



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0147169
(43) 공개일자 2024년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
H01M 4/90 (2006.01) B01J 31/00 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
H01M 4/88 (2006.01) H01M 8/16 (2017.01)
(52) CPC특허분류
H01M 4/9008 (2013.01)
B01J 31/003 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0042739
(22) 출원일자 2023년03월31일
심사청구일자 2023년03월31일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김창준
경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 104동 103호
(평거동, 들말대경아파트)
왕설
경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)
(74) 대리인
특허법인충현

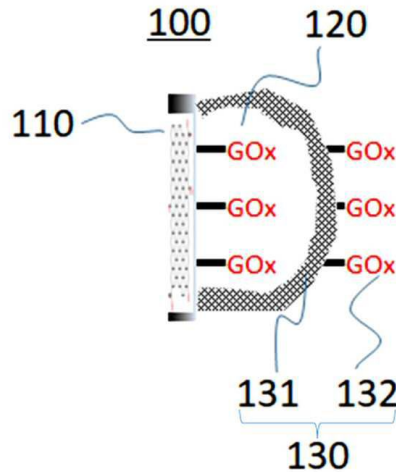
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 산화그래핀을 링커로 하는 효소 전극 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 효소 전극에 관한 것으로서, 산화그래핀을 효소 간의 링커로 설계함으로써, 다량의 효소를 전극 표면에 고정화하는 복잡한 구조에도 불구하고 효소 간의 간섭을 최소화하고, 효소 간의 전자전달 능력을 향상시켜 높은 전류 밀도를 갖도록 할 수 있다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

C12N 9/0006 (2013.01)
C12N 9/2402 (2013.01)
C12Y 101/03004 (2013.01)
C12Y 302/01028 (2013.01)
H01M 4/8825 (2013.01)
H01M 8/16 (2013.01)
Y02E 60/50 (2020.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711163844
과제번호	2020R1F1A1054433
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	땀속의 젖산을 연료로 전기를 생산하는 효소-미토콘드리아 연료전지 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345341781
과제번호	2021RIS-003
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업
연구과제명	작업자 피로도 측정 바이오센서 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2022.08.01 ~ 2023.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 기관;
 상기 환원된 산화그래핀 상에 형성된 제1 효소층;
 상기 제1 효소층 상에 교번적으로 적층된 산화그래핀 층과 제2 효소층; 및
 상기 산화그래핀 층과 상기 제2 효소층은 화학적 결합을 통해 고정화되어 있는 것을 특징으로 하는 효소 전극.

청구항 2

제1항에 있어서,
 상기 기관은 ITO 기관인 것을 특징으로 하는 효소 전극.

청구항 3

제1항에 있어서,
 상기 제1 효소층과 제2 효소층은 글루코스 산화효소, HRP(horseradish peroxidase), NiR(nitrite reductase), 콜레스테롤 산화효소, 글루탐릭 옥살아세트 트랜스미나아제(Glutamic Oxaloacetic Transaminase; GOT) 및 글루탐릭 피루빅 트랜스미나아제(Glutamic Pyruvic Transaminase; GPT) 및 트레할로스 분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소 전극.

청구항 4

제1항에 있어서,
 상기 제2 효소층 상에 하나 또는 하나 이상의 층으로 이루어진 제3 효소층;이 더 포함되는 것을 특징으로 하는 효소 전극.

청구항 5

제1항에 있어서,
 상기 제3 효소층은 트레할로스 분해효소 단일층 또는 산화된 트레할로스 분해효소와 트레할로스 분해효소로 이루어진 이중 또는 산화된 트레할로스 분해효소와 트레할로스 분해효소 및 산화된 트레할로스 분해효소로 이루어진 삼층 중에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소 전극.

청구항 6

- 산화그래핀을 기관 표면에 접촉시키고, 시간 전류법(chronoamperometry, CA)을 이용하여 개질하는 단계;
- 상기 산화그래핀으로 개질된 기관을 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)을 이용하여 환원하는 단계;
- b) 단계로부터 제조된 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 기관 상에 제1 효소층을 고정화하는 단계;
- 상기 제1 효소층 상에 시간 전류법(chronoamperometry, CA)을 이용하여 산화그래핀을 증착하는 단계; 및
- 상기 산화그래핀 상에 제2 효소층을 고정화하는 단계;를 포함하는 효소 전극의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,
 상기 d) 단계와 e) 단계는 1 내지 5회 반복하는 것을 특징으로 하는 효소 전극의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 시간 전류법(chronoamperometry, CA)은 하기 조건으로 수행되는 것을 특징으로 하는 효소 전극의 제조방법.

- 전압 인가시 단위 사이클 : 양의 전압(V+)과 음의 전압(V-)의 순차적 인가
- V+ 크기 및 V+ 인가 시간(t+): 0.5 내지 1.5V 및 60 내지 100 sec
- V- 크기 및 V- 인가 시간(t-) : -1.0 내지 -1.5V 및 60 내지 100 sec
- 단위 사이클 반복 횟수 : 10 내지 60회.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)은 -1.5 V 내지 +1.5 V에서 5 내지 20 mV/s의 속도로 10 내지 60 회 사이클 반복 횟수로 수행되는 것을 특징으로 하는 효소 전극의 제조방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 제1 효소층과 제2 효소층은 글루코스 산화효소, HRP(horseradish peroxidase), NiR(nitrite reductase), 콜레스테롤 산화효소, 글루탐릭 옥살아세트 트랜스미나아제(Glutamic Oxaloacetic Transaminase; GOT) 및 글루탐릭 피루빅 트랜스미나아제(Glutamic Pyruvic Transaminase; GPT) 및 트레할로스 분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소 전극의 제조방법.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 e) 단계 이후,

상기 f) 상기 제2 효소층 상에 제3 효소층을 고정화하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 효소 전극의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 제3 효소층은 트레할로스 분해효소인 것을 특징으로 하는 효소 전극의 제조방법.

청구항 13

제1항에 따른 효소 전극을 포함하는 연료전지 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 산화그래핀을 링커로 하는 효소 전극에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 다층 효소 전극에서 효소와 효소 간의 결합 및 고정화를 위해 산화 그래핀을 사용함으로써 전도성 손실을 최소화한 효소 전극 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 센서, 초소형 전자 소자에 전력을 공급하는 소형 전원 시스템에 대한 개발이 활발히 진행되고 있다. 이 중에서도 바이오 전자 소자의 핵심성분인 효소는 전통적인 전기 화학적 촉매를 대체하여 생화학적 반응을 촉진하는 생 촉매로써, 재생가능하고 오랫동안 지속가능한 에너지 자원을 사용한다는 점에서 각광받고 있다.

- [0003] 효소의 활성부위는 효소 내에 깊숙이 숨겨져 있어 불안정성하고, 효소와 전극표면의 효율적인 전자 전달에 어려움이 있는 등 생물학적 전자 소자의 개발에 결정적인 결점이 존재한다.
- [0004] 이를 극복하기 위하여 많은 연구자들이 효소를 고정화할 수 있고, 전자전달능력이 우수한 전극 소재를 개발하고자 노력하였고, 그 결과 전자전달을 위한 다양한 전달체(탄소나노튜브, 그래핀 및 금 나노입자)들이 개발되었다.
- [0005] 이 중에서도 그래핀은 높은 열 전도성, 전기 전도성 및 기계적 물성으로 인해 가장 널리 활용되었으나, 환원된 산화그래핀(rGO)은 구조적·화학적으로 안정하여 서로 뭉치려는 경향이 강하기 때문에 다른 전극 재료들과 쉽게 혼합되지 않고 전극 개질에 필요한 분산액 제조를 위해 물 또는 친수성 용매를 사용하기 어렵다는 문제가 존재하며, 산화그래핀(graphene oxide, GO)은 전기가 통하지 않는 절연체(insulator)이므로 전극 재료로 사용할 수 없다는 문제가 존재했다.
- [0006] 상술한 문제를 해결하기 위하여, 산화그래핀을 기판 상에 증착하고 환원하여 전도체로 사용하는 방법이 개발되었으나, 종래 알려진 환원방법들은 다량의 화학약품이 요구되어 환경 친화적이지 못하며 전극에 잘 고정되지 않아 균일하고 안정된 표면을 제공하기 어려우며, 특히 효소 전극으로 적용할 경우 효소에 의해 산화되어 발생하는 전자를 전극으로 전달하지 못해 한 층 이상의 효소를 고정하지 못하거나 기질에 대한 효소 활성이 떨어지는 문제가 있었다.
- [0007] 이에 그래핀 또는 그래핀 산화물 사용에 따른 문제점을 해소하면서도, 다층의 효소를 증착한 형태의 효소 전극을 도출해낼 수 있는 새로운 형태, 새로운 방법의 효소 전극에 대한 개발이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허공보 제10-2016-0107464호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 다층 구조의 효소층을 포함하는, 우수한 전극 특성과 안정성을 갖는 효소 전극을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 효소 전극을 대량 생산할 수 있는 효소 전극의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 전극; 상기 환원된 산화그래핀 상에 형성된 제1 효소층; 상기 제1 효소층 상에 교번적으로 적층된 산화그래핀 층과 제2 효소층; 및 상기 산화그래핀 층과 상기 제2 효소층은 화학적 결합을 통해 고정화되어 있는 것을 특징으로 하는 효소 전극을 제공한다.
- [0012] 상기 전극은 ITO 기판일 수 있다.
- [0013] 상기 제1 효소층과 제2 효소층은 글루코스 산화효소, HRP(horseradish peroxidase), NiR(nitrite reductase), 콜레스테롤 산화효소, 글루탐릭 옥살아세트 트랜스미나아제(Glutamic Oxaloacetic Transaminase; GOT) 및 글루탐릭 피루빅 트랜스미나아제(Glutamic Pyruvic Transaminase; GPT) 및 트레할로스 분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0014] 상기 제2 효소층 상에 하나 또는 하나 이상의 층으로 이루어진 제3 효소층;이 더 포함되는 것일 수 있다.
- [0015] 상기 제3 효소층은 트레할로스 분해효소 단일층 또는 산화된 트레할로스 분해효소와 트레할로스 분해효소로 이루어진 이중 또는 산화된 트레할로스 분해효소와 트레할로스 분해효소 및 산화된 트레할로스 분해효소로 이루어진 삼중 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0016] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 하기 단계를 포함하는 효소 전극의 제조방법을 제공한다.

- [0017] a) 산화그래핀을 기판 표면에 접촉시키고, 시간 전류법(chronoamperometry)을 이용하여 개질하는 단계;
- [0018] b) 상기 산화그래핀으로 개질된 기판을 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)을 이용하여 환원하는 단계;
- [0019] c) b) 단계로부터 제조된 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 기판 상에 제1 효소층을 고정화하는 단계;
- [0020] d) 상기 제1 효소층 상에 시간 전류법(chronoamperometry)을 이용하여 산화그래핀을 증착하는 단계; 및
- [0021] e) 상기 산화그래핀 상에 제2 효소층을 고정화하는 단계.
- [0022] 상기 d) 단계와 e) 단계는 1 내지 5회 반복될 수 있다.
- [0023] 상기 시간 전류법(chronoamperometry)는 하기 조건으로 수행되는 것일 수 있다.
- [0024] - 전압 인가시 단위 사이클 : 양의 전압(V+)과 음의 전압(V-)의 순차적 인가
- [0025] - V+ 크기 및 V+ 인가 시간(t+): 0.5 내지 1.5V 및 60 내지 100 sec
- [0026] - V- 크기 및 V- 인가 시간(t-): -1.0 내지 -1.5V 및 60 내지 100 sec
- [0027] - 단위 사이클 반복 횟수 : 10 내지 60회.
- [0028] 상기 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)은 -1.5 V 내지 +1.5 V에서 5 내지 20 mV/s의 속도로 10 내지 60 회 사이클 반복 횟수로 수행되는 것일 수 있다.
- [0029] 상기 제1 효소층과 제2 효소층은 서로 독립적으로 글루코스 산화효소, HRP(horseradish peroxidase), NiR(nitrite reductase), 콜레스테롤 산화효소, 글루타믹 옥살아세틱 트랜스미나아제(Glutamic Oxaloacetic Transaminase; GOT) 및 글루타믹 피루빅 트랜스미나아제(Glutamic Pyruvic Transaminase; GPT) 및 트레할로스 분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0030] 상기 e) 단계 이후, 상기 f) 상기 제2 효소층 상에 제3 효소층을 고정화하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0031] 상기 제3 효소층은 트레할로스 분해효소 및 산화된 트레할로스 분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0032] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 상기 효소 전극을 포함하는 연료전지 시스템을 제공한다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명에 따르면, 효소 전극은 산화그래핀을 효소 간의 링커로 설계함으로써, 다량의 효소를 전극 표면에 고정화하는 복잡한 구조에도 불구하고 효소 간의 간섭을 최소화하고, 효소 간의 전자전달 능력을 향상시켜 높은 전류 밀도를 갖도록 할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 효소 전극은 저렴하면서도 대량 생산이 가능한 시간 전류법(chronoamperometry)과 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)으로 산화그래핀을 증착 및 환원하므로 전자전달 저항을 최소화하면서 과량의 효소를 고정화할 수 있을 뿐만 아니라, 서로 다른 효소(이효소)를 용이하게 고정할 수 있어 다양한 분야에 활용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 효과는 상술한 효과로 한정되는 것은 아니며, 언급되지 아니한 효과들은 본원 명세서 및 첨부된 도면으로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1a는 ITO-GO의 제조과정과 전기화학 반응셀을 개략적으로 도시한 도면이고, 도 1b는 ITO-GO와 ITO-rGO의 제조과정을 도시한 도면이며, 도 1c는 전극의 전기화학적 분석을 위한 스몰셀(small cell) 구조를 개략적으로 도시한 도면이다.
- 도 2a는 본 발명의 제1 실시예에 따른 효소전극의 모식도이고, 도 2b는 본 발명의 제2 실시예에 따른 효소전극의 모식도이며, 도 2c는 본 발명의 제3 실시예에 따른 효소전극의 모식도이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 전극 제조방법의 모식도이다.
- 도 4는 ITO 투명기판 상에 산화그래핀(GO)을 시간 전류법(chronoamperometry)으로 증착할 때, 시간 전류법

(chronoamperometry) 조건에 따른 결과 그래프이다.

도 5는 시간 전류법(chonoamperometry) 조건에 따라 제조된 ITO-GO(60초, 80초, 100초)의 실제 모습을 촬영한 사진이다.

도 6은 환원조건(CV 사이클 수)을 달리하여 제조된 ITO-rGO에 대한 CV(cyclic voltammetry) 결과 그래프이다.

도 7은 환원조건(CV 사이클 수:30, 60)을 달리하여 제조된 ITO-rGO의 실제 모습을 촬영한 사진이다.

도 8은 실시예 1-5 및 실시예 2-5로부터 제조된 단층 효소 전극(ITO-rGO-GOx, ITO-rGO-GOx-Tre)에 대한 CV(cyclic voltammetry) 분석 결과이다.

도 9는 실시예 3-4, 3-5, 3-6로부터 제조된 다층 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx)에 대한 CV(cyclic voltammetry) 분석 결과이다.

도 10은 실시예 4-5 및 실시예 4-10으로부터 제조된 다층 이효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre/Tre-Tre)에 대한 CV(cyclic voltammetry) 분석 결과이다.

도 11은 실시예 4-5(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre) 및 실시예 8 내지 10으로부터 제조된 다층 이효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre^{oxy}, Tre^{oxy}-Tre, Tre^{oxy}-Tre-Tre^{oxy})에 대한 CV(cyclic voltammetry) 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.
- [0038] 본 발명의 목적들, 다른 목적들, 특징들 및 이점들은 첨부된 도면과 관련된 이하의 바람직한 실시예들을 통해서 쉽게 이해될 것이다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 통상의 기술자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.
- [0039] 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0040] 본 명세서에 있어서, 범위가 변수에 대해 기재되는 경우, 상기 변수는 상기 범위의 기재된 종료점들을 포함하는 기재된 범위 내의 모든 값들을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, "5 내지 10"의 범위는 5, 6, 7, 8, 9, 및 10의 값들뿐만 아니라 6 내지 10, 7 내지 10, 6 내지 9, 7 내지 9 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 5.5, 6.5, 7.5, 5.5 내지 8.5 및 6.5 내지 9 등과 같은 기재된 범위의 범주에 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다. 또한 예를 들면, "10% 내지 30%"의 범위는 10%, 11%, 12%, 13% 등의 값들과 30%까지를 포함하는 모든 정수들뿐만 아니라 10% 내지 15%, 12% 내지 18%, 20% 내지 30% 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 10.5%, 15.5%, 25.5% 등과 같이 기재된 범위의 범주 내의 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다.
- [0041] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0042] 본 발명의 일 측면은 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 전극; 상기 환원된 산화그래핀 상에 형성된 제1 효소층; 상기 제1 효소층 상에 교번적으로 적층된 산화그래핀 층과 제2 효소층; 및 상기 산화그래핀 층과 상기 제2 효소층은 화학적 결합을 통해 고정화되어 있는 것을 특징으로 하는 효소 전극에 관한 것이다.
- [0043] 도 2a는 본 발명의 제1 실시예에 따른 효소 전극의 모식도이고, 도 2b는 본 발명의 제2 실시예에 따른 효소 전극의 모식도이며, 도 2c는 본 발명의 제3 실시예에 따른 효소 전극의 모식도이다.
- [0044] 도 2a를 참조하면, 본 발명의 제1 실시예에 따른 효소 전극(100)은 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 기판(110); 상기 환원된 산화그래핀(110) 상에 형성된 제1 효소층(120); 상기 제1 효소층(120) 상에 교번적으로 적층된 산화그래핀 층(131)과 제2 효소층(132); 및 상기 산화그래핀 층(131)과 상기 제2 효소층(132)은 화학적 결합을 통해 고정화되어 있다.
- [0045] 상기 기판(110)은 당업계에서 전극으로 사용되는 소재라면 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 금, 백금, 탄소, ITO(indium tin oxide) 및 반도체성 물질로부터 구성된 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람

직하게는 ITO 기판일 수 있다.

- [0046] 본 발명에 따른 효소 전극(100)은 작동 전극으로 활용될 수 있으며, ITO 기판을 사용하는 경우, 칩 형태로 제작이 용이하며, 바탕 전류의 영향이 낮으며, 투명성 때문에 분광학적 신호 또한 측정할 수 있다는 장점을 갖는다.
- [0047] 본 발명에 따른 효소 전극(100)은 작동 전극으로써, 효소가 고정되어 산화·환원 반응에 의한 전류를 감지하는 역할을 하며, 재질에 대해 특별한 제한이 없으나, 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 것일 수 있다. 특히 본 발명에 따른 효소 전극(100)은 산화그래핀을 시간 전류법(chronoamperometry)과 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)으로 효소 간의 링커로 적층함으로써, 간단하고 용이하며 저가의 방법을 통해 고도로 구조화된 다중구조의 효소층을 구현할 수 있으며, 효소 간의 간섭을 최소화하여 현저하게 향상된 표면적 및 활성 부위를 가져 높은 전류 밀도와 민감도를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 또한 간단하고 용이하며 저가의 방법을 통해 다층 구조의 효소층을 갖는 본 발명의 효소 전극(100)을 대량 생산할 수 있다.
- [0048] 본 발명에서, 산화그래핀은 흑연(그래파이트)을 질산, 황산, 염산 등의 강산을 이용하여 산화시켜 형성되며, 표면에 히드록실기(hydroxyl group)와 에폭시기(epoxy group)가 존재하고 끝부분에는 카르복실기(carboxyl group)와 케톤기(ketone group) 등의 산소 함유 관능기를 포함한다. 이러한 산소 작용기들 때문에 산화그래핀은 친수성이 되고 물에 산화그래핀을 넣고 초음파 처리를 해주면 카본 원자 한 장으로 구성된 프레임을 가지고 있는 산화그래핀이 쉽게 박리가 되고 안정된 분산액을 대량으로 얻을 수 있게 된다. 그러나 산화시키는 과정에서 sp² 혼성 구조가 깨지기 때문에 전기 전도도를 포함한 그래핀 고유의 뛰어난 물리적 특성이 없어지게 된다. 따라서 이후, 산화그래핀에 환원제나 높은 열을 처리해주면 산소 작용기들이 제거되고 sp² 혼성 구조가 복원되면서 환원된 산화그래핀이 생성되어, 고유의 물리적 특성이 복원된다. 본 발명에서는 효소를 사용하므로 화학물질의 환원제가 없이 산화그래핀을 환원하기 위하여 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)을 수행하여 환원된 산화그래핀(rGO)을 생성한다.
- [0049] 상기 기판(110) 표면에 산화 그래핀을 증착하고, 환원하기 위하여 시간 전류법(chronoamperometry)과 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)을 사용할 수 있다.
- [0050] 상술한 방법을 통해 제조된, 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 기판(110)은 효소 고정화 전에, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드(EDC) 및 N-히드록시숙신이미드(NHS)를 첨가하여 카르복시기를 아민기에 반응성이 높은 N-히드록시숙신이미드(NHS)로 전환할 수 있다.
- [0051] 상기 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 기판(110) 상에 제1 효소층(120)이 형성되고, 이는 기판(110)의 일면에 증착된 환원된 산화그래핀의 카르복시기 또는 NHS기에 제1 효소의 아민기가 공유 결합 또는 화학적 결합을 통해 고정화된 것일 수 있다.
- [0052] 단일층의 효소만이 고정화된 효소 전극은 전극에 흡착되는 효소의 양에 한계가 있으므로 효율이 낮다는 단점이 있다. 그러나 본 발명은 기판 상에 효소가 고정된 후 산화그래핀을 링커로 도입함으로써 물과 같은 극성 용매, 생체 내 조건과 유사한 완충액 내에서 효소의 안정성이 유지되며, 화학결합에 의한 강력한 부착성과 흡착되는 효소의 양을 절대적으로 증가시키면서 전자전달을 용이하게 설계함으로써 정확도와 고효율을 구현할 수 있다(동일한 기질 내에서 우수한 전류밀도를 달성할 수 있다).
- [0053] 구체적으로, 상기 제1 효소층(120) 상에 교번적으로 적층된 산화그래핀 층(131)과 제2 효소층(132)을 포함한다. 상기 산화그래핀 층(131)과 제2 효소층(132)은 상기 제1 효소층(120) 상에 교번적으로 배치되어 기판(110)으로의 전자 이동이 용이하도록 할 수 있다. 상기 실시예에서 교번적으로 배치된 산화그래핀 층(131)과 제2 효소층(132)을 통해 효소의 고정화 양이 증가하더라도 생화학적 반응은 유지되도록 하여 전기화학적 특성의 저하없이 전자전달이 용이하게 발생할 수 있다.
- [0054] 상기 산화그래핀 층(131)과 제2 효소층(132)은 1층 이상일 수 있으며, 바람직하게는 1층 내지 10층일 수 있고, 1층 내지 5층일 수 있으며, 1층 내지 2층인 것이 효소 고정화에 의한 전압과 전류의 감소없이 가장 높은 전기화학적 특성을 얻을 수 있다.
- [0055] 상기 제1 효소층(120)과 제2 효소층(132)은 서로 독립적으로 산화환원효소, 가수분해 효소, 전이 효소, 이성화 효소 등을 사용할 수 있으며 이에 대한 특별한 제한이 있는 것은 아니나, 예를 들어 글루코스 산화효소, HRP(horseradish peroxidase), NiR(nitrite reductase), 콜레스테롤 산화효소, 글루타믹 옥살아세트 트랜스미나아제(Glutamic Oxaloacetic Transaminase; GOT) 및 글루타믹 피루빅 트랜스미나아제(Glutamic Pyruvic Transaminase; GPT) 및 트레할로스 분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 글루코스 산화효소 또는 트레할로스 분해효소일 수 있으며, 가장 바람직하게는 글루코스 산화효소일

수 있다.

- [0056] 본 발명에서의 효소 전극(100)은 환원된 산화그래핀을 사용하더라도 단일층(제1 효소층(120))만이 구비되는 경우, 효소의 고정량이 적어 연료전지 시스템으로 활용하기에 전류량이 충분하지 않다. 따라서 효소의 고정량을 확보하기 위하여 다층 구조의 효소를 설계할 필요가 있으나, 효소가 다층으로 결합될 경우에는 효소층의 뭉침 현상이 발생하거나 효소로부터 전자전달이 감소되고, 불안정한 효소층을 형성시킬 수 있기 때문에 오히려 전류량이 낮아지는 문제가 있다. 상술한 문제점을 해결하기 위하여 제1 효소층(120)과 제2 효소층(132) 사이에 산화그래핀을 증착하여 전자전달을 향상시키고, 효소층을 견고하게 고정하도록 하여 고성능 효소 전극을 얻을 수 있었다.
- [0057] 도 2b는 본 발명의 제2 실시예에 따른 효소 전극(100a)에 대한 모식도로, 이는 산화그래핀 층(131a)과 제2 효소층(132a)이 복수 개 연결된 효소 전극(100a)을 개략적으로 도시한 도면이다.
- [0058] 상기 제2 실시예에 관한 효소 전극(100a)은 산화그래핀 층(131a)과 제2 효소층(132a)이 교번적으로 적층된 하나의 층(130a)이 복수 개 결합된 것으로, 상기 제 1 효소층(120a) 상에 산화그래핀 층(131a)이 증착되고, 상기 산화그래핀 층(131a) 상에 제2 효소층(132a)이 고정화되고, 상기 제2 효소층(132a) 상에 산화그래핀 층(133a)이 증착되고, 상기 산화그래핀 층(133a) 상에 제2 효소층(134a)이 고정화될 수 있다. 이때 층(130a)의 개수는 특별히 제한되지 않으나 필요에 따라 변경될 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 10층, 1 내지 5층, 1 내지 2층일 수 있다. 후술하는 실험예에서 상기 산화그래핀 층(131a)과 제2 효소층(132a)의 개수에 따른 전기화학적 성능을 분석하였고, 그 결과 1 내지 2층인 것이 성능을 2.4 내지 2.6배 향상시킬 수 있음을 확인한 바, 1 내지 2층인 것이 가장 바람직하다.
- [0059] 도 2c는 본 발명의 제3 실시예에 따른 효소 전극(100b)에 대한 모식도로, 이는 상기 제2 효소층(132) 상에 하나 또는 하나 이상의 층으로 이루어진 제3 효소층(140b);이 더 포함된 효소 전극(100b)을 개략적으로 도시한 도면이다.
- [0060] 도 2c를 참조하면, 제3 실시예에 따른 효소 전극(100b)에 관하여 보다 상세히 알 수 있다.
- [0061] 상기 효소 전극(100b)은 상기 제2 효소층(132) 상에 하나 또는 하나 이상의 층으로 이루어진 제3 효소층(140b);이 더 포함하여, 글루코스가 아닌 다른 기질을 원료로 전력 발생이 가능하도록 할 수 있다.
- [0062] 일례로 제3 효소층(140b)은 트레할로스 분해효소 및 산화된 트레할로스 분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있는데, 이는 곤충의 체액에 들어있는 트레할로스(trehalose)라는 당 성분을 원료로 전력 발생이 가능하도록 할 수 있다. 상기 트레할로스가 포도당으로 분해되고, 산화환원반응에 의해 전극에서 전력이 생성될 수 있도록 한다.
- [0063] 상기 제3 효소층(140b)의 층 수는 제한되지 않고 필요에 따라 변경될 수 있으며, 구체적으로 트레할로스 분해효소로 이루어진 단일층이거나, 산화된 트레할로스 분해효소와 트레할로스 분해효소로 이루어진 이중이거나, 또는 산화된 트레할로스 분해효소와 트레할로스 분해효소 및 산화된 트레할로스 분해효소로 이루어진 삼층 구조일 수 있다(미도시).
- [0064] 상기 제3 효소층(140b)이 1층 이상일 경우, 효소 간의 링커로 산화된 효소(예컨대 산화된 트레할로스 분해효소)를 사용하면 효소 간의 전압 및 전류를 감소시키지 않고 구성된 효과를 얻을 수 있다.
- [0065] 본 발명의 다른 측면은 하기 단계를 포함하는 효소 전극의 제조방법에 관한 것이다.
- [0066] a) 산화그래핀을 기관 표면에 접촉시키고, 시간 전류법(chronoamperometry)을 이용하여 개질하는 단계;
- [0067] b) 상기 산화그래핀으로 개질된 기관을 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)을 이용하여 환원하는 단계;
- [0068] c) b) 단계로부터 제조된 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 기관 상에 제1 효소층을 고정화하는 단계;
- [0069] d) 상기 제1 효소층 상에 하기 조건의 시간 전류법(chronoamperometry)을 이용하여 산화그래핀을 증착하는 단계; 및
- [0070] e) 상기 산화그래핀 상에 제2 효소층을 고정화하는 단계.
- [0071] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 효소 전극 제조방법의 모식도이다. 도 3을 참조하면 산화그래핀을 기관 표면에 접촉시키고, 시간 전류법(chronoamperometry)을 이용하여 개질한다.
- [0072] 이때, 상기 기관은 당업계에서 전극으로 사용되는 소재라면 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 금, 백금,

탄소, ITO(indium tin oxide) 및 반도체성 물질로부터 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 ITO 기판일 수 있다.

- [0073] 상기 산화그래핀은 흑연(그래파이트)을 질산, 황산, 염산 등의 강산을 이용하여 산화시켜 형성된 것을, 물에 넣고 초음파 처리하여 제조된 것일 수 있다.
- [0074] 상기 산화그래핀으로 개질된 기판은 기판을 상기 산화그래핀이 분산된 용매에 침지하고 시간 전류법(chronoamperometry)을 이용하여 증착시킨 것일 수 있다. 상기 용매는 물 등 친수성 용매일 수 있다.
- [0075] 상기 산화그래핀으로 개질된 기판을 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)을 이용하여 환원한다. 상기 산화그래핀을 부분 환원시켜 환원된 산화그래핀(rGO, reduced graphene oxide)을 생성한다.
- [0076] 상기 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 기판은 하나 이상의 기능기를 가지며, 상기 하나 이상의 기능기는 히드록실기(hydroxyl group) 또는 카르복실기(carboxyl group)일 수 있다.
- [0077] 상기 환원된 산화그래핀과 제1 효소층의 결합을 용이하게 하기 위하여, 상기 b) 단계로부터 제조된 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 기판에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드(EDC), N-히드록시숙신이미드(NHS)를 첨가하는 단계를 추가하여, 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 기판의 카르복시기를 아민기에 반응성이 높은 N-히드록시숙신이미드(NHS)기로 전환할 수 있다.
- [0078] 상기 b) 단계로부터 제조된 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 기판 상에 제1 효소층을 고정화한다(c 단계). 상기 제1 효소층은 상기 환원된 산화그래핀의 기능기와 화학적 결합을 통해 결합되어 고정화될 수 있다.
- [0079] 구체적으로 상기 b) 단계로부터 제조된 환원된 산화그래핀으로 표면 개질된 기판에 제1 효소를 포함하는 용액을 첨가하고 20 내지 30 °C에서 1 내지 5 시간동안 반응시켜, 상기 환원된 산화그래핀 상에 제1 효소층을 고정화할 수 있다.
- [0080] 본 발명에서 기판 상에 증착된 산화그래핀은 제1 효소층의 고정화될 수 있도록 하는데 사용될 뿐만 아니라, 효소반응에 의해 생성된 전자를 전극내에 용이하게 전달할 수 있으므로 효소 전극의 안정성, 정확성 및 전극성능을 높일 수 있다.
- [0081] 상기 제1 효소층 상에 시간 전류법(chronoamperometry)을 이용하여 산화그래핀을 증착한다(d 단계). 상기 제1 효소층이 고정화된 기판 상에 산화그래핀이 분산된 용매를 첨가하고, 시간 전류법(chronoamperometry)을 이용하여 제1 효소층 상에 산화그래핀 층을 적층한다. 상기 용매는 물 등 친수성 용매일 수 있다.
- [0082] 상기 산화그래핀 상에 제2 효소층을 고정화한다(e 단계). 구체적으로 상기 d) 단계로부터 제조된 산화그래핀 층이 적층된 기판에 제2 효소를 포함하는 용액을 첨가하고 20 내지 30 °C에서 1 내지 5 시간동안 반응시켜, 상기 산화그래핀 상에 제2 효소층을 고정화할 수 있다.
- [0083] 상기 산화그래핀 층과 제2 효소층의 결합을 용이하게 하기 위하여, 상기 d) 단계로부터 제조된 산화그래핀 층이 적층된 기판에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드(EDC), N-히드록시숙신이미드(NHS)를 첨가하는 단계를 추가하여, 상기 산화그래핀의 카르복시기를 아민기에 반응성이 높은 N-히드록시숙신이미드(NHS)기로 전환할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 제조방법에서, 상기 시간 전류법(chronoamperometry)은 하기 조건으로 수행되는 것일 수 있다.
- [0085] - 전압 인가시 단위 사이클 : 양의 전압(V+)과 음의 전압(V-)의 순차적 인가
- [0086] - V+ 크기 및 V+ 인가 시간(t+): 0.5 내지 1.5V 및 60 내지 100 sec
- [0087] - V- 크기 및 V- 인가 시간(t-) : -1.0 내지 -1.5V 및 60 내지 100 sec
- [0088] - 단위 사이클 반복 횟수 : 10 내지 60회.
- [0089] 전류 밀도가 현저히 향상된 효소 전극을 얻기 위해서는 상기 시간 전류법(chronoamperometry)의 조건 중에서 V+ 인가 시간과 V- 인가 시간이 80초인 것일 수 있다.
- [0090] 본 발명의 제조방법에서, 상기 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)은 -1.5 V 내지 +1.5 V에서 5 내지 20 mV/s의 속도로 10 내지 60회 사이클 반복 횟수로 수행되는 것일 수 있는데, 전류 밀도를 현저히 향상시키기 위해서는 사이클 반복 횟수를 30회 수행하는 것이 바람직하다.
- [0091] 본 발명에 따른 제조방법은 시간 전류법(chronoamperometry, CA)과 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)을

이용하여 기판 또는 효소 상에 산화그래핀을 증착 및 환원하는 간단한 공정으로 제조할 수 있기 때문에, 제작 공정이 단순화될 수 있고, 적은 비용으로도 제작될 수 있으며, 대량 생산이 용이하고, 경제성이 우수할 수 있다.

[0092] 상기 d) 단계와 e) 단계는 1 내지 5회 반복될 수 있다. 상기 d) 단계와 e) 단계를 반복하면 상기 산화그래핀 층과 상기 제2 효소층으로 이루어진 층의 개수를 늘릴 수 있다. 따라서 반복횟수는 특별히 제한되지 않으나 필요에 따라 변경될 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 10회, 1 내지 5회, 1 내지 2회일 수 있다.

[0093] 상기 제1 효소층과 제2 효소층은 글루코스 산화효소, HRP(horseradish peroxidase), NiR(nitrite reductase), 콜레스테롤 산화효소, 글루타믹 옥살아세틱 트랜스미나아제(Glutamic Oxaloacetic Transaminase; GOT) 및 글루타믹 피루빅 트랜스미나아제(Glutamic Pyruvic Transaminase; GPT) 및 트레할로스 분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 이는 앞에서 상술한 내용을 참고할 수 있다.

[0094] 상기 e) 단계 이후, 상기 f) 상기 제2 효소층 상에 제3 효소층을 고정화하는 단계;를 더 포함할 수 있다. 상기 제2 효소층 상에 하나 또는 하나 이상의 층으로 이루어진 제3 효소층을 더 포함함으로써, 글루코스가 아닌 다른 기질을 원료로 전력 발생이 가능하도록 하는 이효소 전극으로 활용할 수 있다.

[0095] 제3 효소층(140b)은 트레할로스 분해효소 및 산화된 트레할로스 분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있는데, 이는 곤충의 체액에 들어있는 트레할로스(trehalose)라는 당 성분을 원료로 전력 발생이 가능하도록 할 수 있다. 상기 트레할로스가 포도당으로 분해되고, 산화환원반응에 의해 전극에서 전력이 생성될 수 있도록 한다.

[0096] 상기 f) 단계는 1 내지 10회 반복 수행될 수 있으며, 이는 필요한 제3 효소층의 층 수에 따라 변경될 수 있으며, 구체적으로 상기 제3 효소층은 트레할로스 분해효소로 이루어진 단일층이거나, 산화된 트레할로스 분해효소와 트레할로스 분해효소로 이루어진 이중층이거나, 또는 산화된 트레할로스 분해효소와 트레할로스 분해효소 및 산화된 트레할로스 분해효소로 이루어진 삼층 구조일 수 있다

[0097] 상기 제3 효소층이 1층 이상일 경우, 효소 간의 링커로 산화된 효소(예컨대 산화된 트레할로스 분해효소)를 고정화한 후, 제3 효소를 교번적으로 고정화하는 것이 효소 간의 전압 및 전류를 감소시키지 않고 구성된 효과를 얻을 수 있다.

[0098] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 효소 전극을 포함하는 연료전지 시스템에 관한 것이다.

[0099] 상기 연료전지 시스템은 상기 효소 적극을 작동 전극으로 하는 것일 수 있으며, 상대 전극과 기준 전극을 포함하는 3전극 시스템일 수 있다.

[0100] 상기 상대전극은 작동 전극과 짝지어서 전류가 흐르게 하는 역할을 하며, 재질은 작동전극과 유사한 전극을 사용할 수 있다.

[0101] 또한, 상기 기준전극은 전류가 흐르지 않고 작동전극과 상대전극사이에 일정한 작동전압이 유지되도록 하는 기능을 하며, 재질은 주로 Ag/AgCl 이 많이 사용된다. 상기 기준전극은 은 페이스트(Ag paste)층을 염화철(FeCl3) 포화용액으로 산화시킨 다음, 증류수로 세척 후 공기 중에서 건조시켜 제조된 것일 수 있다.

[0102] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.

[0103] <실시예>

[0104] 실시예 1-1 내지 1-9. 단층 효소 전극(ITO-rGO-GOx) 제작

[0105] A. ITO-rGO 기판

[0106] ITO(indium tin oxide)(1.25 cm ■ 0.75 cm) 투명기판을 피라냐 용액 (piranha)(H₂SO₄:H₂O₂:H₂O = 1:3:3, v/v)에 5 분간 침지하여 세척한 후, 행구고 증류수(DW)에서 40 kHz의 초음파 세척기(WUC-D06H, Daihan Scientific Co. Ltd., Wonju, Korea)로 96 W, 5분간 초음파 처리하여, 최종적으로 실온에서 N₂의 흐름하에서 완벽히 건조시켰다.

[0107] 산화그래핀(GO) 분산액(제품번호: 777676, Sigma Aldrich 사, St. Louis, USA)을 준비하고 희석한 후, 초음파

세척기에서 96 W로 5 분간 초음파 처리하여 균일한 상태의 GO 분산액(0.5 mg/mL)을 제조하였다.

[0108] GO 분산액(0.5 mg/mL)에 ITO, Pt wire(상대전극) 및 기준전극인 leakless miniature Ag/AgCl(saturated KCl; LF-2, Innovative Instruments Inc., Tampa, USA)을 담겼다. -1.5 V와 0.5 V에서 시간별로 시간 전류법(chronoamperometry)을 수행하여 각 조건별 GO가 증착된 ITO(이하, 'ITO-GO'라고도 한다)를 제조하였다. 상기 CA 증착 조건은 하기 표 1에 나타내었다.

[0109] 전기화학 환원반응에서 ITO 기판과 접촉한 GO가 기판으로부터 전자를 받고 환원되면 불용성이 되면서 기판 표면에 부착하게 된다. ITO-GO를 4 ml의 PBS 용액(pH 7.0)에 넣고 -1.5~0.0 V 범위에서 50 mV/s의 주사 속도로 0, 30 또는 60 사이클의 CV 스캐닝을 실시하여 ITO 표면의 GO를 환원시켜, 환원된 GO가 부착된 ITO(이하 'ITO-rGO'라고도 한다)를 제조하였다. 상기 환원조건은 하기 표 1에 보다 구체적으로 정리하였다.

[0110] B. 효소 전극 시스템 제조

[0111] 도 1c와 같이, 적정 크기로 자른 양면테이프 아랫면을 삼공 펀치로 타공하고, 상기 A 단계로부터 제조된 ITO-rGO 효소 전극 표면에 부착하였다. 원형의 홀(지름 6 mm, 높이 1.1 mm)에 40 μ L의 전해질 용액을 채우고 기준전극(Ag/AgCl)과 상대전극(Pt wire)을 용액에 담겼다. 노출된 전극 표면은 전위차계 연결부위로 사용하였다. 이때 원형 홀의 작업 부피(working volume)는 40 μ L이다.

[0112] C. rGO-GOx 1층이 고정화된 효소 전극

[0113] 상기 효소 전극 시스템의 원형홀에 EDC(52 mM)와 NHS(430 mM)을 포함한 MES 완충액(100 mM, pH 6.0) 40 μ L를 첨가하고, 이를 항습기(humidity chamber)에 넣고, 상온에서 3시간 반응시켰다. 본 단계를 통해 환원되지 않은 그래핀의 카르복시기가 아민기에 반응성이 높은 NHS로 치환되었다(ITO-rGO-NHS). 다음, 상기 원형 홀에 담겨 있는 반응액을 제거하고 MES 완충액으로 전극 표면의 미반응물과 부산물(urea)을 제거하였다.

[0114] 부산물이 제거된 원형 홀에 GOx 용액(8.7 mg/mL)을 포함하는 MES 완충액 40 μ L를 첨가한 후 항습기에 넣고, 상온에서 3 시간 반응시켜 GOx가 고정화된 효소 전극(이하, 'ITO-rGO-GOx'라고도 한다)을 제작하였다. 이때 *Aspergillus niger* 유래 포도당 산화효소(glucose oxidase, GOx)를 사용하였으며, 이는 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 해당 단계를 통해 GOx의 아민기가 전극 표면의 NHS ester와 반응하여 GOx가 고정화된다. MES 완충액을 사용하여 미반응된 GOx를 제거하였다.

표 1

실시에	증착시간 (sec)	환원조건에서 사이클 수
1-1 (D60-R0)	60	0
1-2 (D60-R30)		30
1-3 (D60-R60)		60
1-4 (D80-R0)	80	0
1-5 (D80-R30)		30
1-6 (D80-R60)		60
1-7 (D100-R0)	100	0
1-8 (D100-R30)		30
1-9 (D100-R60)		60

[0116] 실시예 2-1 내지 2-9. 단층 이효소 전극(ITO-rGO-GOx-Tre) 제작

[0117] 실시예 1-1 내지 1-9로부터 제조된 단층 효소 전극(ITO-rGO-GOx)을 준비하고, 여기에 EDC(52 mM)와 NHS(430

mM)을 포함한 MES 완충액(100 mM, pH 6.0) 40 μ l를 처리한 후, 항습기에 넣고 상온에서 3시간 반응시켜 GOx 표면의 COOH기를 NHS ester기로 치환하였다(ITO-rGO-GOx-NHS). MES 완충액을 사용하여 미반응물을 제거하였다.

[0118] ITO-rGO-GOx-NHS 전극에 트레할로스 분해 효소(trehalase, Tre)(0.1 Unit/mL)를 포함하는 PBS 완충액 40 μ l를 첨가하고, 항습기에 넣어 상온에서 3 시간 반응시킨 후, MES 완충액으로 미반응된 Tre를 제거하여 단층 이효소 전극(ITO-rGO-GOx-Tre 전극)을 제작하였다.

[0119] **실시예 2-10. 이중 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GOx) 제작**

[0120] 실시예 1-5로부터 제조된 단층 효소 전극(ITO-rGO-GOx)을 준비하고, 여기에 EDC(52 mM)와 NHS(430 mM)을 포함한 MES 완충액(100 mM, pH 6.0) 40 μ l를 처리한 후, 항습기에 넣고 상온에서 3시간 반응시켜 GOx 표면의 COOH기를 NHS ester기로 치환하였다(ITO-rGO-GOx-NHS). MES 완충액을 사용하여 미반응물을 제거하였다.

[0121] ITO-rGO-GOx-NHS 전극에 GOx 용액(8.7 mg/mL)을 포함하는 MES 완충액 40 μ l를 첨가하고, 항습기에 넣어 상온에서 3 시간 반응시킨 후, MES 완충액으로 미반응된 GOx 용액을 제거하여 이중 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GOx 전극)을 제작하였다.

[0122] **실시예 3-1 내지 3-9. 복층 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx) 제작**

[0123] 실시예 1-1 내지 1-9로부터 제조된 단층 효소 전극(ITO-rGO-GOx)을 준비하고, ITO-rGO-GOx에 40 μ l의 GO 분산액(0.5 mg/mL)을 첨가한 후, -1.5 V에서 80초 동안 유지하고 0.5 V로 전위를 증가시킨 후 80초 유지하는 시간 전류법(chronoamperometry)을 통해 ITO-rGO-GOx-GO 전극을 제조하였다.

[0124] 상기 ITO-rGO-GOx-GO 전극에 EDC(52 mM)와 NHS 430 mM)을 포함한 MES 완충액(100 mM, pH 6.0) 40 μ l를 처리하고, 항습기에 넣고 상온에서 3 시간동안 반응하였다. MES 완충액을 사용하여 미반응물을 제거하고, GOx 용액(8.7 mg/mL)을 포함하는 MES 완충액 40 μ l를 첨가한 후 항습기에 넣고 상온에서 3 시간동안 반응하여 GO-GOx **복층**이 고정화된 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx)을 제작하였다. MES 완충액을 사용하여 미반응물을 제거하였다.

[0125] **실시예 4-1 내지 4-9. 복층 이효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre)**

[0126] 실시예 3-1 내지 3-9로부터 제조된 이중 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx)을 준비하고, 여기에 EDC(52 mM)와 NHS(430 mM)을 포함한 MES 완충액(100 mM, pH 6.0) 40 μ l를 처리한 후, 항습기에 넣고 상온에서 3시간 반응시켜 GOx 표면의 COOH기를 NHS ester기로 치환하였다(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-NHS). MES 완충액을 사용하여 미반응물을 제거하였다.

[0127] ITO-rGO-GOx-GO-GOx-NHS 전극에 트레할로스 분해효소(trehalase, Tre)(0.1 Unit/mL)를 포함하는 PBS 완충액 40 μ l를 첨가하고, 항습기에 넣어 상온에서 3 시간 반응시킨 후, MES 완충액으로 미반응된 Tre를 제거하여 이효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre 전극)을 제작하였다.

[0128] **실시예 4-10. 복층 이효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre-Tre)**

[0129] 실시예 4-5로부터 제조된 복층 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre)을 준비하고, 여기에 EDC(52 mM)와 NHS(430 mM)을 포함한 MES 완충액(100 mM, pH 6.0) 40 μ l를 처리한 후, 항습기에 넣고 상온에서 3시간 반응시켜 Tre 표면의 COOH기를 NHS ester기로 치환하였다(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre-NHS). MES 완충액을 사용하여 미반응물을 제거하였다.

[0130] ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre-NHS 전극에 트레할로스 분해효소(trehalase, Tre)(0.1 Unit/mL)를 포함하는 PBS 완충액 40 μ l를 첨가하고, 항습기에 넣어 상온에서 3 시간 반응시킨 후, MES 완충액으로 미반응된 Tre를 제거하여 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre-Tre 전극)을 제작하였다.

[0131] **실시예 5-1 내지 5-9. 삼층 효소 전극(ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₂)**

[0132] 실시예 4-1 내지 4-9로부터 제조된 이중 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx)을 준비하고, ITO-rGO-GOx-GO-GOx에 40 μ l의 GO 분산액(0.5 mg/mL)을 첨가한 후, -1.5 V에서 80초 동안 유지하고 0.5 V로 전위를 증가시킨 후 80초 유지하는 시간 전류법(chronoamperometry)을 통해 ITO-rGO-GOx-GO-GOx-GO 전극을 제조하였다.

[0133] 상기 ITO-rGO-GOx-GO-GOx-GO 전극에 EDC(52 mM)와 NHS 430 mM)을 포함한 MES 완충액(100 mM, pH 6.0) 40 μ l를 처리하고, 항습기에 넣고 상온에서 3 시간동안 반응하였다. MES 완충액을 사용하여 미반응물을 제거하고, GOx 용액(8.7 mg/mL)을 포함하는 MES 완충액 40 μ l를 첨가한 후 항습기에 넣고 상온에서 3 시간동안 반응하여 GO-GOx 3층이 고정화된 효소 전극(ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₂)을 제작하였다. MES 완충액을 사용하여 미반응물을 제거

하였다.

[0134] 실시예 6-1 내지 6-9. 사층 효소 전극(ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₃)

[0135] 실시예 5-1 내지 5-9로부터 제조된 삼층 효소 전극(ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₂)을 준비하고, ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₂에 40 μ l의 GO 분산액(0.5 mg/ml)을 첨가한 후, -1.5 V에서 80초 동안 유지하고 0.5 V로 전위를 증가시킨 후 80초 유지하는 시간 전류법(chronoamperometry)을 통해 ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₂-GO 전극을 제조하였다.

[0136] 상기 ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₂-GO 전극에 EDC(52 mM)와 NHS 430 mM)을 포함한 MES 완충액(100 mM, pH 6.0) 40 μ l를 처리하고, 항습기에 넣고 상온에서 3 시간동안 반응하였다. MES 완충액을 사용하여 미반응물을 제거하고, GOx 용액(8.7 mg/ml)을 포함하는 MES 완충액 40 μ l를 첨가한 후 항습기에 넣고 상온에서 3 시간동안 반응하여 GO-GOx 3층이 고정화된 효소 전극(ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₃)을 제작하였다. MES 완충액을 사용하여 미반응물을 제거하였다.

[0137] 실시예 7-1 내지 7-9. 오층 효소 전극(ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₄)

[0138] 실시예 6-1 내지 6-9로부터 제조된 사층 효소 전극(ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₃)을 준비하고, ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₃에 40 μ l의 GO 분산액(0.5 mg/ml)을 첨가한 후, -1.5 V에서 80초 동안 유지하고 0.5 V로 전위를 증가시킨 후 80초 유지하는 시간 전류법(chronoamperometry)을 통해 ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₃-GO 전극을 제조하였다.

[0139] 상기 ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₃-GO 전극에 EDC(52 mM)와 NHS 430 mM)을 포함한 MES 완충액(100 mM, pH 6.0) 40 μ l를 처리하고, 항습기에 넣고 상온에서 3 시간동안 반응하였다. MES 완충액을 사용하여 미반응물을 제거하고, GOx 용액(8.7 mg/ml)을 포함하는 MES 완충액 40 μ l를 첨가한 후 항습기에 넣고 상온에서 3 시간동안 반응하여 GO-GOx 4층이 고정화된 효소 전극(ITO-rGO-GOx-{GO-GOx}₄)을 제작하였다. MES 완충액을 사용하여 미반응물을 제거하였다.

[0140] 실시예 8. 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre^{oxy})

[0141] 실시예 3-5로부터 제조된 이중 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx)을 준비하고, 여기에 산화된 트레할로스 분해효소(Tre^{oxy})(0.1 Unit/mL)를 포함하는 PBS 완충액 40 μ l를 첨가하고, 항습기에 넣어 상온에서 3 시간 반응시킨 후, MES 완충액으로 미반응물을 제거하여 산화된 Tre 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre^{oxy} 전극)을 제작하였다. 이때 산화된 트레할로스 분해효소는 다음과 같이 제조하였다. NaIO₄(Sodium metaperiodate, 6 mg/mL)를 포함한 5 mL PBS 버퍼(pH 6.8)에 트레할로스 분해효소 20 μ L를 첨가하여 4℃ 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응을 종료시키기 위해서 반응액에 에틸렌글리콜(25 mM)을 첨가하여 25℃에서 30 분 방치시켰다. 상술한 과정을 통해 산화된 트레할로스 분해효소(Tre^{oxy})의 표면에는 카발데하이드(carbaldehyde)기가 생성된다. 이는 효소간의 공유 결합을 형성하여 강하게 결합되도록 한다.

[0142] 실시예 9. 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre^{oxy}-Tre, Tre^{oxy}-Tre-Tre^{oxy})

[0143] 실시예 8로부터 제조된 이중 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre^{oxy})을 준비하고, 여기에 트레할로스 분해효소(Tre)(0.1 Unit/mL)를 포함하는 PBS 완충액 40 μ l를 첨가하고, 항습기에 넣어 상온에서 3 시간 반응시킨 후, MES 완충액으로 미반응물을 제거하여 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre^{oxy}-Tre 전극)을 제작하였다.

[0144] 실시예 10. 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre^{oxy}-Tre-Tre^{oxy})

[0145] 실시예 9로부터 제조된 이중 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre^{oxy}-Tre)을 준비하고, 여기에 산화된 트레할로스 분해효소(oxy-Tre)(0.1 Unit/mL)를 포함하는 PBS 완충액 40 μ l를 첨가하고, 항습기에 넣어 상온에서 3 시간 반응시킨 후, MES 완충액으로 미반응물을 제거하여 산화된 Tre 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre^{oxy}-Tre-Tre^{oxy} 전극)을 제작하였다. 이때 산화된 트레할로스 분해효소는 다음과 같이 제조하였다. NaIO₄(Sodium metaperiodate, 6 mg/mL)를 포함한 5 mL PBS 버퍼(pH 6.8)에 트레할로스 분해효소 20 μ L를 첨가하여 4℃ 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응을 종료시키기 위해서 반응액에 에틸렌글리콜(25 mM)을 첨가하여 25℃에서 30 분 방치시켰다.

상술한 과정을 통해 산화된 트레할로스 분해효소(Tre^{oxy})의 표면에는 카발데하이드(carbaldehyde)기가 생성된다. 이는 효소간의 공유 결합을 형성하여 강하게 결합되도록 한다.

[0146] <실험방법>

[0147] 전극 특성 분석

[0148] 전극의 전기화학적 특성을 조사하기 위하여 3 전극 시스템을 사용하였다. 이때 작동전극은 측정하고자하는 전극을 사용하였다. 효소 전극은 PVI-dmo-Os(10 mg/mL)와 PEGDGE(10 mg/mL)가 4:1 중량비로 혼합된 혼합물을 처리하여 표면을 보호하였다. 전극 특성을 알아보기 위한 CV 분석에서 PBS 완충액(pH 7.0)을 전해질 용액으로 사용하였다.

[0149] 각각의 효소 전극에 대한 CV 분석을 위해, 기준 전해질에 30 mM 포도당 및/또는 트레할로스(terhalose)를 추가하였다. 소량의 전해질 용액을 사용하여 CV 분석이 가능한 miniature 전극 테스트 시스템을 제작하였다(도 1c).

[0150] 적정 크기로 자른 양면테이프 아랫면을 삼공 펀치로 타공하고 이를 작동전극 표면에 부착하였다. 원형의 홀(지름 6 mm, 높이 1.1 mm)에 40 μL 의 전해질 용액을 채우고 기준전극(Ag/AgCl)과 상대전극(Pt wire)을 용액에 담그었다. 노출된 전극 표면은 전위차계 연결부위로 사용되었다. 10 mV/s의 주사 속도로 CV 분석을 실시하였다. 상온에서 전위차계(potentiostat, CH Instruments, model 660D, Houston, USA)를 사용하여 모든 전기화학 실험을 수행하였다.

[0151] <시험예>

[0152] 시험예 1. GO 증착 조건 최적화

[0153] ITO 표면에 GO 증착조건을 최적화하고자 하였다. 우선, ITO(indium tin oxide)(1.25 cm $\times$ 0.75 cm) 투명기판을 피라냐 용액(piranha)($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O} = 1:3:3$, v/v)에 5 분간 침지하여 세척한 후, 행구고 증류수(DW)에서 40 kHz의 초음파 세척기(WUC-D06H, Daihan Scientific Co. Ltd., Wonju, Korea)로 96 W, 5분간 초음파 처리하여, 최종적으로 실온에서 N_2 의 흐름하에서 완벽히 건조시켰다. 산화그래핀(GO) 분산액(제품번호: 777676, Sigma Aldrich 사, St. Louis, USA)을 준비하고 희석한 후, 초음파 세척기에서 96 W로 5 분간 초음파 처리하여 균일한 상태의 GO 분산액(0.5 mg/mL)을 제조하였다.

[0154] GO 분산액(0.5 mg/mL)에 ITO, Pt wire(상대전극) 및 기준전극인 leakless miniature Ag/AgCl(saturated KCl; LF-2, Innovative Instruments Inc., Tampa, USA)을 담겼다. -1.5 V와 0.5 V에서 시간별(0~160 초)로 시간 전류법(chronoamperometry; CA)을 수행하여 각 CA 시간 조건에 따른 GO가 증착된 ITO(이하, 'ITO-GO'라고도 한다)를 제조하였다.

[0155] 도 4는 ITO 투명기판 상에 산화그래핀(GO)을 시간 전류법(chronoamperometry)으로 증착할 때, 시간 전류법(chronoamperometry) 조건에 따른 결과 그래프이다. 도 5는 시간 전류법(chronoamperometry) 조건에 따라 제조된 ITO-GO(60초, 80초, 100초)의 실제 모습을 촬영한 사진이다.

[0156] 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이, 시간 전류법(chronoamperometry)을 통해 ITO 표면에 GO(산화그래핀)이 성공적으로 증착되었음을 확인하였고, 특히 80초 CA 조건이 가장 바람직한 조건임을 알 수 있다.

[0157] 시험예 2. GO 환원 조건 최적화

[0158] 시험예 1에서 최적화된 바와 같이, 산화그래핀의 CA 증착 조건을 80초로 하는 것을 제외하고는 시험예 1과 동일하게 하여 ITO-GO를 제조하고, 이를 4 ml의 PBS 용액(pH 7.0)에 넣고 -1.5~0.0 V 범위에서 50 mV/s의 주사 속도로 0 내지 80 사이클 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)을 실시하여 ITO 표면의 GO를 환원시켰다('ITO-rGO 제조'). 상기 CV 사이클 수 마다 CV 그래프를 얻어 도 6에 나타내었다.

[0159] 도 6은 환원조건(CV 사이클 수)을 달리하여 제조된 ITO-rGO에 대한 CV(cyclic voltammetry) 결과 그래프이고, 도 7은 환원조건(CV 사이클 수:30, 60)을 달리하여 제조된 ITO-rGO의 실제 모습을 촬영한 사진이다.

[0160] 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, 산화그래핀을 순환전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)으로 환원하는 경우, 사이클 수가 증가할수록 ITO 표면에 GO(산화그래핀)의 환원 정도가 점차 증가하며(피크 사라짐), 전극 표면의 색도 갈색에서 검은 색으로 변화한다. 과도하게 환원될 경우 효소와의 작용기가 적어지므로, 가장 바람직한 환원조건은 사이클 수가 30인 것이다.

[0161] 시험예 3. 실시예 1-5 및 실시예 2-5의 단층 효소 전극의 특성 분석

[0162] 실시예 1-5 및 실시예 2-5로부터 제조된 단층 효소 전극(ITO-rGO-GOx, ITO-rGO-GOx-Tre)에 대한 전극특성을 CV 스캐닝을 통해 분석하여 도 8에 나타내었다.

[0163] 도 8은 실시예 1-5 및 실시예 2-5로부터 제조된 단층 효소 전극(ITO-rGO-GOx, ITO-rGO-GOx-Tre)에 대한 CV(cyclic voltammetry) 분석 결과로, 이에 따르면 실시예 1-5 및 실시예 2-5의 효소전극은 유사한 전류 생성을 나타내는 것을 알 수 있다.

[0164] 시험예 4. 실시예 3-4, 3-5, 3-6의 다층 효소 전극의 특성 분석

[0165] 다층 효소 구조를 갖는 효소 전극 제조시, 증착 및 환원 조건에 따른 전극특성을 확인하고자 하였다. 구체적으로 실시예 3-4, 3-5, 3-6으로부터 제조된 다층 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx)을 준비하였다.

[0166] 이를 위해, 실시예 3-4, 3-5, 3-6의 전극은 D80-R0 전극, D80-R30 전극, D80-R60 전극으로 그래프 상에 표시하였고, 이를 작동 전극으로 하여 CV로 분석하였다.

[0167] 도 9는 실시예 3-4, 3-5, 3-6로부터 제조된 다층 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx)에 대한 CV(cyclic voltammetry) 분석 결과로, 이에 따르면 산화그래핀을 링커로 두층의 글루코스 산화효소(GOx)를 성공적으로 고정할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한 산화그래핀의 증착 조건에 따라 효소 전극의 성능이 달라진다는 것을 확인하였으며, 증착 조건에서 시간은 80초, 환원조건에서 사이클 수는 30인 것이 가장 바람직하다는 것을 확인하였다.

[0168] 시험예 5. 실시예 3-1 내지 3-9의 다층 효소 전극의 특성 분석

[0169] 다층 효소 구조를 갖는 효소 전극 제조시, 증착 및 환원 조건에 따른 전극특성을 확인하고자 하였다. 구체적으로 실시예 3-1 내지 3-9로부터 제조된 다층 효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx)을 작동전극으로 하여 CV 분석을 수행하여, 각각에 대한 전류 밀도를 측정하여 표 2에 정리하였다.

표 2

구분	Current density($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
실시예 3-1(D60-R0)	133.6
실시예 3-2(D60-R30)	166.3
실시예 3-3(D60-R60)	120.6
실시예 3-4(D80-R0)	157
실시예 3-5(D80-R30)	237.9
실시예 3-6(D80-R60)	151.7
실시예 3-7(D100-R0)	124.4
실시예 3-8(D100-R30)	137.8
실시예 3-9(D100-R60)	98.9

[0171] 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 효소 전극은 모두 우수한 전류 밀도를 갖는 것을 확인하였다. 특히 실시예 3-5(D80-R30)의 효소 전극과 같이 증착 조건이 80초이고, 환원 조건이 30사이클인 것이 유의적으로 현저히 우수한 전류밀도를 갖는 것을 확인하였다.

[0172] 시험예 6. 실시예 1-5, 2-10, 5-5, 6-5, 7-5의 효소 전극 특성 분석

[0173] 효소 전극 제조시, 그래핀-효소((GO-GOx)_n(1<n<5))층이 1이상 적층된 경우, 전극특성을 비교 분석하였다. 구체적으로 실시예 1-5, 2-10, 5-5, 6-5, 7-5의 효소 전극을 작동전극으로 하여 CV 분석을 수행하여, 각각에 대한 전류 밀도를 측정하여 표 3에 정리하였다.

표 3

구분	Current density($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
실시예 1-5 ITO-rGO-GOx	97.9
실시예 2-10 ITO-rGO-GOx-GOx	172.8

실시예 3-5 ITO-rGO-GOx-GO-GOx	239.8
실시예 5-5 ITO-rGO-GOx-(GO-GOx) ₂	259.9
실시예 6-5 ITO-rGO-GOx-(GO-GOx) ₃	152.6
실시예 7-5 ITO-rGO-GOx-(GO-GOx) ₄	155.9

[0175] 표 3에 나타난 바와 같이, 실시예 1-5, 2-10, 5-5, 6-5, 7-5의 효소 전극은 실시예 1-5를 제외한 모두 우수한 전류밀도를 갖는 것을 확인하였고, 이 중에서도 그래핀-효소((GO-GOx)_n(1<n<2))층이 1층 이상 적층된 구조의 효소 전극(실시예 3-5, 5-5)가 가장 우수한 전기화학적 특성을 갖는다는 것을 확인하였다.

[0176] **시험예 7. 실시예 4-5 및 실시예 4-10의 효소 전극 특성 분석**

[0177] 트레할로스 분해효소가 단층 또는 이층인 효소 전극특성을 비교 분석하기 위해, 실시예 4-5 및 실시예 4-10의 효소 전극을 작동 전극으로 하여 CV 분석을 수행하여, 각각에 대한 전류 밀도를 측정하여 도 10에 나타내었다.

[0178] 도 10는 실시예 4-5 및 실시예 4-10으로부터 제조된 다층 이효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre/Tre-Tre)에 대한 CV(cyclic voltammetry) 분석 결과로, 이에 따르면 산화그래핀을 링커로 두층의 글루코스 산화효소(GOx)가 고정된 효소전극은, GOx의 말단에 EDC/NHS를 이용해 트레할로스 분해효소를 성공적으로 고정화할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0179] 또한, 실시예 4-5 및 실시예 4-10의 다층 이효소 전극은 성공적으로 작동하였으며, 구체적으로 전해질 용액에 포함된 기질(트레할로스)를 분해하여 전류를 생산하였고, 트레할로스 분해효소가 증가하면 생성 전류도 증가한다는 것을 확인하였다.

[0180] **시험예 8. 실시예 4-5, 실시예 8 내지 10의 효소 전극 특성 분석**

[0181] 글루코스 산화효소와 트레할로스 분해효소의 결합이 EDS/NHS가 아닌 트레할로스 분해효소의 산화에 의한 공유결합(covalent binding)인 경우, 효소 전극특성을 비교 분석하였다.

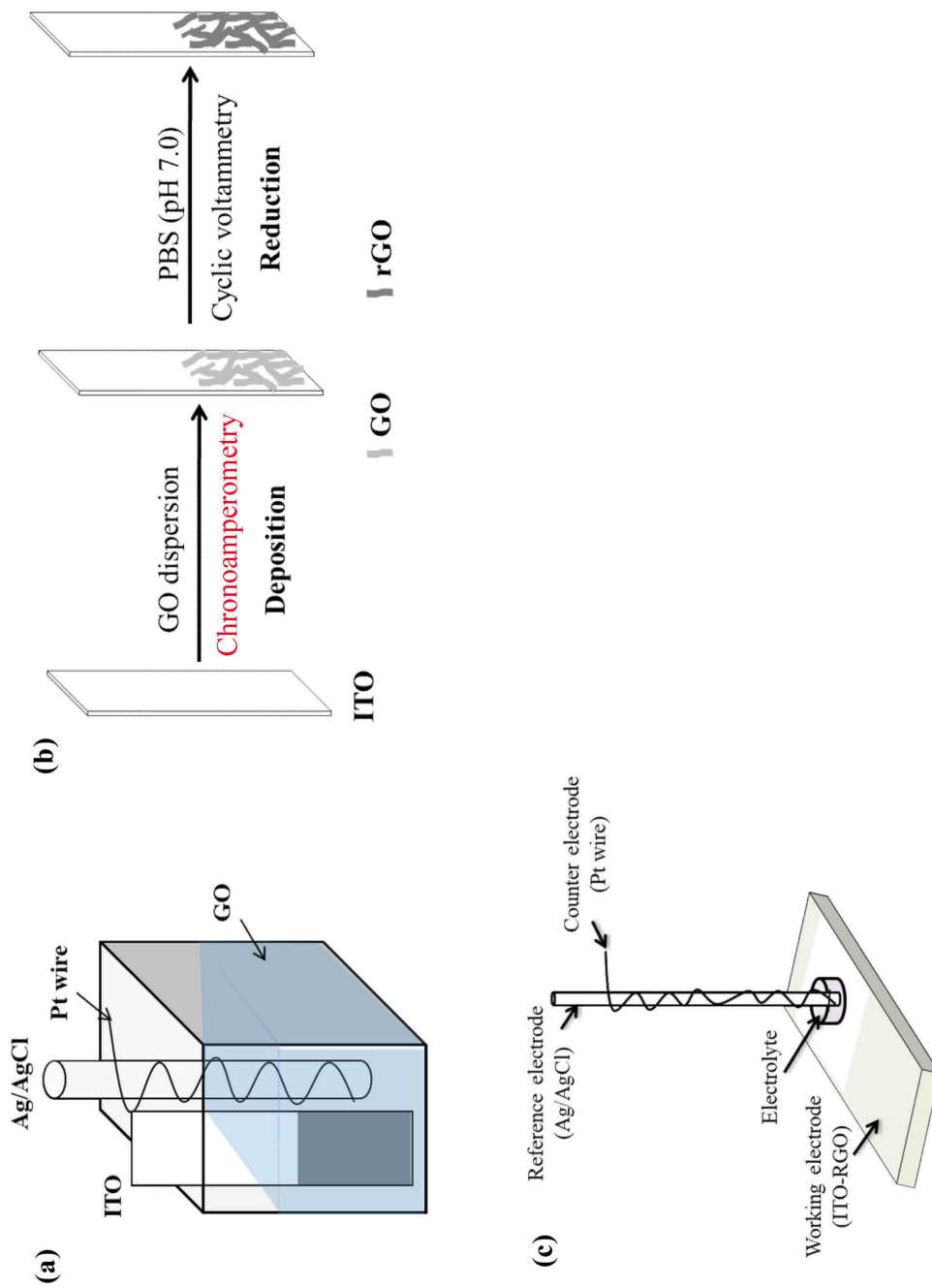
[0182] 이를 위해 실시예 4-5 및 실시예 8 내지 10의 효소 전극을 작동 전극으로 하여 CV 분석을 수행하여, 각각에 대한 전류 밀도를 측정하여 도 11에 나타내었다.

[0183] 도 11은 실시예 4-5(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre) 및 실시예 8 내지 10으로부터 제조된 다층 이효소 전극(ITO-rGO-GOx-GO-GOx-Tre^{oxy}, Tre^{oxy}-Tre, Tre^{oxy}-Tre-Tre^{oxy})에 대한 CV(cyclic voltammetry) 분석 결과로, 이에 따르면 산화 트레할로스 분해효소를 이용한 효소전극이 EDC/NHS를 이용한 효소전극보다 더 높은 전극 성능을 나타내는 것을 확인하였다.

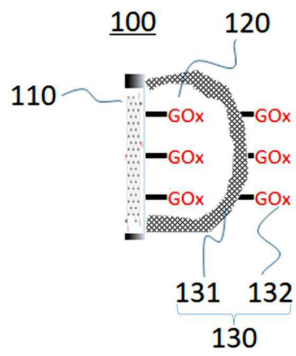
[0184] 즉, 실시예 4-5 및 실시예 8-10의 효소 전극은 모두 성공적으로 작동하였으며, 구체적으로 전해질 용액에 포함된 기질(트레할로스)를 분해하여 전류를 생산하였고, 산화 트레할로스 분해효소를 사용한 실시예 8-10의 효소전극의 성능이 가장 우수하다는 것을 확인하였다.

도면

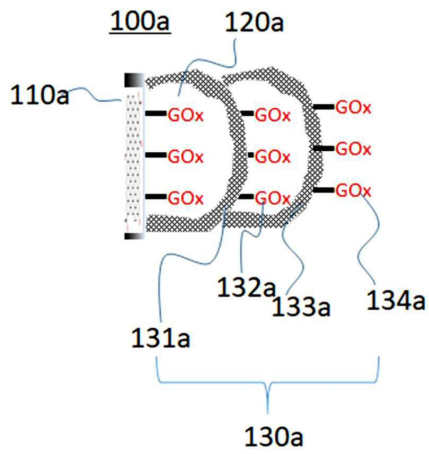
도면1



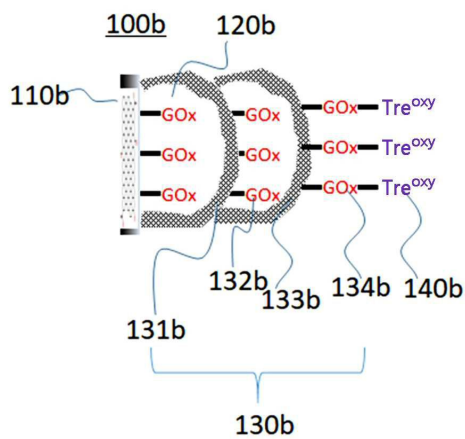
도면2a



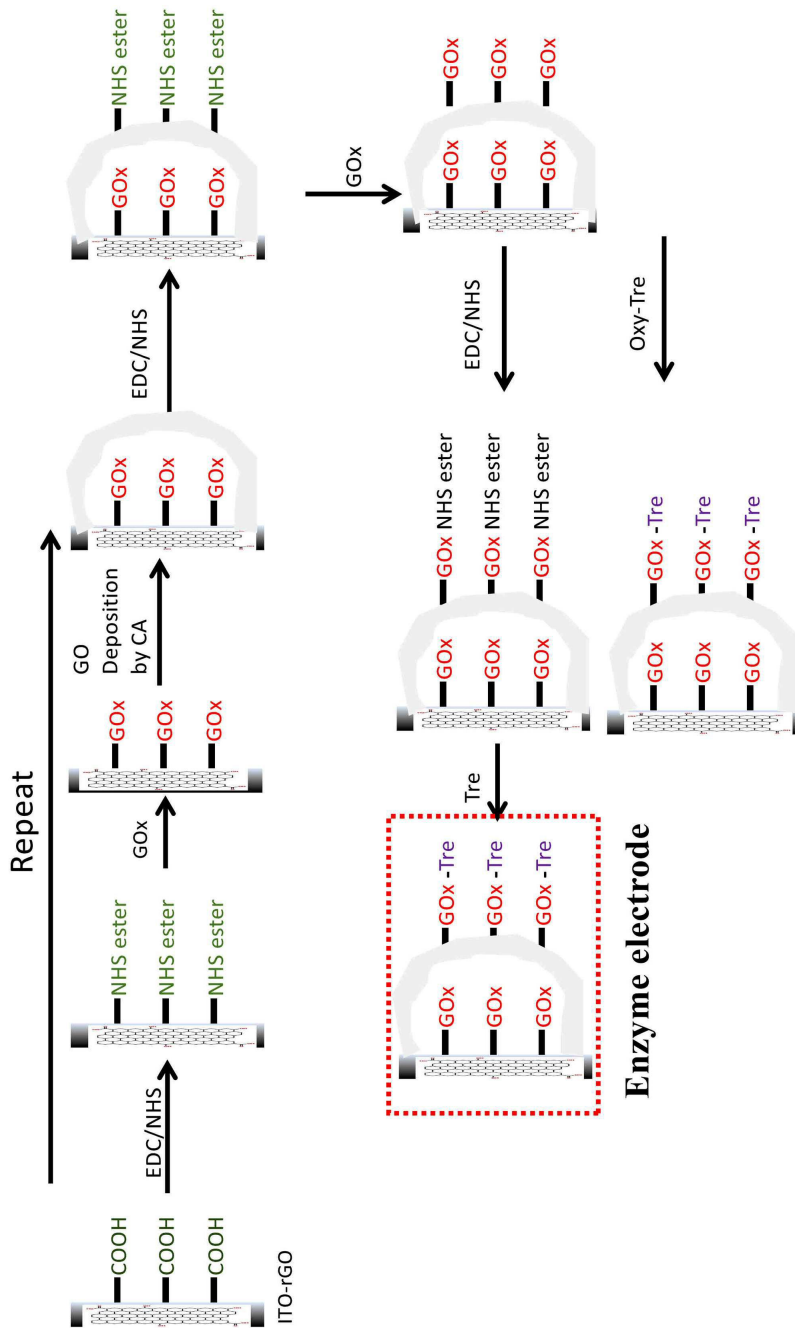
도면2b



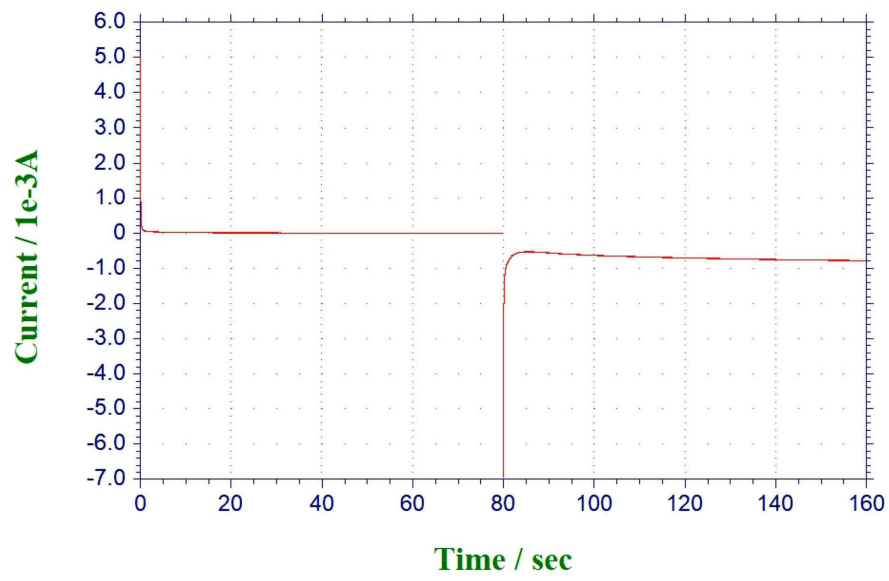
도면2c



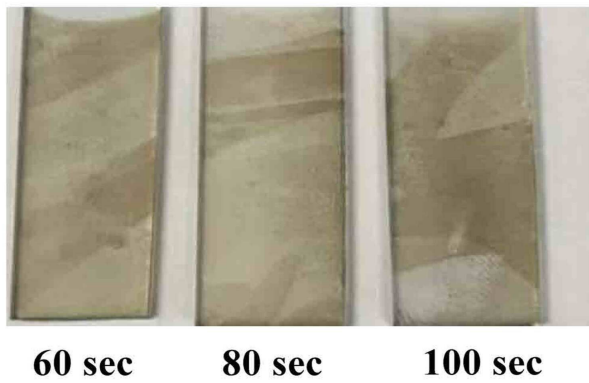
도면3



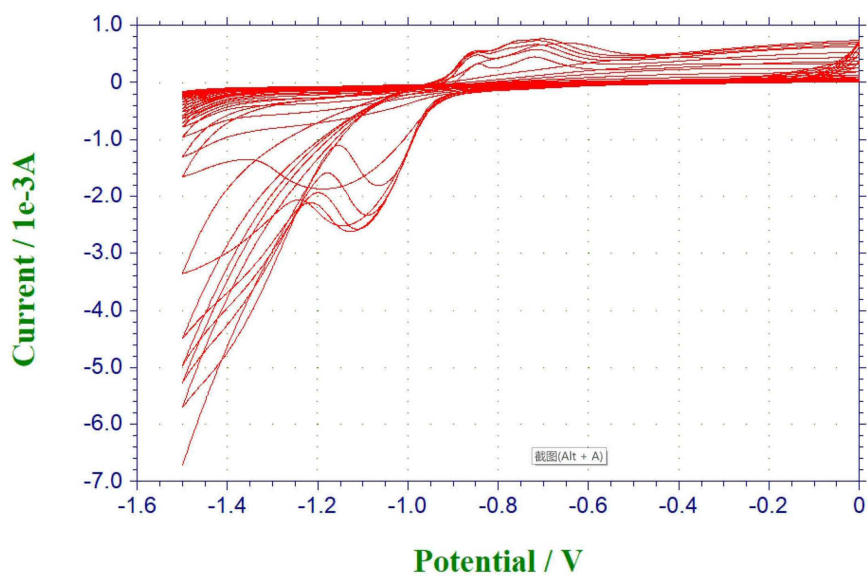
도면4



도면5



도면6

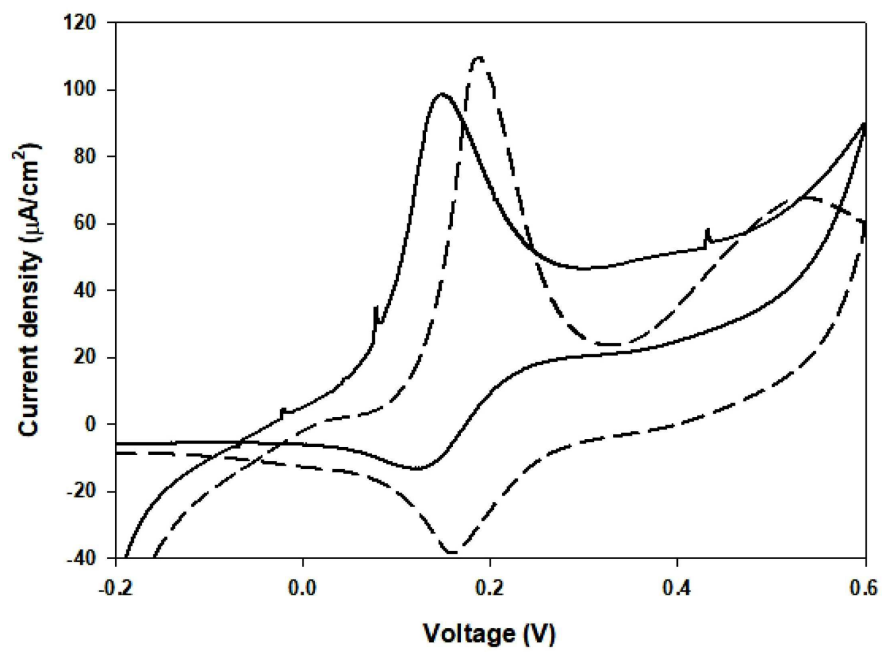


도면7

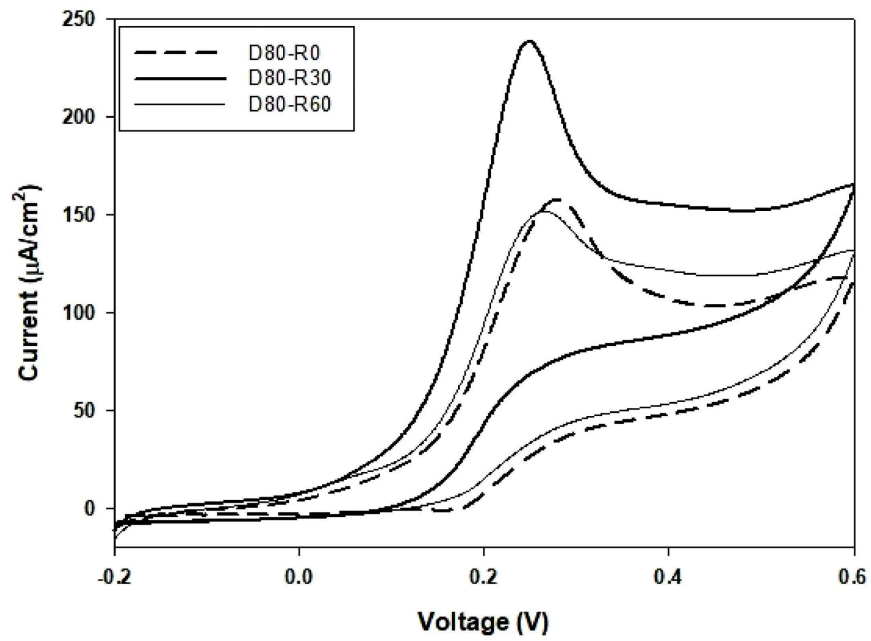


Reduced: 30 cycles 60 cycles
Deposited: 80 sec

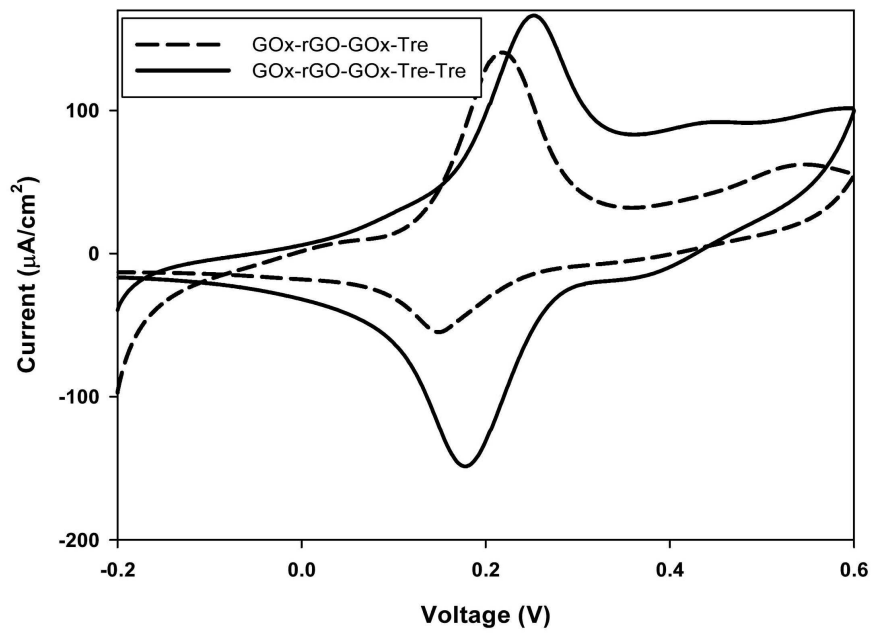
도면8



도면9



도면10



도면11

