

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국(43) 국제공개일
2010년 12월 9일 (09.12.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/140821 A9

- (51) 국제특허분류:
H01M 8/16 (2006.01) C12N 13/00 (2006.01)
H01M 8/04 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/003510
- (22) 국제출원일: 2010년 6월 1일 (01.06.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0048100 2009년 6월 1일 (01.06.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 서울특별시 성북구 안암동 5가 1 고려대학교 내, 136-701 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김승욱 (Kim, Seung Wook) [KR/KR]; 서울특별시 노원구 공릉2동 737번지 삼익아파트 104동 905호, 139-242 Seoul (KR). 이진영 (LEE, Jin Young) [KR/KR]; 서울특별시 동대문구 제기1동 122-512 18/3, 130-061 Seoul (KR). 신현용 (SHIN, Hyun Yong) [KR/KR]; 서울특별시 관악구 신

림4동 503-7호, 151-015 Seoul (KR). 강성우 (KANG, Seong Woo) [KR/KR]; 경기도 구리시 토평동 961 한일아파트 204동 305호, 471-060 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이문섭 (LEE, Moon-Sup); 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, 151-832 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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.

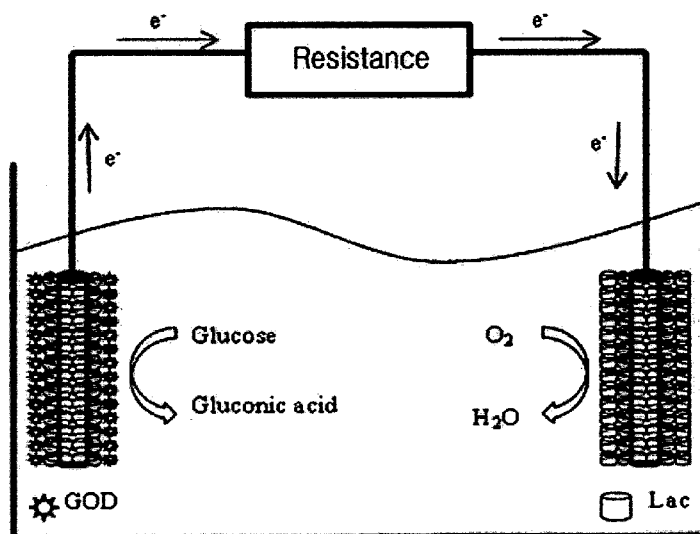
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: ENZYMATIC FUEL CELL USING DNA-WRAPPED CARBON NANOTUBE AND MANUFACTURING METHOD THEREOF

(54) 발명의 명칭 : DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지 및 그 제조방법

[Fig. 4]



(57) Abstract: The present invention relates to an enzymatic fuel cell using a DNA-wrapped carbon nanotube, and more specifically to an electrode for an enzymatic fuel cell comprising a DNA-wrapped carbon nanotube which is adsorbed to the electrode and an enzyme immobilized on the DNA-wrapped carbon nanotube, an enzymatic fuel cell using the same, and manufacturing method thereof. According to the present invention, the activity of the enzyme used for an enzymatic fuel cell and safety can be improved by manufacturing an electrode for fuel cells by means of a DNA-wrapped carbon nanotube and applying the electrode to an enzymatic fuel cell. Therefore, the power density of the enzymatic fuel cell using a DNA-wrapped carbon nanotube can be higher than that of conventional enzymatic fuel cells not using a DNA-wrapped carbon nanotube and be stable for a long time.

(57) 요약서: 본

[다음 쪽 계속]



TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) 국제조사보고서 공개일:

2011 년 3 월 24 일

(48) 본 정정판 공개일:

2011 년 5 월 12 일

(15) 정정사항에 관한 정보:

2011 년 5 월 12 일 자 공지 참조

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

발명은 DNA-탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 전극에 흡착된 DNA-감긴 탄소나노튜브 및 이에 고정화된 효소를 포함하는 효소적 연료전지용 전극, 이를 이용한 효소적 연료전지 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용하여 연료전지용 전극을 제조하고 이를 효소적 연료전지에 적용시키는 경우, 효소적 연료전지에 사용된 효소의 활성도 및 안정성을 향상시킬 수 있어 DNA-감긴 탄소나노튜브를 사용하지 않은 기존의 효소적 연료전지 보다 높은 파워densiti를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 장기간 안정된 파워densiti를 나타낼 수 있다.

명세서

발명의 명칭: DNA-감진 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지 및 그 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 DNA-감진 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 전극에 흡착된 DNA-감진 탄소나노튜브 및 이에 고정화된 효소를 포함하는 효소적 연료전지용 전극, 이를 이용한 효소적 연료전지 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 연료전지(fuel cell)는 바이오연료의 고갈과 환경문제가 부각되면서 대체에너지로서 많은 연구가 진행되고 있으며, 특히 효소적 연료전지(enzymatic fuel cell, EFC)는 연료전지에서 화학촉매 대신 생물학적인 효소를 이용하여 상온과 상압에서 작동이 가능토록 하고, 인체에 무해한 물질을 이용할 뿐만 아니라 그 크기가 작기 때문에 의학, 바이오연료 센서(biosensor), 소형 전자제품의 배터리 등 실생활에 많은 응용이 가능하다. 따라서 이러한 효소적 연료전지의 상용화가 실현되기 위해서는 효소의 안정도와 활성도를 높이고 최적화된 전자 전달 환경을 만들어주는 것이 무엇보다 중요하다.
- [3] 또한, 탄소나노튜브(carbon nanotube, CNT)는 1991년 일본의 스미모 리지마 박사에 의해 발견된 이후 빠른 속도로 발전하고 있으며, 다양한 응용 가능성을 갖고 있는 획기적인 신소재이다. 구리의 1000배나 되는 우수한 전기전도도, 강철의 100배 수준인 뛰어난 역학적 강도 등 물리적·화학적·구조적 특징으로 21세기를 이끌어갈 첨단 신소재로 각광을 받고 있다. 이러한 탄소나노튜브의 종류는 벽을 이루고 있는 탄소원자의 결합수에 따라 구분한다. 우선 단일벽 나노튜브(Single-wall Nanotube)는 탄소원자로 구성된 벽이 하나인 튜브 형태로 전기전도성, 열전도성이 가장 우수하다. 탄소원자로 구성된 벽이 두개인 이중벽 나노튜브(Double-wall Nanotube)는 전기전도성과 기계적 특성이 뛰어나다. 다중벽 나노튜브(Multi-wall Nanotube)는 하나의 튜브에 탄소원자로 구성된 벽이 여러 겹인 튜브 형태로 전기 및 열적 특성은 다소 떨어지나 기계적 특성이 우수하고 제조가 용이해 응용 범위가 넓다. 이밖에 단일벽 나노튜브가 여러 개 붙어서 다발을 이룬 튜브 형태인 다발형 나노튜브(Rope Nanotube)가 있다.
- [4] 탄소나노튜브는 또한 탄성이 좋고 화학적 안정성이 뛰어나며 바이오연료 물질과 친화성이 강하다. 이러한 특성으로 인해 각종 디스플레이기기, 램프, 바이오연료전지, 2차 전지, 반도체 등의 소재로 다양한 활용이 가능하다. 현재 CNT 관련 시장은 초기 단계이나 앞으로 3~5년 후에는 CNT 소재 관련 응용산업과 장치산업이 크게 활성화 될 것으로 예상된다.
- [5] 이에, 본 발명자들은 효소적 연료전지용 전극 제작 시 상기 장점을 가지는

탄소나노튜브를 이용하여 DNA-감긴 탄소나노튜브를 제조하고 이를 효소적 연료전지에 적용할 경우, 효소의 안정성과 활성도가 증가되어 효소적 연료전지의 전류와 파워덴시티를 향상시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

- [6] 또한 본 발명자들은 DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 연료전지용 전극에 효소를 고정화할 때 일부 효소의 활성부위가 감춰지는 문제점을 발견하고, 효소 활성부위의 보호를 통한 효소의 안정성과 활성도를 향상시킬 수 있는 방법을 지속적으로 연구하여, 연료전지용 전극에 효소를 고정화하기 전에 효소의 활성부위를 기질로 블로킹하는 경우 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지의 전류와 파워생산량(power output)이 현저히 향상됨을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 효소적 연료전지에서 효소의 활성도를 향상시키고 전해질 내 전자전달 능력을 향상시킬수 있는, DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지용 전극을 제공하는 데 있다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지를 제공하는데 있다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지용 전극의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 효소 고정화시 효소 활성부위의 보호를 통하여 효소의 안정성과 활성도를 향상시킬 수 있는, DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 효소연료전지용 전극에 효소를 고정화하는 방법을 제공하는 데 있다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 전극, 상기 전극에 흡착된 DNA-감긴 탄소나노튜브, 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브상에 고정화된 효소를 포함하는 효소적 연료전지(EFC)용 전극을 제공한다.
- [14] 본 발명에 사용된 용어 '효소 연료전지(enzymatic fuel cell, EFC)'는 기존의 바이오 연료전지의 촉매를 생체촉매인 효소로 대체하고 수소보다는 비용이 저렴하고 다루기가 편한 일반 알코올이나 젖산, 또는 포도당을 연료로 사용하는 연료전지를 말한다. 여러 가지 생물체내에 존재하는 산화/환원 효소만을 이용하여 바이오 연료물질로부터 전자가 발생하여 전극을 통하여 이동할 수 있는 원리를 이용하여 다양한 효소 연료전지를 구현할 수 있다. 이러한 생물학적 효소를 이용한 연료전지는 친환경적인 전지로서 생체 효소를 이용하기 때문에 상온에서 수행할 수 있으며 미생물을 이용한 연료전지와 달리 값싼 바이오

연료를 계속적으로 넣어줌으로써 연속적인 전기에너지 발생장치가 용이하고 미생물의 성장패턴과 이차대사물의 영향을 고려하지 않아도 되는 장점을 가지고 있다.

- [15] 본 발명에 사용된 용어 ‘음극(anode)’는 일반적으로 연료전지에서의 음성적(negative) 전극을 말하는 것으로 전자를 바이오연료로부터 얻는 전극을 의미하며, 또한 ‘양극(cathode)’는 연료전지에서의 양성적(positive) 전극을 말하는 것으로 전자를 음극으로부터 받아서 전해조로 전달하는 전극을 의미한다.
- [16] 본 발명에서, 상기 전극은 효소적 연료전지의 전극으로 사용될 수 있는 어떠한 종류의 금속일 수 있으나, 바람직하게는 금(Au), 백금(Pt), 니켈(Ni) 또는 그들의 합금 형태, 더욱 바람직하게는 금으로 된 전극이 적당하다.
- [17] 본 발명에서, 상기 DNA는 탄소나노튜브에 감길수 있는 어떤 서열도 될 수 있으나, 바람직하게는 구아닌(G)과 티민(T)이 1개씩 반복적으로 연결된 단일가닥 DNA인 것을 특징으로 하는데, 사용되는 탄소나노튜브의 전장에 따라 구성되는 염기의 개수를 적절하게 조절할 수 있으며 합성되는 DNA 올리고머의 특성상 바람직하게는 20 내지 40개의 염기로 구성되는 것이 적당하며, DNA의 길이가 상기 범위보다 길거나 짧게 되면 감기는 형태가 안정하지 못하여 쉽게 풀려버리게 된다.
- [18] 본 발명에서, 상기 DNA는 5'과 3'말단에 아민기(-NH₂, amine group)를 갖는 것을 특징으로 한다. 상기 아민기는 당업계에 공지된 화학 합성방법으로 DNA에 부착되며 아민기가 부착된 DNA는 후술하는 방법에 의해 탄소나노튜브에 감긴 후, 효소의 고정화를 위해 사용된다. 본 발명의 실시예에 사용된 DNA는 본 발명자들이 직접 디자인하고 상업적 회사에 DNA 합성을 의뢰하여 아민기가 부착된 상태로 입수하였다.
- [19] 본 발명에서, 상기 탄소나노튜브는 단일벽 탄소나노튜브(single walled carbon nanotube), 이중벽 탄소나노튜브(double walled carbon nanotube), 다중벽 탄소나노튜브(multi-walled carbon nanotube) 및 다발형 탄소나노튜브(bundle of carbon nanotube)로 이루어진 군에서 선택하여 사용할 수 있으나, 바람직하게는 이중형, 다중형, 다발형 탄소나노튜브와 비교하여 상대적으로 부피가 크지 않고 DNA가 균일하게 감길 수 있는 내부 및 외부적으로 겹쳐져 있지 않는 단일벽 탄소나노튜브를 사용하는 것이 적당하다.
- [20] 본 발명에서, 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브는 단일가닥 DNA의 5'과 3' 말단에 아미노기(-NH₂, amino group)를 부착한 후, 상기 DNA와 탄소나노튜브를 증류수에 넣고 초음파 처리(sonicate)를 수행함으로써 제조되는 것을 특징으로 한다. 이렇게 제조된 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브는 효소적 연료전지에서 전극의 전자전달매개체의 역할을 한다.
- [21] 본 발명에서, 상기 DNA는 탄소나노튜브와 3차 증류수에서 5-20분간 초음파 처리(sonicate)를 수행하면 감싸기(wrapping) 현상, 즉 물리적으로 나사선 형태로

둘러싸게 되는 현상으로 인해 탄소나노튜브에 감기게 되는데, 이를 본 명세서에서 'DNA-감긴 탄소나노튜브'라 한다. 이러한 감싸기 현상은, Johnson, R. et al., NanoLett. 2008, 8, 69-75에 실제 나사선 형태로 감기게 된다는 것이 개시되어 있다.

- [22] 또한 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브는 TAE(Tris-acetate-EDTA) 버퍼에서 일정한 전압 차지(charge)를 걸어주면 +극에 (-)전하를 띠는 DNA-감긴 탄소나노튜브가 전기적 흡착에 의해 전극에 고정화되며, 이렇게 전극에 고정화된 DNA-감긴 탄소나노튜브에 다시 상기 효소가 결합되어 최종적으로 전극에 고정화된다.
- [23] 본 발명에서, 상기 효소는 효소적 연료전지에 사용되는 연료와 이를 산화 또는 환원시키는 목적에 따라 각 연료에 대응되는 산화반응용 효소 또는 환원반응용 효소가 될 수 있으며, 예를 들어 연료로서 포도당을 사용하는 경우 산화반응용 효소는 포도당 산화효소(glucose oxidase), 환원반응용 효소는 라케이즈(laccase)를 사용하는 것이 바람직하다.
- [24] 특히, 본 발명의 산화반응용 효소(예컨대, 포도당 산화효소)와 환원반응용 효소(예컨대, 라케이즈)는 전극에 고정화시 순환 전압전류 과정(cyclic voltammetry, CV cycle)을 이용하여 고정화하기 때문에 기존의 효소 고정화에 사용된 엔에틸디메틸아미노프로필 카보디아미드 하이드로 클로라이드(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide hydrochloride, EDC)와 같은 커플링 에이전트(coupling agent)가 필요가 없으며, 또한 DNA-감긴 탄소나노튜브가 음극(anode)과 양극(cathode)에서 전자전달매개체 역할을 수행하기 때문에 기존의 효소적 연료전지의 전자전달 매개체인 피롤로퀴놀린 퀴논(pyrroloquinoline quinone, PQQ, 음극의 전자전달매개체)나 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조-티아졸린-6-술포닉 에시드) 다이아모늄 염(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS, 양극의 전자전달매개체)도 필요가 없다.
- [25] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 본 발명에 따른 효소적 연료전지용 전극으로 구성되는 애노드(anode)와 캐소드(cathode), 그리고 포도당, 산소(O₂) 및 인산버퍼로 구성되는 전해질을 포함하는 효소적 연료전지를 제공한다.
- [26] 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지는 실시예 3에서 나타난 바와 같이, DNA-감긴 탄소나노튜브가 없는 효소적 연료전지 및 탄소나노튜브만 이용한 효소적 연료전지와 비교할 때 각각 453%, 129%가 향상된 파워덴시티를 나타내었을 뿐만 아니라, 5일 이상 안정된 파워덴시티가 유지되는 것을 확인할 수 있었다.
- [27] 본 발명의 효소적 연료전지에서, 상기 전해질은 애노드와 캐소드를 구획화하는 막을 포함하지 않는 통합 전해질인 것을 특징으로 한다.
- [28] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 효소적 연료전지용 전극의 제조방법을 제공한다.

- [29] a) DNA-감긴 탄소나노튜브를 준비하는 단계;
- [30] b) 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브를 전기적 포텐셜 과정을 이용하여 전극에 흡착시키는 단계; 및
- [31] c) 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 전극에 효소를 순환 전압전류 과정을 이용하여 고정화하는 단계.
- [32] 을 이용하여 고정화하는 단계.
- [33] 본 발명의 방법에서, 상기 a)단계의 DNA-감긴 탄소나노튜브는 단일가닥 DNA의 5'과 3' 말단에 아미노기(amino group)를 부착한 후, 상기 DNA와 탄소나노튜브를 증류수에 넣고 초음파 처리(sonicate)를 수행함으로써 제조되는 것을 특징으로 한다.
- [34] 본 발명의 방법에서, 상기 b)단계에서 전기적 포텐셜 과정은 파워 서플라이(power supply)라는 장치에서 일정한 전압을 일정 시간동안 적용시키는 반응을 말하는 것으로, 바람직하게는 전압 20-80 V 하에서 0.5-2분간 수행되는 것을 특징으로 한다.
- [35] 상기 전기적 포텐셜 과정은, DNA-감긴 탄소나노튜브를 TAE 버퍼에 분산시킨 후 상기 용액에 백금전극과 고정화하려는 전극을 담그고 파워 서플라이의 음극과 양극에 각각 연결한다. 그 후, 전압을 20 ~ 80V 내에서 0.5 ~ 2분 사이에서 반응시키면 +극에 (-)전하를 띠는 DNA-감긴 탄소나노튜브가 전기적 흡착에 의해 고정화된다.
- [36] 상기 범위보다 낮은 전압으로 실시할 경우에는 원하는 양의 DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착을 못하게 되며 상기 범위보다 높은 전압으로 실시할 경우에는 너무 많은 양의 DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착하게 되어 오히려 전자 전달이 약해지는 경향이 있다.
- [37] 본 발명의 방법에서, 상기 c)단계에서 순환 전압전류(cyclic voltammetry) 과정은 potentiostat/galvanostat라는 장치에서 어느 특정 전압 범위에서 주어지는 스캔 전압속도에서 연속적으로 전압을 증가시키고 하강시키는 과정을 말한다. 상기 일정한 범위는 본 발명의 효소적 연료전지가 사용 가능한 전압 범위에서 적절히 선택하여 실시할 수 있으며, 바람직하게는 순환 전압전류 과정은 0.1 내지 100 mM의 인산버퍼 하에서 전압 -1.0 ~ 1.0 V 및 스캔 속도 20 ~ 200 mV/s로 4~5 사이클 정도 수행되는 것을 특징으로 한다.
- [38] 구체적으로, 효소를 전극에 고정화 시에는 potentiostat/galvanostat라는 장치에서 순환 전압전류 과정인 스위핑 포텐셜 사이클(sweeping potential cycle) 반응을 실시하여 전극에서 효소의 흡착과정이 일어나게 된다. 이러한 전기적 흡착을 수행하는 이유는 보다 더 높은 농도의 효소가 전극에 고정화하기 위해서 실시한 것으로, 일단 전기적으로 흡착이 된 효소의 카르복실기(COOH)는 화학적으로 탄소나노튜브에 감겨있는 DNA의 아민기(NH₂)와 아마이드 결합이 이루어져 최종적으로 고정화된다.
- [39] 이와 같은 효소의 고정화는 상기와 같이 스위핑 전압 과정으로만 수행될 수 있으나, 효소의 카르복실기와 전극의 아미노기의 아마이드 결합을 인위적으로

더욱 잘 유도하기 위하여 커플링제(coupling agent), 예컨대 EDC(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride), DCC(dicyclohexylcarbodiimide), DIC(diisopropylcarbodiimide) 등을 이용할 수도 있다. 본 발명의 실시예3에서는 상기 EDC가 없이 상기 스위칭 전압 과정으로만 효소의 고정화를 수행하였으며, 실시예 5에서는 상기 EDC를 이용하여 추가적으로 효소의 카르복실기와 전극의 아미노기의 아마이드 결합을 유도함으로써 효소와 전극의 결합을 더욱 강력하게 하였다.

[40] 본 발명의 방법에서, 바람직하게는 상기 b)단계와 c)단계사이에 b') 효소의 활성부위를 기질로 블로킹하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 b')단계의 기질과 효소는 효소 연료전지에 사용되는 연료와 이를 산화시키는 효소가 서로 대응되도록 선택하여 사용되는데, 예를 들어, 연료로서 포도당(D-glucose)을 사용하는 경우 산화반응용 효소는 포도당 산화효소(glucose oxidase)를 사용될 수 있고, 효소 연료전지에 사용되는 산화반응용 효소가 포도당 산화효소이면 효소의 활성부위를 블로킹(blocking)하기 위한 기질은 포도당을 사용하는 것이 바람직하다.

[41] 본 발명의 방법에서, '효소의 활성부위를 블로킹' 또는 '효소의 활성부위를 보호'하는 것이란, 효소가 전극에 고정화될 때 효소의 활성부위 이외에 존재하는 COOH기가 전극에 부착되어 있는 NH₂기와 결합하도록 유도하기 위하여 활성부위를 기질로 먼저 결합시키는 것을 의미한다. 만일, 효소의 활성부위에 존재하는 COOH기가 전극의 NH₂기와 결합을 해 버리면 그만큼 효소 활성부위가 감춰져서 활성도가 떨어지게 된다. 따라서, 포도당 산화효소의 활성부위에 존재하는 COOH기를 제외한 나머지 부분의 COOH기에 결합하도록 하기 위하여 활성부위를 기질로 먼저 결합시키는 것이다. 이러한 효소 활성부위의 블로킹에 의해 효소 활성부위의 3차원적 구조가 보존되어 효소 활성도를 유지하게 되고 따라서 활성부위의 전자전달효율도 증가되는 효과를 발휘하게 된다.

[42] 본 발명에 있어서, 디옥시리보핵산 (DNA)이 감겨있는 탄소나노튜브 (CNT) 시스템이 적용된 효소 연료전지에서 효소 고정화 시 그 효소의 활성부위를 보호하면서 고정화하는 방법을 도입하면 음극에서의 포도당 산화효소 (glucose oxidase, GOD)와 양극에서의 라케이즈 (laccase)의 전자전달 능력과 효소 활성도 및 안정도를 높이는 기능을 복합적으로 적용하여 결론적으로 효소연료전지 (EFC)의 파워생산량(power output)을 증가시킬 수 있다.

[43] 본 발명의 구체적인 구현 예에서, 본 발명의 방법으로 제조된 전극을 포함하는 효소 연료전지는, 상기 음극(anode)과 양극(cathode) 연료로서 각각 포도당(glucose)과 산소(O₂)를 사용하고, 상기 산화환원반응용 효소로서 각각 포도당 산화효소(GOD)와 라케이즈(laccase)를 사용하며, 상기 음극과 양극의 전자전달 매개체로서 DNA-감긴 탄소나노튜브를 사용하였다. 또한 음극과 양극의 전해질은 막이 없는 통합된 전해질을 이용하며 두 극의 기질인

포도당(glucose)과 산소(O₂)가 포함된 기존의 인산버퍼(phosphate buffer)를 이용하였다.

[44]

발명의 효과

[45] 본 발명의 방법으로 제조된 전극을 포함하는 효소 연료전지는, 본 발명의 실시예 4 및 도 5 내지 7에서와 볼 수 있듯이, DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용했을 때 최대 442 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (976 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, 0.46V)의 파워덴시티가 생산되며 430 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 이상의 파워덴시티가 약 5일간 지속되는 것으로 미루어 보아, 효소적 연료전지(enzymatic fuel cell)에 있어서 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용하는 경우 전자전달 능력과 효소 활성화도 및 안정도에 효과가 크다는 것을 알 수 있다.

[46] 또한 본 발명의 방법으로 활성화부위가 보호된 효소가 고정된 전극을 포함하는 효소 연료전지는, 본 발명의 실시예 6 및 도 12 내지 13에서와 볼 수 있듯이, 최고 파워생산량(power output)이 약 760 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 로서, 효소 활성화부위를 블로킹하여 보호하지 않은 효소 연료전지의 파워생산량 433.5 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 와 비교하여 약 73%가 증가됨을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 도 13에서는 1주일 동안 약 730 ~ 760 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 의 파워생산량이 유지되는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 효소 연료전지에서 효소 활성화부위를 보호하는 본 발명의 방법을 이용했을 때 전자전달 능력과 효소 활성화도 및 안정도에 효과가 크다는 것을 의미한다.

[47]

도면의 간단한 설명

[48] 도 1은 본 발명에 따른 DNA-감긴 탄소나노튜브를 고정화한 전극(A) 및 DNA-감긴 탄소나노튜브를 고정화한 전극에 다시 효소를 고정화한 전극(B)의 전자현미경 사진이다.

[49] 도 2는 본 발명에 따른 포도당 산화효소가 전극에 고정화 되어 있는 음극(anode) 시스템과 효소가 고정화 되지 않은 시스템이 각각 효소적 연료전지에서 순환전압전류 값에 미치는 영향을 도시한 그래프이다.

[50] 도 3은 본 발명에 따른 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 음극(anode) 전극이 순환 전압전류 값에 미치는 영향을 고정화 방법이 다른 두 개의 전극과 비교 도시한 그래프이며, 도 3 내부의 그래프는 포도당의 농도에 따라 나타나는 전류값을 나타낸 그래프이다.

[51] 도 4는 본 발명에 따른 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지의 설계를 설명한 개략도이다.

[52] 도 5와 도 6은 상기 제작된 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지, 탄소나노튜브만을 이용한 효소적 연료전지, 및 DNA와 탄소나노튜브가 없는 효소적 연료전지에 의해 각각 생산하는 전압-전류와 파워덴시티를 도시한 그래프이다.

[53] 도 7은 본 발명에 따른 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지가

약 5일 동안 생산하는 파워덴시티를 도시한 그래프이다.

[54] 도 8은 DNA-감긴 탄소나노튜브가 고정화된 전극에 활성부위를 보호하지 않거나(A), 활성부위를 보호한(B) 포도당 산화효소를 고정화한 연료전지용 전극의 전자현미경 사진(B)이다.

[55] 도 9는 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호하는 것이 전극의 순환 전압전류 값(CV cycle)에 미치는 영향을 도시한 그래프이다.

[56] 도 10은 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호하는데 사용되는 포도당(D-glucose)의 양에 따른 순환 전압전류 값을 도시한 그래프이다.

[57] 도 11은 효소 활성부위를 보호한 포도당 산화효소를 전극에 고정화하는 방법을 설명하는 개략도이다.

[58] 도 12는 효소 활성부위를 보호한 상태에서 포도당 산화효소를 전극에 고정화(□, power output; ○, cell potential), 및 효소 활성부위를 보호하지 않은 상태에서 포도당 산화효소를 전극에 고정화(■, power output; ●, cell potential)한 DNA-감긴 탄소나노튜브가 포함된 효소 연료전지에서의 생산되는 전압(cell potential), 전류(current density) 및 파워생산량(power output)을 도시한 그래프이다.

[59]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[60] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시 예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[61]

[62] 실시 예 1. DNA-감긴 탄소나노튜브(DNA-wrapped CNT)의 제조

[63] DNA-감긴 탄소나노튜브 (또는, 'DNA-wrapped CNT')를 만들기 위해, 먼저 구아닌(guanine, G)과 티민(Thimine, T) 염기서열이 30 base가 되는 ((GT)₁₅) 되는 단일가닥 DNA를 5'과 3'에 아민기(amine group)가 있는 것으로 디자인하고 상업적 회사에 DNA 합성을 의뢰하여 아민기가 부착된 상태로 입수하였다.

[64] 제작된 DNA (40 mg/mL 증류수)와 단일벽 탄소나노튜브(single walled carbon nanotube, SWNT; Sigma-Eldritch)(40 mg/mL)를 3차 증류수에서 10분 동안 초음파 처리(sonicate)를 실시하여 단일벽 탄소나노튜브에 DNA가 감기도록 유도시켰다. 이는 DNA가 나사선으로 감기려는 성질과 CNT의 π - π stacking interaction이 조화가 되는 반응을 이용한 것이다. 이 용액에 0.2 mM의 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)를 넣고 4°C, 8W에서 2시간 동안 초음파 처리(sonicate)를 실시하고 13,000g에서 30분간 원심분리한 다음, 뭉쳐있는 것을 제거하고 DNA이 기능화된 탄소나노튜브를 완성하였다.

[65]

[66] 실시 예 2. DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 전극의 제조

- [67] 실시예 1에서 제조된 DNA-감긴 탄소나노튜브를 전극에 흡착시키기 위해, 먼저 금(Au)으로 된 전극 표면을 물리적으로 흡착이 되어 있는 물질을 제거하기 위한 용도로서 $0.3\ \mu\text{m}\ \text{Al}_2\text{O}_3$ 분말과 $0.05\ \mu\text{m}\ \text{Al}_2\text{O}_3$ 분말을 이용하여 닦아 내고, 화학적으로 단백질 같은 물질은 분해시키기 위한 용도로서 피란하 용액 (piranha solution; $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 3:1$)에 20분간 반응시켰다. 그리고 초음파 처리한 후 물로 깨끗이 닦아내고 3분간 100%에탄올에 담근 다음, 꺼내어 순환전류전압 과정(CV cycle)을 $0.1\ \text{M}\ \text{H}_2\text{SO}_4$ 용액에서 포텐셜 범위 $0.4 \sim 1.2\ \text{V}$ 로 실시하여 나머지 잔류 이물질을 전극에서 제거하였다.
- [68] 상기 클리닝(cleaning) 처리가 완료된 전극은 파워 서플라이(power supply)의 전압 50V 에서 백금 전극을 이용하여 1분간 실시하여 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브를 전극에 고정화시켰다. 즉, DNA-감긴 탄소나노튜브가 분산되어 있는 TAE 버퍼에 분산되어 있고, 그 용액 내에서 백금전극을 음극으로 하고 상기 클리닝 처리된 전극을 양극으로 하여 파워 서플라이에 연결 후, 전압을 50V 로 1분간 반응시키면 DNA-감긴 탄소나노튜브가 양극 전극에 흡착하게 된다.
- [69]
- [70] 실시예 3. DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 전극에 효소를 고정화한 전극의 제조
- [71] 실시예 2에서 제조된 DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 전극을 바이오연료전극(bioelectrode)인 포도당 산화효소 전극(GOD-anode)과 라케이즈 전극(Lac-cathode)으로 제조하기 위해, 전압 범위를 $-1.0 \sim 1.0\ \text{V}$ 와 스캔 속도(scan rate)를 $20 \sim 200\ \text{mV/s}$ 로 하여 0.1M 인산버퍼에 각각 두 효소, 포도당 산화효소(glucose oxidase, GOD; Bio Basic Inc.)와 라케이즈(laccase, LAC; Fluka)를 넣어 스위핑 전압 과정(sweeping voltammetry)을 Potantioestat/Galvanostat (WPG100, WonATech Ltd., Korea)에서 4~5 사이클 정도 실시하여 전극에 효소를 각각 고정화시켰다.
- [72] 이와 같이, 효소를 전극에 고정화할 때에는 potentiostat/galvanostat라는 장치에서 스위핑 포텐셜 사이클(sweeping potential cycle) 반응을 실시하고 그 조건으로서 상온에서 $-1.0 \sim 1.0\ \text{V}$, 스캔속도 $20 \sim 200\text{mV/s}$ 에서 4~5 cycle 실시하여 전극에서 효소의 흡착과정이 일어나게 된다. 이는 보다 더 높은 농도의 효소가 전극에 고정화하기 위해서 실시한 것으로, 흡착이 된 효소의 카르복실기(COOH)는 화학적으로 탄소나노튜브에 감겨있는 DNA의 아민기(NH_2)와 아마이드 결합이 이루어져서 최종적으로 강한 결합이 이루어지게 되는 것이다.
- [73] 도 1에서, (A)는 DNA-감긴 탄소나노튜브를 고정화한 전극(electrode)을 전자현미경(FE-SEM)으로 관찰한 사진이고, (B)는 전극에 고정화된 DNA-감긴 탄소나노튜브 위에 포도당 산화효소(GOD)가 고정화된 바이오연료전극(bioelectrode)을 전자현미경으로 관찰한 사진이다.
- [74] 도 2는 포도당 산화효소가 전극에 고정화 되어 있는 음극(anode)

시스템(DNA-감긴 CNT가 없는 일반 전극에 효소를 고정화시킨 것)과 효소가 고정화 되지 않은 시스템(용액 내에 효소가 있으나 고정화되지 않은 것)이 각각 효소적 연료전지에서 순환전압전류 값에 미치는 영향을 도시한 그래프이다. 포도당 산화효소가 고정화되어 있는 음극 시스템의 음극 전류 피크(anodic current peak)가 1.0 V에 533 μ A로서 고정화하지 않은 연료전지보다 높게 나타났으며 전체적인 산화환원 면적(redox area)이 산화적 방향으로 전환되었다. 따라서 효소적 연료전지에서 효소의 위치는 전극에 고정화되어 있는 시스템이 그렇지 않은 것보다 전기적인 특성이 우수하였다.

[75] 도 3은 실시예 1에서 제작된 DNA-감긴 탄소나노튜브에 포도당 산화효소가 고정화된 음극(anode) 전극이 순환 전압전류 값에 미치는 영향을 고정화 방법이 다른 두 개의 전극(대조군)과 비교 도시한 그래프이며, 도 3 내부의 그래프는 포도당의 농도에 따라 나타나는 전류값을 나타낸 그래프이다. 여기서, DNA가 없는 탄소나노튜브에 포도당 산화효소가 고정화된 전극(짧은 점선)과 DNA와 탄소나노튜브가 모두 없이 COOH기가 존재하는 전극에 포도당 산화효소를 고정화한 것(긴 점선)은 여기에서 대조군으로 사용되었다.

[76] 그 결과, DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 음극(anode) 전극의 산화환원 면적(redox area)이 크게 나타났으며 음극 전류 피크(anodic current peak)가 1.48 V에 308 μ A로서 다른 방법으로 고정화한 음극(anode) 시스템보다 높게 나타났다. 따라서 본 발명에서 신규하게 제작된 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 음극(anode) 시스템의 전자전달 능력이 상기 대조군 전극들 보다 우수했다는 것을 확인할 수 있었다.

[77]

[78] 실시예 4. DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지(EFC)의 제조 및 파워덴시티 측정

[79] 실시예 3에서 제작된 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 전극을 이용하면서, 음극(anode)의 포도당 산화효소와 양극(cathode)의 라케이즈를 서로 연결하고 그의 연료가 되는 20 mM의 포도당(glucose)과 O₂가 포함된 pH 7인 0.1M의 인산버퍼 (phosphate buffer)를 포함하는 전해질(electrolyte)을 이용하여 이온막이 없는 기본적 효소적 연료전지를 제작하였다. 그리고 이 연료전지를 potentiostat/galvanostat (WPG100, WonATech 주식회사, 한국)에 연결하고 WPG 프로그램(WPG100, WonATech 주식회사, 한국)으로 25°C에서 전압(V)-전류(I) 및 파워덴시티(Power density)를 측정하였다. 도 4는 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 기본적 효소적 연료전지의 설계를 설명한 개략도이다.

[80] 도 5와 도 6은 상기 제작된 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지, 탄소나노튜브만을 이용한 효소적 연료전지, 및 DNA와 탄소나노튜브가 없는 효소적 연료전지에 의해 각각 생산하는 파워덴시티와 전압-전류(전지 포텐셜)를 도시한 그래프이다.

[81] 측정 결과, 도 5에서 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 기본적 효소적

연료전지에서의 최고 파워덴시티가 $442 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 로 높게 나타났다. 이 결과는 탄소나노튜브만을 이용한 기본적 효소적 연료전지 및 DNA와 탄소나노튜브가 모두 없는 기본적 효소적 연료전지에서의 파워덴시티보다 각각 129%와 453%가 증가된 값이었다.

- [82] 또한 도 6에서, DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 기본적 효소적 연료전지에서의 세부적으로 최고 전압-전류값이 $976 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, 0.45V 로 높게 나타났다. 이 결과는 탄소나노튜브만을 이용한 기본적 효소적 연료전지 및 DNA와 탄소나노튜브가 모두 없는 기본적 효소적 연료전지에서의 전류 덴시티(Current density)보다 각각 (241)%와 (646)%가 증가된 값이었다.
- [83] 또한, 도 7은 상기 제작된 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지가 약 5일 동안 생산하는 파워덴시티를 도시한 그래프이다. 이 결과에서, 약 5일 동안 $430 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 이상의 파워덴시티가 유지되는 것을 확인할 수 있었다.
- [84] 결론적으로, DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용했을 때 최대 $442 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ($976 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, 0.46V)의 파워덴시티가 생산되며 $430 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 이상의 파워덴시티가 약 5일간 지속되는 것으로 미루어 보아, 효소적 연료전지(enzymatic fuel cell)에 있어서 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용하는 경우 전자전달 능력과 효소 활성화도 및 안정도에 효과가 크다는 것을 알 수 있다.
- [85]
- [86] 실시예 5. DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 전극에 활성부위가 보호된 포도당 산화효소를 고정화한 전극의 제작
- [87] 실시예 2에서 제조된 DNA-감긴 탄소나노튜브(DNA-wrapped CNT)가 흡착되어 있는 전극을, 5 mM의 EDC(N-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide hydrochloride)가 존재하는 인산버퍼에 넣음으로서 전극에 EDC를 먼저 고정화시키고, 다른 튜브에서는 포도당을 포함하는 인산버퍼에 포도당 산화효소를 넣어 10분간 반응시켜 효소의 활성부위를 보호한 다음, 이 효소가 포함된 용액에 상기 EDC가 고정화된 전극을 넣었다. 이 때 전극에 효소를 고정화하는 방법은 다음과 같다.
- [88] 전압 범위를 $-1.0 \sim 1.0 \text{ V}$ 와 스캔 속도(scan rate)를 $20 \sim 200 \text{ mV/s}$ 로 하여 0.1 M 인산버퍼에 각각 포도당 산화효소(glucose oxidase, GOD; Bio Basic Inc.)와 라케이즈(Laccase, LAC; Fluka)를 넣어 스위핑 전압 과정(sweeping voltammetry)을 4~5 사이클 정도 실시하고 4°C 에서 6시간 반응시킴으로써, 각각의 효소가 고정화된 포도당 산화효소 전극(GOD-anode)과 라케이즈 전극(Lac-cathode)을 제조하였다.
- [89] 도 8에서, A는 DNA-감긴 탄소나노튜브가 고정화된 전극에 활성부위를 보호하지 않은 포도당 산화효소를 고정화한 연료전지용 전극의 전자현미경 사진(FE-SEM)이고, B는 활성부위를 보호한 포도당 산화효소를 고정화한 연료전지용 전극의 전자현미경 사진이다.

- [90] 도 8에서, A와 B에 나타난 전극은 모두 DNA-감긴 탄소나노튜브로 인해 전반적으로 다공성이 풍부한 표면이 된 것을 확인할 수 있었다. 또한 활성부위를 보호한 포도당 산화효소를 고정화한 전극은 상대적으로 검은 반점들이 적은 것으로 나타나, 전극에 고정화된 포도당 산화효소의 양이 더 많은 것으로 판단되었다.
- [91] 여기서, ‘검은 반점’의 의미는 DNA-감긴 탄소나노튜브가 전극에 흡착이 되어 다공성(porous)을 갖는데 그 다공성의 부분에서 사이사이의 공간이 검은 점으로 보이고 있다. 따라서 정확하게 전극의 DNA-감긴 탄소나노튜브에 효소가 고정화가 되면 그만큼 공간이 줄어들게 되므로 검은 부분이 적어질 것으로 예상하였고, 그만큼 DNA-감긴 탄소나노튜브들의 사이즈도 어느 정도 굵어진 것도 판단할 수 있다.
- [92] 상기 도 8의 결과, 전극에 고정화될 수 있는 효소의 여러 표면 중 효소의 활성부위가 보호된 쪽으로는 고정화가 되지 않기 때문에 일정한 고정화 방향을 제공해줄 수 있는 것으로 보이며, 이로 인해 어느 정도 한 방향으로 고정화가 되어 고정화되는 양이 증가한 것으로 예측되었다. 즉, 효소의 활성부위를 블로킹하게 되면 그만큼 고정화되는 3차원적 모양이 어느 정도 일정하게 될 것으로 예측이 되고, 그러한 결과로 가지런히 표면에 고정화가 되면서 그만큼 고정화되는 효소의 양이 증가했을 것이라고 예측할 수 있다.
- [93] 도 9는 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호하는 것이 전극의 순환 전압전류 값(CV cycle)에 미치는 영향을 도시한 그래프이다.
- [94] 도 9에서, 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호하는 것이 전극의 양극 전류 피크(anodic current peak)가 1.0 V에 668 μ A로서 고정화하지 않는 연료전지보다 높게 나타났으며, 전체적인 산화면적(redox area)도 크게 나타났다. 따라서 효소 연료전지에서 효소 활성부위가 보호된 전극이 그렇지 않은 것보다 전기적인 특성이 우수하였다.
- [95] 도 10은 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호하는데 사용되는 포도당(D-glucose)의 양에 따른 순환 전압전류 값을 도시한 그래프이다.
- [96] 도 10에서, 사용된 포도당의 양이 0.1 M일 때 순환 전압전류 값이 가장 우수한 것으로 확인되었고, 0.1 M 이하 또는 0.2 M 이상 사용될 때에는 전체적인 산화면적과 음극 전류 피크가 상대적으로 낮게 나타났다. 따라서 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호할 때 사용되는 포도당의 양은 0.1 M이 가장 적합한 것으로 확인되었다.
- [97]
- [98] 실시예 6. DDNA-감긴 탄소나노튜브가 고정화된 전극에 활성부위가 보호된 포도당 산화효소를 고정화한 전극을 이용한 효소 연료전지의 제작
- [99] 상기 실시예 5에서 제작된 포도당 산화효소 전극(GOD-anode)과 라케이즈 전극(Lac-cathode)을 서로 연결하고, 연료가 되는 20 mM의 포도당과 O₂가 포함된 인산버퍼(phosphate buffer; pH 7, 0.1M)를 이용하여 전해질(electrolyte)을

제조하고 이온막이 없는 효소 연료전지를 제작하였다 (도 11 참조). 제작 후, 연료전지를 potentiostat/galvanostat(WPG100, WonATech사, 한국)에 연결하고 WPG 프로그램(WPG100, WonATech사, 한국)으로 25°C에서 전압(V)-전류(I) 및 파워 텐시티(Power output)를 측정하였다.

- [100] 도 11는 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소 연료전지의 설계에서, 효소 활성부위를 보호한 포도당 산화효소를 전극에 고정화하는 방법을 설명하는 개략도이다.
- [101] 도 12는 효소 활성부위를 보호한 상태에서 포도당 산화효소를 전극에 고정화(□, power output; ○, cell potential), 및 효소 활성부위를 보호하지 않은 상태에서 포도당 산화효소를 전극에 고정화(■, power output; ●, cell potential)한 DNA-감긴 탄소나노튜브가 포함된 효소 연료전지에서의 생산되는 전압(cell potential), 전류(current density) 및 파워생산량(power output)을 도시한 그래프이다.
- [102] 도 12에서, 포도당 산화효소의 고정화 시 효소 활성부위를 보호한 상태에서 고정화한 전극이 결합되어 있는 효소 연료전지의 최고 파워생산량(power output)은 약 $760 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 로 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 활성부위를 보호하지 않은 포도당 산화효소를 고정화한 효소 연료전지의 파워생산량 약 $433.5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 보다 약 73% 증가시킨 값이었다.
- [103] 또한, 도 13은 효소 활성부위를 보호한 상태에서 포도당 산화효소를 고정화한 DNA-감긴 탄소나노튜브를 포함하는 효소 연료전지가 1주일 동안 생산하는 파워생산량(power output)을 도시한 그래프이다.
- [104] 도 13에서, 1주일 동안 약 $730 \sim 760 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 의 파워생산량이 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 효소 활성부위를 보호한 상태에서 포도당 산화효소를 고정화한 DNA-감긴 탄소나노튜브를 포함하는 효소 연료전지에서 최대 $760 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 의 파워생산량이 생산되었고, 이는 효소 연료전지에서 효소 활성부위를 보호하는 효소고정화 방법을 이용했을 때 전자전달 능력과 효소 활성도 및 안정도에 효과가 크다는 것을 의미한다.

[105]

산업상 이용가능성

- [106] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 DNA-감긴 탄소나노튜브를 연료전지용 전극에 고정화시키고 고정화된 DNA-감긴 탄소나노튜브에 산화환원반응용 효소들을 다시 고정화시킨 전극을 이용하여 효소 활성도와 안정도가 향상된 효소적 연료전지를 제조할 수 있다. 따라서 본 발명의 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소적 연료전지는 기존의 낮은 파워텐시티를 갖는 효소적 연료전지의 단점을 보완한 것으로 향후 효소적 연료전지 개발 및 상용화에도 크게 기여할 것으로 판단된다.
- [107] 또한, 본 발명에 따르면 DNA-감긴 탄소나노튜브를 이용한 효소 연료전지의

제작 시 효소의 활성부위를 보호하면서 효소 고정화를 실시하면 효소의 활성도를 높이고 전해질 내에서 전자전달 능력을 높일 수 있어 기존의 효소 활성부위를 보호하지 않은 것보다 향상된 파워생산량(power output)을 얻을 수 있다. 따라서 본 발명의 효소 고정화 방법은 효소 연료전지에서 효소 활성도 및 안정성 향상 뿐만 아니라 파워생산량을 향상시킬 수 있어 효소 연료전지 제조분야에서 매우 유용한 기술로 판단된다.

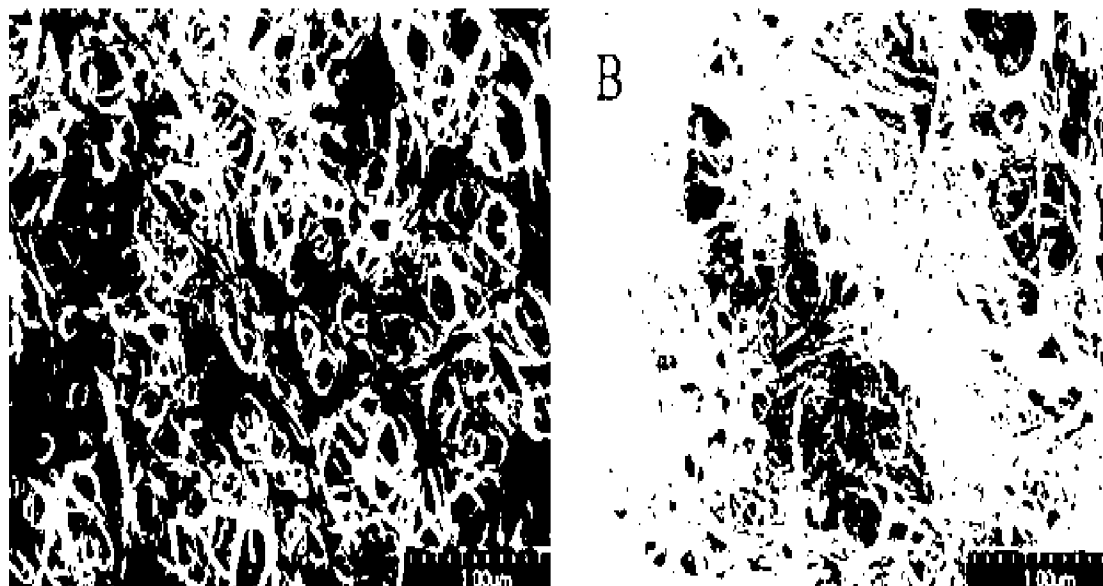
[108]

청구범위

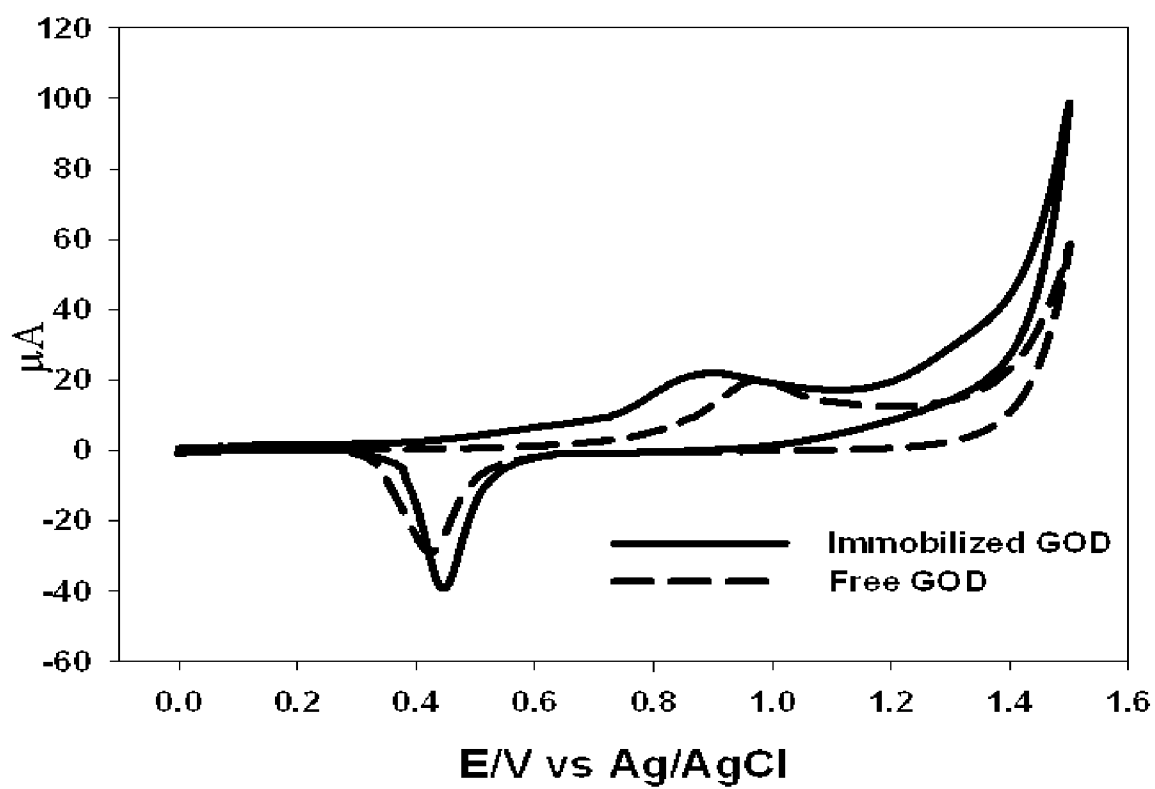
- [청구항 1] 전극, 상기 전극에 흡착된 DNA-감긴 탄소나노튜브, 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브상에 고정화된 효소를 포함하는 효소적 연료전지(EFC)용 전극.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 전극은 금(Au)으로 된 전극인 것을 특징으로 하는 효소적 연료전지용 전극.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 DNA는 20 내지 40개의 염기로 구성되며, 구아닌(G)과 티민(T)이 1개씩 반복적으로 연결된 단일가닥 DNA인 것을 특징으로 하는 효소적 연료전지용 전극.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 DNA는 5'과 3'말단에 아민기(amine group)를 갖는 것을 특징으로 하는 효소적 연료전지용 전극.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 탄소나노튜브는 단일벽 탄소나노튜브(single walled carbon nanotube)인 것을 특징으로 하는 효소적 연료전지용 전극.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브는 단일가닥 DNA의 5'과 3' 말단에 아미노기(amino group)를 부착한 후, 상기 DNA와 탄소나노튜브를 증류수에 넣고 초음파 처리(sonicate)를 수행함으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 효소적 연료전지용 전극.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서, 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브는 전극의 전자전달매개체의 역할을 하는 것을 특징으로 하는 효소적 연료전지용 전극.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서, 상기 효소는 산화반응용 효소인 포도당 산화효소(glucose oxidase) 또는 환원반응용 효소인 라케이즈(laccase)인 것을 특징으로 하는 효소적 연료전지용 전극.
- [청구항 9] 제 1항에 따른 효소적 연료전지용 전극으로 구성되는 애노드(anode) 또는 캐소드(cathode), 그리고 포도당, 산소(O₂) 및 인산버퍼로 구성되는 전해질을 포함하는 효소적 연료전지.
- [청구항 10] 제 11항에 있어서, 상기 전해질은 애노드와 캐소드를 구획화하는 막을 포함하지 않는 통합 전해질인 것을 특징으로 하는 효소적 연료전지.
- [청구항 11] 하기 단계들을 포함하는 효소적 연료전지용 전극의 제조방법:
 a) DNA-감긴 탄소나노튜브를 준비하는 단계;
 b) 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브를 전기적 포텐셜 과정을 이용하여 전극에 흡착시키는 단계; 및
 c) 상기 DNA-감긴 탄소나노튜브가 흡착된 전극에 효소를 순환 전압전류 과정을 이용하여 고정화하는 단계.

- [청구항 12] 제 11항에 있어서, 상기 a)단계의 DNA-감긴 탄소나노튜브는 단일가닥 DNA의 5'과 3' 말단에 아미노기(amino group)를 부착한 후, 상기 DNA와 탄소나노튜브를 증류수에 넣고 초음파 처리(sonicate)를 수행함으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제 11항에 있어서, 상기 b)단계에서 전기적 포텐셜 과정은 전압 20-80 V 하에서 0.5-2분간 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제 11항에 있어서, 상기 c)단계에서 순환 전압전류 과정은 0.1 내지 100 mM의 인산버퍼 하에서 전압 -1.0 ~ 1.0 V 및 스캔 속도 20 ~ 200 mV/s로 4~5 사이클로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제 11항에 있어서, 상기 b)단계와 c)단계사이에 b') 효소의 활성부위를 기질로 블로킹하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서, 상기 b')단계의 효소는 포도당 산화효소(glucose oxidase)이고 기질은 포도당(D-glucose)인 것을 특징으로 하는 방법.

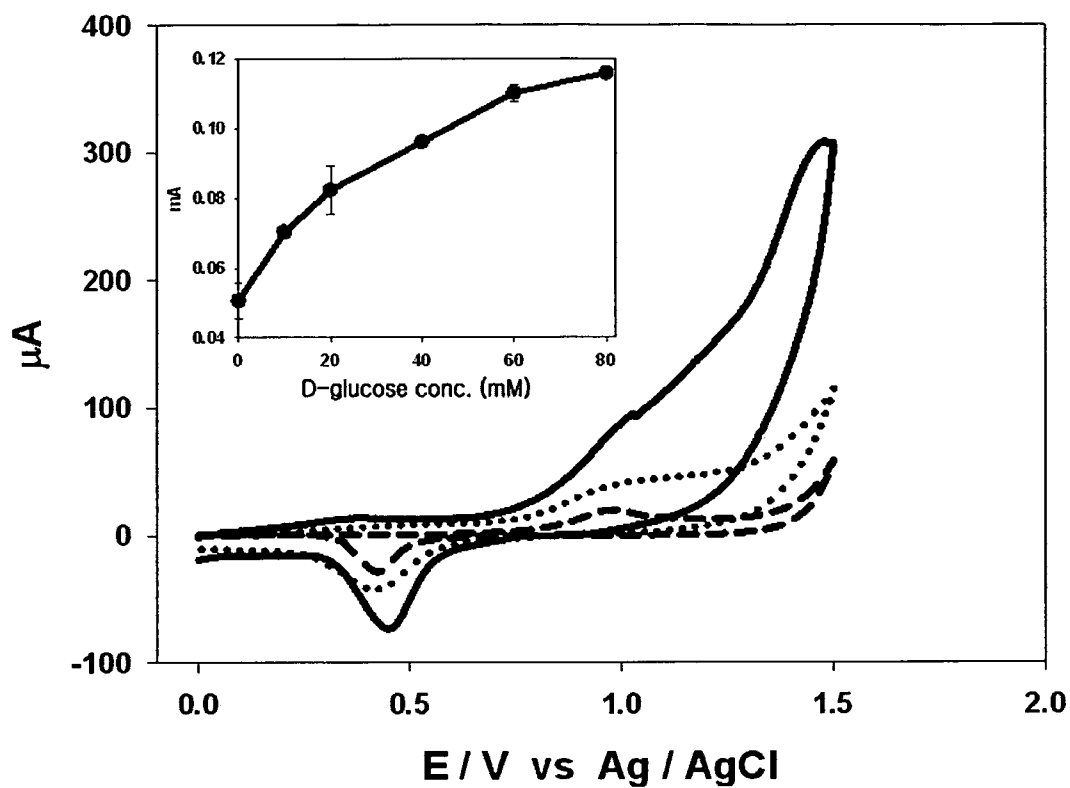
[Fig. 1]



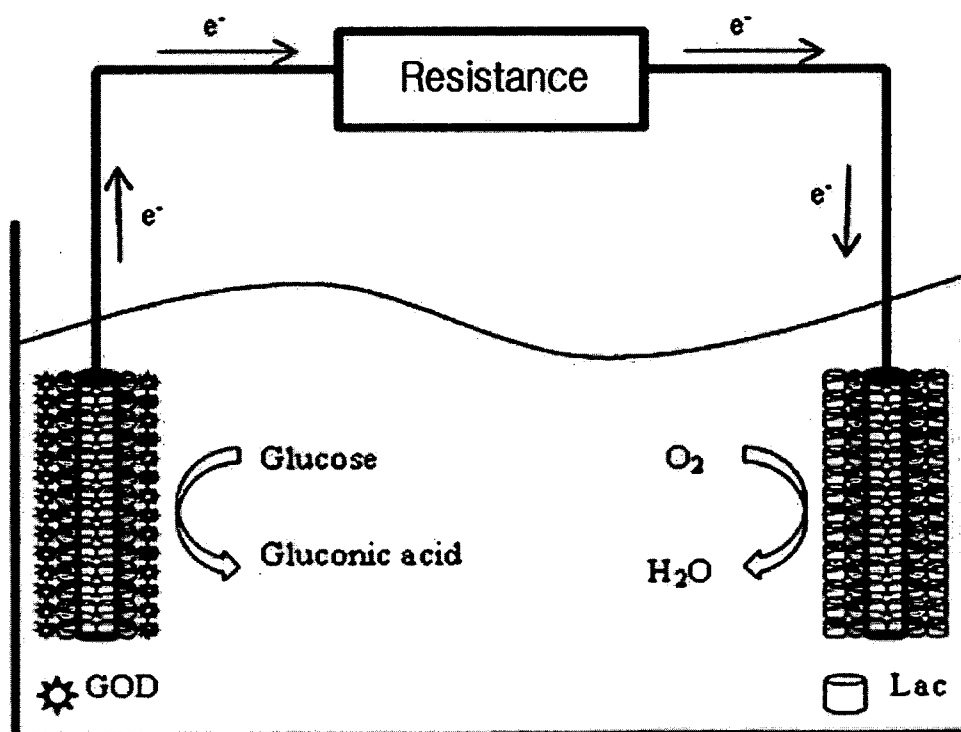
[Fig. 2]



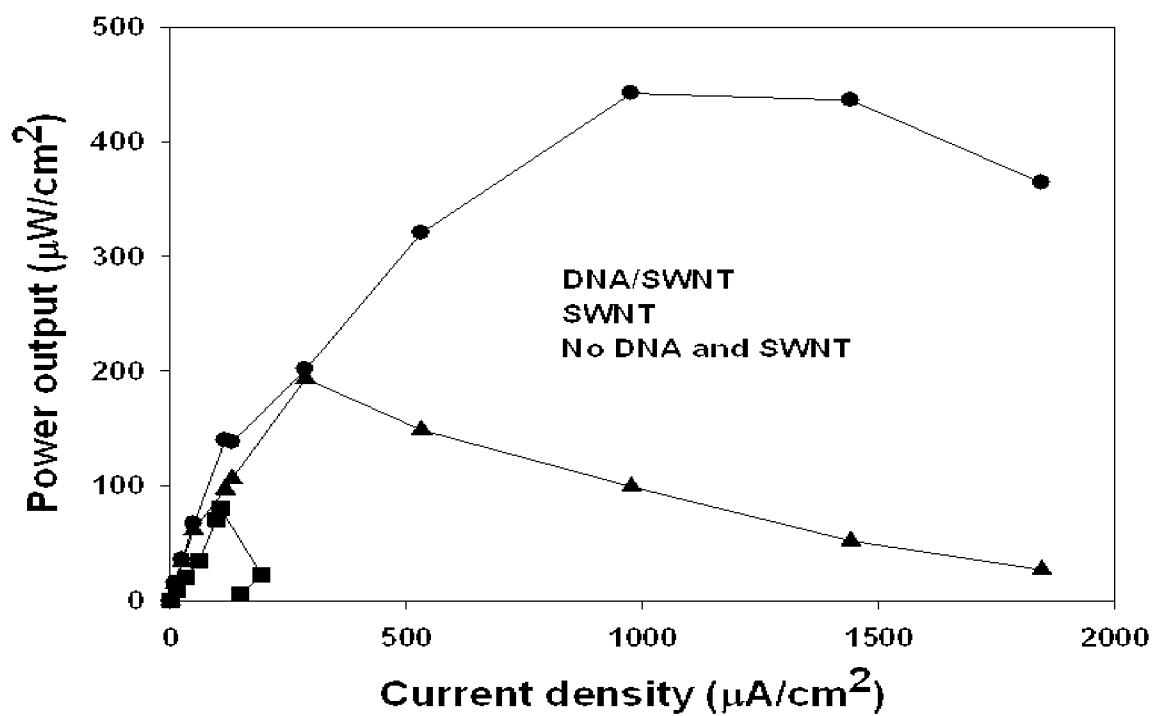
[Fig. 3]



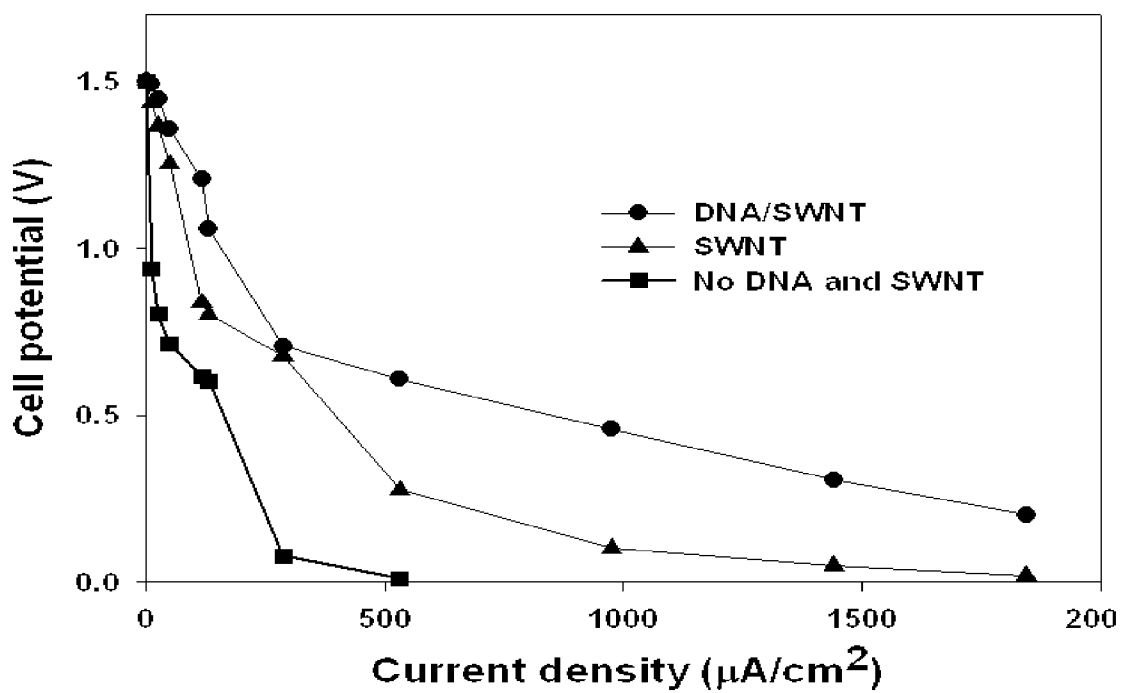
[Fig. 4]



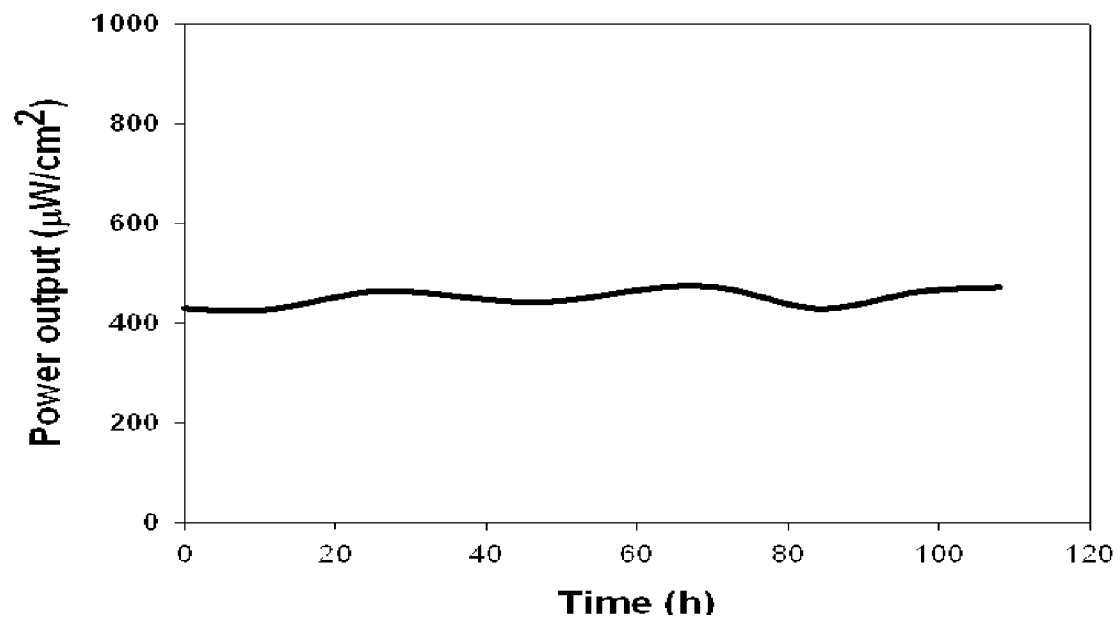
[Fig. 5]



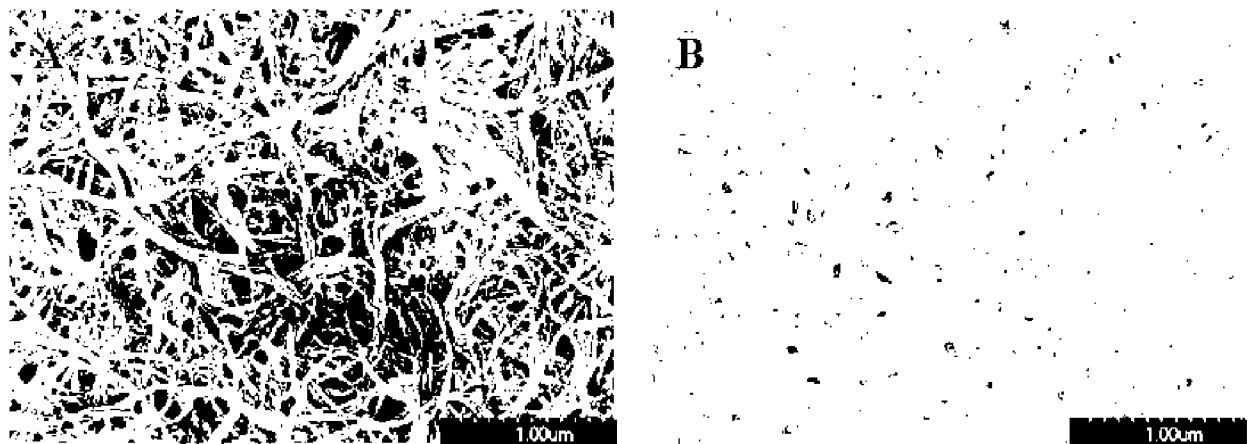
[Fig. 6]



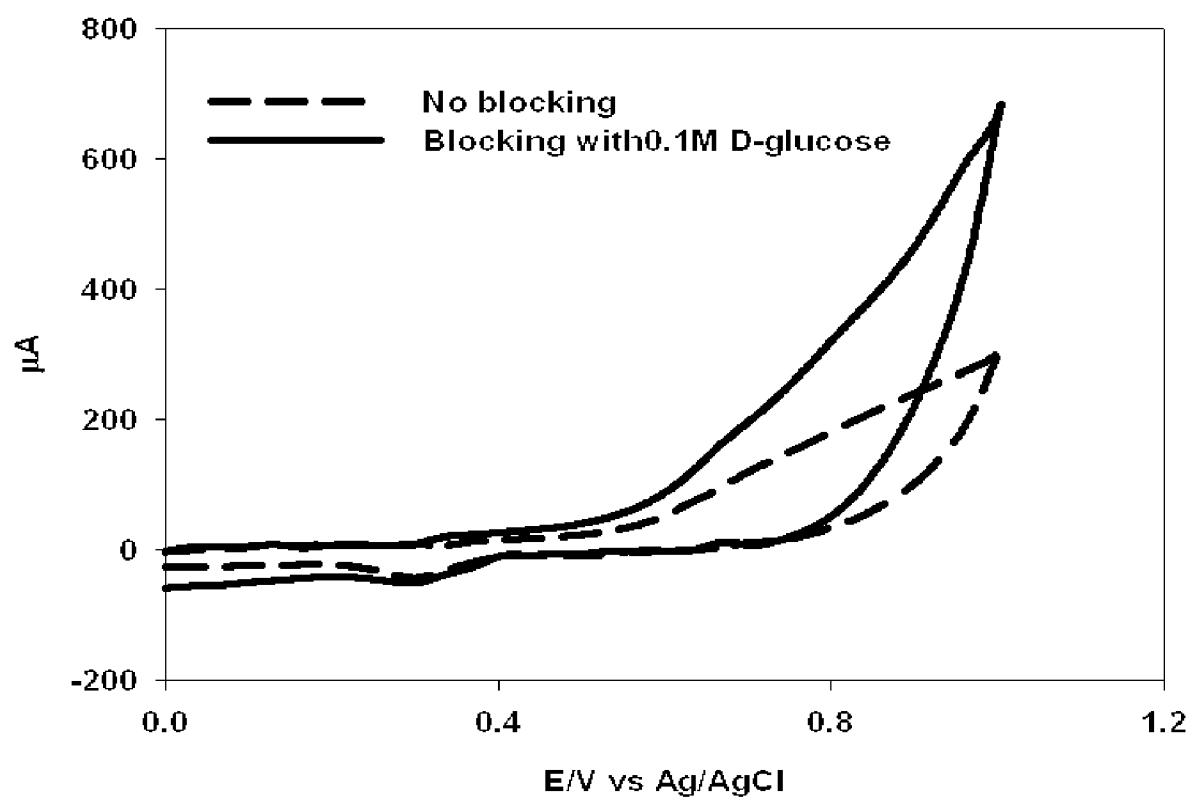
[Fig. 7]



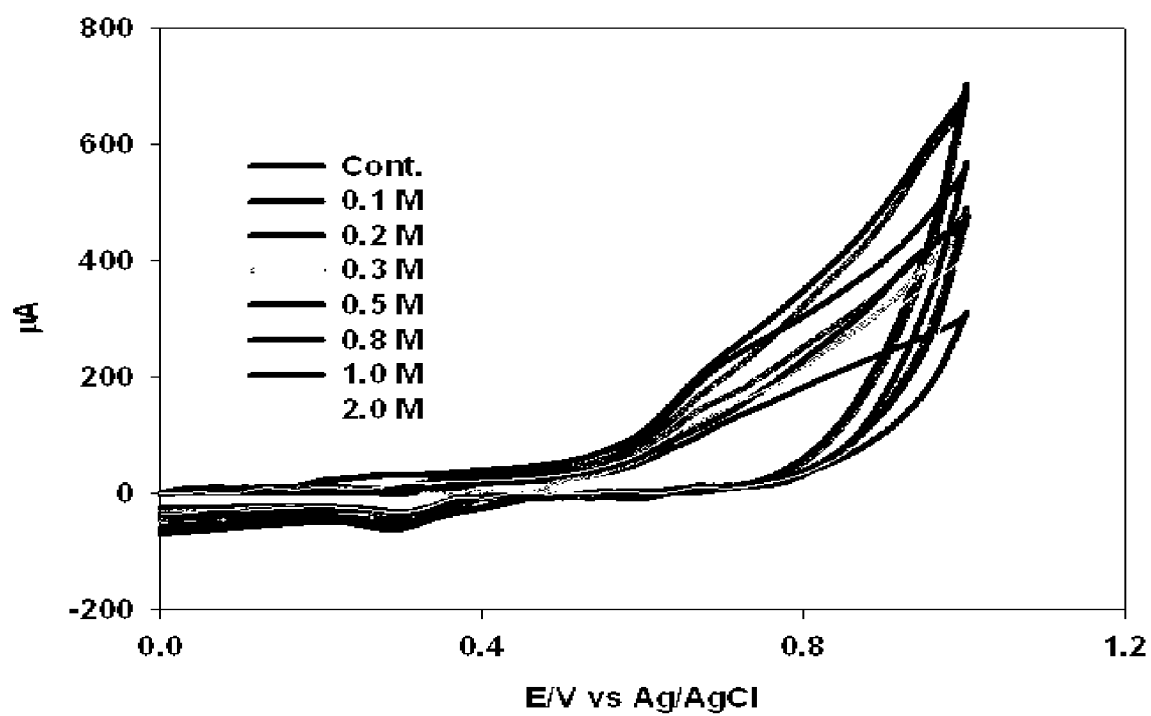
[Fig. 8]



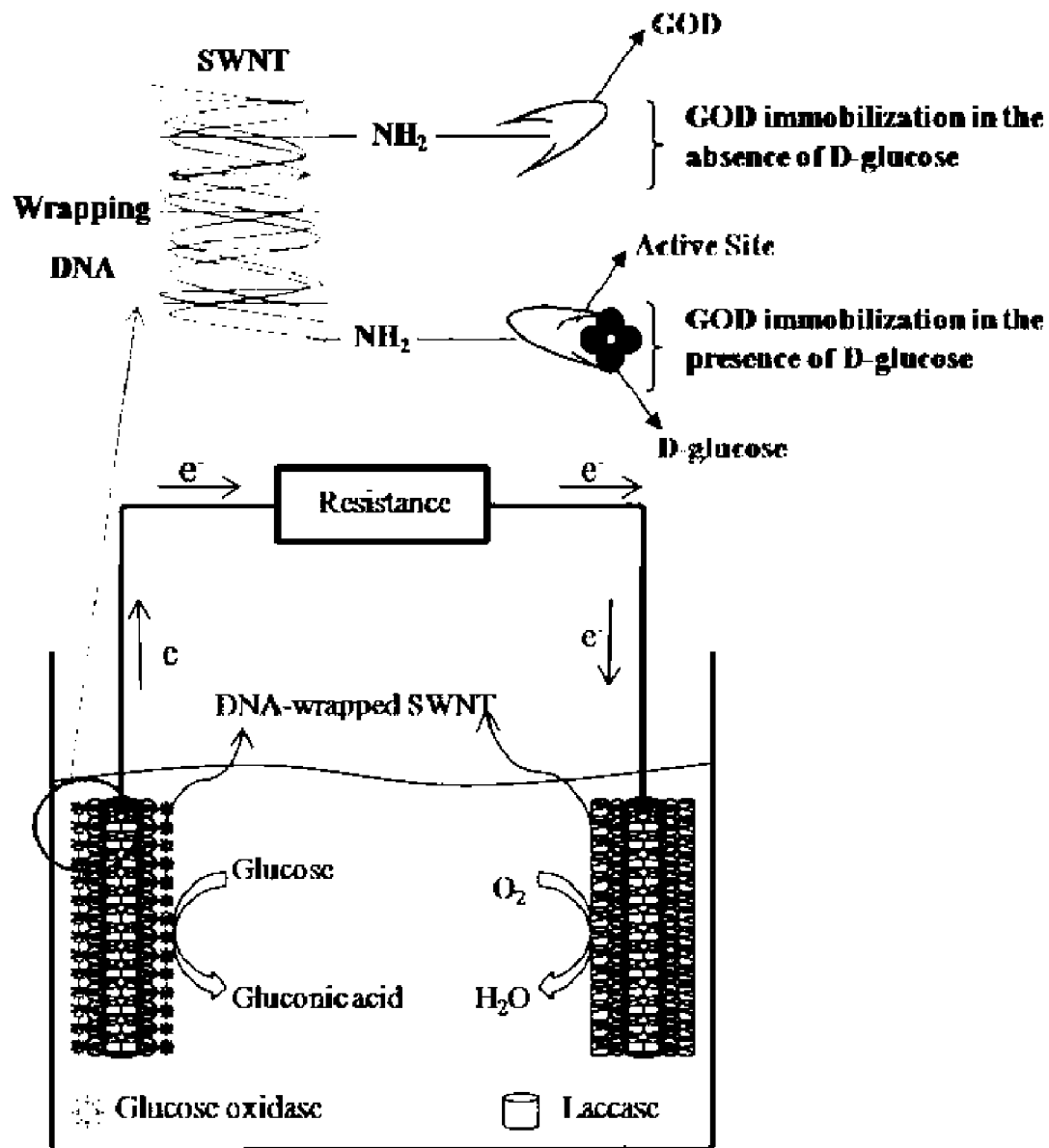
[Fig. 9]



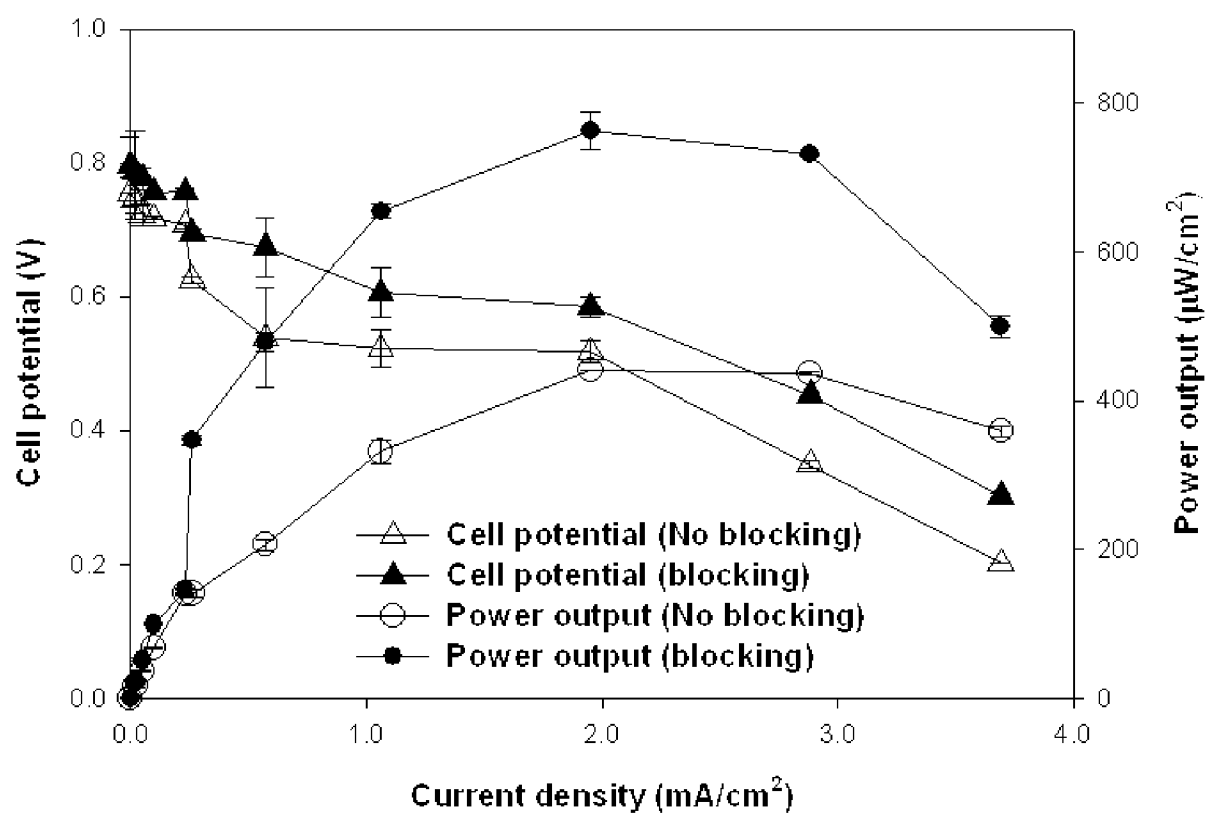
[Fig. 10]



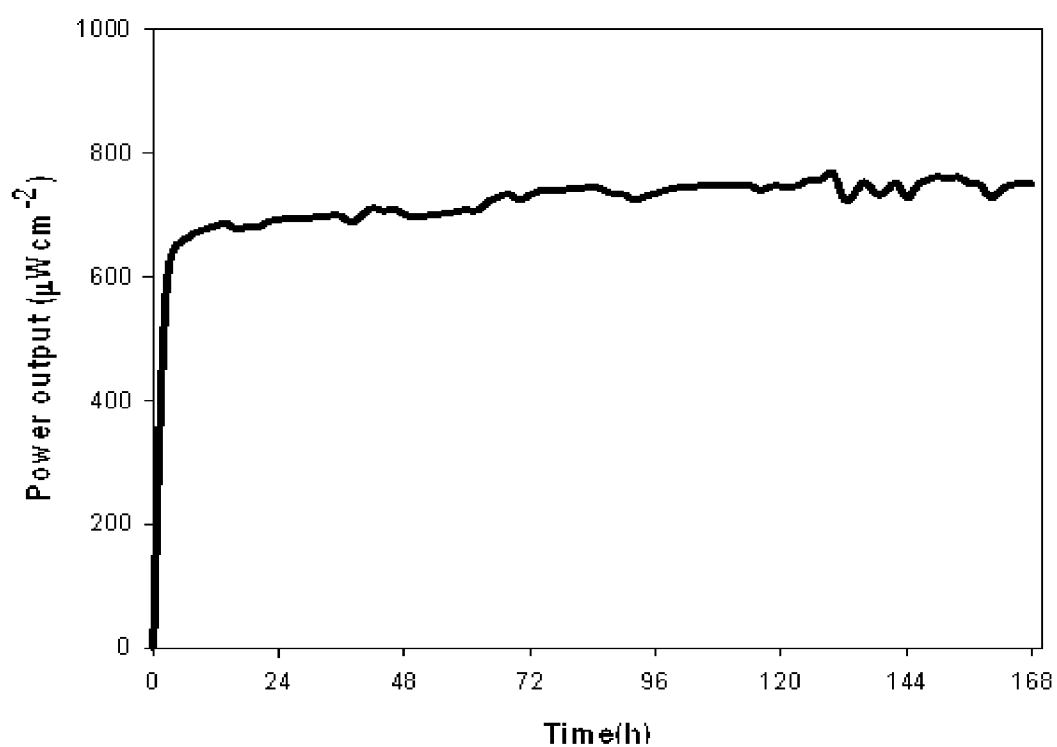
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2010/003510**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****H01M 8/16(2006.01)i, H01M 8/04(2006.01)i, C12N 13/00(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

H01M 8/16; H01M 4/90; B05D 3/12; H01M 4/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: fuel cell, electrode, DNA, carbon nano tube, enzyme

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008-0160384 A1 (IQBAL, ZAFAR et al.) 03 July 2008 See: abstract, detailed description of the invention [0070]-[0178], figures 1-26, claims 1-45	1-16
A	KARACHEVTSEV, V.A. et al., Glucose sensing based on NIR fluorescence of DNA-wrapped single-walled carbon nanotubes, Chemical Physics Letters, vol. 435, PP. 104-108, 20 December 2006 See: abstract, pages 105-108, figure 1	1-16
A	HU, CHENGUO et al., DNA Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes for Electrochemical Detection, J. Phys. Chem. B., vol. 109, PP. 20072-20076, 06 October 2005 See: abstract, pages 20072-20073, figures 1-6	1-16
A	US 2005-0118494 A1 (CHOI, SUNG HOI) 02 June 2005 See: abstract, figures 1-6, claims 1-49	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 JANUARY 2011 (24.01.2011)

Date of mailing of the international search report

25 JANUARY 2011 (25.01.2011)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2010/003510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2008-0160384 A1	03.07.2008	NONE	
US 2005-0118494 A1	02.06.2005	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>H01M 8/16(2006.01)i, H01M 8/04(2006.01)i, C12N 13/00(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) H01M 8/16; H01M 4/90; B05D 3/12; H01M 4/88 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 연료전지, 전극, DNA, 탄소나노튜브, 효소		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2008-0160384 A1 (IQBAL, ZAFAR et al.) 2008.07.03 참조: 초록, 발명의 상세한 설명 [0070]-[0178], 도 1-26, 청구항 1-45	1-16
A	KARACHEVTSEV, V.A. et al., Glucose sensing based on NIR fluorescence of DNA-wrapped single-walled carbon nanotubes, Chemical Physics Letters, Vol. 435, PP. 104-108, 2006.12.20 참조: 초록, 105-108쪽, 도 1	1-16
A	HU, CHENGUO et al., DNA Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes for Electrochemical Detection, J. Phys. Chem. B., Vol. 109, PP. 20072-20076, 2005.10.06 참조: 초록, 20072-20073쪽, 도 1-6	1-16
A	US 2005-0118494 A1 (CHOI, SUNG HOI) 2005.06.02 참조: 초록, 도 1-6, 청구항 1-49	1-16
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2011년 01월 24일 (24.01.2011)		국제조사보고서 발송일 2011년 01월 25일 (25.01.2011)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 선사로 139, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 조기윤 전화번호 82-42-481-8398

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2008-0160384 A1	2008.07.03	없음	
US 2005-0118494 A1	2005.06.02	없음	