에 위치하는 캐소드 전극을 포함할 수 있다.
- [162] 이때, 상기 효소 연료전지용 전극은 상기 애노드 전극 또는 상기 캐소드 전극으로 이용될 수 있다.
- [163]
- [164] 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지는 효소의 활성자리와 전극 사이의 거리를 줄임으로써, 상기 활성자리에서 생성된 전자를 효과적으로 전극에 전달하여 효소 연료전지의 효율을 향상시킬 수 있다.
- [165] 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지는 금속에 특이적으로 고정되는 금속 고정화 펩타이드를 효소 고정수단으로 이용함으로써, 효소를 금속전극에만 선택적으로 고정하여 패터닝 전극을 가질 수 있다.
- [166] 본 발명의 일실시예에 따른 효소 연료전지는 효소에 발현된 금속 고정화 펩타이드를 효소 고정수단으로 이용함으로써, 상기 효소가 전극의 어느 한 부분에 묻치는 일 없이 고르게 고정되어 전지의 효율을 향상시킬 수 있다.
- [167]
- [168] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [169] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[170]

[171] <부호의 설명>

[172] 110 : 기재

[173] 120 : 전극

[174] 130 : 금속 고정화 펩타이드

[175] 140 : 효소

[176] 141 : 효소의 α 단위

[177] 142 : 효소의 γ 단위

[178] 143 : 효소의 보조인자

[179] 150 : 효소 패턴

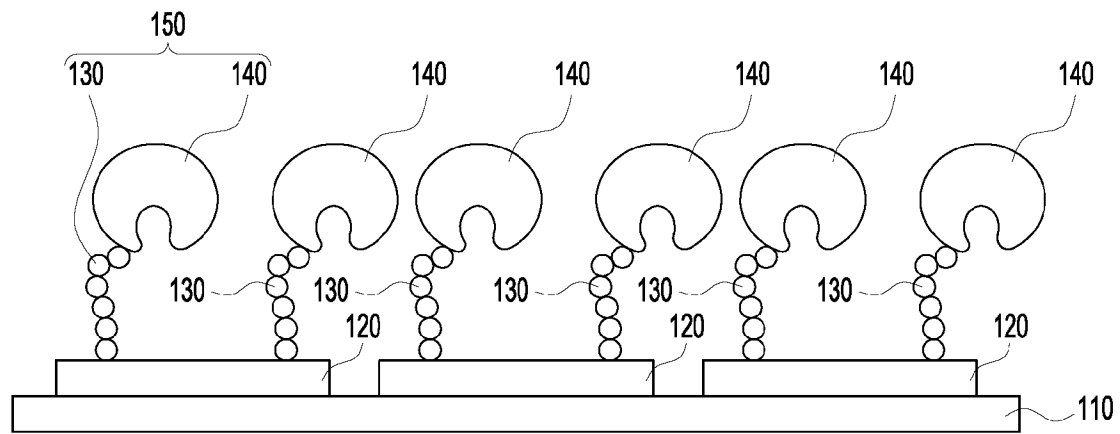
청구범위

- [청구항 1] 기재;
 상기 기재 상에 위치하는 전극; 및
 상기 전극 상에 위치하는 금속 고정화 펩타이드가 발현된 효소를
 포함하는 효소패턴을 포함하고,
 상기 효소에 발현된 금속 고정화 펩타이드가 상기 전극에 고정된 것을
 특징으로 하는 효소 연료전지용 전극.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 효소 연료전지용 전극은 상기 효소의 전자전달 활성자리와 상기
 전극 표면의 거리가 2nm 이하인 것을 특징으로 하는 효소 연료전지용
 전극.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
 상기 기재는 실리콘 웨이퍼, 전도성 고분자, 탄소 천, 탄소 종이 또는
 그래핀을 포함하는 것을 특징으로 하는 효소 연료전지용 전극.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
 상기 전극은 실리카, Cu, Zn, Fe, Ni, Co, Mn, Au 또는 Ag를 포함하는 것을
 특징으로 하는 효소 연료전지용 전극.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
 상기 효소는 활성자리가 위치하는 α 단위 및 상기 α 단위와 연결된 γ 단위를
 포함하고,
 상기 펩타이드는 상기 α 단위 또는 γ 단위 중 어느 하나에 발현되는 것을
 특징으로 하는 효소 연료전지용 전극.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
 상기 펩타이드는 상기 전극과 특이적으로 결합하며, 나선형 구조를
 가지는 것을 특징으로 하는 효소 연료전지용 전극.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
 상기 펩타이드는 아미노산 12개 내지 60개로 구성되는 것을 특징으로
 하는 효소 연료전지용 전극.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 서열번호 10 중 어느 하나 이상의
 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 효소 연료전지용 전극.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
 상기 효소는 글루코오스 탈수소효소, 글루코오스 산화효소, 알칼리성
 인산가수 분해효소 또는 일산화탄소 탈수소효소를 포함하는 것을
 특징으로 하는 효소 연료전지용 전극.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
 상기 효소는 보조인자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 효소

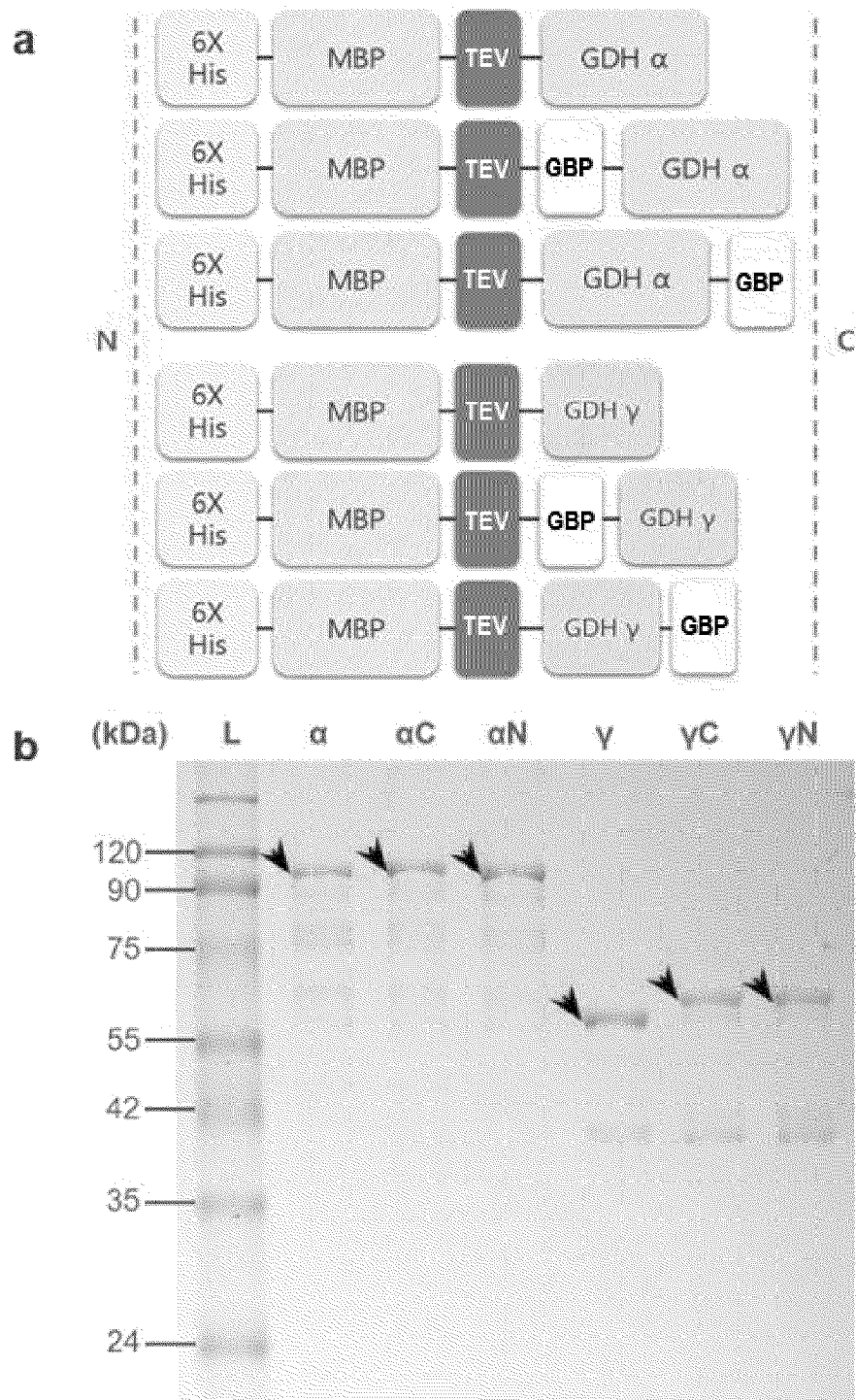
연료전지용 전극.

[청구항 11] 제1항에 따른 전극을 포함하는 것을 특징으로 하는 효소 연료전지.

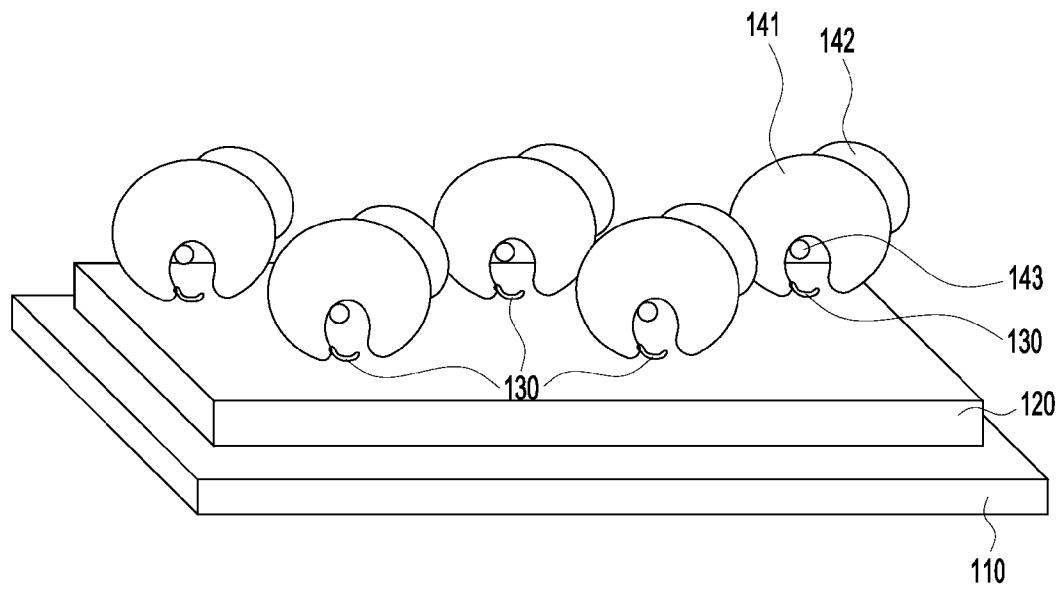
[도 1]



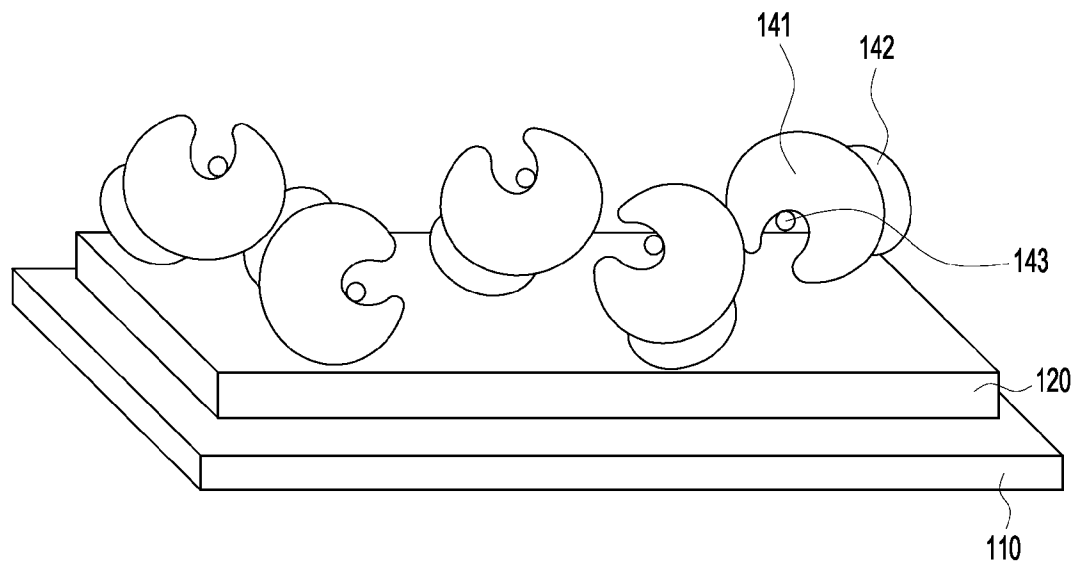
[도2]



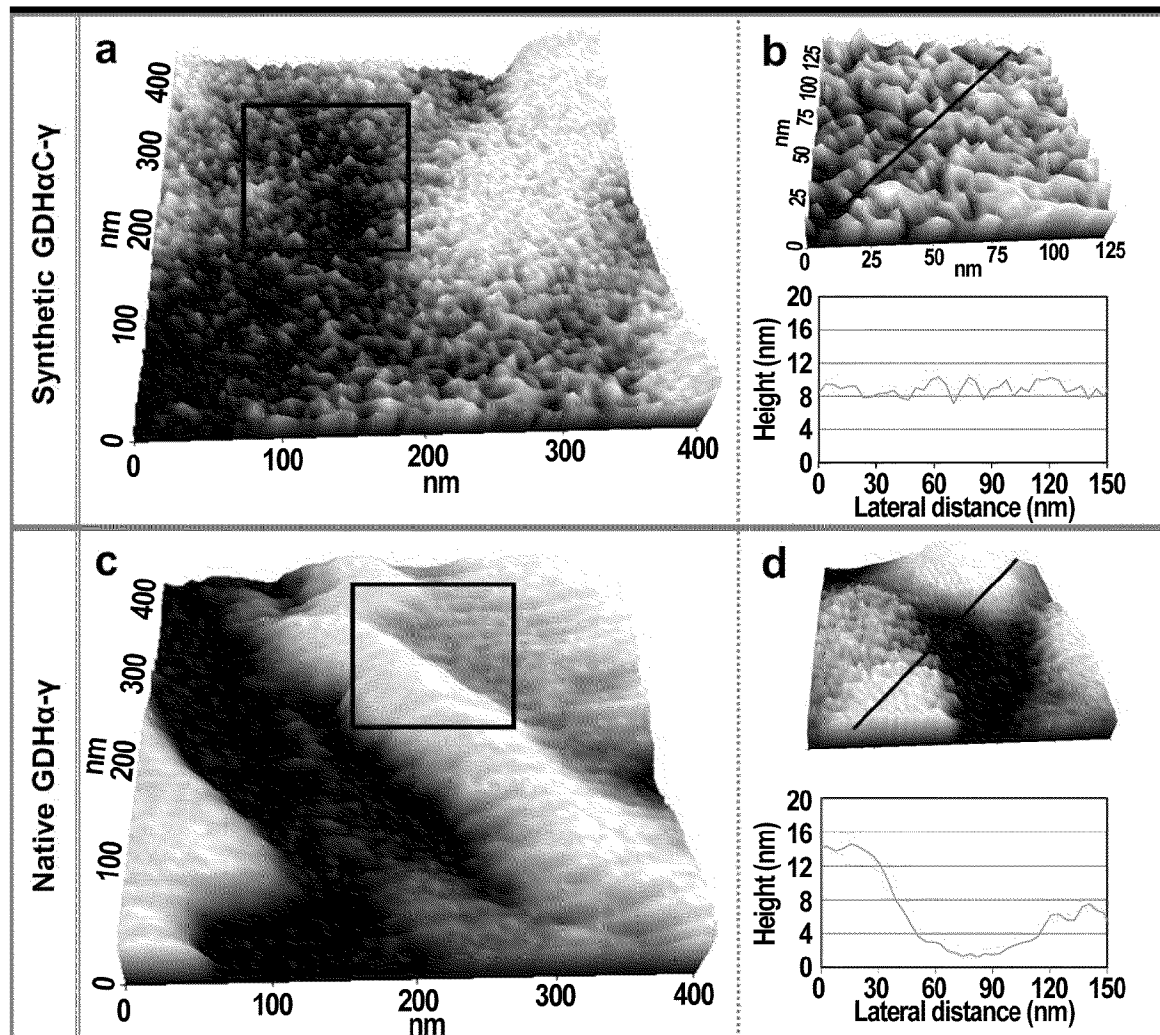
[도3]



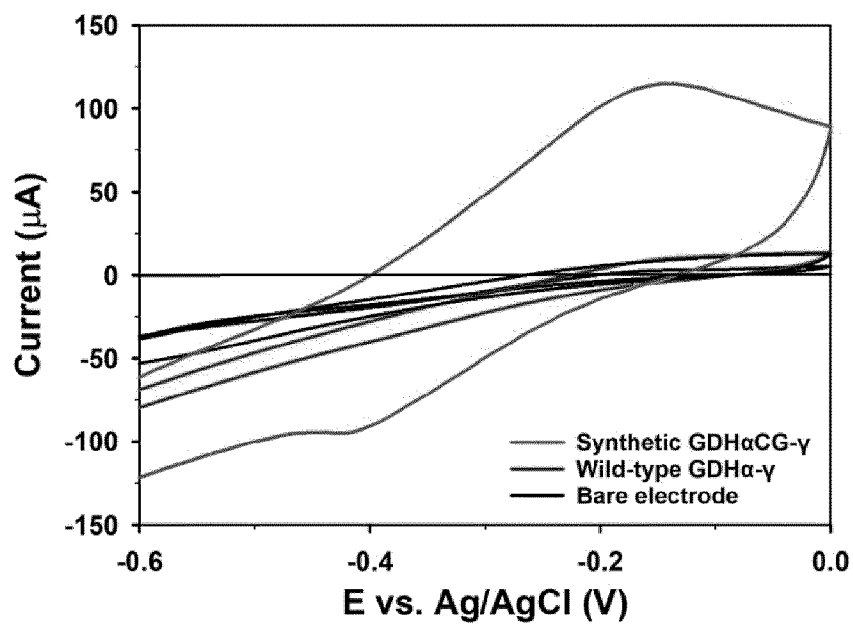
[도4]



[도5]



[도6]



[도7]

