

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 10월 30일 (30.10.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/175635 A1

- (51) 국제특허분류:
H01M 4/86 (2006.01) H01M 8/16 (2006.01)
H01M 4/88 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/003501
- (22) 국제출원일: 2014년 4월 22일 (22.04.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0044476 2013년 4월 22일 (22.04.2013) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 136-701 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김중배 (KIM, Jungbae); 135-795 서울시 강남구 역삼로 309, 101동 1501호, Seoul (KR). 김재현 (KIM, Jae-Hyun); 136-701 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교 화공생명공학과, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 137-130 서울시 서초구 바우피로 225 한마음빌딩 4층, Seoul (KR).

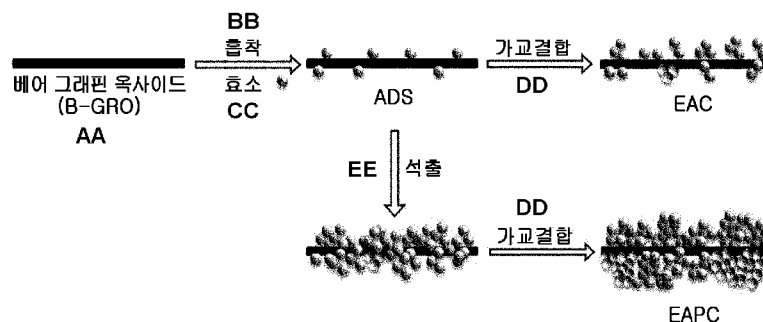
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: ENZYME-GRAPHENE OXIDE COMPLEX USED FOR ELECTROCHEMICAL APPLICATIONS AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) 발명의 명칭 : 전기화학적 응용에 사용되는 효소-그래핀 옥사이드 복합체 및 그 제조방법



AA ... Bare graphene oxide (B-GRO)
BB ... Adsorption
CC ... Enzyme
DD ... Cross-linking
EE ... Extraction

(57) Abstract: The present invention relates to an enzyme-graphene oxide complex used for electrochemical applications. The enzyme-graphene oxide complex according to the present invention can significantly improve stability and output, and thus is applicable to a biofuel cell requiring enzyme activity stable for a long time as well as a biosensor, an enzymatic column, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), a bio-purification device, an anti-fouling road, and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 전기 화학적 응용에 사용되는 효소-그래핀 옥사이드 복합체에 관한 것이다. 본 발명에 따른 효소-그래핀 옥사이드 복합체는 안정성 및 출력을 획기적으로 향상시킬 수 있으므로, 장기간 안정적 효소 활성이 요구되는 바이오연료전지뿐만 아니라 바이오센서, 효소컬럼, 효소면역 흡착 분석법(ELISA), 바이오 정화기기, 방오용 도료 등에 적용할 수 있다.



WO 2014/175635 A1

명세서

발명의 명칭: 전기화학적 응용에 사용되는 효소-그래핀 옥사이드 복합체 및 그 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 전기 화학적 응용에 사용되는 효소-그래핀 옥사이드 복합체에 관한 것이다. 본 발명에 따른 효소-그래핀 옥사이드 복합체는 안정성 및 출력을 획기적으로 향상시킬 수 있으므로, 장기간 안정적 효소 활성이 요구되는 바이오연료전지뿐만 아니라 바이오센서, 효소컬럼, 효소면역 흡착 분석법(ELISA), 바이오 정화기기, 방오용 도료 등에 적용할 수 있다.

[2]

배경기술

- [3] 효소는 생체 촉매로서 기존의 화학 촉매에 비해서 환경친화적이고 기질특이성이 뛰어나다는 장점을 지니고 있으나, 주변 환경 조건에 매우 민감하게 활성이 변하고, 재활용이 어려우며, 만들어진 생성물과의 분리가 어렵다는 점이 상업적으로 이용하는데 있어서 한계로 작용한다. 이러한 단점을 극복하고자 제안된 하나의 방법이 효소를 고정화하는 방법이다.
- [4] 고정화된 효소는 반복 사용이 가능하고, 생성물과 효소의 분리가 용이하지만, 고정화되지 않은 효소에 비해 활성이 떨어지는 단점이 있다. 그러나 고정화된 효소는 무엇보다도 편리하게 다룰 수 있다는 점에서 다양한 상업적 적용이 가능하다.

[5]

- [6] 효소 고정화 연구에 다양한 탄소 나노구조물질이 이용되는데 최근 주목 받고 있는 물질이 그래핀(graphene)이다. 그래핀은 탄소나노튜브(CNT)보다 균일한 금속성, 높은 전기 전도도와 열전도율을 가지고 있고 저렴하게 얻을 수 있는 장점이 있다. 그래핀과 산이 반응하면 그래핀에 산소 기능기인 하이드록시기(-OH), 카르복실기(-COOH), 에폭사이드기(epoxide group), 락톨기(lactol group) 등이 함유된 그래핀 옥사이드(graphene oxide)가 생성되며, 그래핀 옥사이드가 산소 기능기 때문에 수용액에 분산이 잘 되므로 효소 고정화에 이용하였다. 효소-탄소구조물 복합체는 그 목적에 따라 바이오센서, 바이오연료전지, 효소컬럼, ELISA 장치(키트) 등의 용도에 폭넓게 사용되며, 이 경우 탄소구조물은 탄소나노입자, 자성나노입자, 탄소나노튜브, 그래핀 등 다양한 형태가 사용된다. 효소-탄소구조물 복합체를 연료전지의 전극 또는 바이오센서 등에 효과적으로 응용하기 위하여 탄소구조물의 표면에 효소를 고정시켜야 하는데 염석에 의한 효소식출 방법을 이용하여 식출된 효소-탄소구조물 복합체를 형성하였다. 이는 단순히 탄소구조물과 효소 간에 흡착된 경우에 비하여 많은 양의 효소가 탄소구조물의 표면에 고정될 수 있고

비교적 높은 안정성 및 효율을 가질 수 있게 된다.

[7]

[8] 한편, 다양한 환경에서 장기간 반복 사용을 목적으로 하는 효소연료전지나 혈당센서를 포함한 바이오센서 등에서의 성공적인 응용을 위한 획기적인 안정성을 달성하지는 못하고 있는 실정이다. 그 이유로 오랜 시간이나 가혹한 조건에서는 한 두 개의 공유결합에 의해 고정된 효소가 변성(denaturation)이 되기 때문인 것으로 알려져 있다.

[9]

[10] 바이오연료전지는, 중합체 전해질 막에 의해 분리된 양극 및 음극으로 구성된다. 점에서, 전통적인 중합체 전해질 막 바이오연료전지와 유사하다. 촉매로서 귀금속 대신 효소와 같은 생물학적 분자를 사용하는데, 매우 효율적인 촉매이기는 하나 용액에 함유된 형태의 효소는 효소 자체의 불안정성으로 인해 수명이 짧은 문제점이 있다. 현재 바이오연료전지의 음극효소에 대한 연구는 많이 진행된 반면 양극효소에 대한 연구가 진행되지 않아 양극과 음극이 모두 효소로 이루어진 생체 이식 가능한 바이오연료전지의 개발에 어려움을 겪고 있다. 그러므로 바이오연료전지의 양극효소에 대한 연구가 필요하며 양극 효소로는 빌리루빈 산화효소 및 락카아제 등이 잘 알려져 있다. 이 중 락카아제는 산소를 환원시키는 생촉매로 반응산물로는 물을 발생시킨다. 양극과 음극이 모두 효소로 이루어진 바이오연료전지의 원활한 개발을 위해서 양극효소인 락카아제의 안정성 및 이를 이용한 바이오연료전지의 출력 향상이 요구된다. 생체 이식 가능한 바이오연료전지는 심장 박동 조율기 및 소형 전력원 등에 응용이 가능하며 현재 곤충을 이용한 결과가 나오고 있다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 이에, 본 발명은 고효율 고안정성을 갖는 효소-그래핀 옥사이드 복합체 및 그 제조방법을 개발하고자 하는 것으로서, 본 발명은 효소를 석출시킨 후에 효소간의 가교결합을 유도하여 장기간 안정적으로 활성을 유지할 수 있음에 기초한다.

[13] 또한, 본 발명은 전기화학적 응용의 효소 전극으로 이용될 수 있는 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[14] 또한, 본 발명은 바이오연료전지의 양극으로 이용될 수 있는 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[15] 또한, 본 발명은 바이오센서의 전극으로 이용될 수 있는 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[16]

과제 해결 수단

- [17] 상술한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명자들은 예의 연구를 반복한 결과, 효소-그래핀 옥사이드 복합체 및 이것의 제조방법을 제공하고자 한다.
- [18]
- [19] 본 발명의 일 양태로서, 본 발명은 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 제공한다.
- [20] 본 발명에 따른 효소-그래핀 옥사이드 복합체는 효소 및 판형 구조의 그래핀 옥사이드를 포함하는 복합체로서, 상기 효소는 상기 그래핀 옥사이드를 여러 층으로 둘러싸고 있는 것을 특징으로 하는 효소-그래핀 옥사이드 복합체이다.
- [21] 또한, 본 발명의 일 구체예로서, 상기 효소-그래핀 옥사이드 복합체는 추가적으로 전기전도성 물질을 포함할 수 있다.
- [22]
- [23] 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 효소-그래핀 옥사이드 복합체의 제조 방법을 제공할 수 있다. 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다:
- [24] (a) 판형 구조의 그래핀 옥사이드에 효소를 흡착시키는 단계;
- [25] (b) 상기 효소와 상기 그래핀 옥사이드에 가교결합을 형성하기 위하여 가교결합제를 첨가하여 효소집적체를 형성하여 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 제조하는 단계.
- [26] 본 발명의 또다른 양태로서, 상기 (a) 단계와 (b) 단계 사이에, 상기 효소가 흡착된 판형 구조를 가지는 그래핀 옥사이드에 효소 석출화제를 첨가하여 상기 효소를 석출시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [27] 또한, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 (b) 단계 다음에 추가로 전기전도성 물질을 첨가하는 단계를 포함할 수 있다.
- [28]
- [29] 본 발명의 다른 양태로서, 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 포함하는 바이오연료전지용 전극을 제공할 수 있다.
- [30] 상기 바이오연료전지 전극은 양극으로서, 효소는 락카아제(laccase)를 사용할 수 있다.
- [31]
- [32] 본 발명의 또 다른 양태로서, 효소-그래핀 옥사이드를 포함하는 복합체를 포함하는 바이오센서용 전극을 제공할 수 있다.
- [33] 상기 바이오센서는 효소로서 락카아제를 사용하여 페놀류 물질을 검출할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [34]

발명의 효과

- [35] 따라서 본 발명에 따른 효소-그래핀 옥사이드 복합체는 바이오연료전지, 바이오센서 등에 사용하는 경우 종래의 효소-탄소구조물 복합체보다 그 성능을 현저하게 개선시킬 수 있다. 특히, 고정된 효소량을 비약적으로 증가시키며 그 안정성을 획기적으로 향상시킴으로써 상온 및 고온에서의 높은 안정성을

제공할 수 있다.

[36]

도면의 간단한 설명

[37] 도 1은 락카아제(Laccase: LAC)를 베어 그래핀 옥사이드(Bare graphene oxide: B-GRO)에 고정화시키는 제조 방법(LAC/B-GRO)에 관한 모식도이다.

[38] 도 2는 고정된 LAC/B-GRO의 주사형 전자현미경(scanning electron microscope, SEM) 이미지이다. ADS-LAC/B-GRO, EAC-LAC/B-GRO, 및 EAPC-LAC/B-GRO에 대한 SEM 이미지이다.

[39] 도 3은 고정된 LAC/B-GRO의 초기 활성화에 대한 그래프이다. GRO 1mg 당 효소의 활성을 나타내고, A530 nm 파장에서 활성을 나타낸다.

[40] 도 4은 고정된 LAC/B-GRO의 상온에서의 안정성에 대한 그래프이다.

[41] 도 5는 LAC/B-GRO 전극의 전자전달 매개체(mediator, ABTS)의 유무에 따른 출력(power density)값과, 추가로 탄소나노튜브(CNT)가 첨가된 LAC/B-GRO+CNT 전극의 전자전달 매개체 유무에 따른 출력값을 비교한 그래프들이다. LAC/B-GRO에 추가로 탄소나노튜브(CNT)가 첨가된 LAC/B-GRO+CNT 전극의 상온에서의 18일 동안의 출력(power density)값을 비교한 그래프이다. LAC/B-GRO에 추가로 탄소나노튜브(CNT)가 첨가된 LAC/B-GRO+CNT 전극의 50°C에서 13시간 동안의 출력(power density)값을 비교한 그래프이다.

[42] 도 6은 LAC/B-GRO 전극의 상온에서의 안정성에 대한 그래프이다.

[43] 도 7은 LAC/B-GRO 전극의 50 °C에서의 안정성에 대한 그래프이다.

[44]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[45] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[46]

[47] 본 명세서에서 사용되는 용어로서, B-GRO는 베어 그래핀 옥사이드를 의미하고, LAC는 락카아제(laccase) 효소를 의미하며, ADS-LAC/B-GRO, ADS는 베어 그래핀 옥사이드에 효소를 단순 흡착시킨 복합체를 의미하고, EAC-LAC/B-GRO, EAC는 베어 그래핀 옥사이드에 효소를 흡착 및 가교결합시킨 복합체를 의미하며, EAPC-LAC/B-GRO, EAPC는 베어 그래핀 옥사이드에 효소를 흡착, 석출 및 가교결합시킨 복합체를 의미한다.

[48] 본 발명의 일 양태로서, 본 발명은 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 제공할 수 있다.

[49] 상기 복합체는 앞에서 설명한 바와 같이 그래핀 옥사이드에 효소를 흡착 및 가교결합 또는, 흡착, 석출 및 가교결합되어서 제조된다.

[50]

[51] 본 발명의 일 실시예로서, 락카아제를 열전도성, 강도 등이 뛰어난 그래핀

옥사이드에 염색에 의한 효소석출 방법을 이용하여 석출된 효소 응집체 형태를 합성한 후 글루타알데하이드(glutaric dialdehyde, GA)처리를 하여 효소를 가교결합(crosslinking)시킴으로써 합성한 석출된 효소 응집체 형태이다(실시예 1).

- [52] 본 발명에 따른 효소-그래핀 옥사이드 복합체의 구체예는, 도 2에서 나타난 바와 같이, ADS-LAC/B-GRO, EAC-LAC/B-GRO 및 EAPC-LAC/B-GRO를 주사형 전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 이용하여 측정한 결과로서 확인할 수 있다. 흡착-석출-가교시킨 본 발명의 샘플(EAPC-LAC/B-GRO)은 ADS-LAC/B-GRO와 EAC-LAC/B-GRO에 비해 효소들이 GRO 표면을 여러 층으로 둘러싸고 있어서 효소로 덮인 GRO는 점점 두꺼워지는 것을 볼 수 있다. 도 2를 살펴보면 그래핀 옥사이드, ADS-LAC/B-GRO 그리고 EAC-LAC/B-GRO의 SEM 사진을 살펴보면 점점 그래핀 옥사이드 표면은 울퉁불퉁해지며 이는 효소로 둘러 쌓여지는 것으로 예상 할 수 있다. EAPC-LAC/B-GRO는 다른 물질들과는 다르게 그래핀 옥사이드의 두께가 크게 증가한 것을 볼 수 있으며 이로써 훨씬 많은 양의 효소가 그래핀 옥사이드 표면에 고정된 것을 확인 할 수 있다. ADS-LAC/B-GRO 와 EAC-LAC/B-GRO는 단순히 그래핀 옥사이드 표면에 고정화 되지만 EAPC-LAC/B-GRO는 효소 침전에 의해 그래핀 옥사이드 표면에 많이 존재하다가 가교결합에 의해 표면을 감싸는 효소코팅이 이루어져 많은 양의 효소를 고정화 할 수 있다.

[53]

- [54] 본 발명의 일 양태로서, 다음과 같은 단계를 포함하는 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 제조하는 방법을 제공할 수 있다:

[55] (a) 판형 구조를 가지는 그래핀 옥사이드에 효소를 흡착시키는 단계;

- [56] (b) 상기 효소와 상기 그래핀 옥사이드에 가교결합을 형성하기 위하여 가교결합제를 첨가하여 효소집적체를 형성하여 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 제조하는 단계.

[57]

- [58] 또한, 본 발명의 또다른 양태로서, 본 발명은 상기 (a) 단계와 (b) 단계 사이에, 상기 효소가 흡착된 판형 구조를 가지는 그래핀 옥사이드에 효소 석출화제를 첨가하여 상기 효소를 석출시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[59]

- [60] 기존의 일반적인 탄소나노구조물질의 표면은 소수성을 이루고 있기 때문에 효소고정화를 하기 위해서는 탄소나노구조물질의 표면을 친수성으로 만드는 전처리 과정이 필요하다. 그러나 그래핀 옥사이드는 산소기능기를 가지고 있기 때문에 효소가 쉽게 분산될 수 있으므로 그래핀 옥사이드를 이용하면 전처리 과정 없이 효소 고정화가 용이하다는 장점이 있다.

[61]

- [62] 상기에서 효소는 글루코스 데히드로제나아제, 글루코스 이소머라아제,

당산화효소, 락카아제, 락타아제, 리파아제, 망가네이제 페록시다아제, 모트립신, 사일라네이즈, 서물리신, 서브틸리신, 셀룰라아제, 소이빈 페록시다아제, 수크라아제, 알코올 탈수소효소, 오가노포스포히드로라아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 자일라아제, 키모트립신, 콜리에스테라아제, 클로리네스테라아제, 클로로 페록시다아제, 탄산무수화효소, 티로시나아제, 트립신, 파파인, 페록시다아제, 포도당 탈수소효소, 포도당 이성화효소 및 히드로제나아제, 홀세라디쉬 페록시다아제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[63]

[64] 상기에서 가교결합제는 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르 디알데하이드, 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디알데하이드, 디에폭사이드, 디에시드 클로라이드, 디이미드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[65]

[66] 상기에서 석출화제는 1-프로판올, 2-프로판올, 메탄올, 부틸알콜, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐 포스페이트, 아세톤, 암모늄 설페이트, 에탄올, PEG, 포타슘 설페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 포스페이트 및 폴리에틸렌글라이콜 및 이들의 수용액을 단독 또는 혼합한 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[67]

[68] 또한, 본 발명은 다른 구체예로서, 상기 (b) 단계 다음에 전극을 제작하는 단계에서 전기전도성 물질을 첨가할 수 있다. 전기전도성 물질은 예컨대, 탄소나노물질, 탄소나노튜브, 그래파이트, 그래핀 또는 그래핀옥사이드일 수 있다. 이러한 전기전도성 물질의 추가에 의하여 전자전달통로를 생성함으로써 전자 전달을 원활하게 할 수 있다. 구체적인 실시예에서, 그래핀 옥사이드에 효소인 락카아제를 고정화하여 석출된 효소 응집체 형태에 전기전도성 탄소나노튜브(CNT)를 첨가하는 단계(EAPC-LAC/B-GRO+CNT)를 추가하는 실험을 수행하였으며(실시예 5, 6), 전기화학적 성능이 크게 향상된 결과를 확인하였다(도 5). 따라서, 추가적 탄소나노튜브의 첨가는 궁극적으로는 바이오연료전지의 출력을 향상시키는 효과를 제공할 수 있다.

[69]

[70] 또한, 도 1을 통해 제조된 효소-그래핀 옥사이드 복합체의 효소 활성을 자외선 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 구체적으로 우선 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 인산 나트륨 버퍼 (sodium phosphate buffer, 100mM, pH 6.5)에 0.1 mg/ml로 희석시켜 준비하였다. 시린갈다진(syringaldazine)은 메탄올에 녹여 0.216 mM 농도가 되도록 제조하였다. 이렇게 만들어진 용액을 가지고 효소의 활성을 측정하였다. 효소의 활성을 측정하기 위해 800ul 인산 나트륨 버퍼

(100mM, pH 6.5) 용액과 100ul 시린갈다진 용액(0.216mM) 그리고 100ul의 락카아제가 고정화된 그래핀 옥사이드 복합체 용액을 섞어 혼합액을 히팅 블록(heating block)을 이용하여 30도에서 10분간 가열시킨 후에 530 nm에서 자외선 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 도 3은 자외선 분광광도계를 이용한 ADS, EAC, 그리고 EAPC의 활성을 측정한 그래프로서, ADS, EAC, 그리고 EAPC의 활성은 각각 0.53, 2.46, 그리고 36.0 A530min⁻¹/mg B-GRO이다. 본 발명에 따른 효소-그래핀 옥사이드 복합체의 성질은, 도 3에 나타난 바와 같이, 초기활성은 EAPC-LAC/B-GRO가 ADS-LAC/B-GRO에 비해 약 68 배 높은 값을 나타내었고 EAC-LAC/B-GRO에 비해서는 15 배 높은 값을 나타내었다. 도 4에 나타난 바와 같이, 안정성을 살펴보면, ADS-LAC/B-GRO는 16일이 지난 후에는 측정이 불가능 하였고 EAC-LAC/B-GRO는 초기활성의 1.1%가 유지되었다. 반면 EAPC-LAC/B-GRO는 42일이 지난 후에도 초기활성의 40%가 유지되는 안정성이 향상된 결과를 얻을 수 있었다.

[71]

[72] 또한, 본 발명의 다른 양태로서, 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 이용한 전기화학적 응용을 위한 효소전극을 제공할 수 있다.

[73] 또한, 본 발명의 다른 양태로서, 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 이용한 바이오연료전지용 전극을 제공할 수 있다. 여기서, 효소는 락카아제인 것을 특징으로 한다.

[74]

[75] 도 5는 본 발명의 복합체를 이용한 전극의 출력을 나타내고 있다. 바이오연료전지의 성능은 인산 나트륨 버퍼(100 mM, pH 6.5)를 연료로 하여 분극곡선(polarization curve)을 구함으로써 최대전력밀도를 측정하였다. 구체적으로, LAC/B-GRO 전극만의 출력값과 LAC/B-GRO 전극에 전자전달 매개체(mediator, ABTS)를 사용하여 얻은 출력(power density)값과 추가로 탄소나노튜브(CNT)가 첨가된 LAC/B-GRO+CNT 전극만의 출력값과 LAC/B-GRO+CNT 전극에 전자전달 매개체를 사용하여 얻은 출력값을 비교하였다. LAC/B-GRO 전극으로는 ADS-LAC/B-GRO, EAC-LAC/B-GRO 그리고 EAPC-LAC/B-GRO 총 3종류의 출력값을 측정하였다. EAPC-LAC/B-GRO 전극만의 출력값은 0.087 μWcm^{-2} 이고 이에 전자전달 매개체를 사용하여 얻은 출력값은 21.26 μWcm^{-2} 이다. 추가로 탄소나노튜브(CNT)가 첨가된 LAC/B-GRO+CNT 전극만의 출력값은 1.922 μWcm^{-2} 이며 이는 EAPC-LAC/B-GRO 전극만의 출력값보다 22 배 증가한 값이다. LAC/B-GRO+CNT 전극에 전자전달 매개체를 사용하여 얻은 출력값은 265.7 μWcm^{-2} 으로 EAPC-LAC/B-GRO 전극만의 출력 값보다 3054 배 증가한 값이다.

[76]

[77] 도 6에서는 도 5에서 큰 출력값을 나타낸 LAC/B-GRO+CNT 전극을 사용하여 상온에서의 전극 안정성 실험의 결과를 나타낸다. 상온에서 18일 동안 전극

안정성을 측정한 결과 EAPC-LAC/B-GRO는 초기 출력값의 77%를 유지하고 있는 반면, ADS-LAC/B-GRO는 2일이 지난 후에 초기 출력값의 45%를 유지하다가 4일 후에는 효소의 활성이 나타나지 않아서 측정이 불가능하였다.

[78]

[79] 도 7은 도 6에서 사용한 LAC/B-GRO+CNT 전극을 사용하여 고온(50 °C)에서의 전극 안정성 실험을 진행하였다. 50 °C에서 13 시간 동안 전극 안정성을 측정한 결과 EAPC-LAC/B-GRO는 초기 출력값의 81%를 유지하고 있는 반면, ADS-LAC/B-GRO는 3일이 지난 후에 초기 출력값의 18%를 유지하다가 4일 후에는 효소의 활성이 나타나지 않아서 측정이 불가능하였다. EAC-LAC/B-GRO는 4일이 지난 후에 초기 출력값의 17%를 유지하다가 5일 후에는 효소의 활성이 나타나지 않아서 측정이 불가능하였다.

[80]

[81] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서, 효소-그래핀 옥사이드를 포함하는 복합체를 이용한 바이오센서, 특히 페놀 센서에 응용이 가능하다. 여기서 효소는 락카아제인 것을 특징으로 한다. 락카아제는 전자의 입출입에 따라 산화, 환원 반응이 모두 가능한 효소로 바이오연료전지용 효소전극으로 사용될 때에는 외부에서 전자를 받아 산소를 환원시키는 효소로 사용된다. 한편 바이오센서용 효소전극으로 사용될 때에는 페놀류 물질에서 전자를 떼어내는 산화반응을 일으키고, 상기 반응을 통하여 생성된 물질은 전기화학적 분석방법을 통하여 쉽게 정량적 분석이 가능하다. 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[82]

발명의 실시를 위한 형태

[83] 실시예 1

[84] 그래핀 옥사이드에 락카아제를 고정화하는 단계

[85]

[86] 그래핀 옥사이드에 락카아제를 흡착 시킨 후, 염석을 이용하여 효소를 석출시킨다. 그 뒤 가교결합 시켜 그래핀 옥사이드에 락카아제가 고정화 되어 석출된 효소 응집체 형태를 제조한다.

[87]

[88] 구체적으로, ADS-LAC/B-GRO(단순흡착)과 EAC-LAC/B-GRO(단순흡착 후 가교결합) 및 EAPC-LAC/B-GRO(석출화제 첨가 후 가교결합)의 고정화 단계이다. ADS-LAC/B-GRO(단순흡착)가 준비된 후 락카아제 덩어리를 만들기 위해 황산암모늄(ammonium sulfate)를 이용하여 석출된 락카아제가

글루타르알데하이드에 의해 ADS-LAC/B-GRO의 표면과 가교결합하여 락카아제의 응집체 코팅이 발생한다.

- [89] 순수한 그래핀 옥사이드 (B-GRO, 6 mg)를 10 mg/ml 락카아제 용액(3 ml)과 함께 혼합하였다. 순수한 그래핀 옥사이드와 락카아제의 혼합용액을 실온 100 rpm에서 1 시간 동안 교반시켰다. 이 과정까지의 방법을 ADS-LAC/B-GRO (단순흡착)라고 한다. EAPC-LAC/B-GRO (석출화제 첨가 후 가교결합제 첨가)를 제조하기 위해 70 중량% 황산 암모늄 용액(2 ml)과 황산 암모늄 가루(1.10 g)을 3 ml ADS-LAC/B-GRO (단순흡착) 용액에 넣어준 후 30분 동안 100 rpm에서 실온에서 교반시켜준다. ADS-LAC/B-GRO의 효소 석출 코팅을 위해 최종 농도 50 중량%의 황산 암모늄 처리된 용액에 가교결합을 위하여 최종 농도 0.5% 글루타르알데하이드 용액을 넣어주었다. 그 뒤 용액을 실온의 100 rpm에서 30분 동안 교반시켜준 후 4 °C에서 12시간 동안 보관하였다. EAC-LAC/B-GRO (가교결합)를 제조하기 위해서는 인산 나트륨 버퍼 (100mM, pH 6.5) (2 ml)을 3 ml ADS-LAC/B-GRO (단순흡착) 용액에 넣어준 후 30분 동안 100 rpm에서 실온에서 교반시켜준다. 위의 용액에 가교결합을 위하여 최종 농도 0.5% 글루타르알데하이드 용액을 넣어주었다. 그 뒤 용액을 실온의 100 rpm에서 30분 동안 교반시켜준 후 4 °C에서 충분한 반응을 위하여 12시간 동안 놓아두었다. 모든 샘플은 4 °C에서 12시간 동안 반응을 시켜준 후 트리스버퍼(Tris buffer, 100mM, pH 7.4)를 이용해 60분 동안 100 rpm에서 교반시켜준 후 인산 나트륨 버퍼 (100mM, pH 6.5)를 이용하여 효소가 더 이상 새어나오는 것이 없도록 여러 번 씻어주었다. 잘 씻어준 샘플들을 사용하기 전까지 4 °C에서 보관한다.

[90]

[91] 실시예 2

[92] 그래핀 옥사이드에 락카아제가 고정화 된 석출된 효소 응집체 형태 활성 측정

[93]

- [94] 제조된 그래핀 옥사이드에 락카아제가 고정화되어 석출된 효소 응집체 형태를 10분간 30도에서 유지시키고 시린갈다진(Syringaldazine)과 섞은 후, 파장 530nm에서 흡광도 변화로 활성을 측정하고 단순흡착(adsorption, ADS) 고정화 방식인 ADS-LAC/B-GRO와 단순 가교결합(crosslinking) 형태인 EAC-LAC/B-GRO의 활성을 비교 분석하였다. 즉, ADS-LAC/B-GRO(단순흡착)과 EAC-LAC/B-GRO(단순흡착 후 가교결합) 그리고 EAPC-LAC/B-GRO(석출화제 첨가 후 가교결합)의 활성을 자외선 분광광도계(UV spectrophotometer)를 이용하여 측정하였다. 모든 샘플을 인산 나트륨 버퍼 (100mM, pH 6.5)에 0.1 mg/ml로 희석시켜 준비하였다. 그리고 락카아제의 기질로 사용되는 시린갈라진 7.8 mg을 10 ml의 메탄올(methanol)에 녹인 후 메탄올을 이용하여 시린갈라진 용액이 0.216 mM이 되도록 희석시켰다. 이렇게 만들어진 용액을 가지고 효소의 활성을 측정하였다. 효소의 활성을 측정하기 위해 800 μ l 인산 나트륨 버퍼(100mM, pH 6.5)와 100 μ l의 락카아제가 고정화된 샘플 용액은 미리 섞어 30

℃에서 10분간 유지시킨 후 100 μ l 시린갈라진(0.216 mM) 용액을 잘 섞은 후 530 nm에서 자외선 분광광도계에서 흡광도를 측정하였다.

- [95] 도 3은 ADS-LAC/B-GRO, EAC-LAC/B-GRO 및 EAPC-LAC/B-GRO의 1 mg B-GRO 당 초기 활성을 나타내는 그래프로서, 각각의 활성은 0.53, 2.46 그리고 36.0 A530min⁻¹/mg B-GRO으로 측정되었다. EAPC-LAC/B-GRO의 활성은 ADS-LAC/B-GRO에 비해 약 68배 높고 EAC-LAC/B-GRO에 비해 약 4.6배 정도 높은 값을 보여주고 있다. EAPC-LAC/B-GRO의 활성 증가는 효소의 담지량 증가로 설명될 수 있다.

[96]

[97] 실시예 3

[98] 그래핀 옥사이드에 락카아제가 고정화된 석출된 효소 응집체 형태 안정성 측정

[99]

- [100] 석출된 효소 응집체에 대하여 상온에서의 안정성을 흡광도 변화로 측정한다. 도 4는 상온에서 ADS-LAC/B-GRO, EAC-LAC/B-GRO 및 EAPC-LAC/B-GRO의 시간이 경과함에 따른 안정성을 측정한 그래프이다. 락카아제 분석을 통해 측정된 각각의 활성 지점들은 모두 실온에서 보관중인 main stack에서 조금씩 따서 측정되었다. EAPC-LAC/B-GRO가 약 25일 동안 초기 활성의 60% 이상을 유지하는 동안 ADS-LAC/B-GRO, EAC-LAC/B-GRO는 측정할 수 없는 활성값을 나타내는 모습을 보여주고 있다. 이러한 결과는 EAPC-LAC/B-GRO는 B-GRO에 여러 층으로 결합된 효소 코팅이 높은 담지량을 보여주고 또한 효소들이 서로 변성되거나 새어나오는 것을 막고 있다는 것을 말해준다. EAPC-LAC/B-GRO의 모습은 도 2 주사전자현미경 이미지를 통해 관찰되었다. 주사전자현미경 사진을 통해 EAPC-LAC/B-GRO는 여러 층의 효소가 코팅되었고 B-GRO의 주위를 효소 덩어리를 형성하고 있다고 할 수 있다. 또한 이것이 오랜 시간 동안 효소가 새어나오는 것을 막아준다. 이러한 결과를 통해 우리는 ADS-LAC/B-GRO에 비하여 EAPC-LAC/B-GRO가 전기화학적으로 좋은 성능을 보여줄 것이라 예상할 수 있다.

[101]

[102] 실시예 4

[103] 바이오연료전지용 전극 제조

[104]

- [105] 석출된 효소 응집체에 나피온(Nafion)을 잘 섞은 후 전극(glassy carbon electrode, GCE)위에 올려 바이오연료전지용 전극을 제조한다. 단순흡착 형태와 단순 가교 결합 형태도 바이오연료전지용 전극 제조한다. ADS-LAC/B-GRO, EAC-LAC/B-GRO 및 EAPC-LAC/B-GRO 샘플 용액 1 mg/ml 안에 5% 나피온 용액을 넣어 용액 속에 나피온의 농도가 0.1%가 되도록 하였다. 그 뒤 나피온 용액과 모든 샘플 용액이 잘 섞이도록 교반시켜주면서 4 ℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 전극(glassy carbon electrode, GCE)는 바이오연료전지의 작동을 위한

효소 양극을 위한 물질로서 사용되었다. 전극을 0.05 μm Alumina 가루로 표면을 깨끗하게 닦아 낸 후 초음파분산기(sonicator)를 사용하여 5분간 초음파처리를 해주었다. 광택 처리된 전극 위에 나피온 용액을 넣어 준비한 각각의 샘플을 20 μl 씩 올렸다. 그 후 1시간 정도 말려준 후 인산 나트륨 버퍼(100mM, pH 6.5)를 이용하여 4 °C에서 실험에 사용하기 전까지 보관하였다.

[106]

[107] **실시예 5**[108] **탄소나노튜브를 첨가한 바이오연료전지용 전극 제조**

[109]

[110] 바이오연료전지의 출력을 향상시키고자 그래핀 옥사이드에 락카아제가 고정화 되어 석출된 효소 응집체 형태에 추가로 전기전도성 탄소나노튜브를 첨가하여 EAPC-LAC/B-GRO+CNT 전극을 제조하였다. 이와 같이 단순흡착 전극과 단순 가교 결합 전극에도 추가로 전기전도성 탄소나노튜브를 첨가하여 바이오연료전지용 전극을 제조하였다.

[111] ADS-LAC/B-GRO, EAC-LAC/B-GRO 및 EAPC-LAC/B-GRO 샘플 용액 0.75 mg/ml 안에 5% 나피온 용액을 넣어 용액 속에 나피온의 농도가 0.1%가 되도록 하였다. 그리고 인산 나트륨 버퍼 (100mM, pH 6.5)에 탄소나노튜브를 분산시킨 용액(1 mg/ml)을 섞어 샘플 용액이 포함된 총 용액 속에 탄소나노튜브 함량이 25% 가 되도록 하였다. 그 뒤 나피온 용액과 모든 샘플 용액이 잘 섞이도록 교반시켜주면서 4 °C에서 1시간 동안 반응시켰다. 전극(glassy carbon electrode, GCE)는 바이오연료전지의 작동을 위한 효소 양극을 위한 물질로서 사용되었다. 전극을 0.05 μm 알루미나(Alumina) 가루로 표면을 깨끗하게 닦아 낸 후 초음파분산기를 사용하여 5분간 초음파처리를 해주었다. 광택 처리된 전극 위에 나피온 용액을 넣어 준비한 각각의 샘플을 20 μl 씩 올렸다. 그 후 1시간 정도 말려준 후 인산 나트륨 버퍼 (100mM, pH 6.5)를 이용하여 4 °C에서 실험에 사용하기 전까지 보관하였다.

[112]

[113] **실시예 6**[114] **전기화학적 성능 측정 과정**

[115]

[116] 바이오연료전지 실험을 위해 제작된 석출된 효소 응집체 전극과 단순흡착 전극과 단순 가교 결합 전극에 각각 추가로 탄소나노튜브를 첨가한 전극들의 성능을 전자전달매개체(mediator, 1,4-benzoquinone, BQ)유무에 따른 바이오연료전지의 출력을 측정함으로써 비교 분석하였다. 구체적으로, 바이오연료전지의 성능을 측정하기 위해 CHI 760 instruments (Austin, TX, USA)이 사용되었다. 위 바이오연료전지는 반쪽 전지(half-cell) 성능을 측정하기 위한 것으로 중요 구성으로는 효소양극, 전해질, 연료, 상대전극 그리고 기준전극으로 이루어진다. 효소 양극은 실시예 4.에서 제작된 효소양극을 사용하였고

전해질은 인산 나트륨 버퍼 (100mM, pH 6.5)를 사용하였으며 락카아제의 연료로 사용되는 산소(O_2)를 충분히 공급하였다. 상대전극으로 백금(Pt) 전극을 기준전극으로는 Ag/AgCl 전극을 사용하였다. 전자전달매개체(mediator, 1,4-benzoquinone, BQ)를 인산 나트륨 버퍼 (100mM, pH 6.5) 용액에 10 mM이 되도록 넣어주었다. Multi-Current Steps 모드를 이용하여 polarization curve를 얻을 수 있고 이를 통해 최대 전력밀도를 구할 수 있다. Multi-Current Steps 모드는 10분 간격으로 총 10단계를 거치며 각 단계별로 일정한 전류(A)를 걸어주어 전압(V)을 얻는다. 얻어진 전압과 걸어진 전류값으로 구한 파워는 효소전극의 표면적(0.07 cm^2)으로 나누어 최대 전력밀도를 계산하였다. 각각의 샘플 ADS-LAC/B-GRO, EAC-LAC/B-GRO 및 EAPC-LAC/B-GRO의 최대 전력밀도는 0.028, 0.024, 0.087 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 로 측정되었다 (도 5).

EAPC-LAC/B-GRO의 최대 전력밀도는 ADS-LAC/B-GRO 보다 3.1배 높게 나왔다. 전자 전달속도를 증가시키기 위해 추가로 탄소나노튜브를 넣어 제작한 전극 ADS-LAC/B-GRO+CNT, EAC-LAC/B-GRO+CNT 및

EAPC-LAC/B-GRO+CNT의 최대 전력밀도는 0.307, 0.385, 1.922 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 로 측정되었다 (도 5). EAPC-LAC/B-GRO의 최대 전력밀도는 ADS-LAC/B-GRO 보다 6.3배 높고 EAC-LAC/B-GRO에 비해 5배가 높게 나왔다. 각각의 활성값과 최대 전력밀도를 비교해볼 때 어느 정도 상관관계는 있지만

EAPC-LAC/B-GRO가 활성 측정에서 보여주었던 만큼 최대 전력밀도는 증가하지 않았다. 최대 전력밀도가 효소의 양에 따른 전자 생성량과 전자 전달속도에 의해 결정되는데 반해 효소 활성은 효소의 양과 상관이 있다.

전자전달 매개체를 사용하여 측정한 각각의 샘플 ADS-LAC/B-GRO, EAC-LAC/B-GRO 및 EAPC-LAC/B-GRO의 최대 전력밀도는 2.09, 2.25, 21.26 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 로 측정되었다 (도 5). EAPC-LAC/B-GRO의 최대 전력밀도는 ADS-LAC/B-GRO 보다 10.2배 높게 나왔다. 전자 전달속도를 증가시키기 위해 추가로 탄소나노튜브를 넣어 제작한 전극 ADS-LAC/B-GRO+CNT, EAC-LAC/B-GRO+CNT 및 EAPC-LAC/B-GRO+CNT의 최대 전력밀도는 19.25, 31.80, 265.7 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 로 측정되었다 (도 5). EAPC-LAC/B-GRO의 최대 전력밀도는 ADS-LAC/B-GRO보다 13.8배 높고 EAC-LAC/B-GRO에 비해 8.4배가 높게 나왔다.

[117]

[118] 실시예 7

[119] 전기화학적 성능 안정성 측정 과정

[120]

[121] 실시예 6에서 측정한 방법을 이용하여 전기화학적 응용이 가능한 효소전극을 바이오연료전지용 효소전극으로써 효소전극의 안정성을 측정하였다. 도 6에서는 상온에서의 효소전극의 안정성을 측정하였는데 이는 효소전극의 전기화학적 성능을 측정 한 후 효소전극을 100 mM 인산 나트륨 버퍼 (100mM,

pH. 6.5)에 넣어 상온에서 보관 하면서 처음 측정($t=0$) 한 후 1일이 지난 후 측정하고($t=1$) 2일, 4일, 8일, 12일, 18일 순서대로 측정한 것으로 이는 하나의 효소전극을 매번 재사용하였으므로 이 실험으로 안정성이 확보되어 재사용이 가능한 효소전극이라 할 수 있다. EAPC-LAC/B-GRO+CNT 전극은 18일이 지난 후에도 초기 민감도(sensitivity)의 66%를 유지하고 있는 반면 ADS-LAC/B-GRO+CNT는 8일이 지난 후에 초기 민감도(sensitivity)의 13%를 유지하였으며 12일이 지난 후에는 효소의 활성이 나타나지 않아서 측정이 불가능하였다. 상온에서의 효소전극의 안정성을 측정한 데 이어 고온, 50 °C에서의 LAC/B-GRO+CNT 전극들의 안정성을 살펴 보았다 (도 7). 50 °C에서 EAPC-LAC/B-GRO+CNT 전극의 안정성이 상온에서 보다 더 확실하게 드러난다. 1시간 마다 측정이 이루어졌으며 인산 나트륨 버퍼 (100mM, pH. 6.5)에 넣어 50 °C에서 보관 하면서 전극은 ADS-LAC/B-GRO+CNT 전극은 3시간 만에 초기 민감도의 80% 이상이 감소되었으며 EAC-LAC/B-GRO+CNT 전극은 4시간 만에 초기 민감도의 80% 이상이 감소하였다. 이에 반면 EAPC-LAC/B-GRO+CNT 전극은 13시간이 지난 후에도 초기 민감도의 80% 이상을 유지하였다. 효소 담지량이 많은 EAPC-LAC/B-GRO의 경우 높은 효소 활성 및 높은 전극 민감도뿐만이 아니라 효소의 안정성 및 효소 전극의 안정성 또한 ADS-LAC/B-GRO+CNT과 EAC-LAC/B-GRO+CNT 보다 향상되었음을 상온 및 고온(50 °C)에서도 확인하였다.

[122]

산업상 이용가능성

[123] 본 발명에 따른 효소-그래핀 옥사이드 복합체는 바이오연료전지, 바이오센서 등에 사용하는 경우 종래의 효소-탄소구조물 복합체보다 그 성능을 현저하게 개선시킬 수 있으므로, 특히, 고정된 효소량을 비약적으로 증가시키며 그 안정성을 획기적으로 향상시킴으로써 상온 및 고온에서의 높은 안정성을 제공할 수 있어 전기화학적 응용 분야에 적용이 가능하다.

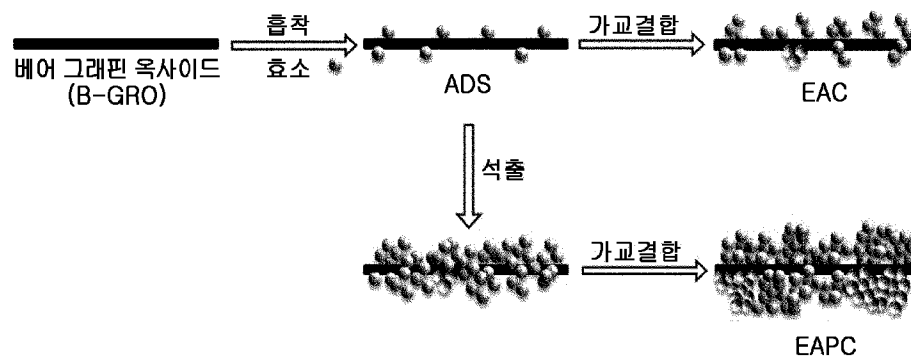
[124]

청구범위

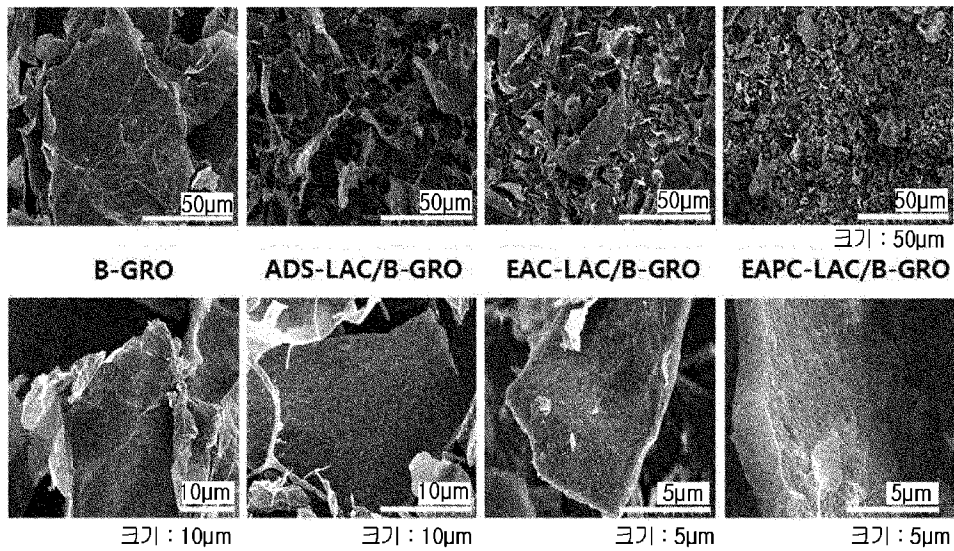
- [청구항 1] 효소 및 판형 구조의 그래핀 옥사이드를 포함하는 효소-그래핀 옥사이드 복합체로서, 상기 효소는 상기 그래핀 옥사이드를 여러 층으로 둘러싸고 있는 것을 특징으로 하는 효소-그래핀 옥사이드 복합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 효소는 글루코스 데히드로제나아제, 글루코스 이소머라아제, 당산화효소, 락카아제, 락타아제, 리파아제, 망가네이제 페록시다아제, 모트립신, 사일라네이즈, 서플리신, 서브틸리신, 셀룰라아제, 소이빈 페록시다아제, 수크라아제, 알코올 탈수소효소, 오가노포스포히드로라아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 자일라아제, 키모트립신, 콜리에스테라아제, 클로리네스테라아제, 클로로 페록시다아제, 탄산무수화효소, 티로시나아제, 트립신, 파파인, 페록시다아제, 포도당 탈수소효소, 포도당 이성화효소 및 히드로제나아제, 홀세라디쉬 페록시다아제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 효소-그래핀 옥사이드 복합체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 복합체에 추가로 전기전도성 물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 효소-그래핀 옥사이드 복합체.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 전기전도성 물질은 탄소나노물질, 탄소나노튜브, 그래파이트, 그래핀 및 그래핀 옥사이드로 구성된 군에서 선택되는 1종 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 효소-그래핀 옥사이드 복합체.
- [청구항 5] (a) 판형 구조를 가지는 그래핀 옥사이드에 효소를 흡착시키는 단계; 및
(b) 상기 효소가 그래핀 옥사이드에 가교결합을 형성하기 위하여 가교결합제를 첨가하여 효소집적체를 형성하여 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 제조하는 단계를 포함하는 효소-그래핀 옥사이드의 제조 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 (a) 단계와 (b) 단계 사이에, 상기 효소가 흡착된 판형 구조를 가지는 그래핀 옥사이드에 효소 석출화제를 첨가하여 상기 효소를 석출시키는 단계를 추가로 포함하는 효소-그래핀 옥사이드 제조 방법.
- [청구항 7] 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 (b) 단계 다음에 추가로 전기전도성 물질을 첨가하는 단계를 포함하는 제조 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서 상기 전기전도성 물질은 탄소나노입자, 자성나노입자, 탄소나노물질, 탄소나노튜브, 그래파이트, 그래핀 및 그래핀 옥사이드로 구성된 군에서 선택되는 하나 또는 그

- 이상인 것을 특징으로 하는 제조 방법.
- [청구항 9] 제5항에 있어서, 상기 효소는 글루코스 데히드로제나아제, 글루코스 이소머라아제, 당산화효소, 락카아제, 락타아제, 리파아제, 망가네이제 페록시다아제, 모트립신, 사일라네이즈, 서몰리신, 서브틸리신, 셀룰라아제, 소이빈 페록시다아제, 수크라아제, 알코올 탈수소효소, 오가노포스포히드로라아제, 유기포스포하이드롤레이즈, 자일라아제, 키모트립신, 콜리에스테라아제, 클로리네스테라아제, 클로로 페록시다아제, 탄산무수화효소, 티로시나아제, 트립신, 파파인, 페록시다아제, 포도당 탈수소효소, 포도당 이성화효소 및 히드로제나아제, 홀세라디쉬 페록시다아제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 제조 방법.
- [청구항 10] 제5항에 있어서, 상기 가교결합제는 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르 디알데하이드, 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디알데하이드, 디에폭사이드, 디에시드 클로라이드, 디이미드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 제조 방법.
- [청구항 11] 제6항에 있어서, 상기 석출화제는 1-프로판올, 2-프로판올, 메탄올, 부틸알콜, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐 포스페이트, 아세톤, 암모늄 설페이트, 에탄올, PEG, 포타슘 설페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 포스페이트 및 폴리에틸렌글라이콜 이들의 수용액을 단독 또는 혼합한 것을 특징으로 하는 제조 방법.
- [청구항 12] 제5항 내지 제11항 중 어느 한 항에 의하여 제조된 효소-그래핀 옥사이드 복합체.
- [청구항 13] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 포함하는 바이오연료전지용 전극.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 효소는 양극 효소인 것을 특징으로 하는 바이오연료전지용 전극.
- [청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 효소는 락카아제(laccase)인 것을 특징으로 하는 바이오연료전지용 전극.
- [청구항 16] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 효소-그래핀 옥사이드 복합체를 포함하는 바이오센서용 전극.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 효소는 락카아제인 것을 특징으로 하는 바이오센서용 전극.
- [청구항 18] 제16항에 있어서, 상기 바이오센서는 페놀류 물질을 검출하는 것을 특징으로 하는 바이오센서용 전극.

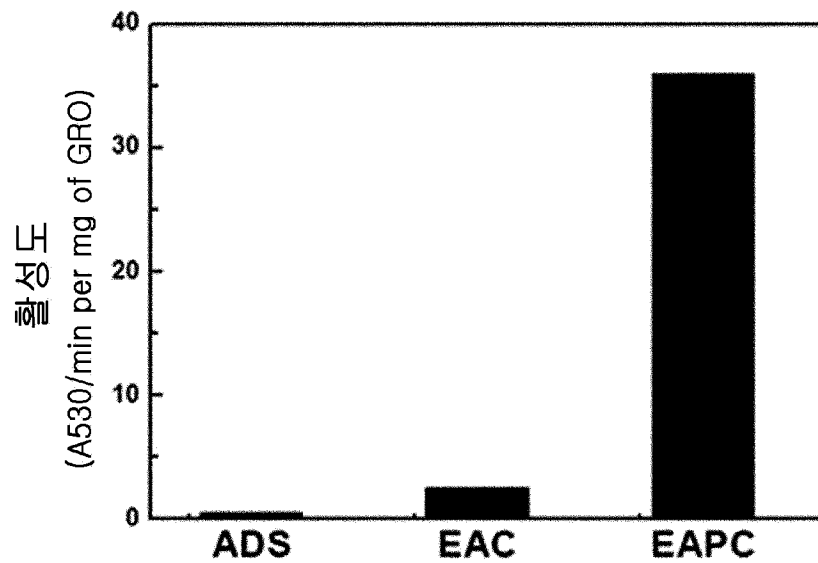
[Fig. 1]



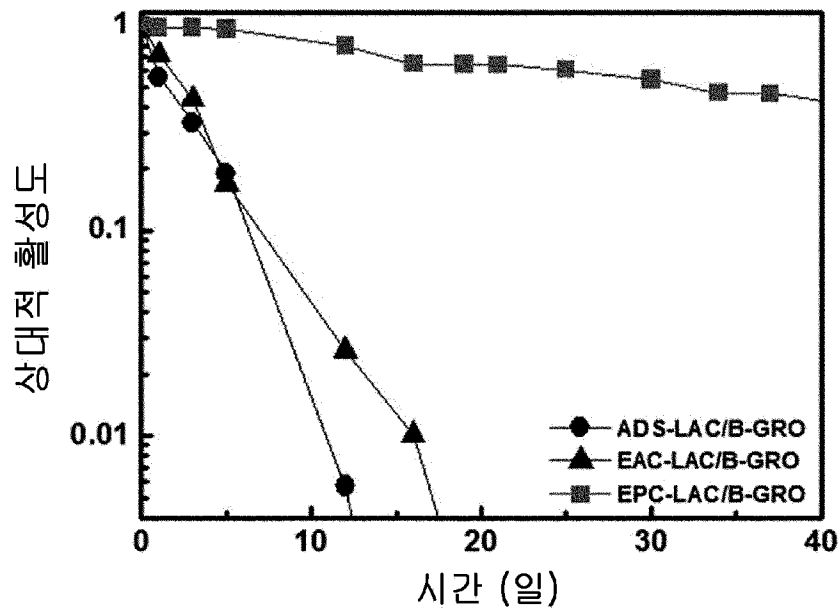
[Fig. 2]



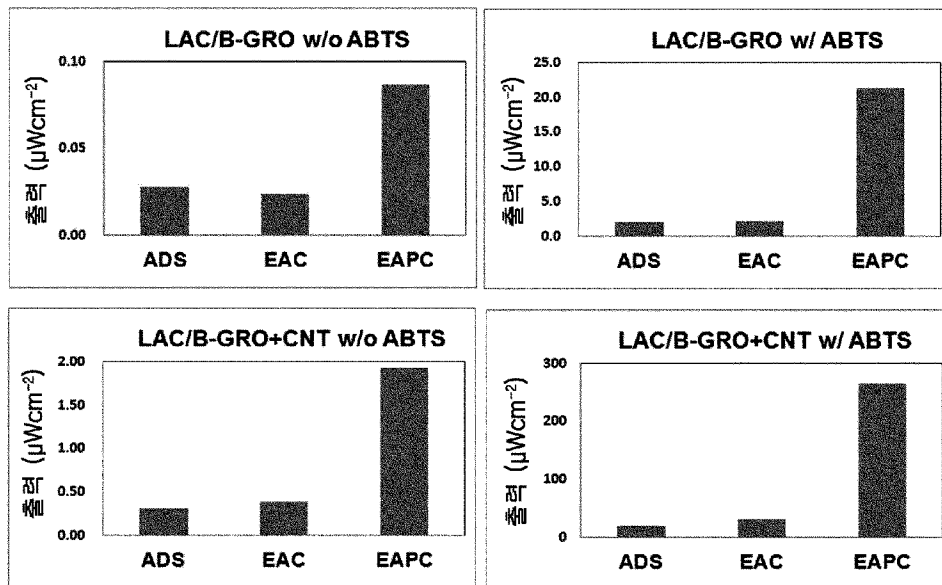
[Fig. 3]



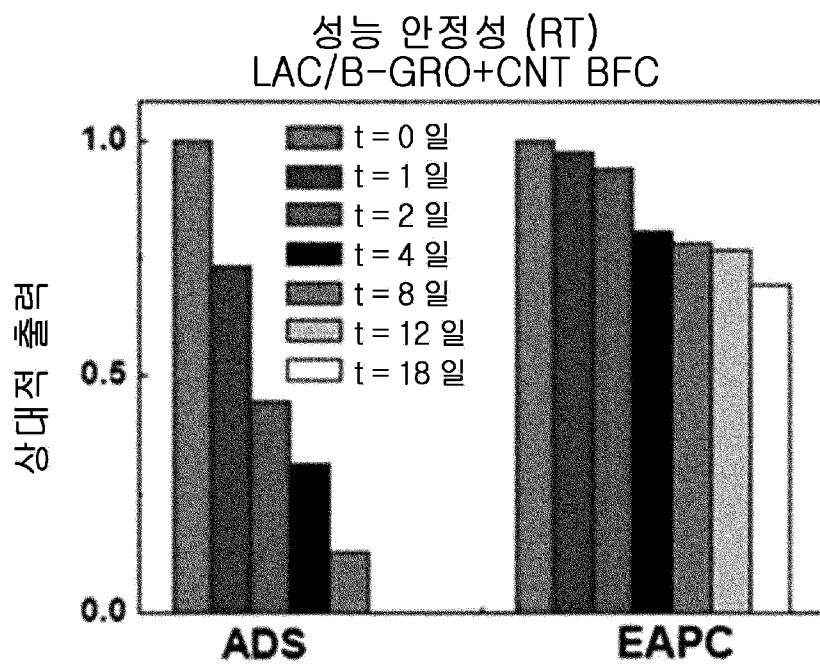
[Fig. 4]



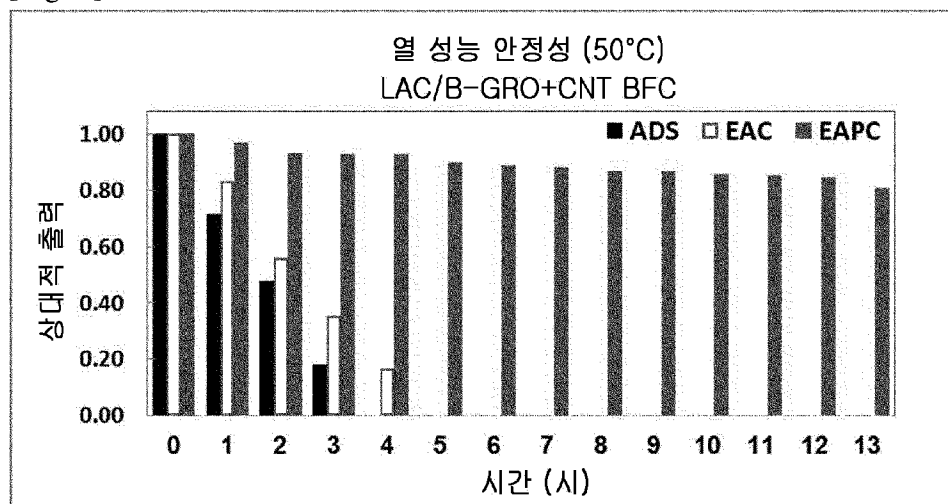
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/003501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

H01M 4/86(2006.01)i, H01M 4/88(2006.01)i, H01M 8/16(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 4/86; C12Q 1/25; B82B 3/00; C12N 11/04; H01M 4/88; H01M 8/16

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: enzyme, graphene oxide, surrounding

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2011-0128134 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 28 November 2011 See abstract; claims 1-14; paragraphs [0025]-[0053]; and figures 1, 5a-5b.	1-11,13-18
Y	SU, RUIJING et al., "Studies on the properties of graphene oxide-alkaline protease bio-composites", Bioresource Technology, Epub: 24 December 2011, vol. 115, pp. 136-140 See abstract; and pages 136-137, 139.	1-11,13-18
A	ZHANG, FENG et al., "Horseradish Peroxidase Immobilized on Graphene Oxide: Physical Properties and Applications in Phenolic Compound Removal", The Journal of Physical Chemistry C, Epub: 06 April 2010, vol. 114, no. 18, pp. 8469-8473 See abstract; and pages 8469-8470.	1-11,13-18
A	ZHANG, JIALI et al., "Graphene Oxide as a Matrix for Enzyme Immobilization", Langmuir, Epub: 18 March 2010, vol. 26, no. 9, pp. 6083-6085 See abstract; and pages 6083-6085.	1-11,13-18
A	KR 10-2011-0128128 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 28 November 2011 See abstract; claims 1-15; paragraphs [0032]-[0062]; and figure 2.	1-11,13-18



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

28 JULY 2014 (28.07.2014)

Date of mailing of the international search report

28 JULY 2014 (28.07.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/003501

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: **12**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/003501

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0128134 A	28/11/2011	WO 2011-145826 A2	24/11/2011
		WO 2011-145826 A3	19/04/2012
KR 10-2011-0128128 A	28/11/2011	US 2013-0130284 A1	23/05/2013
		WO 2011-145809 A2	24/11/2011
		WO 2011-145809 A3	01/03/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) H01M 4/86(2006.01)i, H01M 4/88(2006.01)i, H01M 8/16(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) H01M 4/86; C12Q 1/25; B82B 3/00; C12N 11/04; H01M 4/88; H01M 8/16 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: 효소, 그래핀 옥사이드, 둘러쌈		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2011-0128134 A (고려대학교 산학협력단) 2011.11.28 요약; 청구항 1-14; 단락 [0025]-[0053]; 및 도면 1, 5a-5b 참조.	1-11, 13-18
Y	SU, RUIJING 외 4명, `Studies on the properties of graphene oxide-alkaline protease bio-composites`, Bioresource Technology, Epub: 2011.12.24, 115권, 페이지 136-140 요약; 및 페이지 136-137, 139 참조.	1-11, 13-18
A	ZHANG, FENG 외 6명, `Horseradish Peroxidase Immobilized on Graphene Oxide: Physical Properties and Applications in Phenolic Compound Removal`, The Journal of Physical Chemistry C, Epub: 2010.04.06, 114권, 18호, 페이지 8469-8473 요약; 및 페이지 8469-8470 참조.	1-11, 13-18
A	ZHANG, JIALI 외 6명, `Graphene Oxide as a Matrix for Enzyme Immobilization`, Langmuir, Epub: 2010.03.18, 26권, 9호, 페이지 6083-6085 요약; 및 페이지 6083-6085 참조.	1-11, 13-18
A	KR 10-2011-0128128 A (고려대학교 산학협력단) 2011.11.28 요약; 청구항 1-15; 단락 [0032]-[0062]; 및 도면 2 참조.	1-11, 13-18
☐ 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 특허문헌 “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 신규성 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 2014년 07월 28일 (28.07.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 07월 28일 (28.07.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 신주철 전화번호 +82-42-481-8656 

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☒ 청구항: 12
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0128134 A	2011/11/28	WO 2011-145826 A2 WO 2011-145826 A3	2011/11/24 2012/04/19
KR 10-2011-0128128 A	2011/11/28	US 2013-0130284 A1 WO 2011-145809 A2 WO 2011-145809 A3	2013/05/23 2011/11/24 2012/03/01