



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0073676
(43) 공개일자 2022년06월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 45/85 (2006.01) B01J 31/00 (2006.01)
C01B 32/168 (2017.01) C07C 49/17 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 45/85 (2013.01)
B01J 31/003 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0163924
(22) 출원일자 2021년11월25일
심사청구일자 2021년11월25일
(30) 우선권주장
1020200159489 2020년11월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인
건국대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
(72) 발명자
이정결
서울특별시 광진구 능동로 50, A동 2401호 (자양동, 이튼타워리버2차)
강윤찬
서울특별시 강남구 도곡로 306 래미안그레이트 104동 802호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

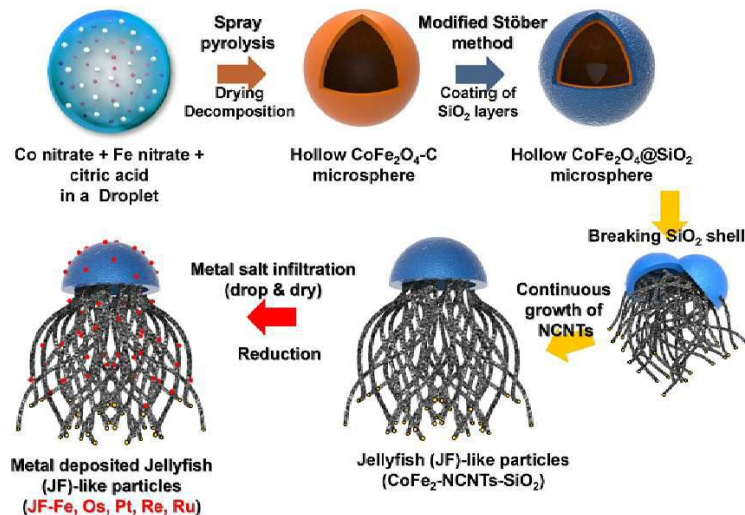
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 N 도핑 탄소나노튜브 기반 캐스케이드 바이오 촉매를 포함하는 바이오 전극 및 이를 이용한 효소 바이오 연료전지

(57) 요약

본 발명은 새로운 3 차원 해파리(JF) 형태의 나노 복합체, 상기 나노 복합체를 포함하는 바이오 전극 및 이를 이용한 효소 바이오 연료전지에 관한 것으로, 복수의 N 도핑 탄소나노튜브(NCNT)를 포함하여, 효소가 접합될 수 있는 풍부한 부위를 제공하고, 금속 나노 입자를 증착 함으로써, 효소의 고정화를 향상시키고, 국소 미세 환경의 전자 전도성을 향상시켜 전력 생산 및/또는 카르보라이제이션(carboligation)에 사용되는 생체 촉매로 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

C01B 32/168 (2017.08)

C07C 49/17 (2013.01)

C12N 9/0006 (2013.01)

C12Y 101/01001 (2013.01)

(72) 발명자

사나트콘다비티

서울특별시 광진구 능동로 120(화양동) 건국대학교
414호

박기대

충청북도 청주시 서원구 두꺼비로 109, 101동 902
호 (산남동, 유송한내들아파트)

램사미 샤면무검

서울특별시 광진구 능동로 120(화양동) 건국대학교
공과대학 A동 502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1711133035

과제번호

2021R1A2B5B03002728

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명

바이오가스로부터 고부가케미칼 생산을 위한 미생물-나노복합체 융합기술 개발

기 여 율

1/2

과제수행기관명

건국대학교

연구기간

2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1711133916

과제번호

2020R1A4A2002854

부처명

과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명

한국연구재단

연구사업명

집단연구지원(R&D)

연구과제명

BT/NT/IT/ET 융합 기반 탄소 전환 연구실

기 여 율

1/2

과제수행기관명

건국대학교

연구기간

2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

SiO₂ 셸, 상기 SiO₂ 셸 일면과 말단이 접촉되어 상기 SiO₂ 일면에 수직하는 방향을 따라 위치하는 복수의 N 도핑 탄소나노튜브(NCNT) 및 CoFe₂ 입자를 포함하고,

3 차원 해파리(Jelly Fish, JF) 형태인 것을 특징으로 하는, 나노 복합체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

금속이 증착된 것을 특징으로 하는, 나노 복합체.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 금속은 Mg, Fe, Ru, Re, Pt 및 Os로부터 선택되는 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 나노 복합체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

5 nm 내지 100 nm 크기의 복수의 기공을 포함하는 것을 특징으로 하는, 나노 복합체.

청구항 5

Co 전구체, Fe 전구체 및 산성 용매를 포함하는 전구체 용액을 준비하는 단계(단계 1);

상기 전구체 용액을 스프레이 열 분해하여, Co 및 Fe를 포함하는 합금 마이크로스피어를 형성하는 단계(단계 2);

상기 합금 마이크로스피어 표면에 SiO₂를 증착하여, SiO₂ 코팅 마이크로스피어를 제조하는 단계(단계 3); 및

상기 SiO₂ 코팅 마이크로스피어를 고온에서 디시안디아미드(Dicyandiamide, DCDA)로 처리하여, 상기 SiO₂ 셸 내부에서 N 도핑 탄소나노튜브(NCNT)를 성장시키는 단계(단계 4);를 포함하고,

상기 단계 4는 성장하는 NCNT에 의해 SiO₂ 셸이 물리적으로 파열될 때까지 수행하는 것을 특징으로 하는,

나노 복합체의 제조방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

금속으로 증착하는 단계(단계 5)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 나노 복합체의 제조방법.

청구항 7

제 1 항의 나노 복합체;

효소 고정제;

상기 나노 복합체에 고정된 효소; 및

탄소지지체;

를 포함하는 바이오 전극.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 효소 고정제는 글루타르알데하이드(Glutaraldehyde), 3-아미노프로필트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES), 카르보디이미드(carbodiimide) 및 폴리에틸렌이민(Polyethyleneimine, PEI)으로부터 선택되는 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 바이오 전극.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 효소는 EtDH(ethanol dehydrogenase) 및 FLS(formolase)로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 바이오 전극.

청구항 10

제 7 항에 있어서,

상기 탄소지지체는, 카본블랙(carbon black), 활성화 탄소, 벌크 탄소, 활성화 탄소, 탄소 페이퍼(carbon paper) 및 탄소 천(carbon cloth, CC)로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 바이오 전극.

청구항 11

제 7 항의 바이오 전극을 포함하는 효소 바이오 연료전지(Enzymatic biofuel cells, EBFC).

청구항 12

제 11 항에 있어서,

에탄올(EtOH)을 기질로 이용하는 것을 특징으로 하는, 효소 바이오 연료전지.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

EtDH 및 FLS가 순차로 고정화된 바이오 전극을 이용한 것을 특징으로 하는 효소 바이오 연료전지.

청구항 14

제 11 항에 있어서,

전력을 생산하는 동시에 아세트인을 합성하는 것을 특징으로 하는 효소 바이오 연료전지.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 새로운 3 차원 해파리(JF) 형태의 나노 복합체, 상기 나노 복합체를 포함하는 바이오 전극 및 이를 이용한 효소 바이오 연료전지에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 연료전지(fuel cell, FC)는 화학 에너지를 전기 에너지로 변환하는 능력을 보유한 전기 에너지 생성 시스템이다. 최근에는, 상기 FC의 한 종류인 바이오 연료전지(bio fuelcell, BFC)가 생체 전기전자 또는 효소를 주요 촉진자로 하는 고정화 전극을 통해 소형 장치에 전원을 공급하는 에너지 생성 기술로 큰 주목을 받고 있다. 상기 BFC는 기질인 유기물이 애노드(anode)에서 산화되는 동시에 캐소드(cathode)에서 전자 수용체(예를 들면, 공기 중의 O_2 등)가 환원되는 기존의 연료 전지 시스템과 유사한 메커니즘으로 작동한다.

[0003] 효소(enzyme)를 애노드의 생물학적 촉매로 사용하는 BFC를 효소 바이오 연료전지(Enzymatic biofuel cells, EBFC)라고 하며, 이는 알콜, 당 및 지방산과 같은 풍부한 유기물을 광범위하게 활용할 수 있고, 주변 환경과 신체 pH에 근접한 EBFC의 작동은 수많은 유기물의 생체 전기 촉매 작용을 추구함으로써 고려되고 있다.

[0004] 효소가 다기능 생체 촉매임에도 불구하고, 효소와 전극 사이의 효과적인 전기 연결을 설정하는 것은 간단한 문제가 아니며, 여러 연구자들이 연구를 시도하고 있다.

[0005] 이와 관련한 방법 중 하나는, 효소와 전도성 지지체 사이에 도입되어 전극과 효소 사이의 전기 통신을 향상시킴으로써 전력 출력을 향상시킬 수 있는 산화환원 매개체를 이용하는 것인데, EBFC의 운전에 있어, NADH와 같은 산화환원 매개체 및 보조 인자는 불안정성, 높은 비용 및 낮은 개방 회로 전압(OCV)의 문제점이 있다.

[0006] 이에, 전력 출력을 증가시키기 위해 성능이 향상된 직접 전자 전달(Direct Electron Transfer, DET) 기반 EBFC(DET-EBFC)의 개발에 대한 연구 노력이 이루어지고 있고, 또한, 효소와의 전기적 상호작용을 위해, 표면적이 향상된 전도성 물질, 예를 들면, 탄소나노튜브(CNT), 그래핀 및 메조포러스 탄소 등이 권장되고 있다.

[0007] 그러나, 종래 전도성 지지체 및 효소를 흡착 공정을 이용하는 방법은 계면 거리의 제어가 불가능하고 결합이 약하여 원하는 전기화학 반응에 효소를 적절하게 활용하지 못하는 등 여러 가지 단점이 있다.

[0008] 에탄올(EtOH)은 높은 에너지 밀도 및 재생 가능한 자원으로부터의 생산 가능성과 같은 유리한 특성으로, EBFC의 효소와 함께 양극에서 일반적으로 기질로 사용되고 있다. 이러한 특성은 에탄올을 연료전지와 같은 에너지 변환 장치에 이용되기 적합한 후보로 만든다. 더욱이 에탄올 생산량 증가에 따른 가격의 하락은 종래 상기 에탄올을 연료 첨가제로 이용하는 자동차 산업에서의 활용에서 최근, 에너지 생산 또는 부가가치 제품 형성으로의 활용으로 초점이 이동되고 있다. 그러나, 현재 연료전지 또는 효소 바이오 연료전지에서 에탄올의 탈수소화는 불완전하고 추가 처리가 필요한 CO_2 와 같은 덜 가치 있는 최종 생성물의 생성으로 제한되고 있다.

[0009] 따라서, 에탄올(EtOH)로부터 아세트인을 수득하는 것과 같은 효소적 카르보라이게이션(carboligation)은 최소한의 에너지로 더 높은 가치의 제품을 생산하는 유망한 접근 방식이 필요하고, 상기 아세트인(C_4)은 세계 무역 데이터에 따라 에탄올에 비해 12.5 배 내지 31.5 배 가치가 더 높으며, 식품 산업 및 화학 합성의 전구체에 대한 수요에 따라, 합성 및 활용의 잠재적 후보로 간주되고 있다.

[0010] 한편, 종래 에탄올로부터 아세트인의 합성방법은 화학합성법에 의해 주로 생산되고 있고, 생물학적 방법의 경우 고가의 포도당을 사용한 발효공정에 의존하여 가격 경쟁력이 떨어지고, 효소 반응을 이용한 아세트인의 전환은 안정성이 매우 낮은 문제점이 있었다.

[0011] 본 발명자들은, 다단계 효소를 고정화 시킬 수 있는 나노 복합체를 포함하는 바이오 전극을 개발하고, 상기 바이오 전극을 전력 생산 및 카르보라이게이션(carboligation)이 동시에 일어날 수 있는 새로운 유형의 EBFC의 애노드로 이용함으로써, 향상된 전기화학적 특성 및 안정적인 아세트인 생성 효과를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 10-1740098호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 SiO_2 셸, 상기 SiO_2 셸 일면과 말단이 접촉되어 상기 SiO_2 일면에 수직하는 방향을 따라 위치하는 복수의 N 도핑 탄소나노튜브(NCNT) 및 CoFe_2 입자를 포함하고, 3 차원 해파리(Jelly Fish, JF) 형태인 것을 특징으로 하는 나노 복합체를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 Co 전구체, Fe 전구체 및 산성 용매를 포함하는 전구체 용액을 준비하는 단계(단계 1); 상기 전구체 용액을 스프레이 열 분해하여, Co 및 Fe를 포함하는 합금 마이크로스피어(microsphere)를 형성하는 단계(단계 2); 상기 합금 마이크로스피어 표면에 SiO_2 를 증착하여, SiO_2 코팅 마이크로스피어를 제조하는 단계(단계 3); 및 상기 SiO_2 코팅 마이크로스피어를 고온에서 디시안디아미드(Dicyandiamide, DCDA)로 처리하여, 상기 SiO_2 셸 내부에서 N 도핑 탄소나노튜브(NCNT)를 성장시키는 단계(단계 4);를 포함하고, 상기 단계 4는 성장하는 NCNT에 의해 SiO_2 셸이 물리적으로 파열될 때까지 수행하는 것을 특징으로 하는, 나노 복합체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 나노 복합체; 효소 고정제; 상기 나노 복합체에 고정된 효소; 및 탄소지지체;를 포함하는 바이오 전극을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오 전극을 포함하는 효소 바이오 연료전지를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0018] 본 발명은 SiO_2 셸, 상기 SiO_2 셸 일면과 말단이 접촉되어 상기 SiO_2 일면에 수직하는 방향을 따라 위치하는 복수의 N 도핑 탄소나노튜브(NCNT) 및 CoFe_2 입자를 포함하고, 3 차원 해파리(Jelly Fish, JF) 형태인 것을 특징으로 하는 나노 복합체를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 Co 전구체, Fe 전구체 및 산성 용매를 포함하는 전구체 용액을 준비하는 단계(단계 1); 상기 전구체 용액을 스프레이 열 분해하여, Co 및 Fe를 포함하는 합금 마이크로스피어(microsphere)를 형성하는 단계(단계 2); 상기 합금 마이크로스피어 표면에 SiO_2 를 증착하여, SiO_2 코팅 마이크로스피어를 제조하는 단계(단계 3); 및 상기 SiO_2 코팅 마이크로스피어를 고온에서 디시안디아미드(Dicyandiamide, DCDA)로 처리하여, 상기 SiO_2 셸 내부에서 N 도핑 탄소나노튜브(NCNT)를 성장시키는 단계(단계 4);를 포함하고, 상기 단계 4는 성장하는 NCNT에 의해 SiO_2 셸이 물리적으로 파열될 때까지 수행하는 것을 특징으로 하는, 나노 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 나노 복합체; 효소 고정제; 상기 나노 복합체에 고정된 효소; 및 탄소지지체;를 포함하는 바이오 전극을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 바이오 전극을 포함하는 효소 바이오 연료전지를 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 3 차원 해파리(JF) 형태의 나노 복합체는, 복수의 N 도핑 탄소나노튜브(NCNT)를 포함하여, 효소가 집합될 수 있는 풍부한 부위를 제공하고, 금속 나노 입자를 증착 함으로써, 효소의 고정화를 향상시키고, 국소 미세 환경의 전자 전도성을 향상시켜 전력 생산 및/또는 카르보라이제이션(carboligation)에 사용되는 생체 촉매

로 이용될 수 있다.

[0023] 또한, 상기 나노 복합체를 포함하는 바이오 전극은 상기 나노 복합체의 전자 전도성 향상을 통해 바이오 전극과 전해질 사이의 계면 전극 저항을 감소시키고, 효소의 향상된 고정화를 통하여, 이를 애노드로 사용하는 EBFC 구동 시, DET 및 전력 생산을 향상시킬 수 있다.

[0024] 또한, 상기 나노 복합체에 EtDH 및 FLS를 고정시키고, 이를 EBFC의 애노드로 이용함으로써, 에탄올을 기질로 이용하는 EBFC 구동으로, NADH와 같은 추가적인 보조 인자의 요구 없이 향상된 전력 생산과 동시에 높은 안정성으로 아세트인을 합성할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 일 실시예의 해파리(Jelly Fish, JF) 형태의 나노 복합체 ($\text{SiO}_2\text{-NCNTs-CoFe}_2$, JF)의 제조방법의 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예의 바이오 전극의 제조 방법의 모식도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예의 합금 마이크로 스피어($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-C}$) 및 SiO_2 코팅 마이크로 스피어($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$)의 SEM 이미지이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예의 금속 증착 JF(JF-금속)의 TEM 이미지 및 매핑 이미지이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예의 금속 증착 JF(JF-금속)의 질소(N_2) 흡탈착 그래프(a) 및 BJH 기공 크기 분포를 나타낸 그래프(b)이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예의 JF-금속이 부착된 GCE 전극의 전기 화학적 프로파일이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예의 바이오 전극의 FT-IR 스펙트럼 분석 결과(a) 및 TGA 분석 결과(b)이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예의 바이오 전극의 XPS 분석 결과이다.

도 9 및 도 10은 본 발명의 일 실시예의 바이오 전극 및 탄소 천(CC)의 SEM 이미지 및 EDX 분석 결과이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예의 바이오 전극의 CV 및 EIS 분석 결과이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예의 바이오 전극의 반복 세척실험의 모식도(a) 및 UV-vis 분광 분석 결과(b) 그래프이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예의 바이오 전극의 전류 밀도 측정 결과 그래프(a), PEI 분자량에 따른 전류밀도 측정 결과(b), EtDH 고정화 시간에 따른 전류 밀도 측정 결과(c) 및 pH(d), 이온강도(e), 온도(f)에 따른 성능 측정 결과이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예의 EBFC 구동 시 산화환원 반응의 전자 전달 경로 모식도(a), CV 스캔 결과 그래프(b), 전력 밀도 프로파일(c) 및 턴오버 조건에서 바이오 전극 유형별 전력밀도 요약 결과(d)이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예의 바이오 전극의 전력 밀도(a), 안정성(b), 시간 전류 측정(c) 및 아세트알데히드 생산(d) 측면에서 바이오 전극 종류에 따른 전기화학적 반응 조사 결과이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예의 EBFC 애노드의 모식도(a), 아세트인 생성 시간 프로파일(b), 턴 오버 조건에서 바이오 전극 유형별 아세트인 생성 요약(c) 및 EBFC 작동 후, 잔류 기질 및 생성물의 프로파일(d)이다.

도 17 및 도 18은 본 발명의 일 실시예의 순차 고정화 및 동시 고정화 바이오 전극을 이용한 EBFC의 아세트인 생성 및 효소 고정화 정도를 확인한 실험 결과이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예의 순차 고정화 및 동시 고정화 바이오 전극을 이용한 EBFC의 애노드 용액의 기질 및 생성물의 프로파일이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 하기의 정의를 가지며 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미에 부합된다. 또한, 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기

재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

- [0027] 용어 "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.
- [0028] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 구성 요소, 또는 단계 또는 구성요소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 구성요소, 또는 단계 또는 구성요소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.
- [0030] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0032] 본 발명의 일 양태는 SiO₂ 셸, 상기 SiO₂ 셸 일면과 말단이 접촉되어 상기 SiO₂ 일면에 수직하는 방향을 따라 위치하는 복수의 N 도핑 탄소나노튜브(NCNT) 및 CoFe₂ 입자를 포함하고, 3 차원 해파리(Jelly Fish, JF) 형태인 것을 특징으로 하는, 나노 복합체를 제공한다.
- [0033] 종래 아세트인은 화학합성법에 의해 주로 생산되고 있고, 생물학적 방법의 경우 고가의 포도당을 사용한 발효 공정에 의존하였다. 상기 종래 아세트인 합성 방법은 가격 경쟁력이 떨어지고, 효소 반응을 이용한 아세트인의 전환은 안정성이 매우 낮은 문제점이 있었다.
- [0034] 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위해 도출된 것으로, 다중 촉매 캐스케이드 반응을 통하여 높은 안정성을 가지고 아세트인을 생합성할 수 있는 새로운 구조의 NCNT 기반 나노 복합체를 제공하는 것을 일 목적으로 하고, 본 발명의 나노 복합체가 포함하는 NCNT 사이에 형성되는 다수의 기공은 효소가 집합될 수 있는 풍부한 부위를 제공할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 나노 복합체는 본 발명의 다른 양태에서 제공하는 나노 복합체의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.
- [0036] 도 1은 본 발명의 나노 복합체의 제조방법의 모식도이다.
- [0037] 도 1을 참조하면, 본 발명의 나노 복합체의 제조방법은 Co 전구체, Fe 전구체 및 산성 용매를 포함하는 전구체 용액을 준비하는 단계(단계 1); 상기 전구체 용액을 스프레이 열 분해하여, Co 및 Fe를 포함하는 합금 마이크로스피어(microsphere)를 형성하는 단계(단계 2); 상기 합금 마이크로스피어 표면에 SiO₂를 증착하여, SiO₂ 코팅 마이크로스피어를 제조하는 단계(단계 3); 및 상기 SiO₂ 코팅 마이크로스피어를 고온에서 디시아나디아미드(Dicyandiamide, DCDA)로 처리하여, 상기 SiO₂ 셸 내부에서 N 도핑 탄소나노튜브(NCNT)를 성장시키는 단계(단계 4);를 포함하고, 상기 단계 4는 성장하는 NCNT에 의해 SiO₂ 셸이 물리적으로 파열될 때까지 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 단계 1 및 단계 2는 스프레이 열분해 공정을 통하여 수행될 수 있다.
- [0039] 구체적으로, Co 전구체, Fe 전구체 및 산성 용매, 예를 들면, 시트르산을 포함하는 전구체 용액의 액적을 약 600 °C 내지 800 °C, 예를 들면, 650 °C 내지 750 °C의 온도의 고온로를 불활성 기체를 캐리어 가스로 이용하여 통과시키면서, 건조 및 분해하여, NCNT 성장을 위한 템플릿으로 이용되는 합금 마이크로스피어를 제조할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 단계 3은 상기 단계 2에서 제조되는 합금 마이크로스피어 표면에 20 nm 내지 100 nm, 예를 들면, 20 nm 내지 60 nm, 예를 들면, 30 nm 내지 50 nm의 두께로 SiO₂ 증착시켜 SiO₂ 셸로 둘러 쌓인 합금 마이크로스피어를 제조할 수 있게 된다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 단계 3에서 제조되는 SiO₂ 코팅 마이크로스피어의 상기 SiO₂ 셸은 후속하는 단계 4에서, NCNT가 성장하는 기관 역할을 할 수 있고, 상기 SiO₂ 내부의 Co 및 Fe 원자를 포함하는 합금 마이크로스피어는 NCNT의 성장을 위한 시드(Seed) 역할을 할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 단계 4는 NCNT를 성장시키는 단계로, 상기 4 단계는 상기 NCNT의 성장으로

인해, SiO₂ 셸이 물리적으로 파열될 때까지 수행될 수 있다.

- [0043] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 단계 4에서, DCDA를 처리하는 공정을 통하여, CoFe₂ 나노 입자는 상기 DCDA의 분해를 통해 형성되는 질화탄소 가스를 사용하여 NCNT의 성장을 위한 시드(Seed)역할을 하게 되고, 상기 DCDA의 분해에서 파생되는 질화탄소 가스의 지속적인 공급은 NCNT의 활발하고 지속적인 성장을 유도하여 구 형태의 SiO₂ 셸을 물리적으로 파열시킬 수 있게 된다.
- [0044] 상기 4 단계의 NCNT 성장으로 인한 SiO₂ 셸의 파열로, 상기 SiO₂ 셸 내부에 위치하는 NCNT가 외부로 노출될 수 있고, SiO₂ 셸 중심 방향의 NCNT 성장 방향이 외부로 노출됨으로써, 상기 SiO₂ 셸 내부로부터 외부 방향으로 정렬되어 위치할 수 있게 되어, 해파리(JF) 구조의 머리 부분에 해당하는 SiO₂ 셸, 해파리(JF) 구조의 다리 부분에 해당하는 상기 SiO₂ 셸 내부면과 말단이 접촉되어 성장한 복수의 NCNT 및 상기 NCNT 다른 말단에 위치하게 되는 CoFe₂ 나노 입자를 포함하는 나노 복합체(SiO₂-NCNTs-CoFe₂, JF)를 수득할 수 있게 된다.
- [0045] 본 발명은 또한, 전기적 성능이 향상된 에탄올을 기질로 하는 효소 바이오 연료전지(Enzymatic biofuel cells, EBFC)를 제공하는 것을 일 목적으로 한다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 나노 복합체는 Mg, Fe, Ru, Re, Pt 및 Os로부터 선택되는 1종 이상의 금속, 예를 들면, Os가 증착된 것일 수 있고, 상기 금속이 상기 나노 복합체에 증착됨으로써, 본 발명의 나노 복합체는 전기 전도성이 향상되어, 바이오 전극의 촉매로 이용될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 금속은 졸-겔 법 또는 드롭-건조(drop and dry) 방법을 이용하여 상기 나노 복합체에 증착될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명의 일 양태는 상기 양태의 나노 복합체; 효소 고정제; 상기 나노 복합체에 고정된 효소; 및 탄소지지체를 포함하는 바이오 전극을 제공한다.
- [0049] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 효소 고정제는 글루타르알데히드 (Glutaraldehyde), 3-아미노프로필트리에톡시실란 (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES), 카르보디이미드 (carbodiimide) 및 폴리에틸렌이민 (Polyethyleneimine, PEI)으로부터 선택되는 1종 이상, 예를 들면, 폴리에틸렌이민(PEI)일 수 있고, 상기 탄소 지지체는, 카본블랙(carbon black), 활성화 탄소, 벌크 탄소, 활성화 탄소, 탄소 페이퍼(carbon paper) 및 탄소 천(carbon cloth, CC)로부터 선택된 1종 이상, 예를 들면, 탄소 천(CC)일 수 있다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 효소는 EtDH(ethanol dehydrogenase) 및 FLS(formolase)로부터 선택된 1종 이상, 예를 들면, 상기 EtDH가 단독으로 고정되거나, 상기 EtDH 및 FLS가 동시 또는 순차로 고정되어 바이오 전극으로 이용될 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 용어, "FLS(formolase)"는 3개의 1-카본 포름알데히드(carbon formaldehyde) 분자를 하나의 3-카본 디하이드록시아세톤(dihydroxyacetone) 분자로 carboligation을 촉매하는 효소로서, 본 발명의 목적 상, 상기 FLS는 에탄올의 대사 과정에서 생성되는 아세트알데히드를 기질로 하여 아세트인을 생성하는데 이용될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 FLS는 슈도모나스 플루오레스센스(Pseudomonas fluorescens)로부터 유래되어 발현될 수 있으나, 본 발명의 아세트인 생성을 위한 효소 생산을 위해서라면, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명에서 용어, "EtDH(ethanol dehydrogenase)"는 기질인 에탄올과 탈수소화 반응을 통해 아세트알데히드 생산을 유도할 수 있는 효소로서, 아세트알데히드 생산을 유도하여, 이를 기질로 이용하는 FLS가 아세트인을 생성하도록 할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 EtDH는 쿠프리아비두스 네카터(Cupriavidus necator)로부터 유래되어 발현될 수 있으나, 본 발명의 아세트인 생성을 위한 효소 생산을 위해서라면, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 효소 고정제로 PEI를 이용하는 경우, 상기 PEI를 포함하는 본 발명의 나노 복합체 및 PEI를 혼합하는 혼합용액을 이용하여 EtDH 또는 FLS를 고정화시킬 수 있고, 구체적으로, 상기 PEI의 아민기 및 상기 EtDH 또는 FLS의 카보닐기가 반응하여 C=N 결합을 형성하여 상기 효소가 상기 나노 복합체에 고정될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 PEI는 분지형 PEI일 수 있고, 상기 PEI의 분자량(MW)는 10,000 g/mol 내지

100,000 g/mol, 예를 들면, 20,000 g/mol 내지 80,000 g/mol, 예를 들면, 20,000 g/mol 내지 75,000 g/mol일 수 있다.

[0057] 본 발명의 일 양태는 상기 양태의 바이오 전극을 애노드로 이용하는 효소 바이오 연료전지(Enzymatic biofuel cell, EBFC)를 제공한다.

[0058] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 바이오 전극은 EtDH 및 FLS가 순차적으로 고정되어 형성된 것일 수 있고, 에탄올을 기질로 사용하여 상기 EBFC를 구동하는 경우, 상기 기질인 에탄올은 첫 번째 단계에서 EtDH에 의해 NADH에 의존하지 않고 직접 전자 전달(DET)을 통해 아세트알데히드로 탈수소화될 수 있다. 이때, 상기 EtDH는 전자를 동시에 방출하는 바, 상기 EBFC를 구동함으로써 전력을 생산할 수 있게 된다.

[0059] 또한, 이와 동시에, 상기 EtDH에 의해 생성된 상기 아세트알데히드는 두 번째 단계에서, FLS에 의해 축합 반응을 거쳐 아세트인을 생성할 수 있다.

[0061] 본 발명의 3 차원 해파리(JF) 형태의 나노 복합체는, 복수의 N 도핑 탄소나노튜브(NCNT)를 포함하여, 효소가 접합될 수 있는 풍부한 부위를 제공하고, 금속 나노 입자를 증착 함으로써, 효소의 고정화를 향상시키고, 국소 미세 환경의 전자 전도성을 향상시켜 전력 생산 및/또는 카르보라이게이션(carboligation)에 사용되는 생체 촉매로 이용될 수 있다.

[0062] 또한, 상기 나노 복합체를 포함하는 바이오 연료전지용 전극은 상기 나노 복합체의 전자 전도성 향상을 통해 바이오 전극과 전해질 사이의 계면 전극 저항을 감소시키고, 효소의 향상된 고정화를 통하여, 이를 애노드 전극으로 사용하는 EBFC 구동 시, DET 및 전력 생산을 향상시킬 수 있다.

[0063] 또한, 상기 나노 복합체에 EtDH 및 FLS를 고정시키고, 이를 EBFC의 애노드로 이용함으로써, 에탄올을 기질로 이용하는 EBFC 구동으로, NADH와 같은 추가적인 보조 인자의 요구 없이 향상된 전력 생산과 동시에 높은 안정성으로 아세트인을 합성할 수 있는 효과가 있다.

[0065] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0067] 실시예

[0068] - 준비

[0069] 산소 공급 캐소드를 포함하는 H 형 이중 챔버 EBFC는 붕규산 유리를 사용하여 제작되었으며, 이는 전력 생산과 동시에 에탄올의 카르보라이게이션(carboligation)을 위해 사용되었다.

[0070] EBFC의 애노드 전극용 탄소 천(Carbon Cloth, CC)은 연료전지 판매점(USA)에서 구입하였다.

[0071] 에탄올의 아세트알데히드로의 산화를 위한 효소(EtDH, ethanol dehydrogenase) 및 아세트알데히드의 아세트인로의 카르보라이게이션(carboligation)을 위한 포몰라제(FLS, formolase)는 각각 쿠프리아비두스 네카터(*Cupriavidus necator*) 및 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*)에서 발현되었고, 상기 EtDH 및 FLS는 이전 연구에 따라 복제, 발현 및 정제되었다(L. Zhang et al., 2018).

[0072] 포타슘 헥사시아노철산염(II) 삼수화물($K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$), 다양한 분자량의 분지형 폴리에틸렌이민(PEI) 및 기타 모든 화학물질 및 시약은 분석 등급이며 Sigma-Aldrich에서 조달하였고, 모든 시약은 18 MΩ Millipore DI water를 사용하여 준비하였다.

[0074] 실시예 1. 나노 복합체의 제조

[0075] - 나노 복합체(SiO_2 -NCNTs-CoFe₂, JF)의 제조

- [0076] 도 1은 해파리(Jelly Fish, JF) 형태의 나노 복합체($\text{SiO}_2\text{-NCNTs-CoFe}_2$, JF)의 제조방법의 모식도이다.
- [0077] 6 개의 진동기로 구성된 1.7 MHz 초음파 분무 발생기를 사용하여 분무 열분해 동안 전구체 액적을 생성하였다. 상기 전구체 액적을 석영 반응기(길이: 1,200 mm, 직경: 50 mm)를 통해 라우팅하였고, 캐리어 가스로 질소(N_2)를 사용하고, 10 L/min의 유속, 700 ° C에서 유지되었다. 이때, 상기 전구체 액적을 생성하는 스프레이 용액은 1 L의 증류수에 $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.033 M), $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0.067 M) 및 시트르산(0.4 M)을 용해하여 제조하였다.
- [0078] 상술한 분무 열분해 공정을 수행하여, 평균 직경이 1.4 μm 인 합금 마이크로 스피어($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-C}$) 분말을 수득하였다.
- [0079] 상기 $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-C}$ 을 수정된 Stober 방법(계면활성제-템플릿 어셈블리 코팅방법)을 사용하여 SiO_2 셸이 형성된 SiO_2 코팅 마이크로스피어($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$)로 전환하였다.
- [0080] 구체적으로, $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-C}$ 0.1 g을 140 mL의 증류수/에틸 알코올(각각 80 mL 및 60 mL), 0.075 g의 cetyltrimethylammonium bromide(CTAB) 및 1 mL의 농축된 수용액에 분산시키고, 암모니아(28 wt.%)를 첨가하여 균일한 분산액을 형성하고, 실온에서 10 분간 교반한 후, 테트라에틸 오르토실리케이트(TEOS) 215 μL 를 연속 교반하면서 30 분간 적가 하였다.
- [0081] 반응 6 시간 후, 상술한 반응의 생성물을 여과에 의해 수집하고 에탄올 및 물로 3 회 세척하고 건조한 후, 300 ° C에서 2 시간 동안 공기 중에서 하소하여 CTAB 템플릿 및 탄소가 제거된 생성된 SiO_2 코팅 마이크로스피어($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$)를 생성하였다.
- [0082] 상기 $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 을 아르곤(Ar) 분위기, 800 ° C에서 디시아디아미드(Dicyandiamide, DCDA)로 후 처리하였다. 상기 후 처리 공정에서, N 도핑 CNT(NCNT)가 상기 $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 내부에서 성장하였다.
- [0083] 상기 DCDA를 처리하는 공정에서, 800 ° C의 온도에서 $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 는 CoFe_2 로 환원되고, 과잉 DCDA는 분해되어 질화 탄소 가스를 형성하게 된다. CoFe_2 의 영향으로 NCNT는 성장 기관의 역할을 하는 SiO_2 셸로 인하여 중앙을 향해 균일하게 성장하게 된다. 상기 NCNT의 지속적인 성장은 결국 외부 SiO_2 셸을 파열시키게 되는데, 상기 파열로 인하여, 본 발명의 나노 복합체(JF), 즉, SiO_2 셸, 상기 SiO_2 셸 일면과 말단이 접촉되어 상기 SiO_2 일면에 수직하는 방향을 따라 위치하는 복수의 N 도핑 탄소나노튜브(NCNT) 및 CoFe_2 입자를 포함하는 해파리(JF) 형태의 나노 복합체($\text{SiO}_2\text{-NCNTs-CoFe}_2$, JF)를 수득할 수 있게 된다.
- [0085] - 금속 증착 JF(JF-금속)의 제조
- [0086] Mg, Fe, Ru, Re, Pt 또는 Os를 에탄올에 녹인 후, 금속 염 용해 용액을 이용하여 간단히 드롭-건조(drop and dry)하는 방법으로 상기 나노 복합체(JF)에 Mg, Fe, Ru, Re, Pt 또는 Os 금속 입자를 증착하고, 아르곤(Ar) 분위기에서 간단히 후 처리하여 금속 입자가 증착된 나노 구조체(JF)를 수득하였다.
- [0087] 이하, 금속 입자가 증착된 나노 복합체(JF)를 통칭하여, 금속 증착 JF 또는 JF-금속로, 금속 종류에 따라 각각 JF-Mg, JF-Fe, JF-Ru, JF-Re, JF-Pt 또는 JF-Os로 표기하였다.
- [0089] 실시예 2. 바이오 전극(JF-(금속)-CC-효소)의 제조
- [0090] 도 2는 본 발명의 바이오 전극의 제조 방법의 모식도이다. 상기 도 2에서, NP는 상기 실시예 1에서 제조된 JF 또는 JF-금속(이하, JF-(금속))을 의미한다.
- [0091] 탄소 천(carbon cloth, CC) 시트에서 0.9 cm^2 인 정사각형 조각을 절단하고, 상기 정사각형 조각의 일 면을 글루건을 사용하여 전도성 에폭시로 도포하였다. 상기 일 면이 전도성 에폭시로 도포된 소수성의 CC 조각을 아세톤 및 이소프로필 알콜 및 탈이온수에서 각각 90 분 동안 순차적으로 초음파 처리하고, 50 ° C에서 30 분 동안 건조하고, 80 ° C에서 1 시간 동안 KOH(3 M) 용액에서 가열하여 전 처리함으로써, 하이드록시(-OH) 그룹을 활성화하

였다. 이 공정을 통하여, CC는 친수성이 증가되고, 후술하는 공정에서, PEI-JF-(금속) 슬러리가 상기 CC에 침투할 수 있게 된다.

[0092] 상기 CC에 침투되는 PEI-JF-(금속) 슬러리는 JF 10 mg을 분지형 폴리에틸렌이민(PEI, Mw: 25,000) 3 mg/ml를 포함하는 에탄올에 분산시킨 후, 실온에서 건조하고, 탈이온수에 담가 세척하여 고정되지 않은 구성 요소를 제거함으로써, 제조되었다.

[0093] 상기 PEI-JF-(금속) 슬러리 10 ml 에탄올 용액에 상술한 공정에서 전 처리된 CC를 침지하고, 3 시간동안 볼텍싱하여 PEI를 포함하는 효소 고정 지지체(JF-(금속)-CC)를 제조하였다.

[0094] 상기 PEI-JF-(금속) 슬러리로 인해 아민 기능화된 CC, 즉 효소 고정 지지체(JF-(금속)-CC)는 EtDH(3U) 및/또는 FLS(3U)를 고정하는데 이용되었다.

[0095] 상술한 공정에서 EtDH 및/또는 FLS가 접합된 JF-(금속)-CC-효소를 구성으로 하는 전극을 HEPES(pH 8.5; 50 mM) 완충액으로 세척하여 결합되지 않은 단백질을 제거하였다. 이때, HEPES에 포함된 음으로 하전된 EtDH 및 FLS는 양으로 하전된 PEI를 포함하는 JF-(금속)-CC에 결합되어, 효소가 고정된 JF-(금속)-CC-EtDH 또는 JF-(금속)-CC-EtDH-FLS 바이오 전극이 제조된다.

[0096] 도 2를 참조하면, 상기 JF-(금속)-CC-EtDH-FLS 바이오 전극의 경우, 동시 고정 및 순차 고정의 두 가지 방법을 이용하여 상기 EtDH 및 FLS가 고정화된다. 이에 대한 설명은 후술하기로 한다.

[0098] 실험예

[0099] - 전극의 전기화학적 측정

[0100] 모든 전기화학적 분석은 3 전극 설정에서 생물학적 SP150 potentiostat을 사용하여 수행되었다. 실시예 2에서 제조된 효소가 고정된 바이오 전극, Pt 와이어 및 Ag/AgCl(포화 NaCl)은 각각 작동 전극, 카운터 전극 및 기준 전극으로 사용되었다. 순환 전압전류법(CV) 및 크로노암페로메트리(CA)에서 보고된 모든 값은 달리 명시되지 않는 한 Ag/AgCl 전극에 대해 참조되었다. 전기화학적 분석 및 EBFC 작동에 앞서, pH 8.0의 15 ml HEPES 완충액(50 mM)에서, 애노드액을 30 분 동안 질소 가스로 퍼지하여 용존 산소를 제거하였다.

[0101] 모든 전기화학적 측정은 계산된 표준 편차와 함께 여러 주기(n=3~5)의 평균 값이고, 전기화학적 임피던스 스펙트럼(EIS) 분석은 10 mV의 진폭 전압으로 100 kHz에서 10 mHz까지 수행하였다. EIS의 Nyquist 임피던스 스펙트럼은 Zview 프로그램을 사용하여 모델 피팅되었다.

[0102] 금속 증착 JF(금속-JF)의 전기화학적 특성화를 위하여 효소가 접합되지 않은 비효소 전극은 유리질 탄소 전극(GCE)을 사용하여 수행되었고, CV 및 EIS는 $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ (5 mM)를 포함하는 질소 살포된 100 mM KCl 용액에서 수행되었다.

[0103] 효소 바이오 연료전지(EBFC) 작동 중 전기화학적 분석은 EBFC 성능을 평가하기 위해 후술하는 식을 이용하여 추가로 계산되었고, 생물학적 Tafel 분석은 $-0.2 \sim +0.8$ V(vs Ag/AgCl)의 3 전극 시스템에서 수행되었다.

[0105] - 효소 바이오 연료전지(EBFC)의 구축 및 운영

[0106] 정사각형 모양의 JF-CC-EtDH는 캐소드로 이용된 백금 와이어와 함께 EBFC에서 애노드로 사용되었다. 상기 애노드 및 캐소드는 양성자 교환막(PEM; Nafion-117)으로 분리하였다. 상기 양성자 교환막은 초기에 증류수 80 ° C에서 1 시간 동안 가열하고, 3 % 과산화수소(H_2O_2)에서 1 시간 동안 가열한 후, 마지막으로 0.5 M H_2SO_4 용액에서 1 시간 동안 가열하여 전처리 되었다. 상기 PEM은 사용 전에 증류수에 보관하였다.

[0108] 실험예 1. 금속 증착 JF(JF-금속)의 합성 및 구조 확인

[0109] SEM 이미지 분석은 전계방출 SEM(FE-SEM; Hitachi S-4800, Tokyo, Japan)을 이용하여 수행되었고, TEM 이미지 분석은 고해상도 TEM(JEM2100F; 200 kV)을 이용하여 수행되었고, 질소 흡착 등온선(TriStar 3000)에 대한 BET(Brunauer-Emmett-Teller) 분석을 수행하여 시료의 비표면적을 평가하였다.

[0110] 도 3은 상기 실시예 1에서 제조된 전구체($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-C}$) 분말(a 및 b) 및 SiO_2 코팅 마이크로스피어($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$)(c 및 d)의 SEM 이미지이고, 도 4는 상기 실시예 1에서 제조된 JF, JF-Fe, JF-Os, JF-Pt, JF-Re 및 JF-Ru의 TEM(a, d, g, j, m 및 p) 이미지, 고해상도 TEM(b, e, h, k, n 및 q) 및 매핑 이미지(c, f, i, l, o 및 r)이다.

[0111] 상기 도 3을 참조하면, 평균 크기가 $1.4 \mu\text{m}$ 인 전구체($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-C}$) 분말 및 얇은 SiO_2 셸이 코팅된 $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 이 형성된 것을 확인할 수 있었고, 상기 도 4의 a 내지 c를 참조하면, $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 내부에서 NCNT가 지속적으로 성장하여, 본 발명의 JF 형태의 나노 구조체를 형성하는 것을 확인할 수 있었고, d 내지 r을 참조하면, 다양한 금속 입자가 본 발명의 나노 구조체 상에 성공적으로 증착된 것을 확인할 수 있었다.

[0112] 도 5는 JF, JF-Fe, JF-Pt, JF-Os, JF-Re 및 JF-Ru의 질소(N_2) 흡탈착 그래프 및 Barrett-Joyner-Halenda(BJH) 기공 크기 분포를 나타낸 그래프이다.

[0113] 도 5를 참조하면, JF의 등온선 및 기공 크기 분포는 NCNT 번들 사이에 중간 기공의 존재를 나타내는 H4 히스테리시스 루프가 있는 일반적인 유형 II 플롯을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 금속 증착 JF의 경우, 도 5의 a와 같이 동일한 히스테리시스 루프를 보여주는 것을 확인할 수 있었고, JF 및 JF-금속의 BJH 기공 크기 분포는 정렬된 NCNT 부분에서 유래되는 5 nm 내지 100 nm 크기의 중간 기공 및 거대 기공을 보여주는 것을 확인할 수 있었다.

[0114] 합리적으로 설계된 금속 증착 JF는 중간 기공 및 거대 기공을 포함하여, 효율적인 효소 고정 및 EFBC에의 이용 시, 우수한 반응을 촉진할 수 있을 것을 예상할 수 있었다.

[0115] 상기 JF 및 JF-Fe, JF-Pt, JF-Os, JF-Re 및 JF-Ru의 Brunauer-Emmett-Teller(BET) 표면적, 평균 기공 부피 및 평균 기공 직경을 하기의 표 1에 도시하였다:

표 1

Material	BET surface area (m^2/g)	Pore volume (cm^3/g)	Pore diameter (nm)
JF	144.0	0.52	20
JF-Fe	103.4	0.45	31
JF-Pt	143.4	0.70	23
JF-Os	132.1	1.23	37
JF-Re	141.9	0.77	30
JF-Ru	109.8	0.69	31

[0117] 상기 표 1을 참조하면, JF, JF-Fe, JF-Pt, JF-Os, JF-Re 및 JF-Ru의 Brunauer-Emmett-Teller(BET) 표면적은 각각 144, 103, 143, 132, 142 및 $110 \text{ m}^2/\text{g}$ 으로, 금속 증착 공정에서도 평균 기공 부피 및 기공 직경 크기는 증착된 금속 원소의 양이 적기 때문에 유사한 값을 나타냈고, 금속 증착 공정은 JF의 기공 구조에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

[0119] 실험예 2. 금속 증착 JF(JF-금속)의 전기화학적 특성 확인

[0120] 다양한 금속 도입에 따른 나노 구조체의 전기 촉매 특성에 대한 영향을 분석하기 위해 50 mM 의 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]3\text{H}_2\text{O}$ 와 함께 100 mM KCl 용액에서 CV 및 EIS 연구를 수행하여 분석하였다. JF에 도입되는 금속 종류에 따른 전기 화학적 활성을 일반 GCE(유리 전극)를 이용하여 제조된 비효소 전극(JF-금속-GCE)을 이용하여 예비 테스트하였다.

[0121] 일반 GCE 전극 및 다양한 JF-금속이 부착된 GCE 전극의 전기 화학적 프로파일을 도 6에 도시하였다. 구체적으로, 상기 도 6의 a 내지 d는 각각 상기 각 전극을 이용하여 분석된 전압 전류 프로파일(a), CV 분석에 의해 도출된 산화환원 피크 전류(b), EIS 분석에 의해 도출된 나이퀴스트 플롯(c) 및 R_{ct} 데이터를 이용하여 계산된 전기전도도(d)이다.

[0122] 상기 도 6에서, 블랙, 레드, 마젠타, 올리브, 네이비, 바이올렛 및 퍼플은 각각 일반 GCE, JF-GCE, JF-Fe-GCE,

JF-Ru-GCE, JF-Re-GCE, JF-Pt-GCE 및 JF-Os-GCE를 표시한다.

- [0123] 도 6의 a 및 b를 참조하면, 일반 GCE 전극은 0.148 mA/cm^2 의 가장 작은 애노드 피크 전류 밀도(I_{pa})로 보다 낮은 전기화학적 활성을 나타내는 반면, JF-금속의 경우, 전도도의 증가로 인해 잘 정의된 산화환원 피크로 이어졌으며, 이는 전기화학적 활성을 향상시키는 데 JF가 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0124] 산화환원 피크 전류는 JF-금속의 금속 종류에 따라 달라졌으며, 모든 JF-금속 중에서 JF-Os-GCE가 가장 높은 전극 촉매 성능(애노드 전류: 0.535 mA/cm^2)을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 전기화학적 성능을 향상시킬 수 있는 JF와 Os의 강력한 전자 상호 작용으로 인해 발생할 수 있고, 이는 전자 전달 측면에서 전체 촉매 활성을 향상시키는 데 유용할 것을 예상할 수 있었다.
- [0125] 한편, Ru, Re 및 Pt와 같은 귀금속으로 증착되지 않은 JF-GCE 전극은 0.214 mA/cm^2 의 산화 전류 밀도를 나타내었으며, 이는 JF-Os-GCE 전극과 비교하여 2.47 배 더 작은 것으로 나타나, 오스뮴(Os)을 도입함으로써, 전자 전달 측면에서 촉매 활성이 향상된 것을 알 수 있었다.
- [0126] 도 6의 c를 참조하면, EIS 분석 결과, 금속의 존재는 전하 전달 저항(R_{ct})을 감소시키면서 전기화학적 성능을 증가시킬 수 있는 것을 알 수 있었다.
- [0127] 상기 테스트된 모든 JF-금속-GCE 중에서, JF-Os-GCE는 CV 분석과 일치하는 가장 낮은 R_{ct} , 즉 $363 \text{ } \Omega$ 였고, 상기 JF-Os-GCE의 R_{ct} 는 JF-GCE($586 \text{ } \Omega$), JF-Fe-GCE($510 \text{ } \Omega$), JF-Ru-GCE($480 \text{ } \Omega$), JF-Re-GCE($430 \text{ } \Omega$) 및 JF-Pt-GCE($380 \text{ } \Omega$)보다 낮았고, 이것은 CV 데이터 및 계산된 전도도(도 6의 d)와도 일치하였다.
- [0128] 금속 증착 JF 중 JF-Os-GCE는 다른 금속 증착 JF와 유사한 입자 크기 및 비표면적을 가짐에도 불구하고 가장 높은 촉매 성능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0130] 실험예 3. JF-금속에 고정된 효소(EtDH) 특성화

- [0131] EtDH의 고정화는 PEI를 포함하는 효소 고정 지지체(JF-(금속)-CC)상에서, PEI의 아민 그룹($-\text{NH}_2$)을 EtDH의 카보닐 그룹에 화학적으로 결합함으로써 달성되었다. JF-(금속)/CC 표면에서의 쉬프 염기 반응을 통한 $\text{C}=\text{N}$ 의 형성을 푸리에 변환 적외선 분광법(FT-IR), X선 광전자 분광법(XPS), 열 중량 분석(TGA) 및 주사전자현미경(SEM) 분석으로 확인하였다.
- [0132] XPS 분석은 Al K α 방사선(ESCALAB-210; $1,486.6 \text{ eV}$)을 이용하여 수행하였고, TGA는 $10 \text{ } ^\circ\text{C/min}$ 의 가열 속도로 공기 중에서 수행되었고, SEM 분석은 전계방출 SEM(FE-SEM; Hitachi S-4800, Tokyo, Japan)을 이용하여 수행되었다.
- [0133] EtDH, PEI를 포함하는 JF-Os-CC 및 JF-Os-CC-EtDH의 FT-IR 스펙트럼 분석 결과(a) 및 TGA 분석 결과(b)를 도 7에 도시하였다. 이때, 블랙, 레드 및 블루 라인은 각각 EtDH, JF-Os-CC 및 JF-Os-CC-EtDH을 표시한다.
- [0134] 도 7의 a를 참조하면, EtDH의 FT-IR 스펙트럼은 $1,640 \text{ cm}^{-1}$ 에서 아미드 결합에 대한 주요 피크, $2,972 \text{ cm}^{-1}$ 에서 메틸렌 기의 신축 진동, 약 $3,300 \text{ cm}^{-1}$ 에서 하이드록실의 존재를 보여주었다. PEI를 포함하는 JF-Os-CC의 경우 $1,069 \text{ cm}^{-1}$ 의 피크는 Si-O 결합에 할당되었고, $1,248 \text{ cm}^{-1}$ 의 피크는 CH_2 의 $-\text{C}-\text{H}$ 결합에 할당되었으며, $2,800\text{--}3,000\text{cm}^{-1}$ 사이의 피크는 PEI-JF-Os-CC 네트워크의 메틸렌 그룹에 할당될 수 있다.
- [0135] 그러나 JF-Os-CC-EtDH의 경우, EtDH 및 JF-Os-CC의 모든 피크를 보여주었으며 아미드 및 하이드록실 그룹에 대한 피크가 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, $1,649 \text{ cm}^{-1}$ 의 피크는 아미드 그룹에 기인할 수 있고, $2,800\text{--}3,000 \text{ cm}^{-1}$ 사이의 피크는 PEI($3,300 \text{ cm}^{-1}$)의 지배적인 하이드록실 그룹에 기인할 수 있다.
- [0136] 도 8은 EtDH, PEI를 포함하는 JF-Os-CC 및 JF-Os-CC-EtDH의 XPS 분석 결과이다. 구체적으로, 도 8의 a는 EtDH (블루 라인), PEI를 포함하는 JF-Os-CC(레드라인) 및 JF-Os-CC-EtDH(블랙 라인)의 XPS 조사 스캔 프로파일이고, b 내지 d는 각각 EtDH, JF-Os-CC 및 JF-Os-CC-EtDH의 디컨볼루션된 $\text{C}1\text{s}$ 스펙트럼이다.

- [0137] 도 8을 참조하면, JF-0s-CC 및 JF-0s-CC-EtDH의 Si 2p 피크는 SiO₂ 셸 표면의 NCNT 합성에 의해 발생하였고, 전반적으로 조사 스캔은 EtDH가 JF-0s-CC 표면에 고정되어 있음을 확인할 수 있었다.
- [0138] EtDH와 JF-0s-CC 사이의 결합을 명확히 하기 위해 고해상도 C1s 스캔 스펙트럼을 가우스 피팅 방법을 사용하여 피팅하였다. 디컨볼루션은 세 가지 주요 구성 요소를 생성하였다. 284.3, 285.5 및 287.4 eV에서 결합 에너지 피크는 각각 포화 또는 불포화 탄소, 탄소-질소 및 탄소-산소 결합에 기인한다.
- [0139] 도 8의 d를 참조하면, -C-C-/C=C- (284.5 eV), -C-OH/-HN-C=O (285.4 eV), -C=O/-CNH₂ (287.9 eV) 및 -C -O/-N-C=O (288.7 eV) 결합 관련 피크가 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 효소를 PEI를 포함하는 JF-0s-CC에 고정화한 후 나타나는 284.5 eV에서 -C-C-/C=C-의 모양은 JF-0s-CC가 EtDH에 직접 결합되었음을 알 수 있었다. 여기에서 C-C 결합에 해당하는 피크가 우세했고, JF-0s-CC 표면에 있는 EtDH의 카르보닐기와 PEI의 아민기 사이의 결합으로 인해 발생하는 C-N 결합에 대한 추가 피크를 확인할 수 있었다.
- [0140] 또한, 상기 도 7의 b를 참조하면, JF-0s-CC 및 효소가 고정화된 JF-0s-CC-EtDH의 TGA는 12.5 %의 중량 손실을 나타내는 것을 확인할 수 있었는데, 상기 중량 손실은 EtDH로부터 펩티드 사슬의 분해에 기인하는 것으로, EtDH가 성공적으로 고정되었다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0141] 도 9 및 도 10은 각각 CC(a) 및 JF-0s-CC-EtDH(b)의 SEM 이미지 및 EDX 분석 결과이다.
- [0142] 도 9를 참조하면, 탄소 섬유(직경 7.3~8.2 μm)로 구성된 CC는 넓은 표면적을 가져, 효소 로딩에 적합한 것을 확인할 수 있었고, JF-0s 및 효소가 고정된 후에도, CC의 구조에는 변화가 없음을 확인할 수 있었다.
- [0143] 도 10을 참조하면, JF-0s-CC-EtDH에서, 질소의 고르지 않은 분포를 관찰할 수 있는 바, 조사된 응집체에 EtDH 및 PEI가 포함되어 있고, 전극에 EtDH가 고정된 것을 확인할 수 있었다.
- [0145] **실험예 4. 바이오 전극의 전기화학적 특성 확인 및 최적화**
- [0146] **- 전기화학적 특성 확인**
- [0147] JF-0s-CC-EtDH를 에탄올로부터 아세트 알데히드로의 탈수소화 반응에 이용하기 위한 전기화학적 특성을 확인하기 위해 pH 8.5의 100 mM HEPES 완충액에서 CV 및 EIS 분석을 수행하고, 결과를 도 11에 도시하였다.
- [0148] 도 11의 a는 CC, JF-CC, JF-0s-CC 및 JF-0s-CC-EtDH 각각의 나이퀴스트 플롯이다. 이때, 블랙 씨클, 레드 씨클, 퍼플 씨클 및 퍼플 오픈 씨클은 각각 CC, JF-CC, JF-0s-CC 및 JF-0s-CC-EtDH를 표시한다.
- [0149] 도 11의 a를 참조하면, CC에 JF-0s를 도입한 후 R_{ct}가 60 Ω으로 감소하였고, 이는, JF-CC(158 Ω) 및 CC(298 Ω)에 비해 각각 1.9 배 및 4.9 배 작은 것을 확인할 수 있었고, 반면, JF-0s-CC-EtDH의 경우, R_{ct}는 138 Ω으로 급격히 증가하였는데, 이를 통해, EtDH가 JF-0s-CC 표면에 잘 고정된 것을 확인할 수 있었다.
- [0150] 도 11의 b는 CC-EtDH, JF-CC-EtDH 및 JF-0s-CC-EtDH 각각의 CV 분석 결과이다(에탄올(10 mM)보충: 유(실선), 무(점선)). 이때, 블랙라인, 레드라인 및 퍼플라인은 각각 CC-EtDH, JF-CC-EtDH 및 JF-0s-CC-EtDH를 표시한다.
- [0151] 도 11의 b를 참조하면, JF-0s-CC에서 EtDH에 의한 에탄올 탈수소화에서 생성된 산화 전류는 에탄올의 이론적인 산화환원 전위와 유사한 약 0.24 V(vs Ag/AgCl)에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 에탄올의 산화 전위는 JF-CC(0.28 V vs Ag/AgCl) 및 CC에 비해 현저히 낮아, EtDH가 고정된 JF-0s-CC-EtDH 전극이 CC 자체보다 더 높은 전기화학적 활성을 나타내기에 충분한 것을 알 수 있었다.
- [0152] 또한, 에탄올을 보충하는 경우에도, CC-EtDH의 산화 전류 생성이 크게 향상되지 않는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 CC-EtDH를 이용한 DET가 제한적이고, JF의 도입이 계면 전자 전달에서 결정적인 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 반면, 에탄올이 존재하는 JF-0s-CC-EtDH(2.91 mA/cm²) 전극은 JF-CC-EtDH(2.05 mA/cm²)에 비해 41.95 % 더 높은 촉매 전류를 보이는 것을 확인할 수 있었다.
- [0153] 효소가 고정된 전극의 활성을 추가로 확인하기 위해, JF-0s-CC-EtDH 및 CC-EtDH를 반복 세척 후, 효소의 고정화 수율(immobilization yield, IY) 및 NADH 생성을 분석하였다.
- [0154] 구체적으로, 공기 건조된 JF-0s-CC-EtDH 및 CC-EtDH 각각을 1,000 μL의 HEPES 완충 용액(pH 8.5, 0.1 M)에 1 분 동안 담가 느슨하게 결합된 EtDH를 제거하여 세척하였다. 세척된 상기 각 전극을 이후, 3,000 μL의 새로운

HEPES 완충액에 1 분 동안 담갔다. 전극의 EtDH 활성은 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD⁺)함량의 변화를 기반으로 결정하였다.

[0155] 상기 세척된 전극을 5.0 mL의 HEPES 완충용액(pH 8.5, 0.1 M), 250 μ L의 NAD⁺(2 mM in DI water, stored in an ice bath) 및 100 μ L의 에탄올(50 mM in 0.1-M HEPES 완충 용액, pH 8.5)에 첨가하고, 연속 교반한 후, 다양한 간격으로 반응용액 500 μ L를 추출하고 340 nm의 흡광도를 기준으로 NAD⁺ 함량의 변화를 측정하고, 결과들도 12에 도시하였다. 구체적으로, 도 12의 a는 UV-vis 분광법에 의한 분석 방법의 모식도이고, b는 상기 UV-vis 분광 분석 결과인데, 이때, 블루, 마젠타, 레드 및 블랙은 각각 CC, JF-0s-CC, JF-0s-CC-EtDH 및 CC-EtDH를 표시한다.

[0156] 또한, 효소가 고정된 JF-0s-CC-EtDH 및 CC-EtDH의 반복 세척 후 EtDH의 활성(표면적 0.15 cm²)을 하기의 표 2에 도시하였다:

표 2

Bioelectrode	Catalytic activity (U)	Immobilization yield(IY) of EtDH (%)
JF-0s-CC-EtDH (immobilized)	2.80 $\pm$ 0.15	93.4
CC-EtDH (immobilized)	1.08 $\pm$ 0.11	35.8

[0158] 도 12 및 표 2를 참조하면, JF-0s-CC-EtDH 및 CC-EtDH의 IY는 각각 93.4 % 및 35.8 %였고, JF-0s-CC-EtDH는 CC-EtDH 대비 3.1 배 더 높은 NADH 생성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이때, JF-0s-CC-EtDH의 IY 값은 EtDH가 효소 고정 지지체(JF-(금속)-CC)에 더 강하게 결합하기 때문인 것을 예상할 수 있었다.

[0159] 도 11의 c는 CC-EtDH, JF-CC-EtDH 및 JF-0s-CC-EtDH의 -0.2 ~ 0.8 V의 전위 창 내의 Tafel 분석 결과이고, 삽입도는 각각의 전극의 에탄올 탈수소화에 대한 Tafel 기울기이다. 이때, 블랙 서클, 레드 서클 및 퍼플 서클은 각각 CC-EtDH, JF-CC-EtDH 및 JF-0s-CC-EtDH를 표시한다.

[0160] 상기 도 11의 c의 Tafel 기울기, 전하이동계수(α), 하기의 식 1 및 식 2를 이용하여 계산된 EtDH 고정 전극의 전기화학적 및 운동적 매개 변수 값을 하기의 표 3에 도시하였다:

표 3

Electrode	parameter			
	Tafel slope (mV/dec)	α	j_0 (A/cm ²)	K_{et} (cm/s)
CC/EtDH	604	0.05	8.20×10^{-5}	8.49×10^{-9}
JF/CC/EtDH	421	0.08	1.19×10^{-4}	1.14×10^{-8}
JF/0s/CC/EtDH	225	0.13	2.38×10^{-4}	2.46×10^{-8}

[0162] [식 1]

$$\alpha = \frac{2.3 RT}{bnF}$$

[0163] 상기 식에서, b는 Tafel 기울기, R은 기체 상수 및 T는 온도이다.

[0165] [식 2]

$$K_{et} = \frac{j_0}{nFC}$$

[0167] 상기 식에서, K_{et} 는 전자 전달 속도, j_0 는 Tafel 플롯의 교환 전류 밀도 및 C는 애노드 용액의 에탄올(100 mM)

농도이다.

[0168] 상기 도 11의 c를 참조하면, 에탄올 탈수소화의 운동 영역과 관련된 JF-0s-CC-EtDH의 Tafel 기울기는 225 mV/dec인 반면, CC-EtDH 및 JF-CC-EtDH의 경우 각각 604 및 421 mV/dec인 것을 확인할 수 있었다. 상기 JF-0s-CC-EtDH의 더 작은 Tafel 기울기는 전류의 급격한 증가를 나타내며 더 빠른 전자 전달 동역학을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0169] 상기 표 3을 참조하면, 바이오 전극의 α 값은 다른 바이오 전극에 비해 JF-0s-CC-EtDH에서 더 높은 것으로 밝혀져 0s의 도입이 에탄올 탈 수소화에 매우 유리하다는 것을 알 수 있었다. 또한, K_{et} 값의 경우, JF-0s-CC-EtDH는 CC-EtDH 및 JF-CC-EtDH 대비 각각 2.91 배 및 2.15 배 더 높은 값을 가지는 바, JF-0s-CC-EtDH의 전자 구조가 에탄올을 탈 수소화하는 효소에 대한 잠재적인 DET 에너지 장벽을 줄이는데 더 적합한 것을 확인할 수 있었다.

[0170] 도 11의 d는 CC-EtDH, JF-CC-EtDH, JF-Fe-CC-EtDH, JF-Ru-CC-EtDH, JF-Re-CC-EtDH, JF-Pt-CC-EtDH, 및 JF-0s-CC-EtDH의 증착 금속에 따른 전극의 운동적 성능을 나타낸 그래프이다. 이때, 블랙 스퀘어, 레드 서클, 마젠타 다운 트라이앵글, 올리브 다이아몬드, 네이비 레프트 트라이앵글, 바이올렛 라이트 트라이앵글 및 퍼플 헥사곤은 각각 CC-EtDH, JF-CC-EtDH, JF-Fe-CC-EtDH, JF-Ru-CC-EtDH, JF-Re-CC-EtDH, JF-Pt-CC-EtDH, 및 JF-0s-CC-EtDH를 표시하고, 블랙 라인은 Michaelis-Menten 역학에 대한 피팅 곡선이다.

[0171] CC-EtDH, JF-CC-EtDH, JF-Fe-CC-EtDH, JF-Ru-CC-EtDH, JF-Re-CC-EtDH, JF-Pt-CC-EtDH, 및 JF-0s-CC-EtDH의 포화 촉매 전류 밀도(J_m), Michaelis-Menten 상수(K_m) 및 최대 턴오버수(K_{cat})를 하기의 표 4에 도시하였다:

표 4

[0172]

Electrode type	J_m (mA/cm ²)	K_m (μ M)	k_{cat} (s ⁻¹)
CC-EtDH	0.246	10.7	0.17
JF-CC-EtDH	0.601	17.12	0.40
JF-Fe-CC-EtDH	0.660	14.34	0.44
JF-Ru-CC-EtDH	1.021	17.53	0.68
JF-Re-CC-EtDH	1.772	27.04	1.14
JF-Pt-CC-EtDH	1.899	27.09	1.27
JF-0s-CC-EtDH	2.390	33.10	1.60

[0173] 상기 도 11의 d 및 표 4를 참조하면, JF-0s-CC-EtDH의 j_m 값은 JF-CC-EtDH 및 CC-EtDH의 값보다 각각 3.98 배 및 9.9 배 더 높고, JF-0s-CC-EtDH의 k_{cat} 은 JF-CC-EtDH 및 CC-EtDH보다 3.9 배 및 9.4 배 더 높아 가장 높은 k_{cat} 값을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0174] 상기 j_m 및 k_{cat} 값은 전자 전달을 향상시키는 JF-금속의 높은 전도도에 기인할 수 있다. 상기 금속의 종류에 따른 바이오 전극의 j_m 및 k_{cat} 값은 전기화학적 CV의 결과와 유사한 경향을 따르고, 상관관계를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 금속의 종류에 따른 JF-금속 전극에 대한 j_m 및 k_{cat} 값의 순서는 JF-0s-CC-EtDH > JF-Pt-CC-EtDH > JF-Re-CC-EtDH > JF-Ru-CC-EtDH > JF-Fe-CC-EtDH > JF-CC-EtDH > CC-EtDH 순인 것을 알 수 있었다.

[0176] - 바이오 전극의 최적화

[0177] JF-0s-CC-EtDH 바이오 전극의 전기 촉매 성능의 최적화를 위한 실험을 수행하고 결과를 도 13에 도시하였다.

[0178] 도 13의 a는 시간에 따라, 에탄올을 첨가하는 경우, JF-0s-CC-EtDH 전극의 전류밀도를 측정할 결과 그래프를 나타낸 것으로, 도 13의 a를 참조하면, JF-0s-CC-EtDH 전극의 산화 전류 증가는 에탄올이 첨가되었을 때 발생하는 것을 확인할 수 있었다.

[0179] 도 13의 b 상기 실시예 2에서, EtDH의 효소 고정 지지체(JF-0s-CC)로의 고정 시 이용되는 PEI의 분자량에 따른 전류밀도를 측정할 결과를 도시하고 있고, 하기의 표 5는 상기 PEI 분자량에 따른 JF-0s-CC-EtDH 바이오 전극의

운동 매개변수의 변화를 도시하고 있다:

표 5

MWs of PEI (g/mol)	J_m (mA/cm ²)	K_m (μ M)	k_{cat} (s ⁻¹)
800	0.719	23.79	0.48
5,000	1.638	26.01	1.09
25,000	2.390	33.10	1.60
750,000	1.865	26.53	1.24

상기 도 13의 b에서, 블랙 스퀘어, 레드 서클, 블루 삼각형 및 마젠타 삼각형은 각각 PEI-800, PEI-5,000, PEI-25,000 및 PEI-750,000를 표시한다.

도 13의 b 및 표 5를 참조하면, 최적의 전기화학적 활성은 분자량이 25,000 g/mol인 분지형 PEI를 갖는 바이오 전극에서 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

MW가 낮은 PEI는 MW가 큰 PEI에 비해 나노 구조체와 효소의 강도를 약화시키는 것으로 알려져 있으나, PEI의 MW를 75,000 g/mol로 추가로 증가시키면 오히려 전도도 감소로 인해 전류 밀도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

JF-0s-CC에 대한 EtDH의 흡수 거동을 확인하기 위해, EtDH 고정화 시간을 다르게 설정하여 전류 밀도를 기록하고, 결과를 도 13의 c에 도시하였다.

도 13의 c를 참조하면, 고정화 초기 15 분에서 전류 밀도의 급격한 증가를 관찰할 수 있었고, 120 분 후, 전류 밀도가 안정화되는 것을 확인할 수 있었다.

Ag/AgCl에 대한 +0.2 V의 인가 전압에서 에탄올 산화에 대한 JF-0s-CC-EtDH 바이오 전극의 성능에 대한 무산소 HEPES 완충 용액의 pH(d), 이온강도(e) 및 온도(f)의 영향을 확인하고 각각의 결과를 도 13의 d 내지 f에 도시하였다.

도 13의 d를 참조하면, pH 8.5에서 가장 높은 활성을 나타냈으며, e를 참조하면, 완충 용액의 농도가 75 mM까지 증가함에 따라 전류 밀도의 증가가 확인되었고, 100 mM의 이온 강도에서 전류 밀도의 유의한 증가가 없는 것을 확인할 수 있었다.

도 13의 f를 참조하면, 산화 전류의 증가(3.3 배)는 온도가 4 ° C에서 30 ° C로 증가함에 따라 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 전류 밀도는 4 ° C에서의 작동과 비교하여 30 ° C에서 3.3 배 더 높았으나, 30 ° C에서 60 ° C로 온도가 더 증가함에 따라 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

이후, 추가적인 실험은 작동 온도 30 ° C에서 100 mM 버퍼를 사용하여 pH 8.5의 최적화된 조건에서 수행하였다.

실험예 4. EBFC의 전력 생산

EtDH에 의한 전력 생산과 동시에, 에탄올을 알데히드로 탈 수소화하는 것은 에탄올로부터 아세트인을 생산하는 카르보라이게이션(carboligation)의 선행 단계이다.

도 14의 a는 본 발명의 2 구획 에탄올/O₂ EBFC에서 산화환원 반응의 전자 전달 경로의 모식도이다.

도 14의 a를 참조하면, 본 발명의 EBFC는 실시예 2의 바이오 연료 전지 전극(JF-0s-CC-EtDH)을 애노드로 활용하고, 캐소드로 상용 Pt 촉매와 쌍을 이루었고, EtDH에 의한 2 구획 에탄올 탈수소화와 Pt에 의한 산소 환원은 전 처리된 양성자 교환막에 의해 분리되었다. 구체적으로, 본 발명의 JF/0s/CC/EtDH 전극은 전자와 양성자를 동시에 방출함으로써 애노드에서 에탄올을 탈수소화하고, 상기 방출된 전자는 캐소드로 이동하여 공기 중의 O₂와 결합하여 물을 형성한다.

상기 JF-0s-CC-EtDH 바이오 전극은 명백한 비활성화 없이 에탄올의 탈수소화에 대한 우수한 전기 촉매 산화를 나타내었고, 동시에 캐소드는 발전을 위해 연속 산소 공급 모드로 작동되었다.

[0196] 블랭크(CC), CC-EtDH, JF-CC-EtDH, JF-Fe-CC-EtDH, JF-Ru-CC-EtDH, JF-Re-CC-EtDH, JF-Pt-CC-EtDH 및 JF-Os-CC-EtDH 각각의 성능 매개 변수 값을 하기의 표 6에 도시하였다:

표 6

Electrode	Open-circuit voltage (OCV;V)	Power density (mW/cm^2)	Ethanol depletion (%)	Acetaldehyde production (%)	Mass balance (%)	FE (%)
Blank	0.135	0.08	-	-	-	-
CC-EtDH	0.652	0.24	28.9	15.5	53.6	17.5
JF-CC-EtDH	0.685	0.58	41.2	30.3	73.5	41.6
JF-Fe-CC-EtDH	0.758	0.64	66.2	59.6	90.1	48.5
JF-Ru-CC-EtDH	0.765	0.69	70.5	64.3	91.2	51.2
JF-Re-CC-EtDH	0.769	0.85	76.2	70.1	91.9	66.3
JF-Pt-CC-EtDH	0.771	0.97	81.5	75.8	93.0	71.8
JF-Os-CC-EtDH	0.773	1.13	84.2	80.2	95.2	78.2

[0198] 도 14의 b는 본 발명의 EBFC의 발전 시 스캔 속도 10 mV/s의 CV 스캔 결과 그래프이다. 구체적으로, JF/Os/CC/EtDH 전극 애노드의 turnover(자주색 실선) 및 nonturn over 조건(자주색 점선)과 Pt 와이어 캐소드의 N_2 (갈색 점선) 및 공기중 O_2 (갈색 실선)의 CV 스캔 결과를 도시하였다.

[0199] 캐소드 환원 전류의 증가는 EBFC의 캐소드 챔버에 공기를 공급함에 따라 나타났고, 산소 감소 피크는 -0.48 V(vs Ag/AgCl)에서 나타났으며, 이는 산소 감소에 대한 다른 연구와 일치하는 것으로 나타났다. 상기 결과를 통하여, 본 발명의 EBFC가 효율적으로 작동할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0200] 또한, 에탄올/ O_2 EBFC의 애노드로서 블랭크(CC), CC-EtDH, JF-CC-EtDH 및 JF-Os-CC-EtDH 바이오 전극의 전력 밀도 프로파일을 분석하고, 결과를 도 14의 c에 도시하였다. 이때, 핑크 서클, 블랙 서클, 레드 서클 및 퍼플 서클은 각각 CC, CC-EtDH, JF-CC-EtDH 및 JF-Os-CC-EtDH를 표시한다.

[0201] 도 14의 c 및 표 6을 참조하면, 본 발명의 JF-Os-CC-EtDH 전극은 0.773 V의 개방 회로 전압(OCV)을 나타내고, $1.13 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 의 P_{max} 에 도달한 반면, 블랭크(CC)의 경우, P_{max} 가 $0.09 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 에 불과한 바, EtDH는 산화 전류를 증가시켜 에탄올의 탈수소화를 촉매하는 것을 확인할 수 있었다.

[0202] JF-CC-EtDH 및 CC-EtDH를 사용한 EBFC 작동은 각각 $0.585 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 및 $0.240 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 의 최대 P_{max} 값을 나타내었고, JF-Os-CC-EtDH의 P_{max} 는 JF-CC-EtDH 및 CC-EtDH 전극의 P_{max} 보다 각각 1.93 배 및 4.67 배 높은 값을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0203] 도 14의 d는 턴오버 조건에서 바이오 전극 유형의 함수로 EtOH/ O_2 EBFC의 전력밀도를 요약하여 도시하였다. 구체적으로, 블랙, 레드, 마젠타, 올리브, 네이비, 바이올렛 및 퍼플 바는 각각 CC-EtDH, JF-CC-EtDH, JF-Fe-CC-EtDH, JF-Ru-CC-EtDH, JF-Re-CC-EtDH, JF-Pt-CC-EtDH 및 JF-Os-CC-EtDH를 표시한다.

[0204] 도 14의 d를 참조하면, 증착된 금속 종류에 따른 P_{max} 데이터는 전기화학적 CV 결과 및 효소 활성(K_m) 결과에서 관찰된 것과 유사한 거동을 보여주는 것을 확인할 수 있었다. 이로써, Os가 증착된 JF-Os-CC-EtDH 전극이 다른 종류의 금속이 증착된 전극에 비해 향상된 성능을 나타내는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다.

[0205] 상기 14의 d를 참조한 모든 바이오 전극의 P_{max} 경향은 다음과 같았다:

[0206] JF-Os-CC-EtDH ($1.13 \text{ mW}/\text{cm}^2$) > JF-Ru-CC-EtDH ($0.976 \text{ mW}/\text{cm}^2$) > JF-Re-CC-EtDH ($0.859 \text{ mW}/\text{cm}^2$) > JF-Ru-CC-EtDH ($0.692 \text{ mW}/\text{cm}^2$) > JF-Fe-CC-EtDH ($0.642 \text{ mW}/\text{cm}^2$) > JF-CC-EtDH ($0.581 \text{ mW}/\text{cm}^2$) > CC-EtDH ($0.24 \text{ mW}/\text{cm}^2$).

[0207] 상기 실험에서 관찰된 JF/Os/CC/EtDH 전극의 P_{max} 값은 에탄올을 기질로 사용하여 작동하는 다른 효소 DET-EBFC 연구에 비해 7 내지 37.6 배 더 높은 것으로 밝혀졌다.

[0208] 도 15는 본 발명의 바이오 전극의 전력 밀도(a), 안정성(b), 시간 전류 측정(c) 및 아세트알데히드 생산(d) 측

면에서 다양한 생체 전극의 전기화학적 반응을 조사하고 그 결과를 도시한 것이다.

- [0209] 도 15의 a는 EtOH/O₂ EBFC 작동 시 JF-Fe-CC-EtDH, JF-Ru-CC-EtDH, JF-Re-CC-EtDH 및 JF-Pt-CC-EtDH의 전력 밀도 곡선을 나타낸 것이다. 이때, 마젠타, 올리브, 네이비 및 바이올렛 프로파일은 각각 JF-Fe-CC-EtDH, JF-Ru-CC-EtDH, JF-Re-CC-EtDH 및 JF-Pt-CC-EtDH를 표시한다.
- [0210] 가장 높은 P_{max} 값을 가지는 JF-Os-CC-EtDH 및 대조군으로 CC-EtDH를 선택하여 안정성 분석을 수행하였다. 구체적으로, EBFC를 구동하고 4 °C의 완충 용액에서 저장하기를 반복하여 시간에 따른 분극 분석을 수행하였다.
- [0211] 도 15의 b는 JF-Os-CC-EtDH 및 CC-EtDH의 안정성 조사 결과 그래프이다. 이때, 퍼플 서클 및 블랙 스퀘어는 각각 JF-Os-CC-EtDH 및 CC-EtDH를 표시한다.
- [0212] 도 15의 b를 참조하면, JF-Os-CC-EtDH는 4 °C의 냉장 완충액에서 반복적인 작동과 보관 동안 21 %의 P_{max} 감소를 나타내는 반면, CC-EtDH는 71 %의 P_{max} 감소를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 상기 CC-EtDH의 P_{max} 의 감소는 효소 손실 및 비활성화에 인한 것으로, 이를 통하여, 금속 증착된 JF가 EtDH를 더욱 효율적으로 고정화하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0213] 안정성 분석 첫 주 동안 CC-EtDH에서 P_{max} 의 최대 감소는 5.4%로 나타난 반면, JF-Os-CC-EtDH의 경우 첫 주 및 세번째 주 후에 P_{max} 의 감소가 최대 0.1 % 및 3.5 %로, 저장 안정성이 우수하며, 에탄올/O₂ EBFC에 대한 다른 연구와 비교한 P_{max} 의 향상은 본 발명의 금속 증착된 나노 복합체(JF)가 전력 생산 EtDH의 로딩을 위한 우수한 물질임을 시사하였다.
- [0214] 에너지 생성 분야에서 에탄올의 생체 전기 탈수소화 과정에서 최대 전자의 축적은 에너지 밀도를 높이는데 바람직하다. 예를 들어, 이론적으로 에탄올 탈수소화에서 전자 2 개가 수집될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 바이오 전극의 생체 전기 산화 프로파일을 평가하였다.
- [0215] 도 15의 c에 pH 8.5에서 HEPES 완충액에서 Ag/AgCl에 대한 +0.2 V의 바이어스 전압에서 에탄올 산화(100mM) 동안 CC-EtDH, JF-CC-EtDH, JF-Fe-CC-EtDH, JF-Ru-CC-EtDH, JF-Re-CC-EtDH, JF-Pt-CC-EtDH 및 JF-Os-CC-EtDH 전극의 시간 전류 측정 반응 결과를 도시하고, 도 15의 d에 EBFC 작동 6 시간 후 에탄올의 생체 전기 분해를 통하여 수득한 아세트 알데히드의 양을 도시하였다. 이때, 블랙, 레드, 마젠타, 올리브, 네이비, 바이올렛 및 퍼플 프로파일은 각각 CC-EtDH, JF-CC-EtDH, JF-Fe-CC-EtDH, JF-Ru-CC-EtDH, JF-Re-CC-EtDH, JF-Pt-CC-EtDH 및 JF-Os-CC-EtDH를 표시한다.
- [0216] 상기 도 15의 c 및 d를 참조하면, 6 시간 동안 에탄올 탈수소화 동안 EtDH가 고정화된 애노드는 JF-Os-CC-EtDH와 같은 금속 증착 JF를 포함하는 전극이 금속이 없는 시스템(CC 전극)과 달리 에탄올 탈수소화에 매우 도움이 되는 것으로 나타났다.
- [0217] 분극 결과(도 14의 c)와 같이 JF-Os-CC-EtDH가 에탄올 탈수소화에 가장 활성이 되었고, EtDH 촉매 에탄올 탈수소화에 대한 +0.2 V에서의 시간 전류 밀도 경향은 효소 분극 분석을 기반으로 한다. 또한 금속 증착 JF와 함께 EtDH의 존재가 에탄올 탈수소화에서 중요한 역할을 한다는 것도 알 수 있었다. 특히, 블랭크(일반 CC)의 경우, 6 시간의 반응 후에 어떠한 생성물도 나타나지 않았다(표 6).
- [0218] 반면, CC-EtDH는 100 mM 에탄올에서 15.5mM 아세트알데히드를 생성하였으나, 아세트알데히드 농도는 JF-CC-EtDH 및 JF-Os-CC-EtDH에서 상기 CC-EtDH의 아세트 알데히드 생성 농도 대비 각각 1.97 배(30.2 mM) 및 5.17 배(80.2 mM) 증가하였다.
- [0219] 에탄올 탈수소화 동안 통과된 전하를 기반으로 계산된 패러데이 효율(FE)(도 15의 c)과 아세트알데히드 형성을 기반으로 계산된 전하의 범위는 금속 증착 JF가 포함된 경우 48 % 내지 78 %였다.
- [0220] JF-Os-CC-EtDH의 향상된 성능은 CC-EtDH 및 JF-CC-EtDH와 비교하여 각각 FE가 61 % 및 37 % 증가하여 에탄올의 효율적인 탈수소화를 나타낸다.
- [0221] 이것은 에탄올의 탈수소화 동안 EtDH로부터 더 높은 전자 흡수를 갖는 Os의 영향과 EtOH/O₂ 연료 전지에서 발전을 위한 생성된 전자의 기여를 보여준다.
- [0222] 따라서, 본 발명의 금속 증착 JF를 포함하는 제안된 EBFC는 한 분자의 에탄올에서 두 개의 전자를 수집하고 아

세트알데히드를 아세트인으로 탄수화물화할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0224] **실험예 5. 에탄올에서 아세트인으로의 카르보라이게이션(carboligation)**

[0225] 본 발명의 EBFC 애노드에서 에탄올을 아세트인으로 전환하기 위해 새로운 인공 카르보라이게이션 시스템을 설계하였다.

[0226] 도 16의 a는 상기 설계된 본 발명의 전력 생산 및 에탄올로부터 아세트인으로 카르보라이게이션을 동시에 수행할 수 있는 EBFC 애노드의 모식도이다.

[0227] 도 16의 a를 참조하면, 본 발명의 EBFC의 애노드에서 에탄올은 첫 번째 단계에서 EtDH에 의해 NADH에 의존하지 않고 직접 전자 전달(DET)을 통해 아세트알데히드로 탈수소화된다. 이어서, 두 번째 단계에서, 상기 아세트알데히드는 FLS에 의해 축합반응을 거쳐 아세트인을 생성한다.

[0228] 일반적으로 아세트인에 대한 에탄올의 효소적 연쇄 반응은 전자 수용체로서 추가 NADH 보조인자를 필요로 하나, 이는 대규모 작업에 비용이 많이 들고 화학량론적으로 제한적이다. 따라서 실제적인 대규모 응용에서 말단 전자 수용체로서 산소와 함께 NADH 산화효소를 사용하는 것과 같은 보조인자의 재생이 필수적이다. 그러나, 이는 추가 효소 합성 및 공기(O₂) 공급을 위한 추가 운영 비용이 요구된다.

[0229] 전기 화학적 활성이 우수하고, 보조 인자가 필요 없는 본 발명의 JF-0s-CC와 같은 고체 효소 고정 지지체를 이용한 EBFC는 재생 메커니즘에 의존하는 초기 효소 시스템 대비 부가가치 제품 형성과 동시에 전력을 생산할 수 있다는 장점이 있다.

[0230] 본 발명의 바이오 전극의 아세트인의 합성을 확인하기 위하여, 효소 고정 지지체로 JF-0s/CC를 이용하고, 상기 JF-0s-CC에 i) EtDH 및 FLS를 3 시간 동안 동시에 고정(동시 고정화 JF-0s-CC-EtDH-FLS)하거나, ii) EtDH를 먼저 2 시간 동안 고정한 후, FLS를 추가 고정(순차 고정화 JF-0s-CC-EtDH-FLS)하는, 2 가지 방법을 이용하여 EtDH 및 FLS의 이중 효소가 고정된 JF-0s-CC-EtDH-FLS 바이오 전극을 제조하고, 이를 후속하는 실험에 이용하였다.

[0231] 도 17은 상기 2 가지 방법을 이용하여 제조된 JF-0s-EtDH-FLS 및 대조군의 아세트인 생성 및 효소 고정화 정도를 확인한 실험 결과이다.

[0232] 구체적으로, 상기 도 17의 a는 상기 2 가지 방법을 이용하여 제조된 동시 고정화 JF-0s-CC-EtDH-FLS와 순차 고정화 JF-0s-CC-EtDH-FLS 및 대조군으로, i) FLS를 포함하지 않는 JF-0s-CC-EtDH ii) 자유 EtDH 및 자유 FLS를 포함하는 애노드 용액, iii) JF-0s-CC-FLS 및 자유 EtDH를 포함하는 애노드 용액, iv) JF-0s-CC-EtDH 및 자유 FLS를 포함하는 애노드 용액을 이용한 EBFC에서, 시간에 따른 아세트인의 생성량을 확인한 실험 결과이다. 이때, 옐로우, 블랙, 레드, 퍼플, 블루 및 마젠타 서클은 각각 FLS를 포함하지 않는 JF-0s-CC-EtDH, 자유 효소(EtDH 및 FLS)를 포함하는 애노드 용액, JF-0s-CC-FLS 및 자유 EtDH를 포함하는 애노드 용액, JF-0s-CC-EtDH 및 자유 FLS를 포함하는 애노드 용액, 동시 고정화 JF-0s-CC-EtDH-FLS 및 순차 고정화 JF-0s-CC-EtDH-FLS를 표시한다.

[0233] 도 17의 a를 참조하면, 순차 고정화 JF-0s-CC-EtDH-FLS에서, 최대 아세트인 생성은 41.3 mM, 수율은 82.6 %인 반면, 동시 고정화 JF-0s-CC-EtDH-FLS에서, 아세트인 생성 EtDH 및 FLS를 포함하는 애노드 용액에서 아세트인 생성량은 7.64 mM로, 순차 고정화 JF-0s-CC-EtDH-FLS 대비 5.4 배 더 낮은것으로 확인되었고, FLS를 포함하지 않는 JF-0s-CC-EtDH에서는 아세트인 생성이 기록되지 않은 것을 확인할 수 있었다.

[0234] 실시간 QCM(quartz crystal microbalance) 분석을 실시하고, 결과를 도 17의 b에 도시하였다.

[0235] 도 17의 b를 참조하면, EtDH 및 FLS의 개별 고정은 각각 -46.69 및 -0123.1 Hz의 Δf 값을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. FLS(238 kDa)를 사용한 더 높은 Δ 변화는 EtDH(81.3 kDa)에 비해 큰 분자 질량 때문으로, EtDH와 FLS의 동시 고정($\Delta = -128.3$ Hz) 동안 Δ 의 변화는 FLS 단독의 고정(-123.1 Hz)과 유사하였고, 이러한 결과로, 상대적으로 크기가 큰 FLS가 상대적으로 크기가 작은 EtDH 대비 효소 고정 지지체에 더 고정화 되기 용이한 것을 추정할 수 있었다.

[0236] 이를 평가하기 위해, i) FLS 고정 후 EtDH를 고정 ii) EtDH 고정 후 FLS를 고정하는 두가지 순차적 고정 방법을 추가로 수행하였다.

[0237] 상기 i) FLS 고정 후 EtDH를 고정하는 방법에서, FLS 고정 후 EtDH를 고정하는 동안 안정적인 FLS Δf (-130.5 Hz)가 기록되었고, 3.2 시간에 Δf 가 안정화된 후, EtDH는 QCM 센서에 고정되었고 Δf (-132.9 Hz)의 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 반면, ii) EtDH 고정 후 FLS를 고정하는 방법의 경우, EtDH는 초기에 QCM 센서에 고정되어 -45.25 Hz의 Δf 를 나타내고, 2.8 시간 후, FLS 고정은 Δf (-125.3 Hz)의 상당한 증가를 가져왔다.

[0238] 상기 결과로, 부피가 큰 효소의 고정화가 효소 고정 지지체에 대한 더 작은 효소의 표면 가용성 및 진입을 제한하는 바, EtDH 및 FLS의 효율적인 고정은 EtDH와 같은 더 작은 효소의 순차적 고정에 이어 FLS의 고정에 의해 달성되는 것을 확인할 수 있었다.

[0239] 상기 동시 고정화 JF-Os-CC-EtDH-FLS와 순차 고정화 JF-Os-CC-EtDH-FLS에서, 고정된 효소의 양을 크기 배제 컬럼을 사용하여 FPLC(Fast protein liquid chromatography) 분석을 사용하여 정량화 하였다. 구체적으로, 고정 후 상등액의 효소 함량을 측정하여 개별적으로 고정된 EtDH 및 FLS의 양을 계산하였다.

[0240] FPLC로 추정되는 JF-Os-CC 고정 후 상등액에 남아 있는 EtDH 및 FLS의 양을 도 17의 c(블루 및 마젠타 프로파일은 각각 동시 고정화 JF-Os-CC-EtDH-FLS와 순차 고정화 JF-Os-CC-EtDH-FLS를 표시함)에 도시하였고, FPLC 분석을 통해 측정된 EtDH와 FLS의 고정화도(DOI), 분자량(MW) 및 머무름 시간 등의 실험 결과를 하기의 표 7에 도시하였다:

표 7

	EtDH	FLS
DOI with simultaneous immobilization (%)	15.8	85.6
DOI with sequential immobilization (%)	92.4	93.4
Type of enzyme	Dimer	Tetramer
Retention time (min)	72.8	51.4
FPLC-based molecular weight (kDa)	88.5	237
Molecular weight based on sequence (kDa)	81.3	238
SDS-PAGE-based molecular weight (kDa)	약 40.0	약 60.0

[0242] 상기 동시 고정화 JF-Os-CC-EtDH-FLS와 순차 고정화 JF-Os-CC-EtDH-FLS에서, 효소의 고정을 시각화하기 위한 공초점 레이저 스캐닝 현미경(confocal laser scanning electron microscopy, CLSM) 분석을 도 17의 d 및 e에 도시하였다. 이때, EtDH 및 FLS는 각각 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 및 로다민 B 이소티오시아네이트(RhB)로 표지된다.

[0243] 상기 도 17의 c 내지 e 및 표 7을 참조하면, 순차 고정화 JF-Os-CC-EtDH-FLS의 경우, EtDH 및 FLS를 각각 93.4 % 및 92.4 % 고정화 시킨 반면, 동시 고정화 JF-Os-CC-EtDH-FLS의 경우, EtDH 및 FLS를 각각 15.5 % 및 85.6 % 고정화 시킨 것을 확인할 수 있었다. 또한, CLMS 분석에서도, 순차 고정화 JF-Os-CC-EtDH-FLS는 EtDH 및 FLS가 효율적으로 분포하는 것을 확인할 수 있었다.

[0244] 아세트인의 생성을 위한 EBFC의 적용 가능성을 확인하기 위해, 아세트인 생성 시간 프로파일을 도 16의 b에 도시하였다. 이때, 블랙 스퀘어, 레드 서클 및 블루 트라이앵글은 각각 기질 에탄올(100 mM), 아세트알데히드 및 아세트인을 표시하고, 삽입도는 아세트인 생성동안 관찰된 크로노암페로미터(CA) 전류 생성을 나타낸다.

[0245] 상기 도 16의 b를 참조하면, 6 시간의 전기효소 반응 후, 애노드 용액은 87.2 %의 수율과 함께 43.6 mM의 최대 아세트인 생성을 나타내고, 기질 에탄올은 6 시간 후 애노드 용액에서 8.1 mM 잔류 에탄올로 빠르게 탈수소화되는 것을 확인할 수 있었다. 중간체인 아세트알데히드 농도는 반응 초기 2 시간 동안 10.1 mM으로 증가하고 6 시간에 도달하였을 때, 6.5 mM으로 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0246] 턴 오버 조건에서 CC-EtDH-FLS, JF-CC-EtDH-FLS, JF-Fe-CC-EtDH-FLS, JF-Ru-CC-EtDH-FLS, JF-Re-CC-EtDH-FLS, JF-Pt-CC-EtDH-FLS 및 JF-Os-CC-EtDH-FLS의 전극 별 EtOH/O₂ EBFC에서의 아세트인 생성을 요약하여 도 16의 c에 도시하였다. 이때, 블랙, 레드, 마젠타, 올리브, 네이비, 바이올렛 및 퍼플 바는 각각 CC-EtDH-FLS, JF-CC-EtDH-FLS, JF-Fe-CC-EtDH-FLS, JF-Ru-CC-EtDH-FLS, JF-Re-CC-EtDH-FLS, JF-Pt-CC-EtDH-FLS 및 JF-Os-CC-EtDH-FLS를 표시한다.

[0247] 상기 도 16의 c를 참조하면, CC-EtDH-FLS를 사용한 EBFC의 작동은 6 시간 후 16.9 %의 아세트인 수율로 100 mM 에탄올에서 8.5 mM의 소량의 아세트인 생성을 나타내어, JF-CC-EtDH-FLS 및 JF-Os-CC-EtDH-FLS보다 각각 2.56

배 및 5.12 배 낮은 것을 확인할 수 있었다. 상기 아세트인 생성 경향은 EBFC 분극 분석에서 관찰된 경향과 유사하였다.

[0248] 또한, CC-EtDH-FLS, JF-CC-EtDH-FLS 및 JF-Os-CC-EtDH-FLS를 애노드로 이용한 EBFC의 작동 6 시간 후 관찰된 잔류 에탄올(블랙), 아세트알데히드(레드) 및 아세트인(블루)를 도 16의 d에 도시하였다. 이때, 퍼플 박스, 라이트 블루 박스 및 오렌지 박스는 각각 CC-EtDH-FLS, JF-CC-EtDH-FLS 및 JF-Os-CC-EtDH-FLS를 표시한다.

[0249] 상기 도 16의 d를 참조하면, CC-EtDH-FLS는 다량의 잔류 에탄올(75.6 mM)을 나타내는 반면, JF-CC-EtDH-FLS 및 JF-Os-CC-EtDH-FLS는 각각 26.5 mM 및 6.1mM의 농도로 더 낮은 잔류 에탄올을 나타내어, 아세트인 생성의 차이가 주로 전자 싱크 역할을 하는 전극 물질의 변화에 기인함을 시사하였다.

[0250] 도 18은 JF-CC-EtDH-FLS 및 JF-Os-CC-EtDH-FLS 애노드를 이용하는 EBFC의 애노드 용액의 기질 및 생성물 프로파일을 도시한다.

[0251] 구체적으로, 도 18의 a는 가스 크로마토그래피 분석 결과, c 및 d는 JF-CC-EtDH-FLS 및 JF-Os-CC-EtDH-FLS의 아세트인 생산에 따른 에탄올 농도의 영향을 도시한다. 이때, 블랙, 레드 및 블루 바는 각각 에탄올, 아세트알데히드 및 아세트인을 각각 표시한다.

[0252] 상기 도 18의 b 및 c를 참조하면, JF-CC-EtDH-FLS 및 JF-Os-CC-EtDH-FLS를 사용하여 에탄올 농도가 증가함에 따라 아세트인 생산이 증가하였고, 유사하게, 아세트알데히드 축적은 이론 수율이 감소함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0253] 최대 아세트인 농도(201.2 mM)는 JF-Os-CC-EtDH-FLS의 에탄올 농도 700 mM에서 관찰되어 이론 수율 57.1 %를 나타낸 반면, JF-CC-EtDH-FLS는 700 mM의 에탄올 농도에서 39.7 %의 이론적인 수율로 최대 139.1 mM의 아세트인 농도를 나타내어, 아세트인 생성의 유의미한 향상은 에탄올의 농도 증가로 관찰되지 않았다. 에탄올 농도의 증가로 아세트알데히드가 축적되는 것은 FLS가 아세트인 생산을 제한한다는 것을 나타낸다.

[0255] 실험예 6. 독성 평가

[0256] 아세트인은 식품 산업에서 널리 사용되기 때문에 생물발광 해양세균인 *Vibrio fischeri*를 사용하여 JF의 급성 독성 분석을 수행하고, 결과를 하기의 표 8에 도시하였다:

표 8

[0257]

Particles	Parameter	EC ₅₀ concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
JF	EC _{50-15min}	1022 $\pm$ 74
	EC _{50-30min}	988 $\pm$ 63
JF-Re	EC _{50-15min}	994 $\pm$ 67
	EC _{50-30min}	946 $\pm$ 55
JF-Os	EC _{50-15min}	1016 $\pm$ 61
	EC _{50-30min}	981 $\pm$ 58
JF-Fe	EC _{50-15min}	1001 $\pm$ 54
	EC _{50-30min}	802 $\pm$ 52
JF-Pt	EC _{50-15min}	1045 $\pm$ 70
	EC _{50-30min}	981 $\pm$ 68
JF-Ru	EC _{50-15min}	986 $\pm$ 46
	EC _{50-30min}	810 $\pm$ 45

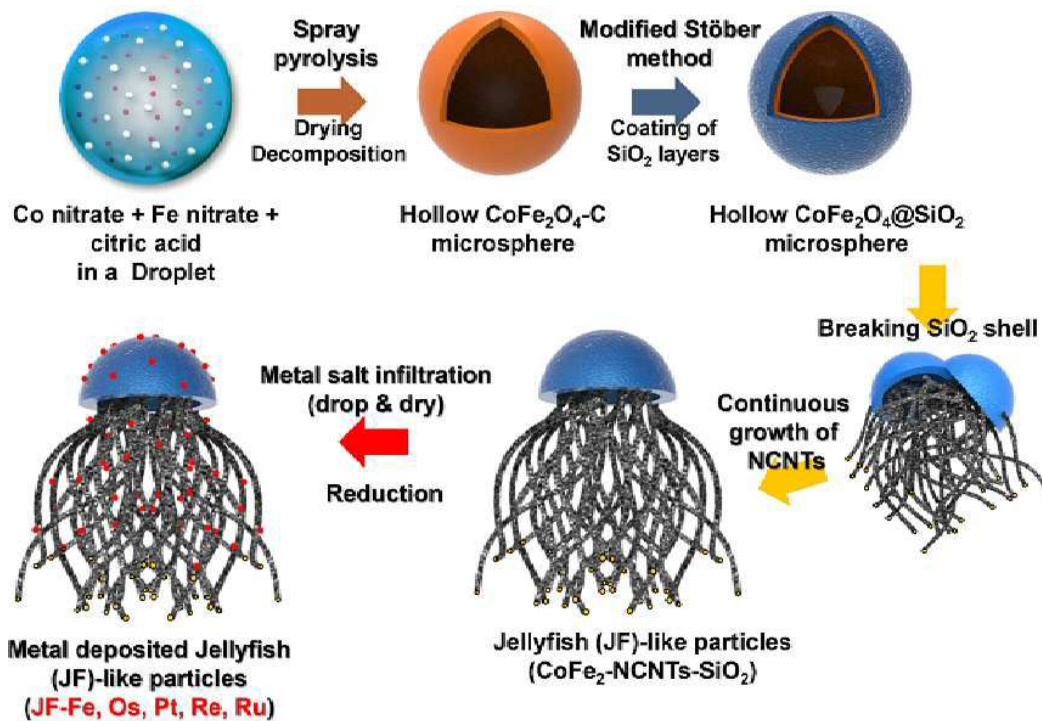
[0258] 상기 표에서, EC_{50-15min} 및 EC_{50-30min}은 각각 인큐베이션 15 분 및 30 분 후 예상되는 생물발광 억제를 나타낸다.

[0259] 상기 표 8을 참조하면, 테스트한 JF-(금속)에 대해 급성 독성 값의 유의미한 차이는 관찰되지 않았고, 이것은 증착되는 금속으로 인한 JF의 변경이 생체 적합성을 변경하지 않았음을 시사한다. JF는 각각 15 분 및 30 분 동안 인큐베이션 후 1022 및 988 $\mu\text{g/mL}$ 의 EC_{50} 값을 나타냈고, JF-0s에 대한 EC_{50} 값은 인큐베이션 15 분 및 30 분 후 각각 1016 및 981 $\mu\text{g/mL}$ 였다.

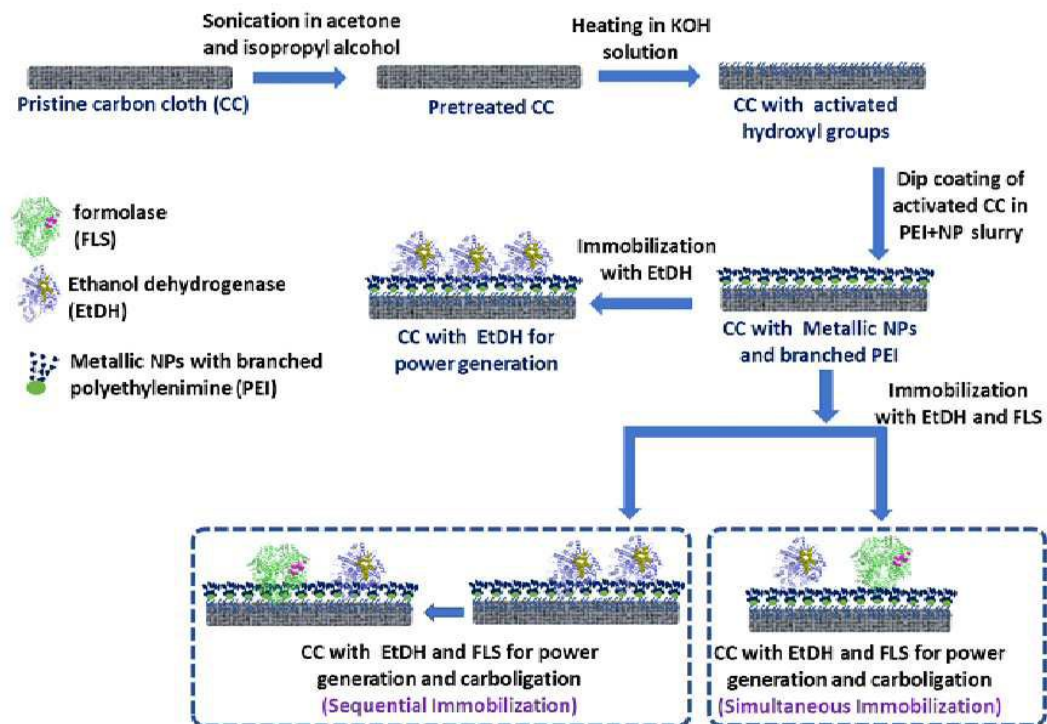
[0261] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

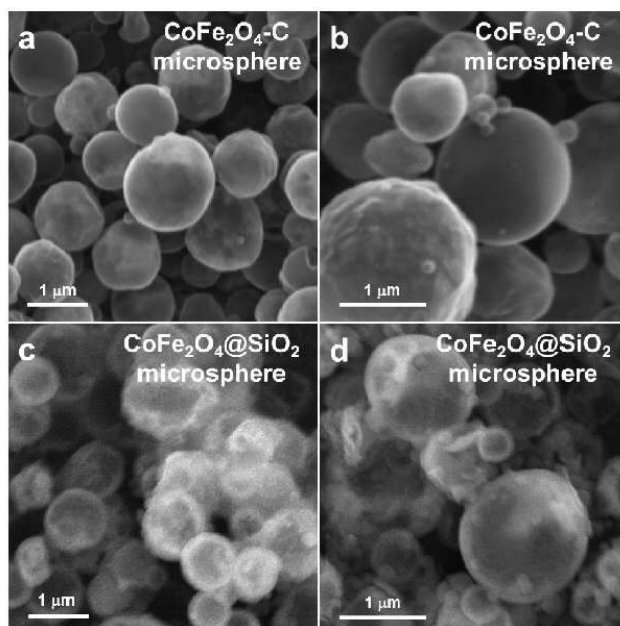
도면1



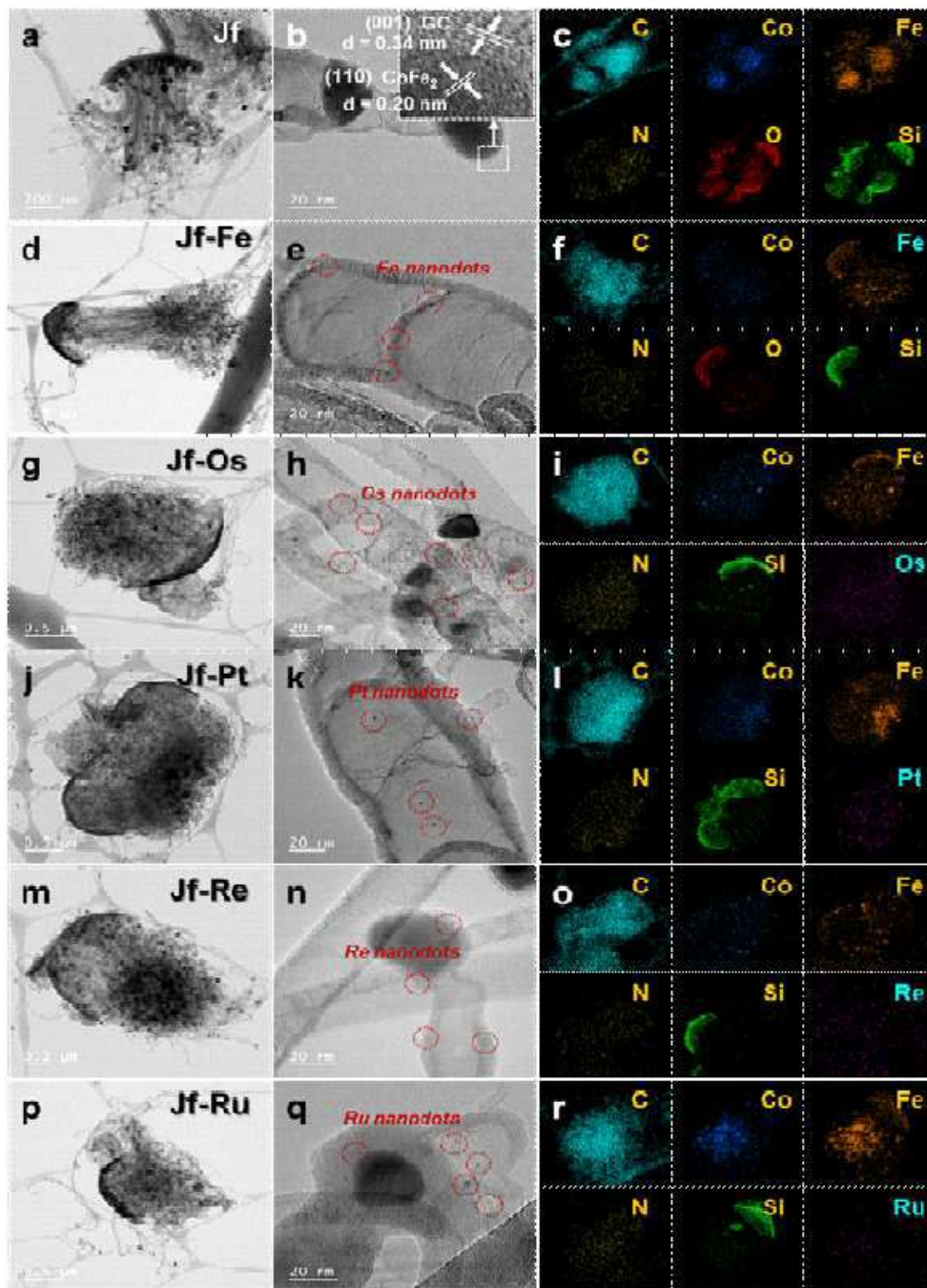
도면2



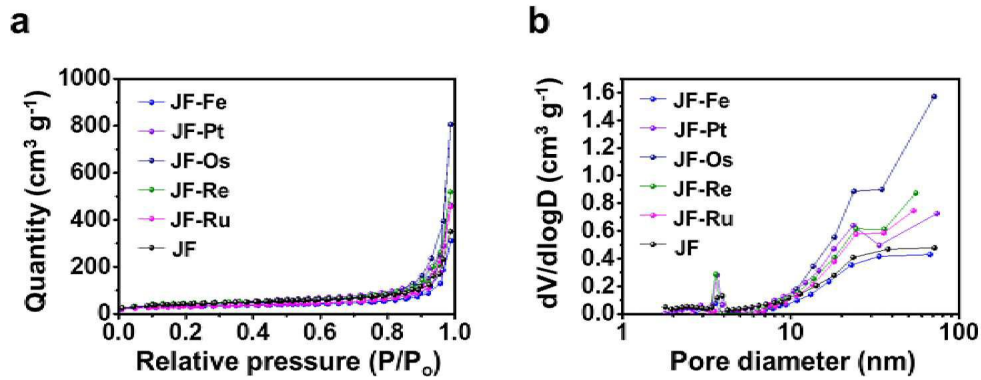
도면3



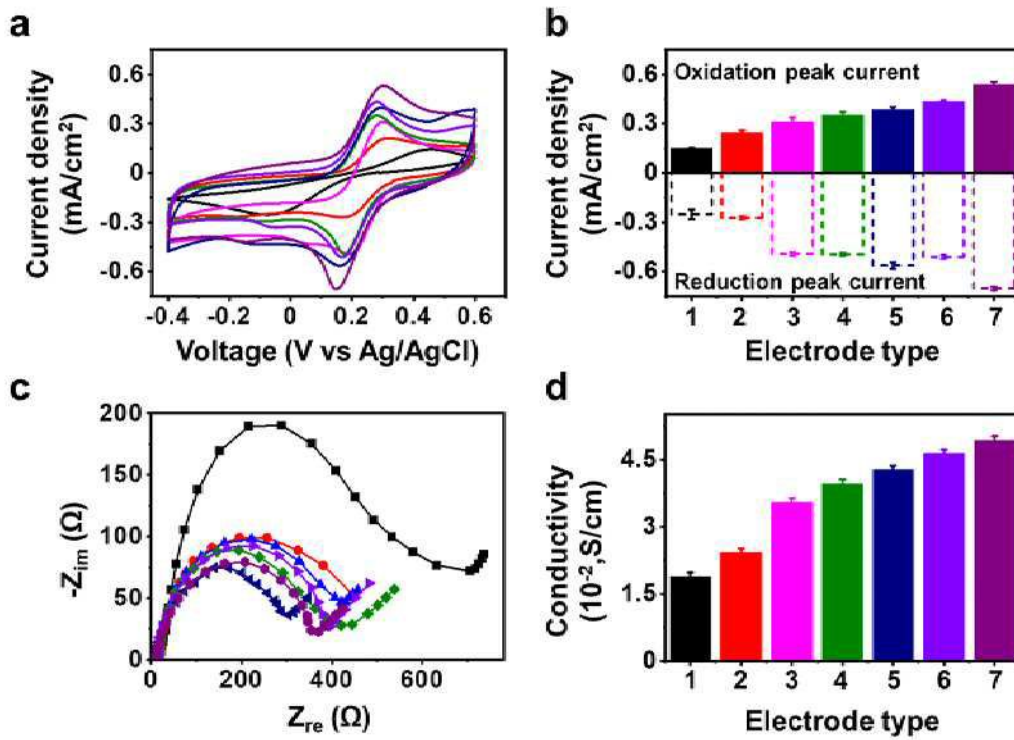
도면4



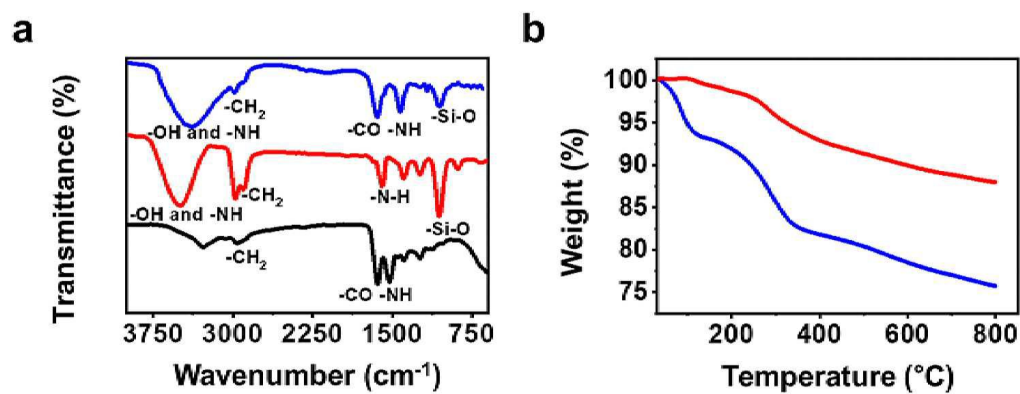
도면5



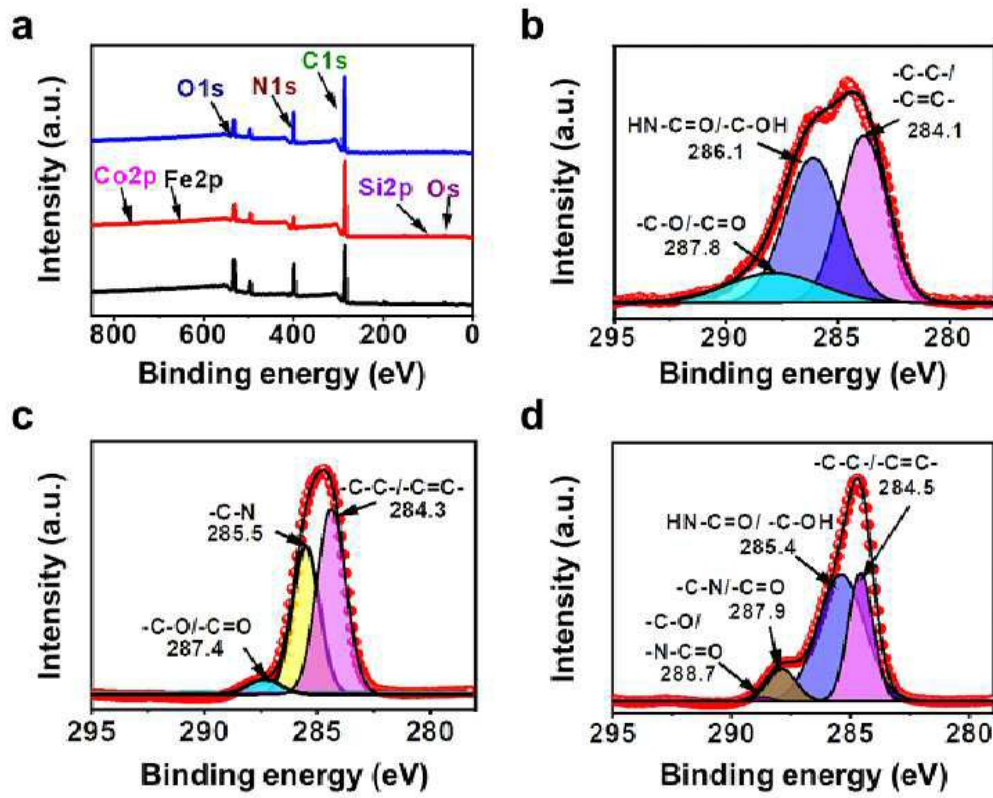
도면6



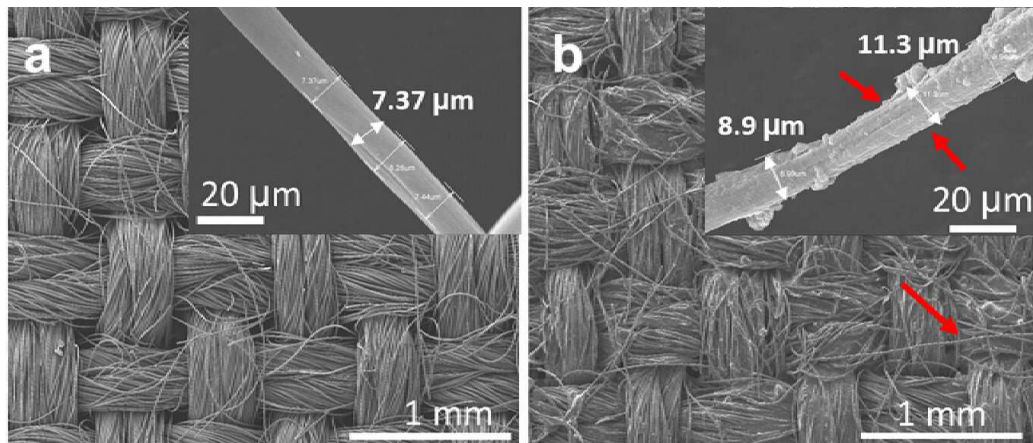
도면7



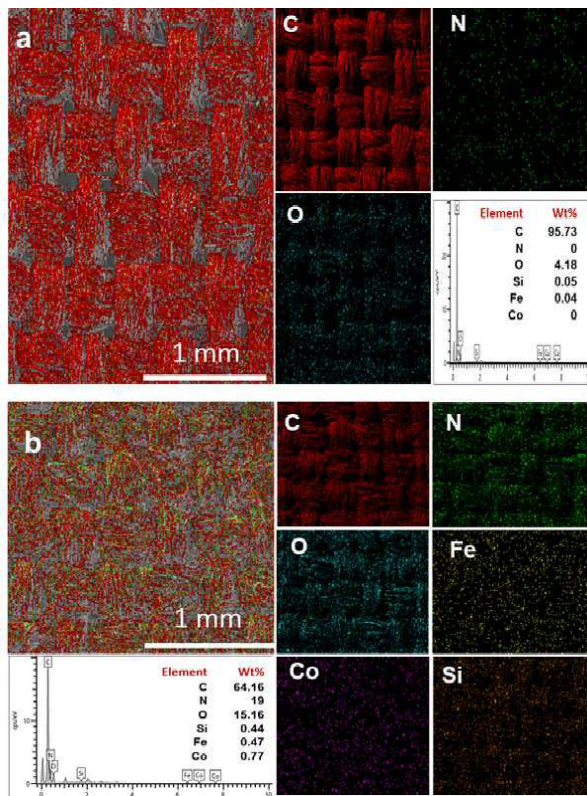
도면8



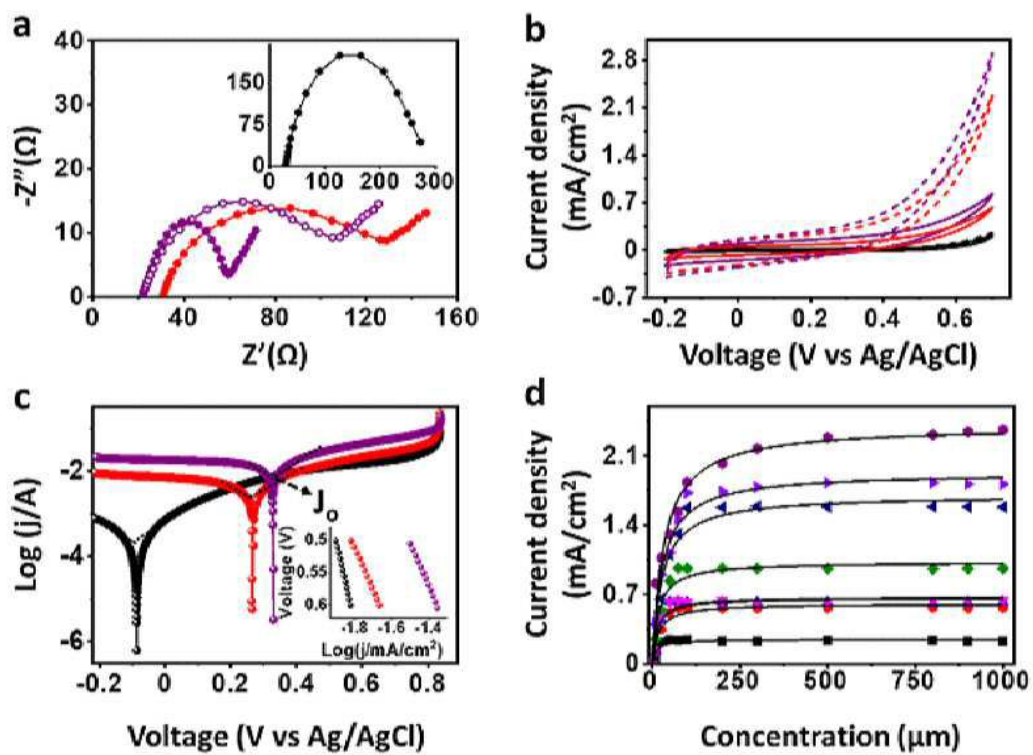
도면9



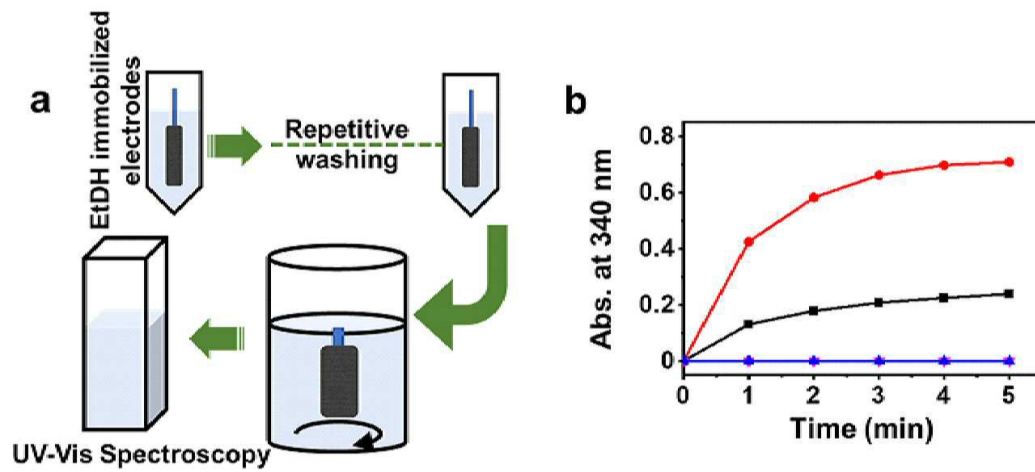
도면10



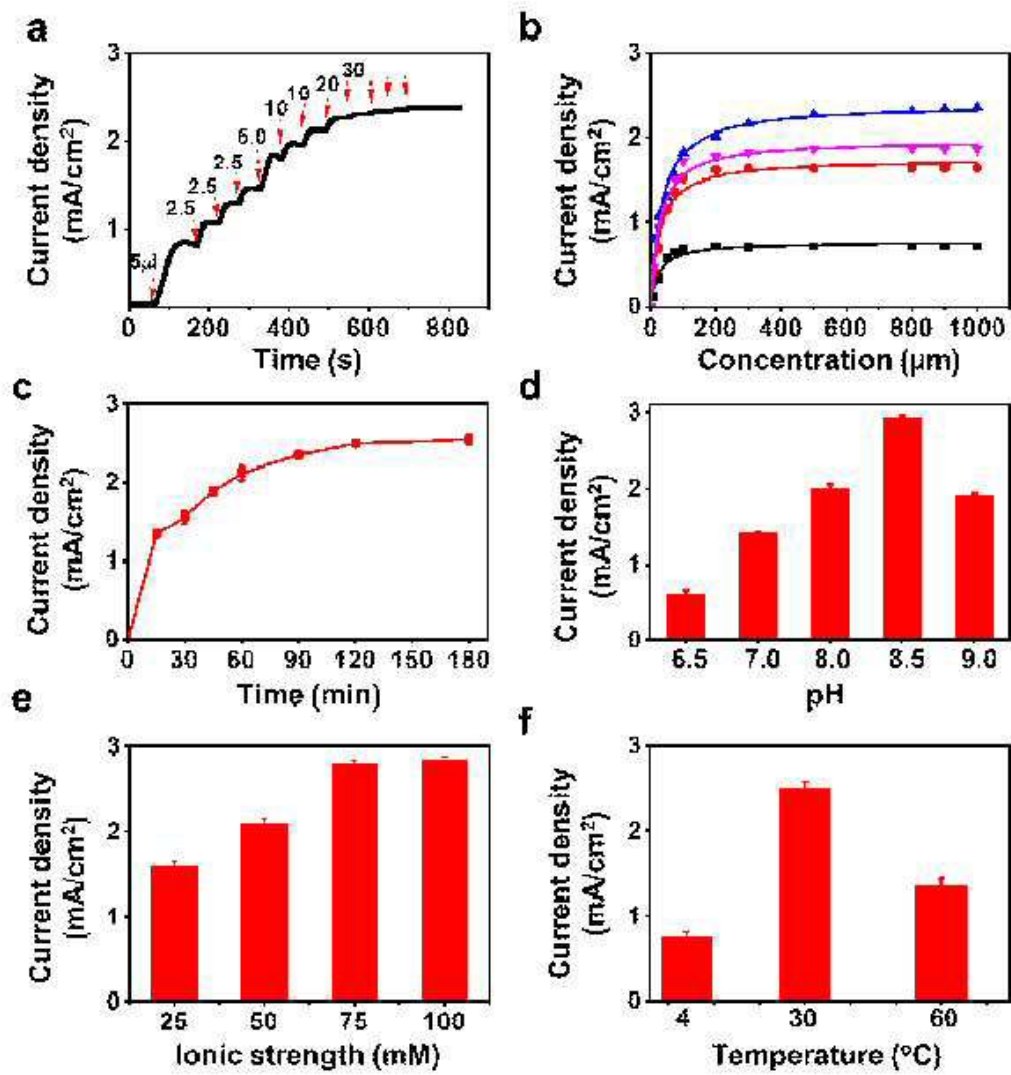
도면11



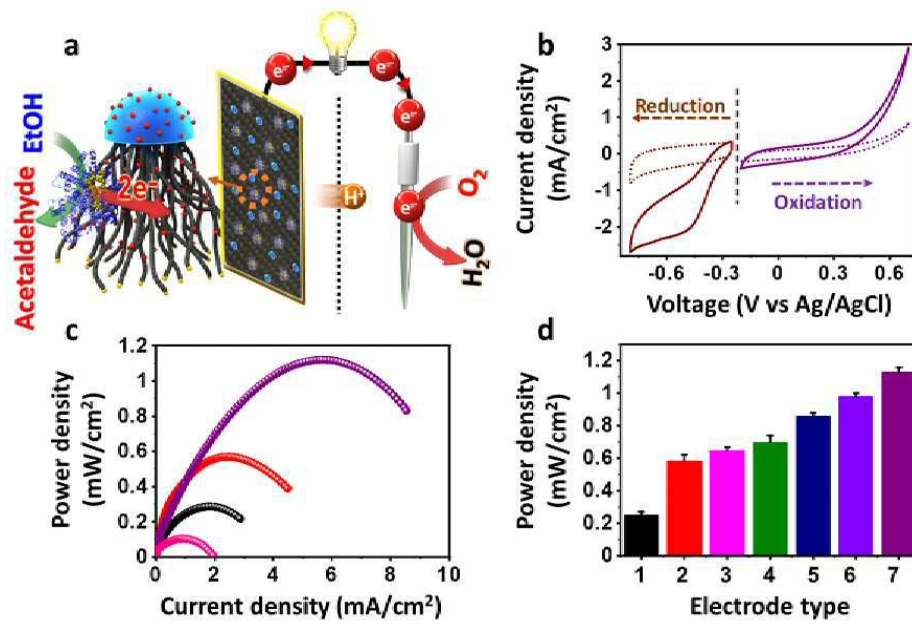
도면12



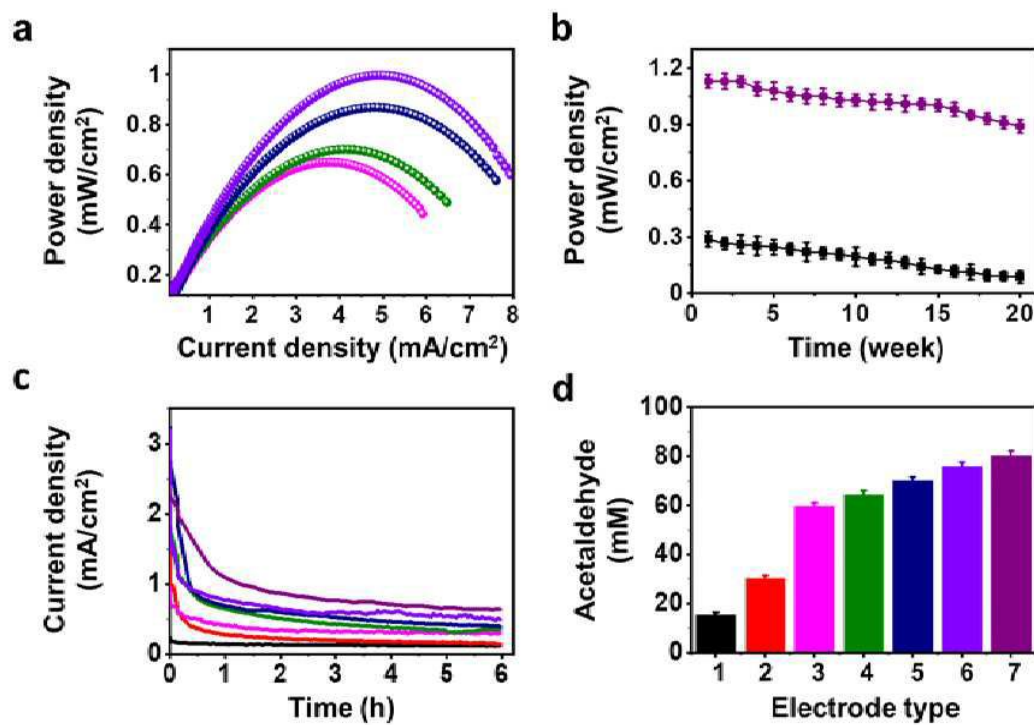
도면13



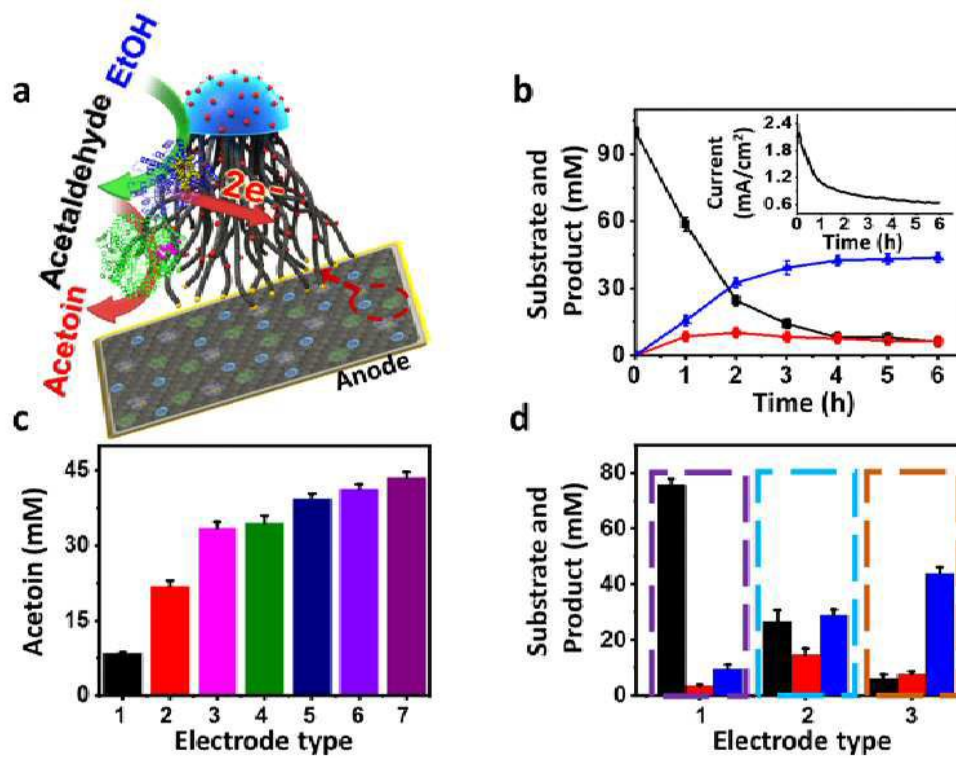
도면14



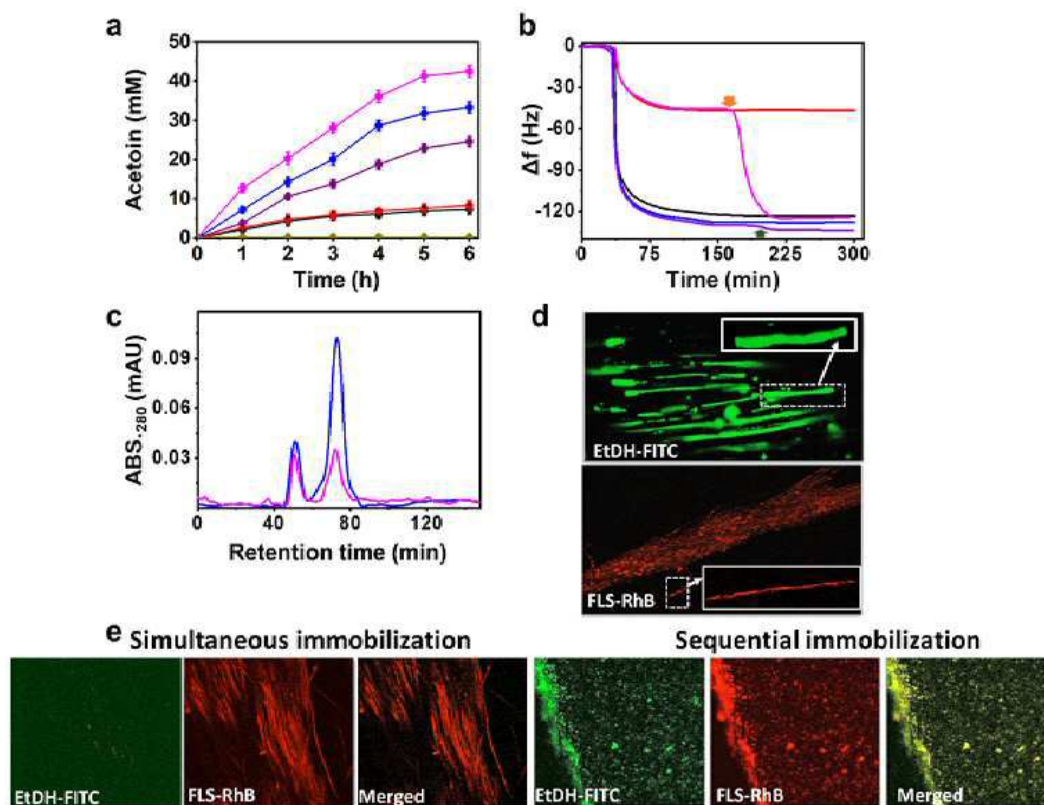
도면15



도면16



도면17



도면18

