



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월11일

(11) 등록번호 10-2076264

(24) 등록일자 2020년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

H01M 8/16 (2017.01) *C12Q 1/00* (2018.01)

H01M 4/86 (2006.01) *H01M 4/88* (2006.01)

H01M 4/90 (2006.01)

(52) CPC특허분류

H01M 8/16 (2013.01)

C12Q 1/005 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0089880

(22) 출원일자 2018년08월01일

심사청구일자 2018년08월01일

(56) 선행기술조사문헌

JP2009048833 A

KR1020120040872 A

JP2006024555 A

(73) 특허권자

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김창준

경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 104동 103호(평거동, 들말대경아파트)

왕설

경상남도 진주시 진주대로 501

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 17 항

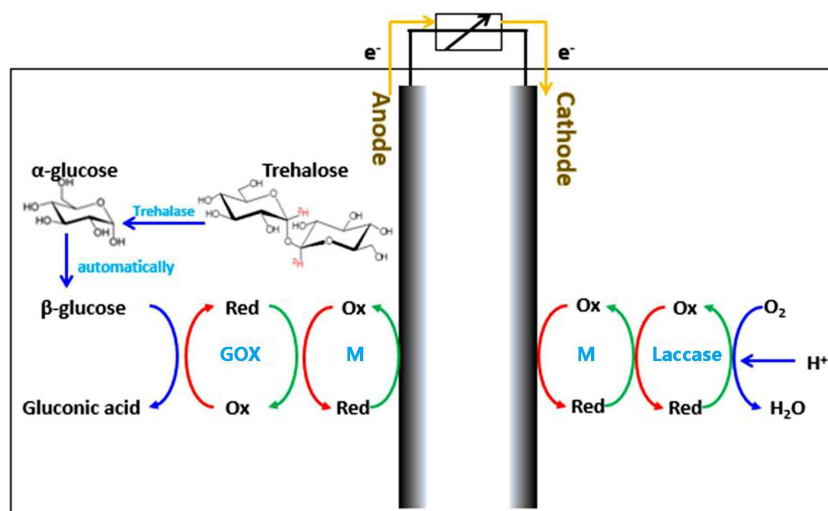
심사관 : 강연무

(54) 발명의 명칭 이효소 기반 생체연료전지 시스템 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 연료전지 시스템 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 서로 다른 두 효소를 활용하여 이 당류로부터 효율적으로 전기를 생산할 수 있는 고성능 연료전지 시스템 및 이의 제조방법에 관한 것이다

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

H01M 4/8663 (2013.01)

H01M 4/8673 (2013.01)

H01M 4/88 (2013.01)

H01M 4/9008 (2013.01)

H01M 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345264351

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)

연구과제명 곤충에서 자가발전이 가능한 고집적 번들 타입 생체연료전지

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.02.28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

제1전극, 상기 제1전극 표면에 고정되고, 글루코스 산화효소와 전자전달매개체를 포함하는 제1층; 및 상기 제1층 상에 부착되고, 생물연료 분해효소 및 겔화 고분자를 포함하는 제2층;으로 구성된 애노드 전극(산화전극, 양극, anode); 및

제2전극 표면에 환원효소가 고정화되어 있는 캐소드 전극(환원전극, 음극, cathode);를 포함하는 연료전지 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1층은 2 내지 7 개의 단(段)이 적층되어 형성된 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 제1층은 적어도 하나 이상의 단에 단일벽탄소나노튜브가 더 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제1층에서 전극 표면에 글루코스 산화효소와 전자전달매개체 및 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하는 1 내지 3 개의 단이 순차적으로 적층되고, 그 위로 단일벽탄소나노튜브를 포함하지 않는 글루코스 산화효소와 전자전달매개체를 포함하는 1 내지 3 개의 단이 추가적으로 적층되는 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제2층은 겔화 고분자 및 생물연료 분해효소를 포함하는 조성물을 도포하여 제조되고, 상기 조성물은 상기 겔화 고분자를 조성물 총량에 대해 0.1 내지 1 중량%의 양으로 함유하는 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 생물연료 분해효소는 트레할로스 분해효소, 수크로스 분해효소 및 락토스 분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 제2층에는 전자전달매개체가 더 포함되고, 상기 전자전달매개체는 Os-고분자 복합체인 산화환원성 고분자(redox polymer), 페로센메탄올(ferrocenemethanol), 페리시아화칼륨($K_3[Fe(CN)_6]$) 및 하이드로 퀴논(hydroquinone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 겔화 고분자는 아가로스(agarose), 젤라틴(gelatin), 하이드로젤(hydrogel) 및 키토산(chitosane)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제1전극 및 제2전극은 서로 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로 금, 은, 백금, 구리, 알루미늄, ITO(indium tin oxide), 탄소나노튜브 및 그래핀(graphene)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 환원효소는 빌리루빈 산화효소(bilirubin oxidase; BOD), 라케이즈(Laccase), 퍼록시다이제(horseradish peroxidase, HRP), 카탈라아제(catalase), 시토크롬 c(cytochrome c), 시토크롬 산화효소(cytochrome oxidase), 마이크로과산화효소(microperoxidase) 및 호스래디쉬 과산화효소(horseradish peroxidase)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 효소인 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 연료전지 시스템은 젓당, 수크로스 및 곤충의 혈액 혹은 체액에 존재하는 트레할로스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 생물연료로 이용하는 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 캐소드 전극은 1 내지 6 개의 단(段)이 적층되어 형성되고,

상기 캐소드 전극은 단일벽탄소나노튜브를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템.

청구항 13

제1항에 따른 연료전지 시스템을 포함하는 바이오센서.

청구항 14

a) 제1전극 표면에 글루코스 산화효소와 전자전달매개체를 포함하는 제1층을 적층하는 단계;

b) 상기 제1층 상에 생물연료 분해효소, 전자전달매개체 및 겔화 고분자를 포함하는 제2층을 적층하여 애노드 전극을 제조하는 단계; 및

c) 제2전극 표면에 환원효소를 고정시켜 캐소드 전극을 제조하는 단계;를 포함하는 연료전지 시스템의 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 a) 단계는

a-1) 제1전극 표면에 글루코스 산화효소와 전자전달매개체 및 단일벽 탄소나노튜브를 포함하는 1 내지 3 개의 단이 고정화하는 단계; 및

a-2) 상기 a-1) 단 표면에 단일벽탄소나노튜브를 포함하지 않는 글루코스 산화효소와 전자전달매개체를 포함하는 1 내지 3 개의 단이 고정화하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템의 제조방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 b) 단계는 겔화 고분자 및 생물연료 분해효소를 포함하는 조성물을 도포하여 제조되고, 상기 조성물은 상기 겔화 고분자를 조성물 총량에 대해 0.1 내지 1 중량%의 양으로 함유하는 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템의 제조방법.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 c) 단계는,

c-1) 제2전극 표면에 제2전극 표면에 환원효소 및 단일벽탄소나노튜브를 포함하는 1 내지 2 개의 단이 고정화하는 단계; 및

c-2) 상기 c-1) 단 표면에 단일벽탄소나노튜브를 포함하지 않는 환원효소를 포함하는 1 내지 2 개의 단이 고정화하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 연료전지 시스템의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 효소기반 연료전지 시스템 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 서로 다른 두 효소를 활용하여 이당류로부터 효율적으로 전기를 생산할 수 있는 고성능 연료전지 시스템 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 연료전지(fuel cell)는 연료고갈과 환경문제가 부각되면서 대체에너지로서 많은 연구가 진행되고 있다. 이 중에서도, 효소연료전지(enzymatic fuel cell)는 효소를 촉매로 사용하며, 상온, 상압, 자연 발생적 pH 등의 조건하에서 작동이 가능할 뿐만 아니라, 인체에 무해한 물질을 활용하여 제조되며 그 크기가 일반 연료전지에 비해 매우 작다는 다양한 장점들을 가지고 있어, 많은 연구자들의 관심을 받고 있다. 효소연료전지는 의학, 바이오센서, 소형 전자제품의 배터리 등 실생활에 많은 응용이 가능할 것이라 예상되고 있다.

[0003] 그러나 실상 효소연료전지는 사용할 수 있는 기질이 제한적이고, 이로부터 발생되는 전력량이 매우 낮다는 문제점을 가지고 있기 때문에, 활용될 수 있는 분야가 매우 한정적이다. 예컨대, 생물질 중에는 이당류가 가장 많이 존재하는데도 불구하고, 생체이식형 전원들은 대부분 글루코스와 같은 단당류에만 적용이 가능하다. 게다가, 이식을 위해 연료전지의 크기를 수 마이크로미터 이하로 줄여야할 경우에는 효소 연료전지의 발생 전력량이 더욱 감소되어 낮은 파워를 생산한다는 문제점들을 가지고 있다. 특히, 곤충의 혈액에는 주로 이당류인 트레할로스가 존재하므로, 이를 연료로 사용하기 위해서는 이당류를 단당류로 전환하는 효소와 단당류로부터 전자를 생성하기 위한 효소의 고정화가 요구되는데, 2 가지 이상의 효소가 전극 물질에 고정화될 경우, 전지의 성능이 오히려 저하되는 문제점이 있었다.

[0004] 이러한 효소 연료 전지의 성능을 향상시키기 위하여 일반적으로 고려해야 할 몇 가지 사항들이 있다. 첫째, 일반적으로 효소는 물리적 흡착 또는 화학적 결합에 의해 전극 물질에 고정화될 수 있는데, 장기간 부착이 가능하기 위해서는 화학적 결합에 의한 고정화가 좋다. 둘째, 글루코스를 산화시켜 전기를 발생시키는 데 있어서, 글루코스 산화효소의 활성점과 그 곁에 존재하는 환원 보조 인자인 FDA가 그 역할을 한다. 효소 고정화 단계에서 이러한 FDA를 내포하고 있는 활성점이 전극 물질에 직접 부착하게 되면, 용액에 존재하는 글루코스와 쉽게 접촉할 수 없게 되어 성능이 감소할 수 있다. 셋째, 화학적 전극 물질에 효소가 부착될 때, 단일층으로 결합하게 되어 전극 단위 면적당 부착할 수 있는 효소의 양이 한계가 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 생물연료에 따라 두 효소를 전극에 고정화한 연료전지의 구성성분들의 구조를 최적화하여 전기 생산능력이 높은 효소 연료전지를 개발할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2014-0127169호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 하나의 이당류계열의 생물 연료로부터 전기를 얻기 위하여, 2종 이상의 효소가 고정화되어야 하고, 상기 효소를 분리하여 서로 다른 복층으로 부착함으로써 전자전달 저항이 최소화되어 우수한 전기 생성 특성을 갖는 compact 한 구조의 연료전지 시스템을 제공하고자 하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 연료전지 시스템을 이용해, 이당류의 검출을 위한 바이오센서를 제공하고자 하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 연료전지 시스템을 대량 생산할 수 있는 제조방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 제1전극, 상기 제1전극 표면에 고정되고, 글루코스 산화효소와 전자전달 매개체를 포함하는 제1층; 및 상기 제1층 상에 부착되고, 생물연료 분해효소, 및 겔화 고분자를 포함하는 제2층;으로 구성된 애노드 전극(산화전극, 양극, anode); 및 제2전극 표면에 환원효소가 고정화되어 있는 캐소드 전극(환원전극, 음극, cathode);를 포함하는 연료전지 시스템을 제공한다.

[0011] 상기 제1층은 1 내지 6 개의 단(段)이 적층되어 형성된 것일 수 있다.

[0012] 상기 제1층은 적어도 하나 이상의 단에 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)가 더 포함될 수 있다.

[0013] 상기 제1층에서 제1전극 표면에 글루코스 산화효소와 전자전달매개체 및 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하는 1 내지 3 개의 단이 순차적으로 적층되고, 그 위로 단일벽탄소나노튜브를 포함하지 않는 글루코스 산화효소와 전자전달매개체를 포함하는 1 내지 3 개의 단이 추가적으로 적층되는 것일 수 있다.

[0014] 상기 제2층은 겔화 고분자 및 생물연료 분해효소를 포함하는 조성물을 도포하여 제조되고, 상기 조성물은 상기 겔화 고분자를 조성물 총량에 대해 0.1 내지 1 중량%의 양으로 함유하는 것일 수 있다.

[0015] 상기 제2층은 겔화 고분자 및 생물연료 분해효소를 포함하는 조성물을 도포하여 제조되고, 상기 조성물은 상기 겔화 고분자를 조성물 총량에 대해 0.25 중량%의 양으로 함유하는 것일 수 있다.

[0016] 상기 생물연료 분해효소는 특이 활성이 1 내지 10 unit 일 수 있다.

[0017] 상기 생물연료 분해효소는 트레할로스 분해효소, 수크로스 분해효소 및 락토스 분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 것일 수 있다.

[0018] 상기 전자전달매개체는 Os-고분자 복합체인 산화환원성 고분자(redox polymer), 페로센메탄올(ferrocenemethanol), 페리시안화칼륨 ($K_3[Fe(CN)_6]$), 하이드로 퀴논(hydroquinone)일 수 있다.

[0019] 상기 겔화 고분자는 아가로스(agarose), 젤라틴(gelatin), 하이드로젤 (hydrogel), 키토산(chitosane)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것일 수 있다.

[0020] 상기 제1층은 가교제를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 상기 가교제는 PEGDGE(Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether)일 수 있다.

[0022] 상기 제1전극 및 제2전극은 서로 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로 금, 은, 백금, 구리, 알루미늄, ITO(indium tin oxide), 탄소나노튜브 및 그래핀(graphene)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것일 수 있다.

[0023] 상기 환원효소는 빌리루빈 산화효소(bilirubin oxidase; BOD), 라케이즈(Laccase), 시토크롬 산화효소(cytochrome oxidase)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 효소일 수 있다.

- [0024] 상기 연료전지 시스템은 젓당, 수크로스, 또는 곤충의 혈액 혹은 체액에 존재하는 트레할로스를 생물연료로 이용하는 것일 수 있다.
- [0025] 상기 캐소드 전극은 1 내지 6 개의 단(段)이 적층되어 형성된 것일 수 있다.
- [0026] 상기 캐소드 전극은 단일벽탄소나노튜브를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0027] 상기 캐소드 전극에서 제2전극 표면에 환원효소 및 단일벽탄소나노튜브를 포함하는 1 내지 2 개의 단이 순차적으로 적층되고, 그 위로 단일벽탄소나노튜브를 포함하지 않는 환원효소를 포함하는 1 내지 2 개의 단이 추가적으로 적층되는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 캐소드 전극은 환원용 전자전달매개체를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 상기 환원용 전자전달매개체는 Os-고분자 복합체인 산화환원성 고분자(redox polymer), ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), 시토크롬 c(cytochrome c), DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 및 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 것일 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 다른 목적을 이루기 위하여, 상기 연료전지 시스템을 포함하는 이당류 검출을 위한 바이오센서를 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 또 다른 목적을 이루기 위하여 하기 단계를 포함하는 연료전지 시스템의 제조방법을 제공한다.
- [0032] a) 제1전극 표면에 글루코스 산화효소와 전자전달매개체를 포함하는 제1층을 적층하는 단계;
- [0033] b) 상기 제1층 상에 생물연료 분해효소, 전자전달매개체 및 겔화 고분자를 포함하는 제2층을 적층하여 애노드 전극을 제조하는 단계; 및
- [0034] c) 제2전극 표면에 환원효소를 고정시켜 캐소드 전극을 제조하는 단계.
- [0035] 상기 a) 단계의 제1층에는 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0036] 상기 a) 단계는 a-1) 제1전극 표면에 글루코스 산화효소와 전자전달매개체 및 단일벽탄소나노튜브를 포함하는 1 내지 3 개의 단이 고정화하는 단계; 및 a-2) 상기 a-1) 단 표면에 단일벽탄소나노튜브를 포함하지 않는 글루코스 산화효소와 전자전달매개체를 포함하는 1 내지 3 개의 단이 고정화하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [0037] 상기 b) 단계는 겔화 고분자 및 생물연료 분해효소를 포함하는 조성물을 도포하여 제조되고, 상기 조성물은 상기 겔화 고분자를 조성물 총량에 대해 0.1 내지 1 중량%의 양으로 함유하는 것일 수 있다.
- [0038] 상기 c) 단계에는 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0039] 상기 c) 단계는, c-1) 제2전극 표면에 환원효소 및 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하는 1 내지 2 개의 단이 고정화하는 단계; 및 c-2) 상기 c-1) 단 표면에 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하지 않는 환원효소를 포함하는 1 내지 2 개의 단이 고정화하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명에 따른 연료전지 시스템은 혈액 또는 체액에 존재하는 당류를 연료로 사용하여 효율적으로 전기를 생산할 수 있는 것으로, 이러한 전환과정에 2 가지 이상의 효소가 요구되는 데, 이로 인해 전기전도도 (electrical conductivity)가 감소하여 생성된 전자가 전극으로 이동하는데 어려움이 많다. 본 발명은 이러한 취약한 문제점을 해결함으로써, 컴팩트한 구조이면서 우수한 성능을 갖도록 할 수 있다.
- [0041] 다시 말해 글루코스 산화효소와 생물연료 분해효소가 겔화 고분자에 의해 서로 분리된 층으로 전극 표면에 고정화됨으로써, 이들 서로 간의 간섭을 최소화하고, 생물연료의 분해 및 분해산물인 단당류의 산화로부터 전기의 생산량이 증가하기 때문에, 적은 효소량으로도 전극 단위면적 당 높은 전기생성이 가능하다.
- [0042] 또한, 본 발명의 연료전지 시스템은 애노드 전극과 캐소드 전극의 구조를 개선함으로써, 전기 생산 성능이 향상되었을 뿐만 아니라, 공정 과정이 단순하기 때문에, 대량 생산이 가능하다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0043]

도 1a는 본 발명의 일 구현예에 따른 이효소 연료전지 시스템(bi-enzymatic fuel cell system)의 단면도이다.

도 1b는 본 발명의 일 구현예에 따른 애노드 전극 구조를 나타낸 개략도이다.

도 2는 본 발명의 바람직한 실시예에 따라 상기 도 1에 도시된 연료전지 시스템의 애노드 및 캐소드에서의 반응을 설명하기 위한 개념도이다.

도 3은 비교예 1 내지 4로부터 제조된 두 효소가 동시에 고정화된 애노드 전극표면에 부착된 트레할로스 효소량에 따른 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)을 분석한 결과 그래프이다.

도 4는 도 3을 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 5A는 실험예 1에서 사용한 두 효소가 분리되지 않고 동시에 고정화된 애노드 전극을 포함하는 테스트 시스템의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

도 5B는 실험예 1에서 사용한 글루코스 산화효소가 고정화된 애노드 전극과 free enzyme 형태의 트레할로스 분해효소로 구성된 테스트 시스템의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

도 5C는 실험예 1에서 사용한 글루코스 산화효소가 고정화된 애노드 전극과 트레할로스 분해효소가 고정화된 추가 전극을 포함하는 테스트 시스템의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

도 5D는 실시예 1로부터 제조된 즉, 포도당 산화효소와 트레할로스 분해효소가 분리되어 고정화된 컴팩트한 구조의 애노드를 포함하는 테스트 시스템 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

도 6은 비교예 4, 비교예 5, 비교예 6 및 실시예 1로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극 표면에 효소들의 배치가 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극에 부착된 포도당 산화효소의 표면을 감싸는 아가로스 농도가 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 도 7을 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 9는 실시예 4 내지 10으로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극표면에 포도당산화효소와 전자전달매개체로 이루어진 단의 수가 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 실시예 4 내지 10으로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극표면에 포도당산화효소와 전자전달매개체로 이루어진 단의 수가 전류생산에 미치는 영향을 EIS(Electrochemical impedance spectroscopy, 임피던스 분광법)로 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 11은 도 10로부터 측정된 수치로부터 전하전달저항값을 계산하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 12는 실시예 11 내지 14로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극 표면에 부착된 포도당 산화효소를 감싸는 아가로스 겔에 첨가된 트레할로스 분해효소의 효소량이 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 13은 도 12를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

도 14는 실시예 15, 17, 20 및 22로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극 제1층의 포도당산화효소-단일벽탄소나노튜브 단수 증가가 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 15는 실시예 15 내지 23으로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템의 전류 전위곡선(cyclic voltammetry) 분석 결과를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

도 16은 실시예 24, 27 및 30로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극의 제1층에서 포도당산화효소 또는 포도당산화효소-단일벽탄소나노튜브 배열에 따른 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 17는 실시예 24, 27 및 30로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극의 제1층

에서 포도당산화효소 또는 포도당산화효소-단일벽탄소나노튜브 배열에 따른 전류생산에 미치는 영향을 EIS(Electrochemical impedance spectroscopy, 임피던스 분광법)로 측정하고, 이로부터 전하전달 저항값을 계산하여 나타낸 그래프이다.

도 18은 실시예 31 내지 36로부터 제조된 캐소드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 캐소드 전극의 라케이즈 효소층 수에 따른 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 19는 실시예 31 내지 36로부터 제조된 캐소드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 캐소드 전극의 라케이즈 효소 단수에 따른 전극의 전하전달저항에 미치는 영향을 EIS(Electrochemical impedance spectroscopy, 임피던스 분광법)로 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 20은 실시예 37, 41 및 42로부터 제조된 캐소드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 캐소드 전극의 단수가 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 21은 실시예 37 내지 42로부터 제조된 캐소드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 캐소드 전극의 단수가 전류생산에 미치는 영향을 EIS(Electrochemical impedance spectroscopy, 임피던스 분광법)로 측정하고, 이로부터 전극의 전하전달저항을 계산하여 나타낸 그래프이다.

도 22는 실시예 48로부터 제조된 연료전지 시스템에서 일정전류를 방전하며 측정한 전류밀도 곡선을 나타낸 것이다.

도 23은 실시예 49로부터 제조된 연료전지 시스템에서 일정전류를 방전하며 측정한 전류밀도 곡선을 나타낸 것이다.

도 24는 실시예 50으로부터 제조된 연료전지 시스템에서 일정전류를 방전하며 측정한 전류밀도 곡선이다.

도 25는 본 발명의 일 구현예에 따른 연료전지 시스템을 곤충 인식용 연료전지 시스템으로 활용한 구조의 단면도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044]

이하, 본 발명에 대해 보다 상세하게 설명하기로 한다.

[0045]

본 발명의 일 측면은 제1전극 표면에, 글루코스 산화효소와 이당류 분해효소가 고정화된 애노드 전극(산화전극, 양극, anode); 및 제2전극 표면에 환원효소가 고정되어 있는 캐소드 전극(환원전극, 음극, cathode);를 포함하는 연료전지 시스템에 관한 것이다.

[0046]

일반적으로 트레할로스, 수크로스, 락토스와 같은 이당류를 연료로 사용하는 경우, 어느 하나의 산화효소만으로 전기를 생산할 수 없고, 상기 이당류를 단당류로 분해하는 효소와 생성된 단당류를 산화하는 효소 등 적어도 둘 이상 효소의 협업이 요구된다. 이러한 둘 이상의 효소를 혼합하여 단순히 하나의 전극에 고정화하는 경우, 생성되는 전류값이 매우 낮다는 문제가 발생한다(실험예 1 참고). 이를 해결하기 위하여, 적어도 하나 이상의 효소가 사용되는 이식형 연료전지 시스템용 전극에 대한 새로운 구조의 설계가 요구되며, 특히 전자전달저항을 줄이는 것이 가장 시급한 문제이다.

[0047]

예를 들어 곤충 혈액에는 이당류인 트레할로스(trehalose) 당이 존재하고, 이를 생물연료로 사용하여 전기를 생산하고자 할 경우, 애노드에는 트레할로스 분해효소(trehalase)와 글루코스 산화효소(glucose oxidase)가 고정화되어 하기 도 2의 좌측 반응식에 따라 전자를 생성한다.

[0048]

도 2에 나타나 있는 바와 같이 둘 이상의 효소가 분리되지 않고 동시에 고정화(co-immobilization)될 경우, 서로가 서로에게 간섭하여 활성을 낮추거나, 생성된 전자가 전극으로 이동하는 것을 방해하여 저항체로 작용하는 등의 문제를 야기하여 연료전지의 성능이 현저히 저하되는 문제가 있음을 확인하였다.

[0049]

이에 본 발명에서는 상술한 문제점을 해결할 뿐만 아니라, 글루코스 전환율 및 전환속도를 증대시켜 전자 생성을 높일 수 있는 신개념의 고성능 연료전지 시스템 구조를 개발하기 위하여 무수히 많은 실험을 수행한 바, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0050]

본 발명은 제1전극, 상기 제1전극 표면에 고정되고, 글루코스 산화효소와 전자전달매개체를 포함하는 제1층; 및

상기 제1층 상에 부착되고, 생물연료 분해효소와 겔화 고분자를 포함하는 제2층;으로 구성된 애노드 전극(산화 전극, 양극, anode); 및 제2전극 표면에 환원효소가 고정화되어 있는 캐소드 전극(환원전극, 음극, cathode);를 포함하는 연료전지 시스템에 관한 것이다.

- [0051] 도 1a는 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 이효소 연료전지 시스템(bi-enzymatic fuel cell system)을 도시한 개념도이다. 도 1a를 참조하면, 연료전지 시스템(100)은 애노드(110), 캐소드(120)을 포함한다.
- [0052] 상기 애노드(110)은 제1전극(111)에 글루코스 산화효소와 이당류 분해효소가 고정된 것으로, 구체적으로 상기 제1전극(111) 표면에 고정되고, 글루코스 산화효소와 전자전달매개체를 포함하는 제1층(112); 및 상기 제1층(112) 상에 부착되고, 생물연료 분해효소와 겔화 고분자를 포함하는 제2층(113)으로 구성된다.
- [0053] 상기 제1전극(111)은 금속성 물질이면 특별히 이에 제한되지 않으나, 금, 은, 백금, 구리, 알루미늄, ITO(indium tin oxide), 탄소나노튜브 및 그래핀(graphene)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것일 수 있다. 상기 제1전극(111)은 박막 또는 막대 형태일 수 있고, 박막형태인 경우 50 nm 내지 300 nm 두께로 형성될 수 있다. 상기 제1 전극(111)은 생물학적 촉매를 포함하는 제1층(112) 및 제2층(113)의 형성을 용이하게 하며, 제1층(112)과 제2층(113)을 통해 발생된 전자를 전극에 전달한다.
- [0054] 상기 제1층(112)은 하나 이상의 단(段)(112a~112f)이 적층되어 형성된 복층 구조일 수 있고, 구체적인 구조는 도 1b에 나타내었다.
- [0055] 본 발명에서 '단(段)'은 상기 제1층이 보다 세부적으로 구획화 되어 있음을 나타내기 위한 것으로, 상기 제1층에서 제1전극의 바깥 방향으로 복수의 층이 형성되고, 각 층을 구분하는 단위 구역을 의미한다.
- [0056] 바람직하게 상기 제1층(112)은 1 내지 7 개의 단(段)(112a~112f)이 적층되어 형성되는 것이 바람직하고, 동일한 구성의 제1층만 적용될 경우에는 최고 전기 생산량과 낮은 전자전달저항을 얻기 위해서 4 개의 단을 초과하여 적층되지 않는 것이 바람직하며, 1 내지 3 개의 단이 적층되어 형성되는 것이 가장 바람직하다.
- [0057] 상기 제1층은 적어도 하나 이상의 단에 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)가 더 포함되어 있을 수 있고, 단일벽탄소나노튜브가 더 포함되는 경우에는 1 내지 7 개의 단(段)이 적층되어 형성되는 것이 바람직하다.
- [0058] 상기 애노드 전극이 가장 최소한으로 저항이 발생하면서 가장 높은 전류밀도를 갖는 가장 바람직한 구조는 상기 제1층에서 전극 표면에 글루코스 산화효소와 전자전달매개체 및 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하는 1 내지 3 개의 단(112a~112c)이 순차적으로 고정화되고, 그 위로 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하지 않는 글루코스 산화효소와 전자전달매개체를 포함하는 1 내지 3 개의 단(112d~112f)이 고정화되는 것일 수 있다(도 1b 참조).
- [0059] 상기 제2층(113)은 생물연료 분해효소와 겔화 고분자를 포함하는 것으로, 구체적으로 상기 겔화 고분자 및 생물연료 분해효소를 포함하는 조성물을 도포하여 제조되는 것일 수 있다. 상기 조성물은, 생물연료물질의 확산 저항을 고려하여 상기 겔화 고분자를 조성물 총량에 대해 0.1 내지 1 중량%의 양으로 함유하는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 0.25 중량%의 양으로 함유하는 것일 수 있다.
- [0060] 상기 제2층(113)에서, 상기 생물연료 분해효소의 활성화에 따라 생물연료의 분해 전환율이 다르므로 애노드 전극의 전류 생산 성능도 달라지게 된다. 이를 고려하면 전극 당 상기 생물연료 분해활성이 1 내지 10 unit 인 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0061] 상기 생물연료 분해효소는 트레할로스 분해효소, 수크로스 분해효소 및 락토스 분해효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 사용 목적에 따라 적절히 선택될 수 있다. 예를 들어 곤충 이식형 연료전지 시스템이라면 곤충의 혈액과 체액에는 트레할로스가 주로 분포하고 있으므로 상기 생물연료 분해효소로 트레할로스 분해효소를 선택하는 것이 바람직하다.
- [0062] 상기 제1층에는 전자전달매개체가 더 포함될 수 있고, 생성된 전자를 전달하기 위한 것이라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게 상기 전자전달매개체는 Os-고분자 복합체인 산화환원성 고분자(redox polymer), 페로센메탄올(ferrocenemethanol), 페리시아노화칼륨($K_3[Fe(CN)_6]$) 및 하이드로 퀴논(hydroquinone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 Os-고분자 복합체인 산화환원성 고분자(redox polymer)일 수 있다.
- [0063] 상기 겔화 고분자는 아가로스(agarose), 젤라틴(gelatin), 하이드로젤 (hydrogel) 및 키토산(chitosane)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것일 수 있다.

- [0064] 상기 제1층은 가교제를 더 포함할 수 있는데, 효소를 전극 표면에 고정하기 위한 것이라면 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 PEGDGE(Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether)일 수 있다.
- [0065] 상기 애노드 전극(110)에서는 상기 제2층(113)에 존재하는 생물연료 분해효소에 의해 혈액 또는 체액에 존재하는 생물연료의 다당류가 글루코스와 같은 단당류로 분해되고, 상기 단당류는 상기 제1층(112)에 존재하는 글루코스 산화효소에 의해 산화반응이 일어난다. 산화반응을 통해 연료로부터 생성된 전자가 전자전달매개체를 거쳐 제1전극(111)으로 전달되고, 연료를 포함하는 연료 용액 내로 수소 이온이 전달된다(도 2).
- [0066] 상기 캐소드 전극(120)은 제2전극(121), 환원효소가 고정되어 있는 층(122)으로 구성된다.
- [0067] 상기 제2전극(121)은 금속성 물질이면 특별히 이에 제한되지 않고, 제1전극(111)과 서로 동일하거나 상이할 수 있고, 금, 은, 백금, 구리, 알루미늄, ITO(indium tin oxide), 탄소나노튜브 및 그래핀(graphene)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 것일 수 있고, 바람직하게는 금일 수 있다.
- [0068] 상기 제2전극(121)은 박막 또는 막대 형태일 수 있고, 박막형태인 경우 50 nm 내지 300 nm 두께로 형성될 수 있다. 상기 제2전극(121)이 금인 경우, 생물학적 촉매인 환원효소의 형성을 용이하게 하며, 환원효소에 의해 연료 용액 내의 수소 이온은 도선을 통해 전달된 전자 및 용존 산소와 결합하여 물이 형성된다.
- [0069] 상기 환원효소는 빌리루빈 산화효소(bilirubin oxidase; BOD), 라케이즈(Laccase), 퍼록시다아제(horseradish peroxidase, HRP), 카탈라아제(catalase), 시토크롬 c(cytochrome c), 시토크롬 산화효소(cytochrome oxidase), 마이크로과산화효소(microperoxidase) 및 호스래디쉬 과산화효소(horseradish peroxidase)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 효소일 수 있고, 바람직하게는 빌리루빈 산화효소(bilirubin oxidase; BOD), 라케이즈(Laccase), 시토크롬 산화효소(cytochrome oxidase)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 효소일 수 있다.
- [0070] 상기 환원효소가 고정되어 있는 층(122)은 하나 이상의 단(段)(122a~122f)(미도시)이 적층되어 형성된 복층 구조일 수 있다.
- [0071] 본 발명에서 '단(段)'은 상기 환원효소가 고정되어 있는 층이 보다 세부적으로 구획화 되어 있음을 나타내기 위한 것으로, 상기 환원효소가 고정되어 있는 층에서 제2전극의 바깥 방향으로 복수의 층이 형성되고, 각 층을 구분하는 단위 구역을 의미한다.
- [0072] 상기 환원효소가 고정되어 있는 층(122)은 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 더 포함할 수 있고, 이 경우, 상기 환원효소가 고정되어 있는 층(122)은 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하는 단과 포함하지 단이 순차적으로 적층되어 있는 구조가 바람직하는데, 구체적으로 제2전극 표면에 환원효소 및 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하는 1 내지 2 개의 단(122a~122b)이 순차적으로 고정화되고, 그 위로 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하지 않는 환원효소를 포함하는 1 내지 2 개의 단(122c~122d)이 고정화되는 것일 수 있다.
- [0073] 상기 캐소드 전극(120)에서는 환원반응이 일어난다. 따라서, 연료 용액 내의 용존산소는 캐소드 전극(120)에서 수소 이온과 결합한다.
- [0074] 상기 캐소드 전극은 환원용 전자전달매개체를 더 포함할 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 Os-고분자 복합체인 산화환원성 고분자(redox polymer), ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), 시토크롬 c(cytochrome c), DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 및 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 것일 수 있다.
- [0075] 상기 연료 용액은 생물연료인 것이 바람직하고, 상기 생물연료는 젓당, 수크로스 및 곤충의 혈액 혹은 체액에 존재하는 트레할로스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 가장 바람직하게는 트레할로스가 포함되어 있는 곤충의 혈액 혹은 체액일 수 있다.
- [0076] 상기 생물연료에 존재하는 이당류는 애노드 전극의 제2층(113)에 존재하는 생물연료 분해효소와 반응하여 글루코스(glucose)와 같은 단당류로 전환되고, 상기 글루코스는 애노드 전극(110)의 제1층(112)에 존재하는 글루코스 산화효소에 의해 산화되고, 이를 통해 생성된 전자는 애노드 전극(110)에 전달된다.
- [0077] 도 2는 본 발명의 바람직한 실시예에 따라 상기 도 1에 도시된 연료전지 시스템의 애노드 및 캐소드에서의 반응을 설명하기 위한 개념도이다. 도 2를 참조하면, 먼저, 애노드 전극에서는 생물연료의 분해 및 분해산물인

단당류의 산화반응이 일어난다. 즉, 생물연료에 존재하는 이당류는 애노드 전극 제2층의 생물연료 분해효소와 반응하여 글루코스와 같은 단당류를 생성하고, 상기 글루코스는 애노드 전극 제1층의 글루코스 산화효소와 반응한다. 반응을 통해 생성된 수소이온은 전해질 용액으로 이동하고, 전자는 애노드 전극 내로 전달된다. 또한, 산화반응의 결과물인 글루코닉산(gluconic acid ; $C_6H_{12}O_7$)은 전해질 용액으로 이동한다. 이는 반응식 1로 정리된다.

[0078] 구체적으로 도 2는 트레할로스가 생물연료로 제공될 경우에 대한 것으로, 이 경우, 애노드 전극에서는 트레할로스가 트레할로스 분해효소에 의해 글루코스로 전환되고, 글루코스는 글루코스 산화효소(GOD)에 의해 글루콘산(gluconic acid)으로 변화면서 전자를 생성한다. 생성된 전자는 전자전달체(M)에 의해 전극으로 전달된다. 상기 과정은 산화상태의 전자전달체(Red, M)가 전자를 받아 환원되고 환원상태의 전자전달체(Ox, M)가 전자를 전극으로 전달함으로써 산화된 상태(Red)로 돌아온다.

[0079] 또한, 캐소드 전극에서는 환원반응이 일어난다. 생물연료 중에 용존하는 산소는 환원효소의 관여 하에 수소이온 및 도 2의 도선을 통해 전달되는 전자와 결합하여 물을 형성한다. 구체적으로 상기 도 2의 도선을 통해 전달되는 전자가 캐소드(Cathode) 전극을 통해 전자전달매체(M)로 전달되고 라케이즈(Laccase)가 전자전달체(M)로부터 전자를 받아 산소를 물로 전환시킨다.

[0080] 따라서, 애노드 전극 및 캐소드 전극으로 구성된 효소연료전지 시스템에서 생물연료 분해에 의한 단당류 생성, 단당류의 산화를 통한 전자생성 및 전자기동에 대한 전체적인 반응은 도 2에 도시한 바와 같다.

[0081] 본 발명의 다른 측면은 상기 연료전지 시스템을 포함하는 바이오센서에 관한 것이다.

[0082] 상기 바이오센서에 표적물질이 접촉할 경우, 전기화학적 계측법에 의해 표적물질을 검출할 수 있다. 바이오센서에 의한 전기화학적 계측법으로서는, 예를 들면 산화 전류 또는 환원 전류를 측정하는 크로노암페로메트리법(chronoamperometry法), 쿨로메트리법(coulometry 法), 순환전압전류법(cyclic voltammetry) 등의 공지의 계측법을 사용할 수 있다. 측정방식으로는, 디스포지블방식(disposable 方式), 배치 방식(batch 方式), 플로우인젝션 방식(flow injection 方式) 등 어느 것이라도 좋다.

[0083] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 단계를 포함하는 연료전지 시스템의 제조 방법에 관한 것이다.

[0084] a) 제1전극 표면에 글루코스 산화효소와 전자전달매체를 포함하는 제1층을 적층하는 단계;

[0085] b) 상기 제1층 상부에 생물연료 분해효소와 겔화 고분자를 포함하는 제2층을 적층하여 애노드 전극을 제조하는 단계; 및

[0086] c) 제2전극 표면에 환원효소를 고정시켜 캐소드 전극을 제조하는 단계.

[0087] 또한, 상기 a) 단계의 제1층의 반응성을 향상시키기 위해 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 더 포함할 수 있고, 이 경우, 제1전극 표면에 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하는 단과 포함하지 않는 단이 복층으로 고정되어 형성될 수 있다. 이에 대해 앞서 상세하게 설명하였으므로, 반복되는 내용은 생략하기로 한다.

[0088] 바람직하게 상기 a) 단계는 a-1) 제1전극 표면에 글루코스 산화효소와 전자전달매체 및 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하는 1 내지 3 개의 단이 고정화하는 단계; 및 a-2) 상기 a-1) 단 표면에 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하지 않는 글루코스 산화효소와 전자전달매체를 포함하는 1 내지 3 개의 단이 고정화하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.

[0089] 상기 b) 단계는 겔화 고분자 및 생물연료 분해효소를 포함하는 조성물을 도포하여 제조되고, 상기 조성물은 상기 겔화 고분자를 조성물 총량에 대해 0.1 내지 1 중량%의 양으로 함유하는 것일 수 있다.

[0090] 상기 c) 단계에는 캐소드 전극의 반응성을 향상시키기 위해 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 더 포함할 수 있고, 이 경우, 제1전극 표면에 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하는 단과 포함하지 않는 단이 복층으로 고정되어 형성될 수 있다. 이에 대해 앞서 상세하게 설명하였으므로, 반복되는 내용은 생략하기로 한다.

[0091] 상기 c) 단계는, c-1) 제2전극 표면에 제2전극 표면에 환원효소 및 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하는 1 내지 2 개의 단이 고정화하는 단계; 및 c-2) 상기 c-1) 단 표면에 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs)를 포함하지 않는 환원효소를 포함하는 1 내지 2 개의 단이 고정화하는 단계;로 구성될 수 있다.

[0092] 상기 a), c) 단계의 고정화하는 방법은 본 발명이 속하는 기술분야에서 공지된 방법들이라면 제한없이 사용할 수 있고, 용액을 도포하여 건조하는 방법을 사용할 수 있다.

[0093] 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.

[0094] <실시예 1 내지 3> 두 효소가 복층으로 고정된 애노드 전극 제조.

[0095] 일본 소재 TCI 사(Tokyo Chemical Industry, Co. Ltd.)로부터 구매한 글루코스 산화효소(GOx, 59 units/mg)를 PBS 버퍼(pH=7.0)에 용해하여 제조한 용액(6 mg/ml)와 전자전달매개체인 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl]^{+1/2+}(PVI-Os-dme-bpy) 용액(10 mg/ml) 및 Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether(PEGDGE, 10 mg/ml)를 부피비 4 : 4 : 1로 혼합하여 효소-전자전달매개체 혼합용액을 제조하였다. 금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후, 상기 효소-전자전달매개체 혼합용액을 2 μ l 도포하고, 상온에서 건조하여, 제1층이 고정화된 애노드 전극을 제조하였다.

[0096] 이어서, 100 $^{\circ}$ C에서 용해된 아가로스 용액(0.5%, 1%, 2% w/v)를 50 $^{\circ}$ C까지 냉각한 후, 아일랜드 소재 Megazyme 으로부터 구매한 트레할로스 분해효소(trahalase, 300 Unit/mg)를 PBS 버퍼 (pH=7.0)에 적정농도로 용해하여 제조한 용액과 1 : 1로 혼합하여, 제2층 혼합용액을 제조하였다. 상기 제2층 혼합용액을 상기 제1층이 고정화된 애노드 전극 표면에 4 μ l (4.2 Unit trahalase 포함)도포하고 상온에서 건조하여 두 효소가 복층으로 고정된 애노드 전극을 제조하였다.

[0097] <실시예 4 내지 10> 서로 다른 단수로 적층된 제1층과 제2층이 고정된 애노드 전극 제조.

[0098] 일본 소재 TCI 사(Tokyo Chemical Industry, Co. Ltd.)로부터 구매한 글루코스 산화효소(GOx, 59 units/mg)를 PBS 버퍼 (pH=7.0)에 용해하여 제조한 용액 (6 mg/ml)와 전자전달매개체인 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl]^{+1/2+}(PVI-Os-dme-bpy) 용액 (10 mg/ml) 및 Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether(PEGDGE, 10 mg/ml)를 부피비 4 : 4 : 1로 혼합하여 효소-전자전달매개체 혼합용액을 제조하였다. 금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후, 상기 효소-전자전달매개체 혼합용액을 2 μ l 도포하고, 상온에서 건조하여, 제1층이 단층으로 고정화된 애노드 전극을 제조하였다. 이후, 다시 상기 효소-전자전달매개체 혼합용액 2 μ l를 도포하고 상온에서 건조하여 2단의 제1층을 형성하였다. 이의 과정을 반복하여 1단, 2단, 3단, 4단, 5단, 6단, 7단의 제1층을 갖는 애노드 전극을 각각 제조하였다(단수에 따라 실시예 4부터 실시예 10까지).

[0099] 이어서, 100 $^{\circ}$ C에서 용해된 아가로스 용액(0.5%, w/v)를 50 $^{\circ}$ C까지 냉각한 후, 아일랜드 소재 Megazyme 으로부터 구매한 트레할로스 분해효소(trahalase, 300 Unit/mg)를 PBS 버퍼(pH=7.0)에 용해하여 제조한 용액 과 1 : 1로 혼합하여, 2층 혼합용액을 제조하였다. 상기 제2층 혼합용액을 상기 제1층이 고정화된 애노드 전극 표면에 4 μ l (4.2 Unit trahalase 포함) 도포하고 상온에서 건조하여 두 효소가 복층으로 고정된 애노드 전극을 제조하였다.

[0100] <실시예 11 내지 14> 고정화된 트레할로스 분해효소의 효소량에 따른 애노드 전극 제조.

[0101] 일본 소재 TCI 사(Tokyo Chemical Industry, Co. Ltd.)로부터 구매한 글루코스 산화효소(GOx, 59 units/mg)를 PBS 버퍼 (pH=7.0)에 용해하여 제조한 용액 (6 mg/ml)와 전자전달매개체인 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl]^{+1/2+}(PVI-Os-dme-bpy) 용액 (10 mg/ml) 및 Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether(PEGDGE, 10 mg/ml)를 부피비 4 : 4 : 1로 혼합하여 효소-전자전달매개체 혼합용액을 제조하였다. 금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후, 상기 효소-전자전달매개체 혼합용액을 2 μ l 도포하고, 상온에서 건조하여, 제1층이 단층으로 고정화된 애노드 전극을 제조하였다. 이후, 다시 상기 효소-전자전달매개체 혼합용액 2 μ l를 도포하고 상온에서 건조하는 단계를 반복하여 3단의 제1층을 형성하였다.

- [0102] 이어서, 100 ℃에서 용해된 아가로스 용액(0.5%, w/v)를 50 ℃까지 냉각한 후, 아일랜드 소재 Megazyme으로부터 구매한 트레할로스 분해효소(trahalase, 300 Unit/mg)를 PBS 버퍼(pH=7.0)에 용해하여 제조한 용액과 1 : 1로 혼합하여, 다양한 효소량의 트레할로스 분해효소를 포함하는 제2층 혼합용액을 제조하였다. 상기 제2층 혼합용액을 상기 제1층이 고정화된 애노드 전극 표면에 4 μ l(1.05, 2.1, 4.2, 또는 8.4 Unit trahalase 포함) 도포하고 상온에서 건조하여 두 효소가 복층으로 고정된 실시예 11 내지 실시예 14의 애노드 전극을 제조하였다.
- [0103] <실시예 15 내지 23> 1층에 단일탄소나노튜브가 더 포함된 애노드 전극 제조.
- [0104] 1) 단일탄소나노튜브(SWCNT) 용액 제조
- [0105] 미국 소재 Sigma 사로부터 구매한 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs) 5 mg을 MES 완충액 5 ml에 분산시키고 초음파 챔버에서 3 시간동안 초음파 처리 후, 원심분리 하고, 상등액을 회수하여 단일탄소나노튜브 용액을 제조하였다.
- [0106] 2) 애노드 전극 제조
- [0107] 일본 소재 TCI 사(Tokyo Chemical Industry, Co. Ltd.)로부터 구매한 글루코스 산화효소(GOx, 59 units/mg)를 PBS 버퍼(pH=7.0)에 용해하여 제조한 용액(12 mg/ml)를 상기 단일벽탄소나노튜브 용액(0.35 mg/ml)과 1 : 1 부피비로 혼합하였다. 상기 혼합액과 전자전달매개체인 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)2Cl]^{+/2+}(PVI-Os-dme-bpy) 용액(10 mg/ml) 및 Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether(PEGDGE, 10 mg/ml)를 부피비 4 : 4 : 1로 혼합하여 효소-단일벽탄소나노튜브-전자전달매개체 혼합용액을 제조하였다. 금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후, 상기 효소-단일벽탄소나노튜브-전자전달매개체 혼합용액을 2 μ l 도포하고, 상온에서 건조하여, 제1층이 단층으로 고정화된 애노드 전극을 제조하였다. 이후, 다시 상기 효소-단일벽탄소나노튜브-전자전달매개체 혼합용액 2 μ l를 도포하고 상온에서 건조하는 단계를 반복하여 1단, 2단, 3단, 4단, 5단, 6단, 7단, 8단 및 9단의 제1층이 고정화된 각각의 애노드 전극 형성하였다.
- [0108] 이어서, 100 ℃에서 용해된 아가로스 용액(0.5% w/v)를 50 ℃까지 냉각한 후, 아일랜드 소재 Megazyme으로부터 구매한 트레할로스 분해효소(trahalase, 300 Unit/mg)를 PBS 버퍼(pH=7.0)에 용해하여 제조한 용액과 1 : 1로 혼합하여 제2층 혼합용액을 제조하였다. 상기 제2층 혼합용액을 상기 제1층이 고정화된 각각의 애노드 전극 표면에 4 μ l(4.2 Unit trahalase 포함) 도포하고 상온에서 건조하여 두 효소가 복층으로 고정화된 실시예 15 내지 실시예 23의 애노드 전극을 제조하였다.
- [0109] <실시예 24 내지 30> GOx 효소 단/GOx-SWCNT 복합물 단이 최적화된 애노드 전극 제조.
- [0110] 1) 효소-단일탄소나노튜브(SWCNT)-전자전달매개체 단 (GOx-SWCNT 단) 제조용 용액
- [0111] 미국 소재 Sigma 사로부터 구매한 단일벽탄소나노튜브(SWCNTs) SWCNT 5 mg을 MES 완충액 5 ml에 분산시키고 초음파 챔버에서 3시간동안 초음파 처리 후, 원심분리 하여, 상등액을 회수하여 단일벽탄소나노튜브 용액을 제조하였다.
- [0112] 일본 소재 TCI 사(Tokyo Chemical Industry, Co. Ltd.)로부터 구매한 글루코스 산화효소(GOx, 59 units/mg)를 PBS 버퍼 (pH=7.0)에 용해하여 제조한 용액 (12 mg/ml)를 상기 단일벽탄소나노튜브 용액(0.35 mg/ml)과 1 : 1 부피비로 혼합하였다. 상기 혼합액과 전자전달매개체인 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)2Cl]^{+/2+}(PVI-Os-dme-bpy) 용액(10 mg/ml) 및 Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether(PEGDGE, 10 mg/ml)를 부피비 4 : 4 : 1로 혼합하여 효소-단일벽탄소나노튜브-전자전달매개체 혼합용액을 제조하였다.
- [0113] 2) 효소-전자전달매개체 층(GOx 층) 제조용 용액
- [0114] 일본 소재 TCI 사(Tokyo Chemical Industry, Co. Ltd.)로부터 구매한 글루코스 산화효소(GOx, 59 units/mg)를 PBS 버퍼(pH=7.0)에 용해하여 제조한 용액 (6 mg/ml)와 전자전달매개체인 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)2Cl]^{+/2+}(PVI-Os-dme-bpy) 용액(10 mg/ml) 및 Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether(PEGDGE, 10 mg/ml)를 부피비 4 : 4 : 1로 혼합하여 효소-전자전달매개체 혼합용액을 제조하였다.
- [0115] 3) 애노드 전극 제조
- [0116] 금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후, 상기 효소-단일벽탄소나노튜브 용액 또는 상기 효

소-전자전달매개체 용액을 2 μl 도포하고, 상온에서 건조하여, 제1층이 단층으로 고정화된 애노드 전극을 제조하였다. 이후, 다시 용액 2 μl 를 도포하고 상온에서 건조하는 단계를 반복하여 n 단의 제1층이 고정화된 각각의 애노드 전극 형성하였다. 적층 순서와 배열은 하기 표 1에 구체적으로 나타내었다.

[0117] 이어서, 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 용해된 아가로스 용액(0.25% w/v)를 50 $^{\circ}\text{C}$ 까지 냉각한 후, 아일랜드 소재 Megazyme으로부터 구매한 트레할로스 분해효소(trahalase, 300 Unit/mg)를 PBS 버퍼(pH=7.0)에 용해하여 제조한 용액과 1 : 1로 혼합하여 제2층 혼합용액을 제조하였다. 상기 제2층 혼합용액을 상기 제1층이 고정화된 각각의 애노드 전극 표면에 4 μl (4.2 Unit trahalase 포함) 도포하고 상온에서 건조하여 두 효소가 복층으로 고정된 실시예 24 내지 실시예 30의 애노드 전극을 제조하였다.

표 1

구분	애노드 전극	
	제1층	제2층
실시예 24	전극/6단의 GOx 층	0.25% 아가로스+ 4.2 U 트레할로스 분해효소
실시예 25	전극/1단의 GOx-SWCNT 층/ 5단의 GOx 층	0.25% 아가로스+ 4.2 U 트레할로스 분해효소
실시예 26	전극/2단의 GOx-SWCNT 층/ 4단의 GOx 층	0.25% 아가로스+ 4.2 U 트레할로스 분해효소
실시예 27	전극/3단의 GOx-SWCNT 층/ 3단의 GOx 층	0.25% 아가로스+ 4.2 U 트레할로스 분해효소
실시예 28	전극/4단의 GOx-SWCNT 층/ 2단의 GOx 층	0.25% 아가로스+ 4.2 U 트레할로스 분해효소
실시예 29	전극/5단의 GOx-SWCNT 층/ 1단의 GOx 층	0.25% 아가로스+ 4.2 U 트레할로스 분해효소
실시예 30	전극/6단의 GOx-SWCNT 층	0.25% 아가로스+ 4.2 U 트레할로스 분해효소

[0119] <실시예 31 내지 36> 캐소드 전극 제조.

[0120] 미국 소재 Sigma 사로부터 구매한 라케이즈(Laccase)(Lac, 5 mg/ml)와 전자전달매개체인 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺(PVI-Os-dCl-bpy)(10 mg/ml) 및 PEGDGE(10 mg/ml)를 부피비 4 : 4 : 1로 혼합하여 Lac-전자전달매개체 혼합용액을 제조하였다. 금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후, 상기 Lac-전자전달매개체 혼합용액을 2 μl 도포하고, 상온에서 건조하여, 단층으로 고정화된 캐소드 전극을 제조하였다. 이후, 다시 상기 Lac-전자전달매개체 혼합용액 2 μl 를 도포하고 상온에서 건조하여 2단, 3단, 4단, 5단, 6단의 캐소드 전극 형성하였다. 최종적으로 캐소드 전극 표면에 5 wt% 나피온(Nafion) 용액을 4 μl 도포하고 건조함으로써, 1 내지 6단으로 고정화된 캐소드 전극(실시예 31-36)을 제조하였다.

[0121] <실시예 37 내지 42> 캐소드 전극 제조.

[0122] 미국 소재 Sigma 사로부터 구매한 SWCNT 5 mg을 MES 완충액 5 ml에 분산시키고 초음파 챔버에서 3시간동안 초음파 처리 후, 원심분리하고, 상등액을 회수하여 단일탄소나노튜브 용액을 제조하였다. 미국 소재 Sigma 사로부터 구매한 라케이즈(Laccase, 10 mg/ml)를 상기 단일벽탄소나노튜브 용액(0.35 mg/ml)과 1 : 1 부피비로 혼합하였다. 상기 혼합액과 전자전달매개체인 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺(PVI-Os-dCl-bpy)(10 mg/ml) 및 PEGDGE(10 mg/ml)를 부피비 4 : 4 : 1로 혼합하여 Lac-단일탄소나노튜브 용액을 제조하였다. 금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후, 상기 Lac-단일벽탄소나노튜브 혼합용액을 2 μl 도포하고, 상온에서 건조하여, 단층으로 고정화된 캐소드 전극을 제조하였다. 이후, 다시 상기 Lac-단일벽탄소나노튜브 혼합용액 2 μl 를 도포하고 상온에서 건조하여 2단, 3단, 4단, 5단, 6단의 캐소드 전극 형성하였다. 최종적으로 캐소드 전극 표면에 5 wt% 나피온(Nafion) 용액을 4 μl 도포하고 건조함으로써, 1 내지 6단으로 고정화된 캐소드 전극(실시예 37-42)을 제조하였다.

[0123] <실시예 43 내지 47> 캐소드 전극 제조.

[0124] 1) Lac-단일탄소나노튜브(SWCNT) 층 제조용 용액

[0125] 미국 소재 Sigma 사로부터 구매한 SWCNT 5 mg을 MES 완충액 5 ml에 분산시키고 초음파 챔버에서 3시간동안 초음파 처리 후, 원심분리 하여, 상등액을 회수하여 단일탄소나노튜브 용액을 제조하였다. 미국 소재 Sigma 사로부터 구매한 라케이즈(Laccase, 10 mg/ml)를 상기 단일탄소나노튜브 용액(0.35 mg/ml)과 1 : 1 부피비로 혼합하였다. 상기 혼합액과 전자전달매개체인 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)2Cl]⁺²⁺(PVI-Os-dCl-bpy)(10 mg/ml) 및 PEGDGE(10 mg/ml)를 부피비 4 : 4 : 1로 혼합하여 Lac-단일탄소나노튜브 용액을 제조하였다.

[0126] 2) Lac-전자전달매개체 층(Lac 층) 제조용 용액

[0127] 미국 소재 Sigma 사로부터 구매한 라케이즈(Laccase, 10 mg/ml)와 전자전달매개체인 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine)2Cl]⁺²⁺(PVI-Os-dCl-bpy)(10 mg/ml) 및 PEGDGE(10 mg/ml)를 부피비 4 : 4 : 1로 혼합하여 Lac-전자전달매개체 혼합용액을 제조하였다.

[0128] 3) 캐소드 전극 제조

[0129] 금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후, 상기 Lac-단일탄소나노튜브 용액 또는 상기 Lac-전자전달매개체 용액을 2 μ l 도포하고, 상온에서 건조하여, 제1층이 단층으로 고정화된 애노드 전극을 제조하였다. 이후, 다시 용액 2 μ l를 도포하고 상온에서 건조하는 단계를 반복하여 n 단의 제1층이 고정화된 각각의 애노드 전극을 형성하였다. 적층 순서와 배열은 하기 표 2에 구체적으로 나타내었다. 최종적으로 캐소드 전극 표면에 5 wt% 나피온(Nafion) 용액을 4 μ l 도포하고 건조하였다.

표 2

[0130]

구분	애노드 전극
실시예 43	전극/4단의 Lac 층
실시예 44	전극/3단의 Lac-SWCNT 층/ 1단의 Lac 층
실시예 45	전극/2단의 Lac-SWCNT 층/ 2단의 Lac 층
실시예 46	전극/1단의 Lac-SWCNT 층/ 3단의 Lac 층
실시예 47	전극/4단의 Lac-SWCNT 층

[0131] <실시예 48> 연료전지 시스템 제조.

[0132] 실시예 6으로부터 제조된 애노드 전극(3단의 GOx 제1층과 4.2 unit의 트레할로스 분해효소가 포함된 0.25% 아가로스로 이루어진 제2층이 순차적으로 전극 표면에 고정화됨)과 실시예 31로부터 제조된 캐소드 전극(Lac-전자전달매개체 용액으로 전극 표면을 1회 도포하고, 건조시켜 제조된 캐소드 전극)을 30 mM 트레할로스가 첨가된 PBS 완충액(pH 7.0) 8 ml에 침지하여, 상온에서 전압을 측정하여 전류밀도 곡선을 분석하였다.

[0133] <실시예 49> 연료전지 시스템 제조.

[0134] 실시예 27로부터 제조된 애노드 전극(3단의 GOx-SWCNT 및 3단의 GOx층이 적층되어 형성된 제1층과 4.2 unit의 트레할로스 분해효소가 포함된 0.25% 아가로스로 이루어진 제2층이 순차적으로 전극 표면에 고정화됨)과 실시예 31로부터 제조된 캐소드 전극(Lac-전자전달매개체 용액으로 전극 표면을 1회 도포하고, 건조시켜 제조된 캐소드 전극)을 30 mM 트레할로스가 첨가된 PBS 완충액(pH 7.0) 8 ml에 침지하여, 상온에서 전압을 측정하여 전류밀도 곡선을 분석하였다.

[0135] <실시예 50> 연료전지 시스템 제조.

[0136] 실시예 27로부터 제조된 애노드 전극(3단의 GOx-SWCNT 및 3단의 GOx층이 적층되어 형성된 제1층과 4.2 unit의 트레할로스 분해효소가 용해된 0.25% 아가로스로 이루어진 제2층이 순차적으로 전극 표면에 고정화됨)과 실시예 45로부터 제조된 캐소드 전극(2단의 Lac-SWCNT 및 2단의 Lac 층으로 적층되어 형성된 캐소드 전극)을 30 mM 트

레할로스가 첨가된 PBS 완충액(pH 7.0) 8 ml에 침지하여, 상온에서 전압을 측정하여 전류밀도 곡선을 분석하였다.

[0137] <비교예 1 내지 4> 두 효소가 동시 고정된 애노드 전극 제조.

[0138] 일본 소재 TCI 사(Tokyo Chemical Industry, Co. Ltd.)로부터 구매한 글루코스 산화효소(GOx, 12 mg/ml)와 미국 소재 Sigma 사로부터 구매한 트레할로스 분해효소를 부피비 1:1로 혼합하여, 다양한 농도의 트레할로스 분해 효소(trahalase, 0, 0.47, 0.93, 1.87 Unit)를 포함하는 글루코스 산화효소(6 mg/ml)-트레할로스 분해 효소로 구성된 이 효소용액을 제조하였다.

[0139] 상기 각각의 효소용액과 전자전달매개체인 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺(PVI-Os-dme-bpy) 용액(10 mg/ml) 및 Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether(PEGDGE, 10 mg/ml)를 부피비 4 : 4 : 1로 혼합하여 효소-전자전달매개체 혼합용액을 제조하였다. 금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후, 상기 효소-전자전달매개체 혼합용액을 2 μ l 도포하고, 상온에서 건조함으로써, 두 효소가 동시 고정된 애노드 전극을 제조하였다.

[0140] <비교예 5> 글루코스 산화효소만 고정화한 애노드 전극의 제조

[0141] 글루코스 산화효소가 고정화한 애노드 전극과 free enzyme 형태의 트레할로스 분해효소로 구성된 테스트 시스템을 구성하였다. 일본 소재 TCI 사(Tokyo Chemical Industry, Co. Ltd.)로부터 구매한 글루코스 산화효소(GOx, 59 units/mg)를 PBS 버퍼(pH=7.0)에 용해하여 제조한 용액(6 mg/ml)와 전자전달매개체인 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)₂Cl]⁺²⁺(PVI-Os-dme-bpy) 용액(10 mg/ml) 및 Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether(PEGDGE, 10 mg/ml)를 부피비 4 : 4 : 1로 혼합하여 효소-전자전달매개체 혼합용액을 제조하였다. 금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후, 상기 효소-전자전달매개체 혼합용액을 2 μ l 도포하고, 상온에서 건조함으로써, free enzyme 형태의 애노드 전극을 제조하였다. 30 mM 트레할로스가 첨가된 PBS (pH, 7.0)에 트레할로스분해효소 (trehalase)를 용해(1.05 units/mL) 시켰다.

[0142] <실험예 1> 두 효소가 분리되지 않고 동시에 고정화한 애노드 전극의 전기화학적 활성 분석

[0143] 1) 테스트 연료전지 시스템 제조

[0144] 비교예 1 내지 4로부터 제조된 애노드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다.

[0145] 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 대전극을 글루코스 30 mM이 첨가된 PBS(pH 7) 완충액 8 ml를 전해질 용액에 침지한 후, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)을 분석하였다. 도 5A는 실험예 1에서 사용한 두 효소가 동시 고정된 애노드 전극을 포함하는 테스트 시스템의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

[0146] 2) 전류 전위곡선(cyclic voltammetry) 분석

[0147] 비교예 1 내지 4에 따라 제조된 애노드 전극은 두 종류 효소가 분리되지 않고 동시에 전극 표면에 고정화(co-immobilization)된 구조이다. 상기 효소의 함량에 따른 성능차를 확인하기 위하여 트레할로스 효소량이 상이한 비교예 1 내지 4의 애노드 전극을 활용하였다. 상기 테스트 시스템에서, 글루코스 산화효소(GOx)에 의해 생성되는 전기량을 측정하기 위하여 순환전류법(cyclic voltammetry)을 사용하였고, 고정화한 트레할로스 효소량에 따른 전기 검출량을 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0148] 도 3은 비교예 1 내지 4로부터 제조된 두 효소가 동시에 고정화한 애노드 전극표면에 부착된 트레할로스 효소량에 따른 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)을 분석한 결과 그래프이고, 도 4는 도 3을 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

[0149] 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이 전극에 고정화한 두 효소(bienzyme)에서 트레할로스 효소량(unit)이 증가할수록 생성되는 전기량이 감소하고 있음을 확인하였다. 즉, 트레할로스 효소는 글루코스 산화효소에 의해 생성된 전자가 전극으로 이동하는 것을 방해하는 전자전달 저항체로 작용한다는 것을 알 수 있다.

[0150] 효소 구성 성분의 대부분을 차지하는 유기물은 전극의 저항체로 작용하고, 이에 효소의 농도가 증가할수록 전극의 저항도 증가하므로 생성 전류값이 현저히 감소한다는 것을 알 수 있다(전류(current, μA)가 5배 이상 감소함). 다시 말해 두 가지 이상의 효소가 요구되는 연료전지 시스템에서, 서로 다른 두 효소를 단순히 혼합하여 고정화할 경우(예를 들어, 공동 고정화(coimmobilization)), 생성되는 전류값이 5 배 이상이 현저히 저하되고 있음을 확인하였다. 따라서, 이와 관련하여 새로운 구조의 효소전극 설계가 요구되며, 특히 전자전달저항을 줄이는 것이 가장 시급한 문제임을 확인하였다.

[0151] <실험예 2> 애노드 전극 구조에 따른 성능 분석

[0152] 1) 두 효소가 동시 고정된 애노드 전극을 이용한 테스트 시스템 제조

[0153] 비교예 4로부터 제조된 애노드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다.

[0154] 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 대전극을 글루코스 30 mM이 첨가된 PBS(pH 7) 완충액 8 mL를 전해질 용액에 침지한 후, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)을 분석하였다. 도 5A는 실험예 1에서 사용한 두 효소가 분리되지 않고 동시에 고정화된 애노드 전극을 포함하는 테스트 시스템의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

[0155] 2) 글루코스 산화효소가 고정화된 애노드 전극과 free enzyme 형태의 트레할로스 분해효소로 구성된 테스트 시스템 제조

[0156] 비교예 5로부터 제조된 애노드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다.

[0157] 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 대전극을 트레할로스 30 mM이 첨가된 PBS(pH 7) 완충액 8 mL를 전해질 용액에 침지하고, 상기 완충액에 미국 소재 Sigma 사로부터 구매한 트레할로스 분해효소(trehalase) 1.05 unit을 부가한 조건하에서, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)을 분석하였다. 도 5D는 실험예 1에서 사용한 글루코스 산화효소가 고정화된 애노드 전극과 free enzyme 형태의 트레할로스 분해효소로 구성된 테스트 시스템의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

[0158] 3) 글루코스 산화효소가 고정화된 애노드 전극과 트레할로스 분해효소가 고정화된 추가 전극을 포함하는 테스트 시스템 제조

[0159] 비교예 5로부터 제조된 애노드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다. 이어서, 금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후, 트레할로스(4,200 unit/mL)를 2 μL 도포하고(로딩량 : 8.4 unit), 상온에서 건조하여, 트레할로스 분해효소가 고정화된 추가전극을 제조하였다. 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 추가전극 및 대전극을 트레할로스 30 mM이 첨가된 PBS(pH 7) 완충액 8 mL를 전해질 용액에 침지하여, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)을 분석하였다. 도 5C는 실험예 1에서 사용한 글루코스 산화효소가 고정화된 애노드 전극과 트레할로스 분해효소가 고정화된 추가 전극을 포함하는 테스트 시스템의 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

[0160] 4) 두 효소가 분리되어 복층으로 고정된 애노드 전극을 이용한 테스트 시스템

[0161] 실시예 1로부터 제조된 애노드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다.

[0162] 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 대전극을 트레할로스 30 mM이 첨가된 PBS(pH 7) 완충액 8 mL를 전해질 용액에 침지하여, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)을 분석하였다. 도 5B는 실시예 1로부터 제조된 즉, 포도당 산화효소와 트레할로스 분해효소가 분리되어 고정화된 컴팩트한 구조의 애노드를 포함하는 테스트 시스템 구조를 개략적으로 나타낸 것이다.

[0163] 5) 전류 전위곡선(cyclic voltammetry) 분석

[0164] 다양한 애노드 구조에 따른 연료전지 시스템을 제안하고, 이 중에서 가장 바람직한 구조를 선별하기 위하여 비교예 4, 비교예 5, 비교예 6 및 실시예 1로부터 제조된 애노드 전극이 적용된 테스트 시스템의 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)을 측정하고 비교하였다. 도 6은 비교예 4, 비교예 5, 비교예 6 및 실시예 1로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극 표면에 효소들의 배치가 전류생산에 미치는 영향을

전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

- [0165] 도 6에 나타난 바와 같이, 비교예 4의 애노드 전극을 사용한 테스트 시스템에서는 전류피크가 거의 관찰되지 않고 있음을 확인하였다. 글루코스 산화효소를 애노드 전극(비교예 5)에 고정화하고, 트레할로스 분해효소는 전해질 용액에 용해시킨 free enzyme 형태의 테스트 시스템의 경우, 높은 전류 피크가 관찰되었다. 글루코스 산화효소와 트레할로스 분해효소를 각각 다른 전극에 고정화한 테스트 시스템(C)은 비교예 4의 애노드 전극을 사용한 테스트 시스템(A)보다는 높고 free enzyme 형태의 테스트 시스템(D)보다는 낮은 전류피크를 갖는 것을 확인하였다.
- [0166] 즉, 두 효소를 동시에 고정화한 테스트 시스템(비교예 4)은 트레할로스 분해효소가 글루코스 산화효소의 촉매작용으로 생성된 전자의 이동을 방해하는 저항체로 작용하여, 전기 생성량이 현저히 저하됨을 알 수 있다.
- [0167] 상술한 문제를 해결하기 위해서, 실험에 1에서도 언급한 바와 같이 글루코스 산화효소와 트레할로스 분해효소를 분리하여 고정화하는 새로운 구조의 전극 설계가 요구됨을 알 수 있다. 또한 free enzyme 형태의 테스트 시스템(도 5D)과 글루코스 산화효소가 고정화된 애노드 전극과 트레할로스 분해효소가 고정화된 추가 전극을 포함하는 테스트 시스템(도 5C)의 경우, 전류 피크는 높으나 생체 이식형으로 실질적 적용이 불가능하므로, 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 콤팩트(compact)한 구조가 요구됨을 알 수 있다.
- [0168] 따라서, 상술한 비교예 4, 5, 6의 애노드 전극이 적용된 테스트 시스템으로부터 확인된 문제점을 해결하기 위하여 실시예 1과 같이 일차적으로 전극 표면에 글루코스 산화효소를 고정화한 후, 2차적으로 트레할로스 분해효소를 0.25% 아가로스 겔에 혼합함으로써 복층으로 애노드 전극을 적층하였다.
- [0169] 실시예 1로부터 제조된 애노드 전극(도 5B)은 전지 시스템에 적용시 그 구조가 콤팩트할 뿐만 아니라 전류 피크도 우수한 것으로 확인하였다. 즉, 실시예 1로부터 제조된 애노드 전극은 종래 구조적, 성능적 문제점을 해결하면서도 매우 작은 크기로 우수한 성능의 전기 생성량을 만족할 수 있는 최종 구조임을 확인하였다. 실시예 1의 애노드 전극은 전극 표면에서 아가로스 겔에 의해 두 효소가 물리적으로 분리됨으로써 성능이 현저히 향상한 것으로 여겨진다.
- [0170] 다만, 전극 표면에 아가로스 겔이 도포됨에 따라 기질의 물질전달이 방해받을 수 있으므로, 이를 최소화하기 위해 상기 전극 표면에 도포되는 각 층의 조건을 최적화하는 것이 요구된다. 이는 하기 실험을 통해 확인하였다.

[0171] <실험예 3> 애노드 전극의 구조 최적화에 따른 성능 분석

- [0172] 기질이 효소로 물질전달을 하는데 있어, 애노드 표면에 고정화되는 제2층의 아가로스 농도를 최적화하고자 서로 다른 아가로스 농도가 적용된 실시예 1 내지 3의 애노드 전극을 작업전극으로 하여 테스트 시스템을 제작하였다. 구체적으로 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 애노드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다. 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 대전극을 글루코스 30 mM이 첨가된 PBS(pH 7) 완충액 8 mL를 전해질 용액에 침지하여, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)을 분석하였다.
- [0173] 이의 대조군으로 제2층에 아가르스를 사용하지 않은 것을 제외하고는 실시예 1과 모두 동일하게 제조한 연료전지 시스템을 사용하였다(0%, w/v).
- [0174] 도 7은 실시예 1 내지 3으로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극에 부착된 포도당 산화효소의 표면을 감싸는 아가로스 농도가 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 8은 도 7을 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.
- [0175] 도 7 및 8에 나타난 바와 같이, 애노드 전극의 제2층을 구성하는 아가로스 농도에 따라 전류 피크값이 달라짐을 확인하였다. 애노드 전극의 제2층을 구성하는 아가로스 농도가 증가할수록 전류피크 값이 감소하였는데, 이를 통해 아가로스가 물질전달을 저해하는 저항체로 작용하고 있음을 알 수 있다. 즉, 아가로스 농도가 너무 낮으면 상온에서 겔이 형성되지 않아 충분한 양의 효소를 고정화할 수 없고, 너무 높으면 물질전달 저해도가 증가함을 확인하였다. 따라서 제2층을 구성하는 아가로스 농도는 0.1%~1%가 가장 바람직함을 알 수 있다.

[0176] <실험예 4> 애노드 전극의 제1층 구조에 따른 성능 분석

- [0177] 앞선 실험을 통해 트레할로스를 기질로 하는 이효소 복합전극(글루코스 산화효소(제1층)-트레할로스 분해효소+아가로스(제2층))(실시예 1-3)이 실질적으로 생산하는 전류량은 $1.7 \mu\text{A}$ 내외인 것으로 확인되었다. 본 발명의 전극 성능을 향상시키기 위하여 애노드의 제1층과 제2층에 고정화되는 효소의 양을 달리하여 전류 전위곡선을 분석하였다.
- [0178] 실시예 4 내지 10의 애노드 전극을 작업전극으로 하여 테스트 시스템을 제작하였다. 구체적으로 실시예 4 내지 10으로부터 제조된 애노드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다. 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 대전극을 트레할로스 30 mM이 첨가된 PBS(pH 7) 완충액 8 mL를 전해질 용액에 침지하여, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)을 분석하였다.
- [0179] 도 9는 실시예 4 내지 10으로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극표면에 포도당산화효소와 전자전달매개체로 이루어진 단의 수가 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 10은 실시예 4 내지 10으로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극표면에 포도당산화효소와 전자전달매개체로 이루어진 단의 수가 전류생산에 미치는 영향을 EIS(Electrochemical impedance spectroscopy, 임피던스 분광법)로 측정하여 나타낸 그래프이며, 도 11은 도 10로부터 측정된 수치로부터 전하전달저항값을 계산하여 그래프로 나타낸 것이다.
- [0180] 순환전류법으로 측정한 실시예 4 내지 10의 애노드 전극이 적용된 테스트 시스템의 전기 생성능력을 비교한 결과(도 9), 단층의 제1층이 고정된 실시예 4의 애노드 전극을 이용한 테스트 시스템은 발생 전기량이 $1.7 \mu\text{A}$ 내외이고, 제1층의 단수가 증가함(실시예 5 내지 10)에 따라 발생 전기량이 증가함을 확인한 바, 상기 제1층은 1 내지 7개의 단이 적층되어 형성될 수 있음을 알 수 있다.
- [0181] 구체적으로 실시예 6의 애노드 전극의 생산 전기량은 최대 $4 \mu\text{A}$ 내외였고, 실시예 7의 애노드 전극과 같이 4단 이상의 제1층이 고정화된 경우에는 오히려 전기 생산량이 감소함을 확인하였다(도 9).
- [0182] 도 10은 애노드 전극의 전자전달 저항을 분석할 수 있는데, 제1층의 단수가 증가함에 따라 고주파 영역의 반원의 크기가 증가하였고, 이를 통해 제1층의 단수가 증가함에 따라 전자전달저항이 증가함을 의미한다. 제1층의 단수가 증가하면 글루코스 산화효소에 의한 산화속도가 증가되나, 4단 이상의 제1층을 포함할 경우 애노드 전극의 전자전달저항도 증가하기 때문에, 이 모든 것을 고려한다면 실시예 4 내지 6의 애노드 전극(1-3단의 제1층)을 사용하는 것이 가장 바람직함을 알 수 있다.
- [0183] <실험예 5> 애노드 전극의 제2층 효소량에 따른 성능 분석
- [0184] 실시예 11 내지 14의 애노드 전극을 작업전극으로 하여 테스트 시스템을 제작하였다. 구체적으로 실시예 11 내지 14로부터 제조된 애노드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다. 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 대전극을 트레할로스 30 mM이 첨가된 PBS(pH 7) 완충액 8 mL를 전해질 용액에 침지하여, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)을 분석하였다.
- [0185] 도 12는 실시예 11 내지 14로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극 표면에 부착된 포도당 산화효소를 감싸는 아가로스 겔에 첨가된 트레할로스 분해효소의 효소량이 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 13은 도 12를 정량화하여 나타낸 그래프이다.
- [0186] 도 12 및 도 13에 나타난 바와 같이, 제2층에 아가로스과 혼합되는 트레할로스 분해효소의 효소량을 실시예 11 내지 14와 같이 변화시킨 결과, 트레할로스 분해효소의 unit이 증가함에 따라 전류 생성량이 증가하는 것을 확인하였다. 제2층에 사용되는 트레할로스 분해효소는 특히 활성이 1 내지 10 unit 인 것을 사용하는 것이 가장 바람직함을 확인하였다.
- [0187] <실험예 6> CNT를 더 포함하는 애노드 전극의 성능 분석
- [0188] 실시예 15 내지 23의 애노드 전극을 작업전극으로 하여 테스트 시스템을 제작하였다. 구체적으로 실시예 15 내지 23으로부터 제조된 애노드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다. 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백

금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 대전극을 트레할로스 50 mM이 첨가된 PBS(pH 7) 완충액 8 mL를 전해질 용액에 침지하여, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)을 분석하였다.

[0189] 도 14는 실시예 15, 17, 20 및 22로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극의 포도당산화효소, 단일벽탄소나노튜브, 및 전자전달매개체로 이루어진 단의 수가 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 15는 실시예 15 내지 23으로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템의 전류 전위곡선(cyclic voltammetry) 분석 결과를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

[0190] 도 14 및 도 15에 나타난 바와 같이, 실시예 20의 애노드 전극이 가장 많은 전류를 생성하고 있음을 확인하였다. 구체적으로 실시예 17의 애노드 전극의 경우 최대 전류가 4 μ A인데 반해, 실시예 20의 애노드 전극은 약 1.9 배이상인 7.5 μ A를 생성하고 있음을 알 수 있다.

[0191] 이는 애노드 전극의 제1층에 단일벽탄소나노튜브가 포함될 경우, 효소량의 증가로 인해 전자전달 저항이 감소되어 나타나는 현상이라 가늠해볼 수 있다. 그러나 단일벽탄소나노튜브의 부착량이 과도하게 증가하는 경우, 두께의 증가로 인해 전극과 전자 간의 거리가 증가되므로, 오히려 전자전달저항이 증가하는 문제가 발생하는 것을 확인하였다(실시예 22). 따라서 애노드 전극에서 단일벽탄소나노튜브가 첨가된 제1층은 1 내지 7 개의 단으로 형성되는 것이 가장 바람직함을 알 수 있다.

[0192] <실험예 7> 최적화된 구조의 애노드 전극 성능 분석

[0193] 저항을 최소화하면서도 촉매활성을 최대화할 수 있는 애노드 전극의 최적 구조를 제공하고자 하였다. 실시예 24 내지 30의 애노드 전극을 작업전극으로 하여 테스트 시스템을 제작하였다. 구체적으로 실시예 24 내지 30로부터 제조된 애노드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다. 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 대전극을 트레할로스 50 mM이 첨가된 PBS(pH 7) 완충액 8 mL를 전해질 용액에 침지하여, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)을 분석하였다.

[0194] 도 16은 실시예 24, 27 및 30로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극의 제1층에서 포도당산화효소 또는 포도당산화효소-단일벽탄소나노튜브 배열에 따른 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 17는 실시예 24, 27 및 30로부터 제조된 애노드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 애노드 전극의 제1층에서 포도당산화효소 또는 포도당산화효소-단일벽탄소나노튜브 배열에 따른 전류생산에 미치는 영향을 EIS(Electrochemical impedance spectroscopy, 임피던스 분광법)로 측정하고, 이로부터 전하전달저항값을 계산하여 나타낸 그래프이다.

표 3

구분	resistance(k Ω)	current density(μ A/cm ²)
실시예 24	7.8 $\pm$ 0.3	200 $\pm$ 44.4
실시예 25	3.7 $\pm$ 0.2	350 $\pm$ 11.1
실시예 26	4.4 $\pm$ 0.4	394 $\pm$ 16.7
실시예 27	3.2 $\pm$ 0.2	494.4 $\pm$ 16.7
실시예 28	4.3 $\pm$ 0.2	494.4 $\pm$ 11.1
실시예 29	6.5 $\pm$ 1.3	416.7 $\pm$ 22.2
실시예 30	6.8 $\pm$ 0.2	405.6 $\pm$ 11.1

[0196] 도 16, 도 17 및 표 3에 나타난 바와 같이, 실시예 27의 애노드 전극이 최대 성능을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 가장 바람직한 애노드 전극의 구조는 실시예 27에서와 같이 전극/3단의 효소-단일벽탄소나노튜브 층/3단의 효소-전자전달매개체 층으로 이루어진 제1층이 가장 낮은 저항값과 8 μ A 이상의 최대 전류값을 갖는 것을 알 수 있다. 이는 아무것도 코팅하지 않은 테스트 시스템의 저항이 1.4 k Ω 임을 고려하였을 때, 이에 대해 가장 최소한으로 저항이 증가하면서 가장 높은 전류밀도를 갖는 것으로 현저히 개선된 성능이라 할 것이다.

[0197] <실험예 8> 최적화된 구조의 캐소드 전극 성능 분석

[0198] 최적의 연료전지 시스템 구현을 위해 성능이 향상된 컴팩트한 구조의 캐소드 전극을 제공하고자 한다. 실시예 31의 캐소드 전극을 작업전극으로 하여 테스트 시스템을 제작하였다. 구체적으로 실시예 31 내지 36로부터 제조된 캐소드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다. 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 대전극을 PBS(pH 7) 완충액 8 mL를 전해질 용액에 침지하여, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)과 임피던스 분석하였다.

[0199] 도 18은 실시예 31 내지 36로부터 제조된 캐소드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 캐소드 전극의 라케이즈 효소층 수에 따른 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 19는 실시예 31 내지 36로부터 제조된 캐소드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 캐소드 전극의 라케이즈 효소층 단수에 따른 전극의 전하전달저항에 미치는 영향을 EIS(Electrochemical impedance spectroscopy, 임피던스 분광법)로 측정하여 나타낸 그래프이다.

[0200] 도 18 및 도 19에 나타난 바와 같이 라케이즈 효소층의 단수가 증가할수록 환원전류 전류 피크가 증가함을 확인하였다. 2 내지 5단으로 구비되는 것이 최대 피크를 갖는 캐소드 전극(실시예 32-35)을 얻을 수 있음을 알 수 있다. 5단 이상의 경우(실시예 36)에는 더 이상의 성능 증가가 없으므로 제조공정상의 비용만 발생하므로, 2 내지 5단이 가장 바람직하다.

[0201] <실험예 9> 단일벽탄소나노튜브를 더 포함하는 캐소드 전극 성능 분석

[0202] 실시예 37 내지 42의 캐소드 전극을 작업전극으로 하여 테스트 시스템을 제작하였다. 구체적으로 실시예 37 내지 41로부터 제조된 캐소드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다. 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 대전극을 0.1 M의 아세트이트 완충액(pH 4.7) 혹은 PBS(pH 7) 완충액 8 mL를 전해질 용액에 침지하여, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)와 임피던스를 분석하였다.

[0203] 도 20은 실시예 37, 41 및 42로부터 제조된 캐소드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 캐소드 전극의 단수가 전류생산에 미치는 영향을 전류 전위곡선(cyclic voltammetry)으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 21은 실시예 37 내지 42로부터 제조된 캐소드 전극을 적용한 테스트 시스템을 통해, 캐소드 전극의 단수가 전류생산에 미치는 영향을 EIS(Electrochemical impedance spectroscopy, 임피던스 분광법)로 측정하고, 이로부터 전극의 전하전달저항값을 계산하여 나타낸 그래프이다.

[0204] 도 20 및 21에 나타난 바와 같이, 단일벽탄소나노튜브를 더 포함하는 캐소드 전극은 단수가 증가함에 따라 환원전류 전류 피크가 증가하다가, 6단 이상인 실시예 42의 캐소드 전극에서 전류 피크가 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 최대 성능을 나타내도록 하기 위해서는 실시예 33 내지 41의 캐소드 전극을 사용하는 것이 바람직함을 확인할 수 있다.

[0205] <실험예 10> 최적화된 구조의 캐소드 전극 성능 분석

[0206] 실시예 43 내지 47의 캐소드 전극을 작업전극으로 하여 테스트 시스템을 제작하였다. 구체적으로 실시예 43 내지 47로부터 제조된 캐소드 전극을 작업전극(WE)으로 사용하였다. 백금 와이어를 대전극으로 준비하였다. 백금 전극 표면을 사포로 문지르고 증류수로 깨끗이 세척한 후 상온에서 건조하였다. 상기 작업전극과 대전극을 0.1 M의 아세트이트 완충액(pH 4.7) 혹은 PBS(pH 7) 완충액 8 mL를 전해질 용액에 침지하여, 전류 전위곡선(주사 속도: 10 mV/s)와 임피던스를 분석하여 표 4에 나타내었다.

표 4

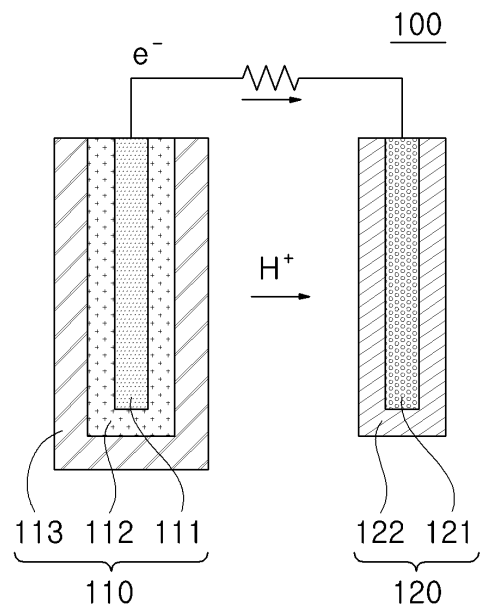
[0207]

구분	resistance(k Ω)	current density(μ A/ cm ²)
실시예 43	0.60 $\pm$ 0.1	427.8 $\pm$ 11.1
실시예 44	0.4 $\pm$ 0.0	438.9 $\pm$ 0.0
실시예 45	0.2 $\pm$ 0.1	561.1 $\pm$ 5.6
실시예 46	0.3 $\pm$ 0.0	533.3 $\pm$ 11.1
실시예 47	0.4 $\pm$ 0.0	527.8 $\pm$ 22.2

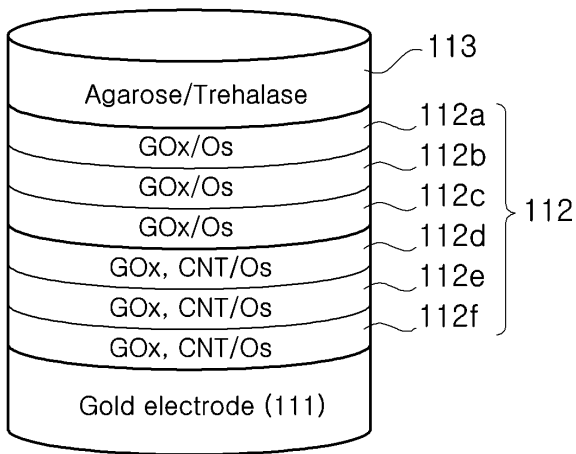
- [0208] 표 4에 나타난 바와 같이, 실시예 43 내지 47의 캐소드 전극이 낮은 저항과 높은 전류밀도를 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 가장 바람직한 캐소드 전극의 구조는 실시예 45에서와 같이 전극/2단의 lac-단일벽탄소나노튜브 층/3단의 Lac 층으로 이루어진 것이 가장 낮은 저항값과 $500 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 이상의 최대 전류값을 갖는 것을 알 수 있다. 이는 아무것도 코팅하지 않은 테스트 시스템의 저항이 $1.4 \text{ k}\Omega$ 임을 고려하였을 때, 이에 대해 7 배 이상 저항이 감소된 것으로 현저히 개선된 성능이라 할 것이다.
- [0209] <실험예 11> 최적화된 구조의 연료전지 시스템의 성능 분석
- [0210] 도 22는 실시예 48로부터 제조된 연료전지 시스템의 일정전류를 방전하며 측정한 전류밀도 곡선을 나타낸 것이고, 도 23은 실시예 49로부터 제조된 연료전지 시스템의 일정전류를 방전하며 측정한 전류밀도 곡선을 나타낸 것이며, 도 24는 실시예 50으로부터 제조된 연료전지 시스템의 일정전류를 방전하며 측정한 전류밀도 곡선이다.
- [0211] 도 22에 나타난 바와 같이 실시예 48의 연료전지 시스템은 20 nA 전류 방전시 시스템 전압이 천천히 감소하다가 방전 전류가 증가하면 전압 감소속도가 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 실시예 48의 연료전지 시스템은 최대 전력밀도가 $0.28 \pm 0.03 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 임을 확인하였다.
- [0212] 도 23에 나타난 바와 같이 실시예 49의 연료전지 시스템은 전류 방전시 전압이 서서히 감소하고, 20 nA 이상 방전시 전압감소 속도가 증가하며, 40 nA 이상 방전시에는 전압이 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 또한 실시예 49의 연료전지 시스템의 최대 전력 밀도는 $0.46 \pm 0.05 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 였다.
- [0213] 실시예 48의 연료전지 시스템과 실시예 49의 연료전지 시스템은 애노드 전극에 있어서, SWCNT 유무와 제1층의 단수에 구조적 차이가 있다.
- [0214] 도 24에 나타난 바와 같이, 실시예 50의 연료전지 시스템은 방전시 전압 감소가 거의 없다가 40 nA 이상에서 전압이 급격히 감소하였고, 최대 전력밀도는 실시예 48의 연료전지 시스템보다 4.3 배 이상 높은 $1.23 \pm 0.04 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 인 것을 확인하였다.
- [0215] 실시예 50의 연료전지 시스템은 실시예 49의 연료전지 시스템보다 전력 밀도가 2.7 배 높았다. 실시예 50의 연료전지 시스템과 실시예 49의 연료전지 시스템은 애노드 전극의 구조가 동일하나 캐소드 전극 구조가 상이하다. 즉, 본 발명에 있어서 애노드 전극 혹은 캐소드 전극 어느 하나라도 상술한 조건을 벗어난다면 연료전지 시스템의 성능 차이가 현저히 저하되는 것을 알 수 있다.

도면

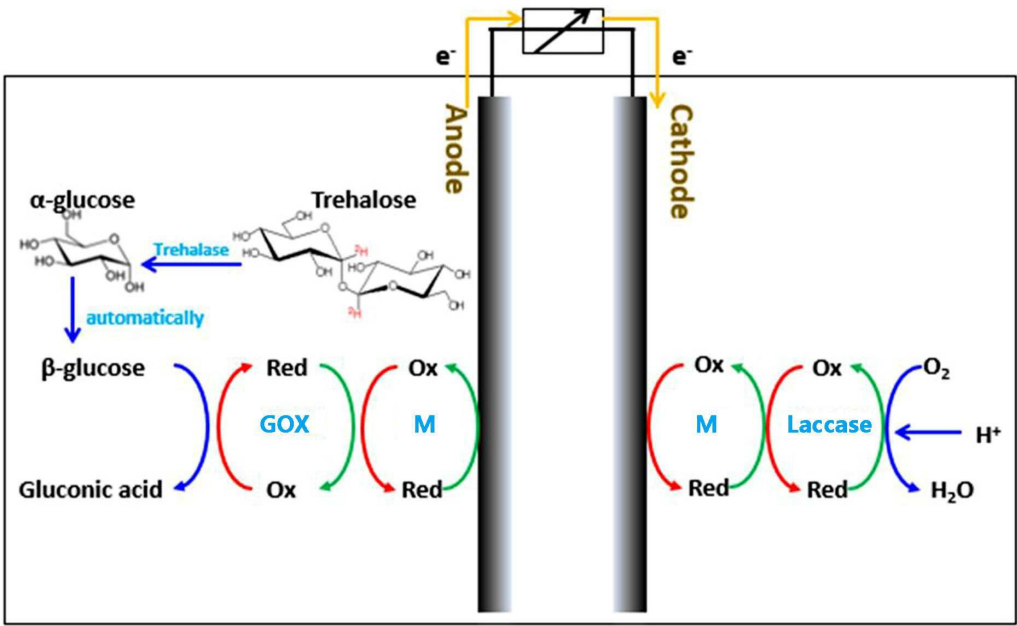
도면1a



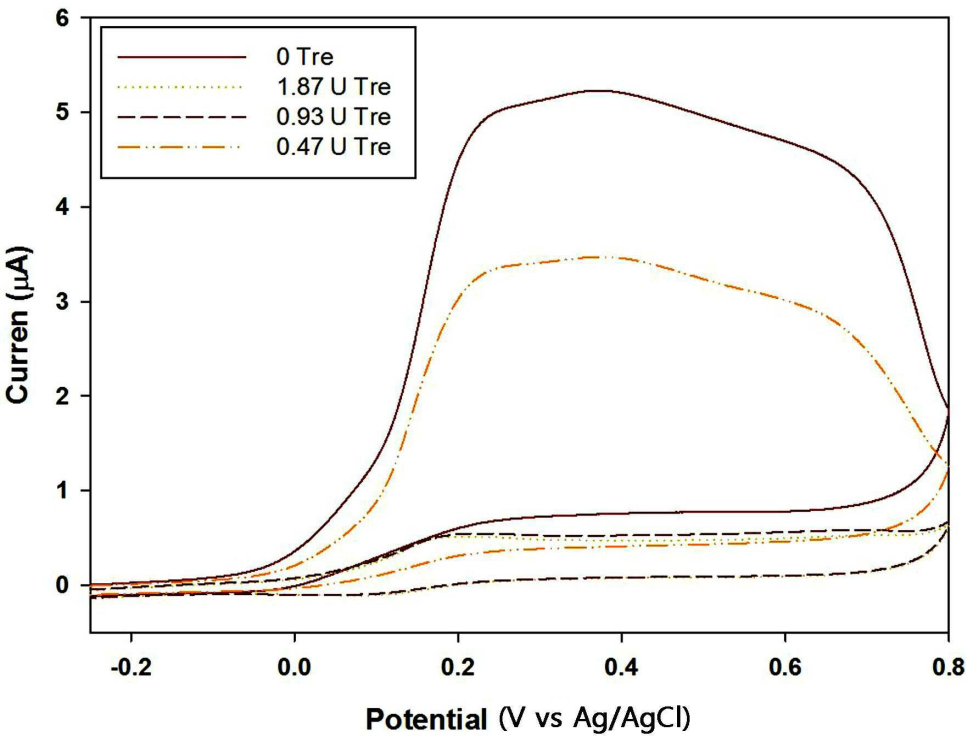
도면1b



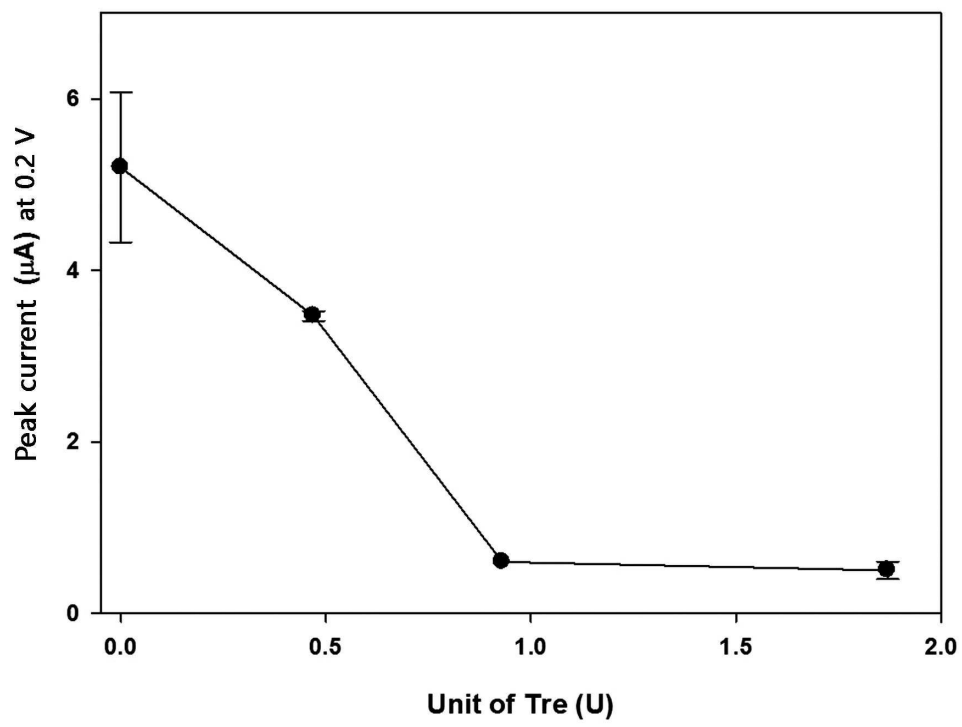
도면2



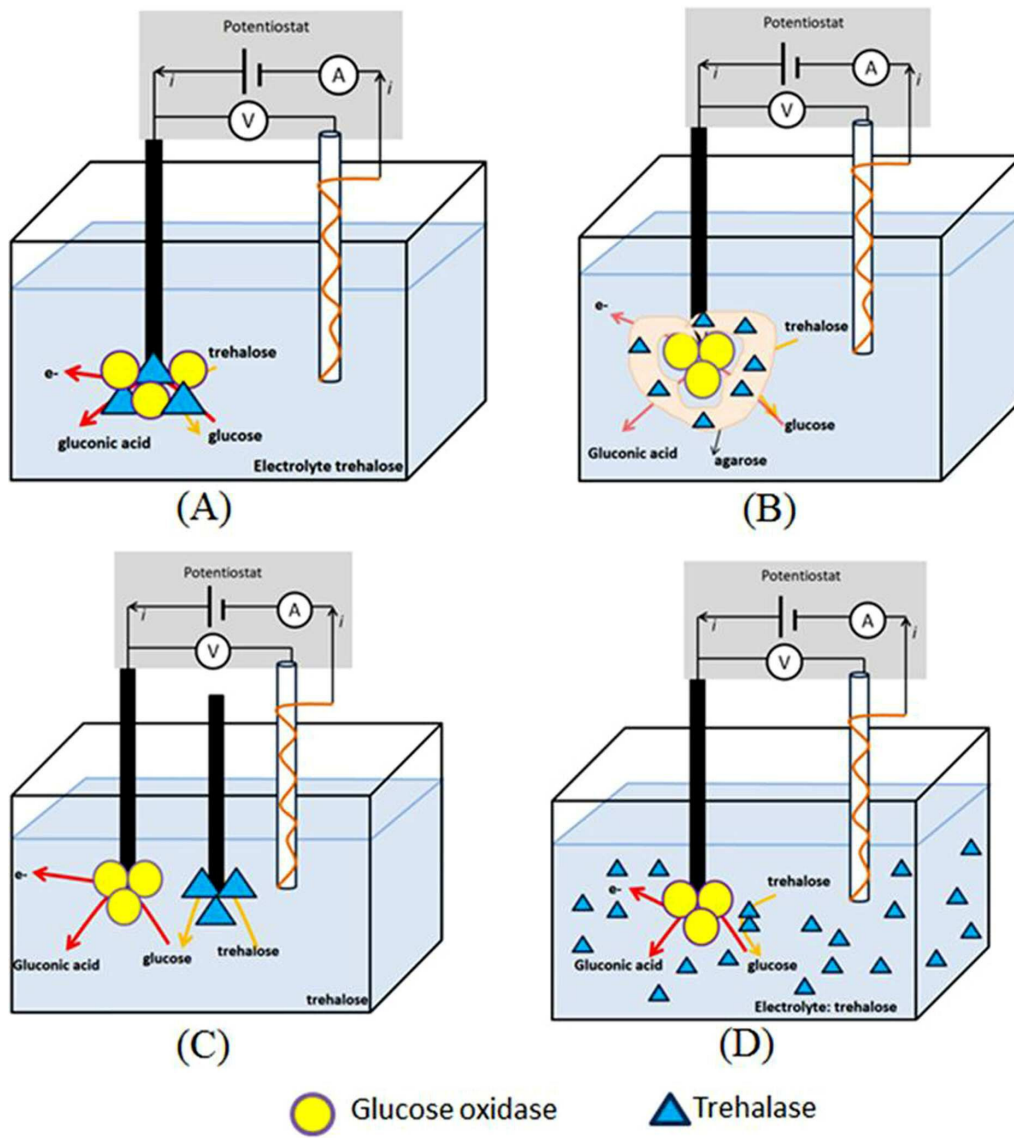
도면3



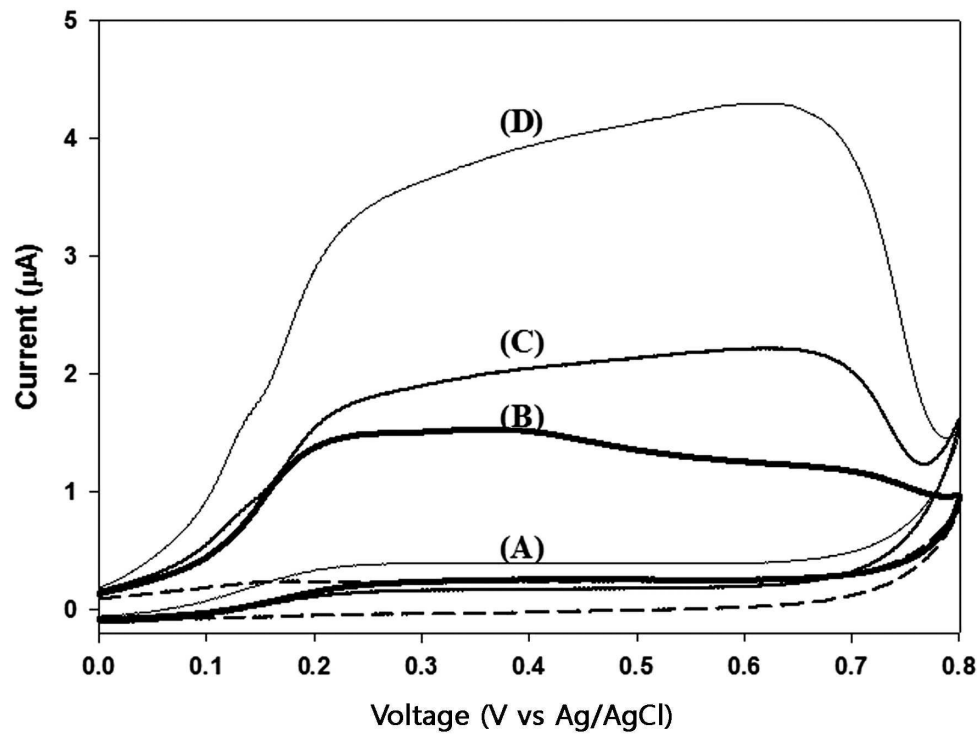
도면4



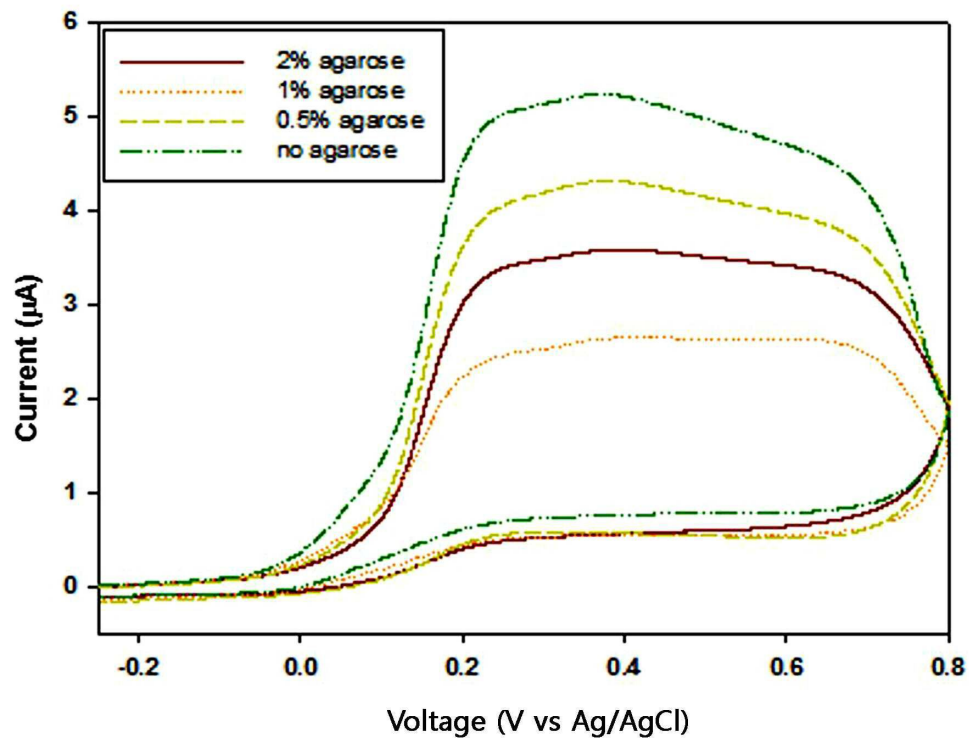
도면5



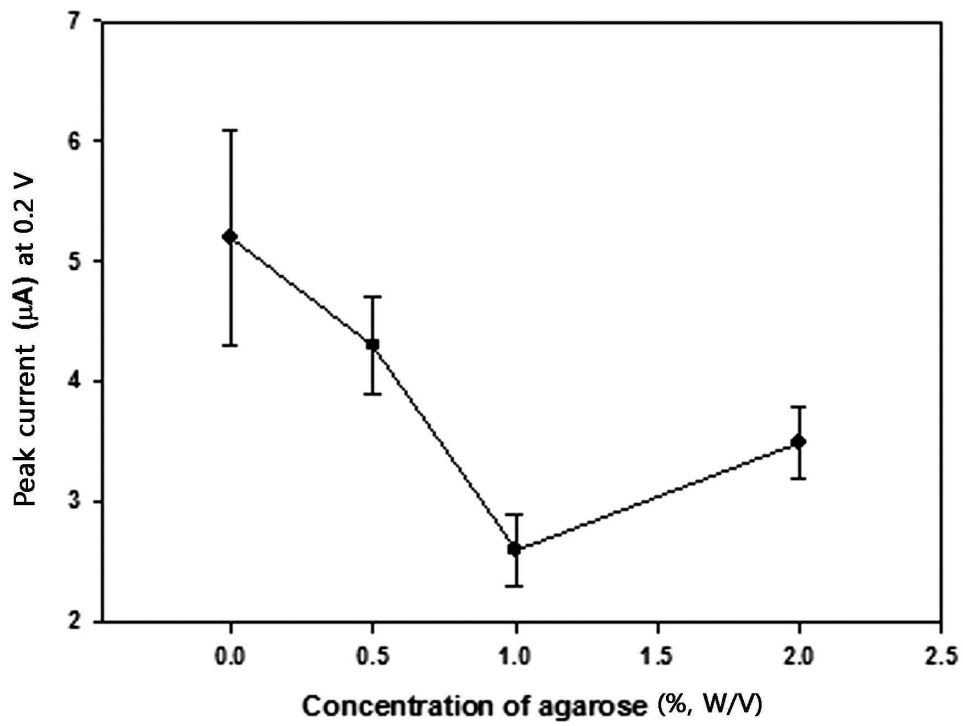
도면6



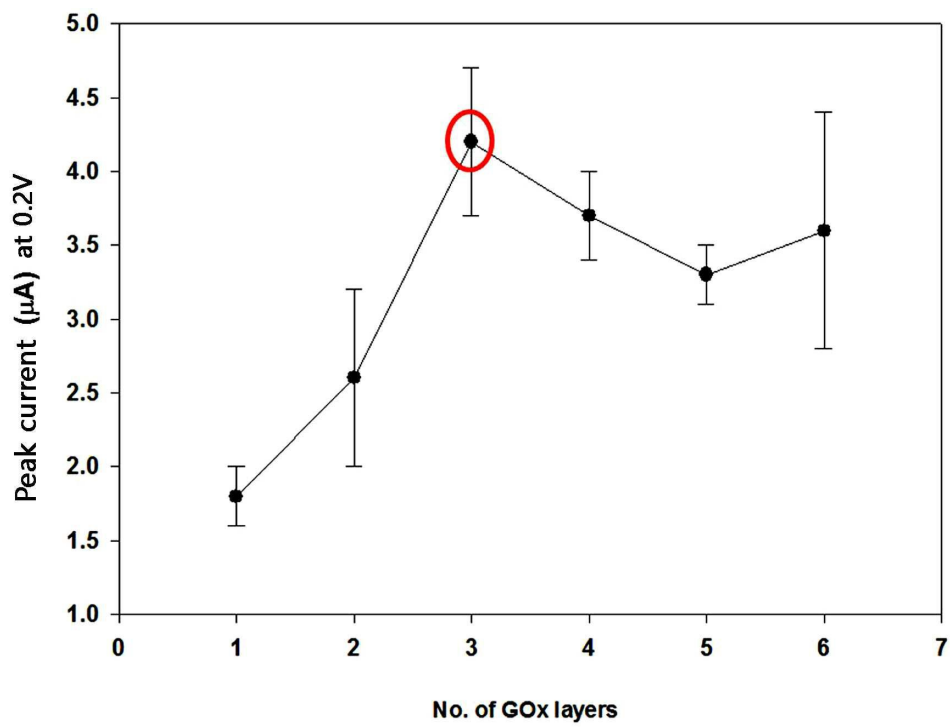
도면7



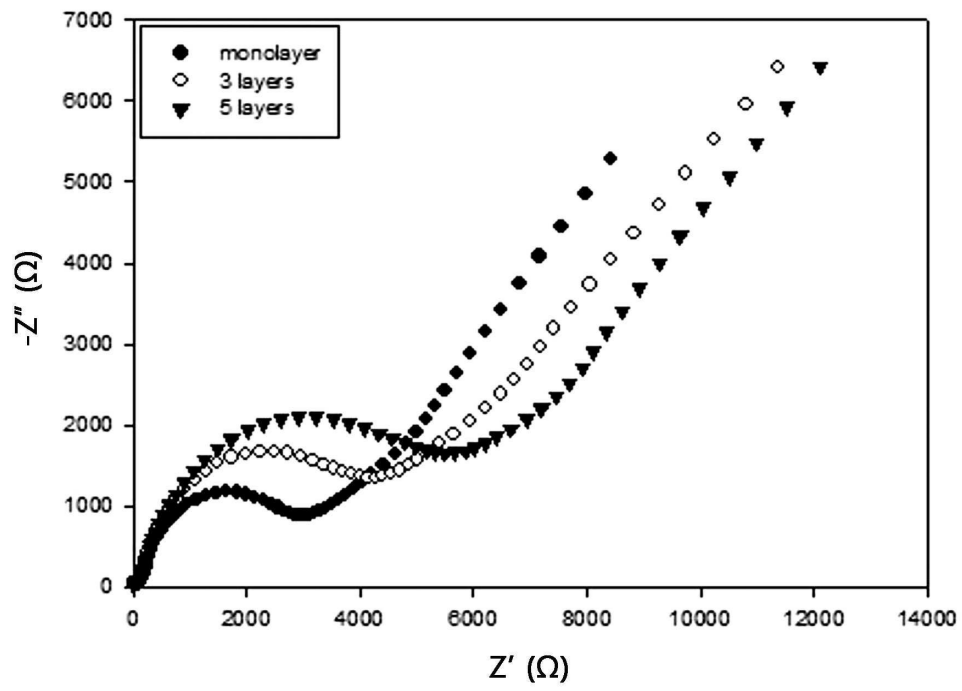
도면8



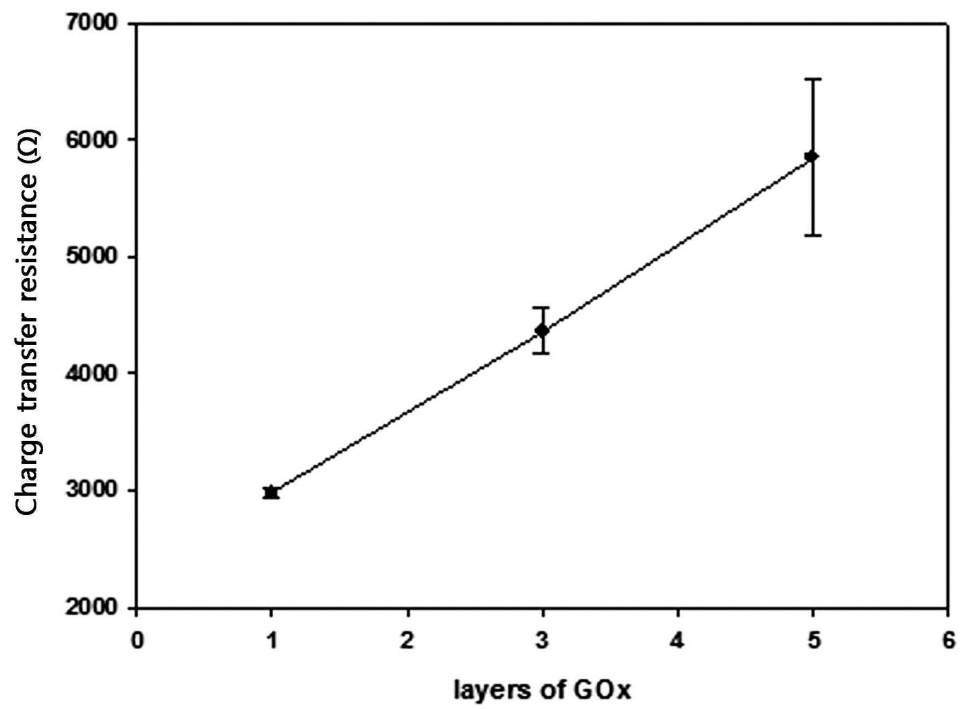
도면9



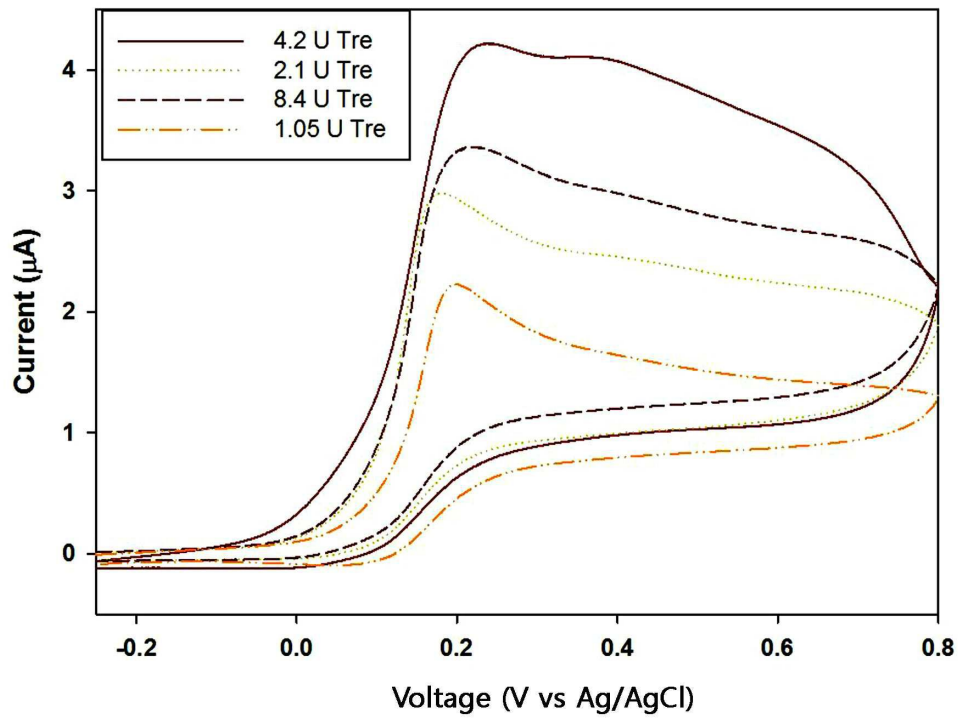
도면10



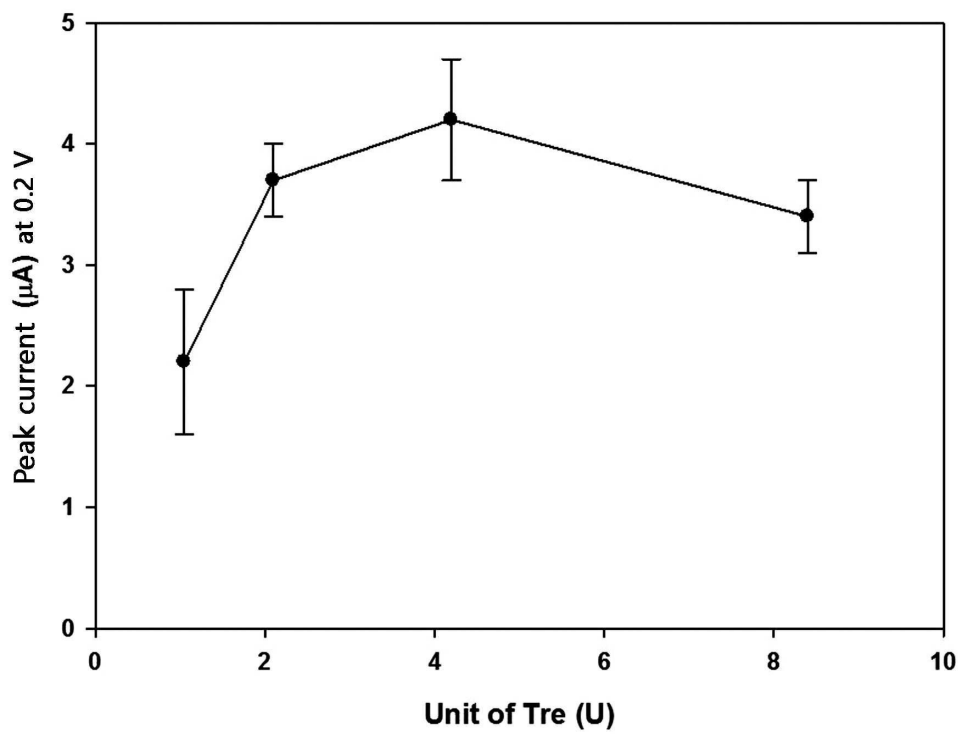
도면11



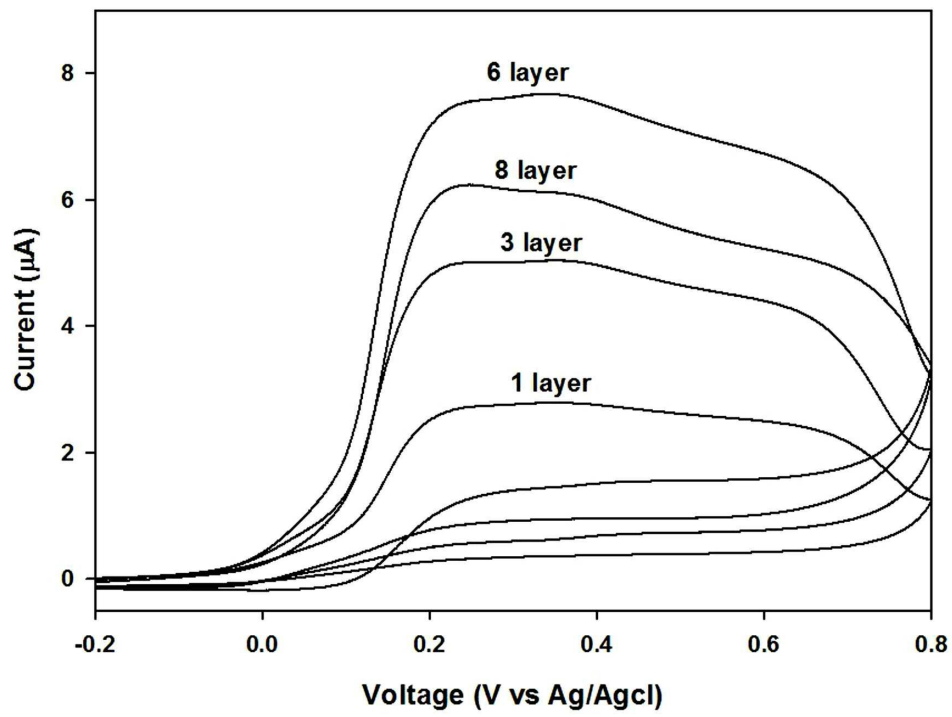
도면12



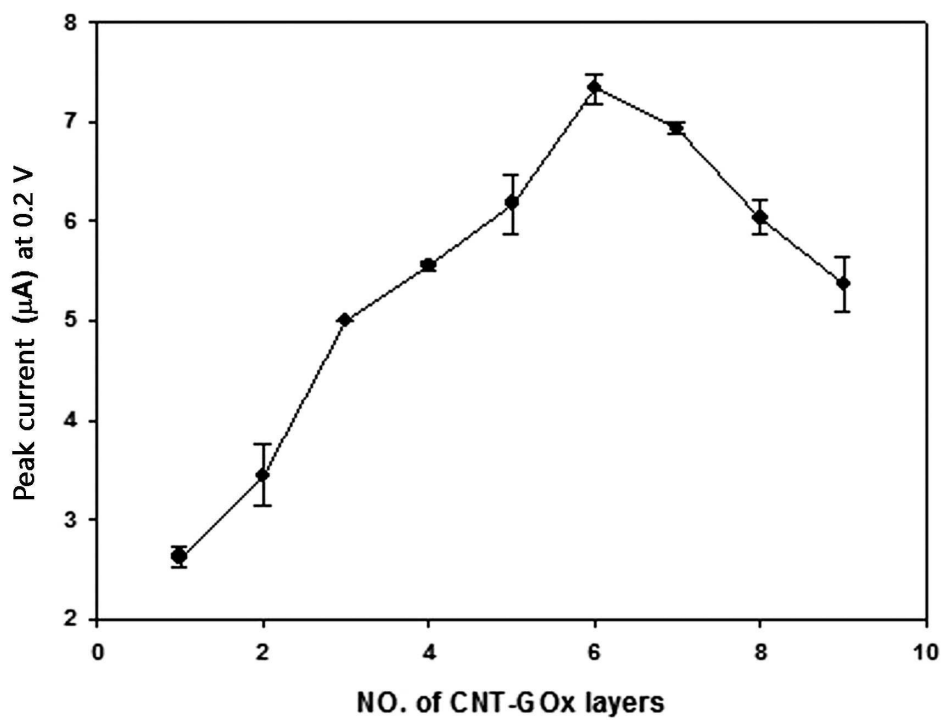
도면13



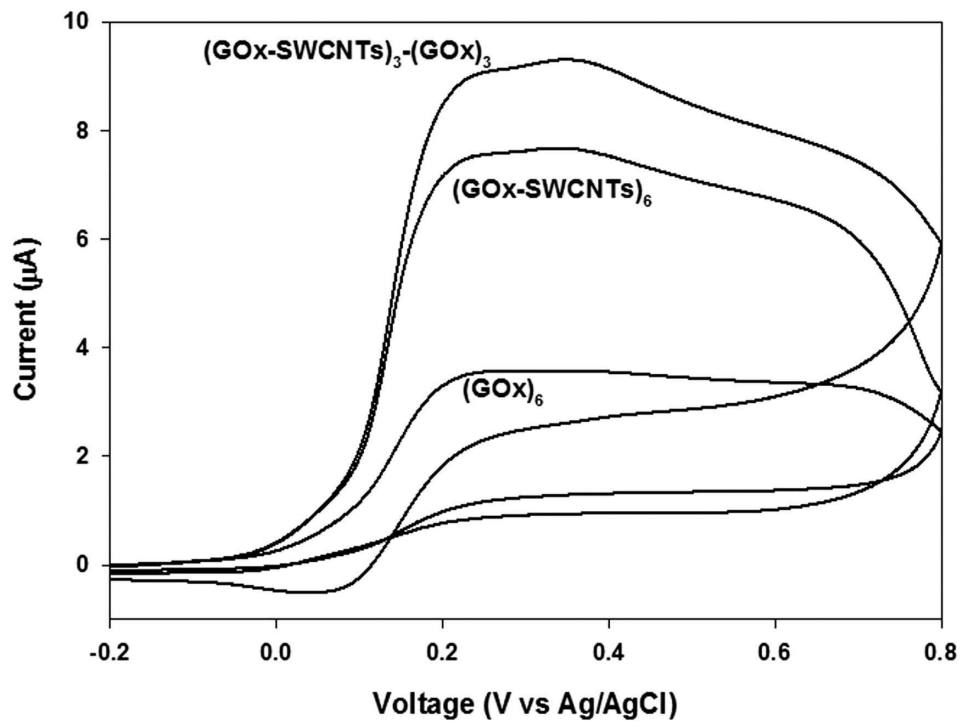
도면14



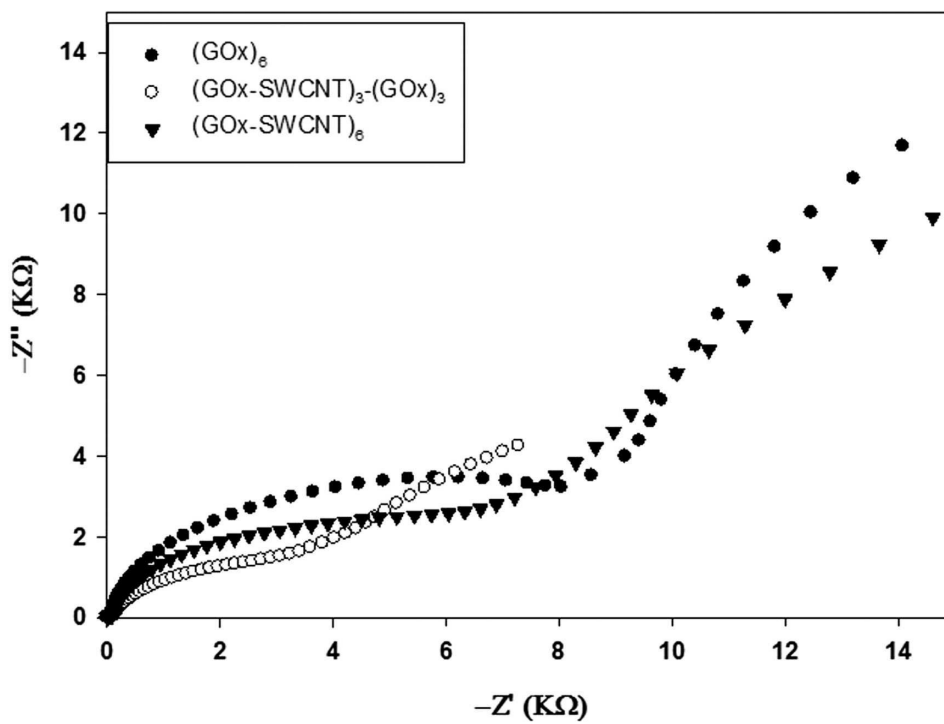
도면15



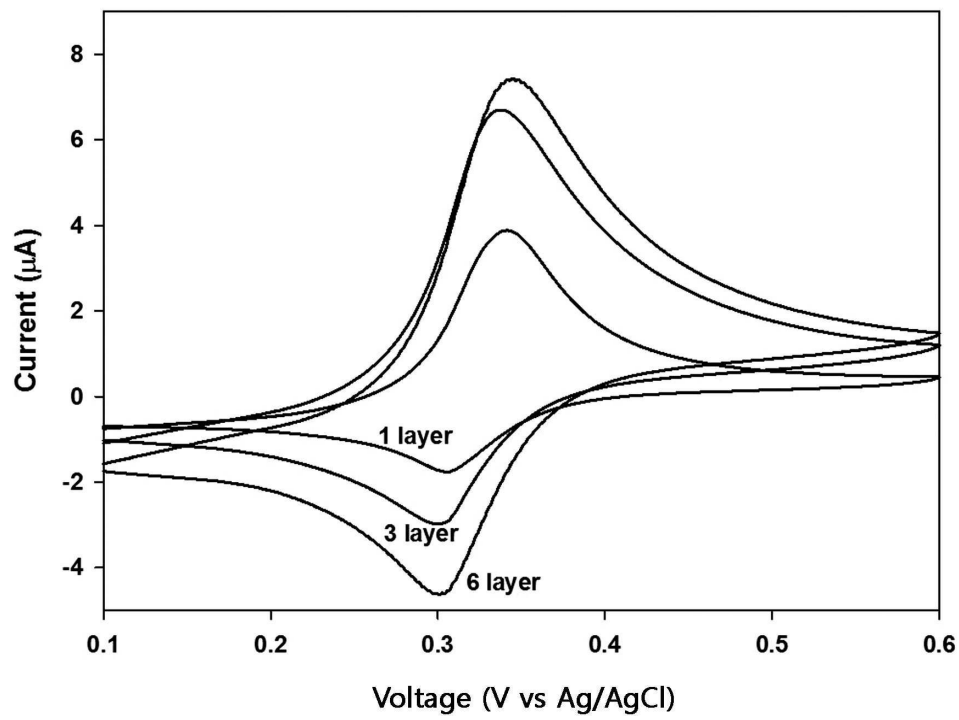
도면16



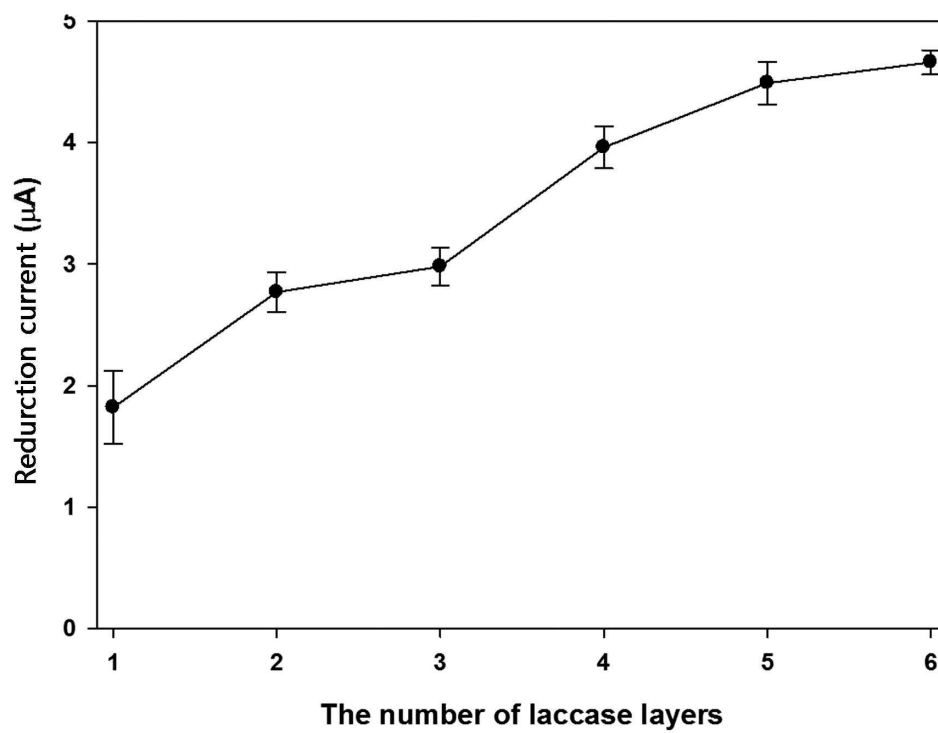
도면17



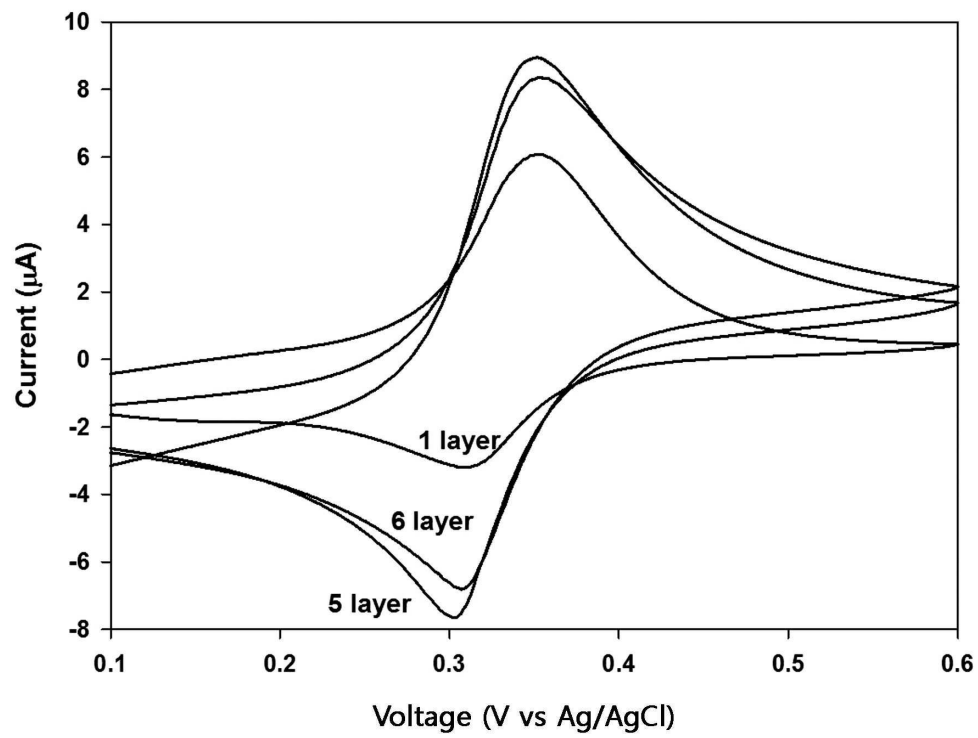
도면18



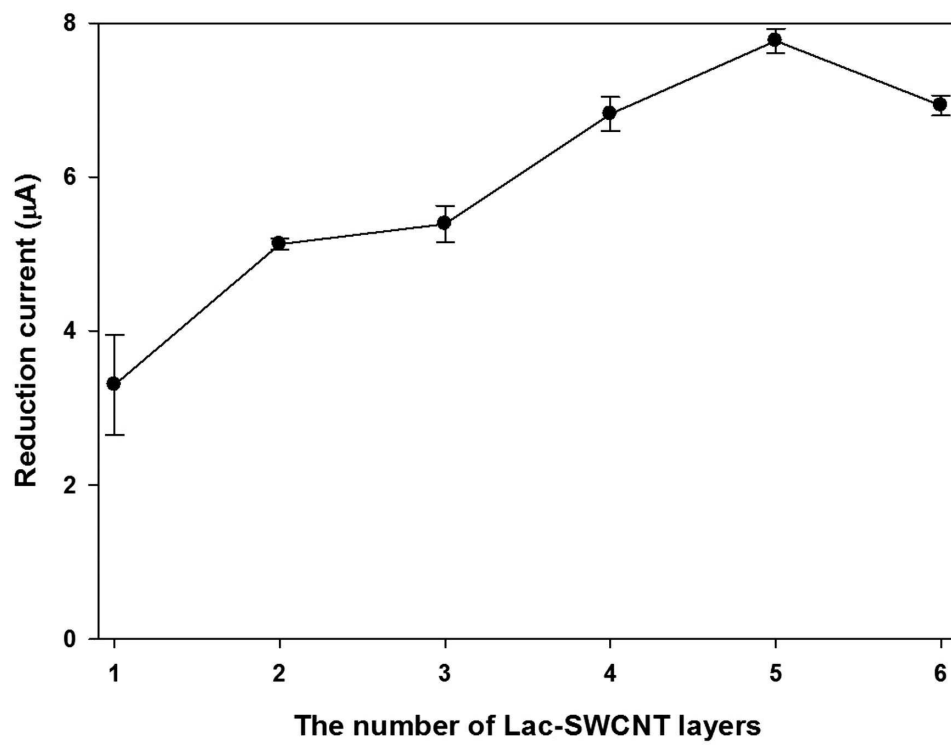
도면19



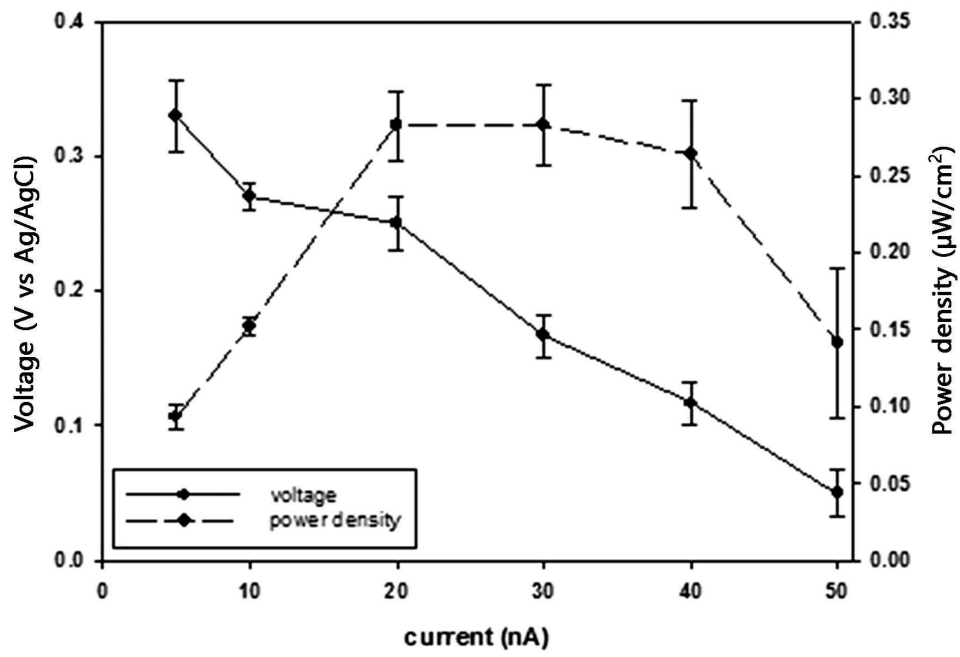
도면20



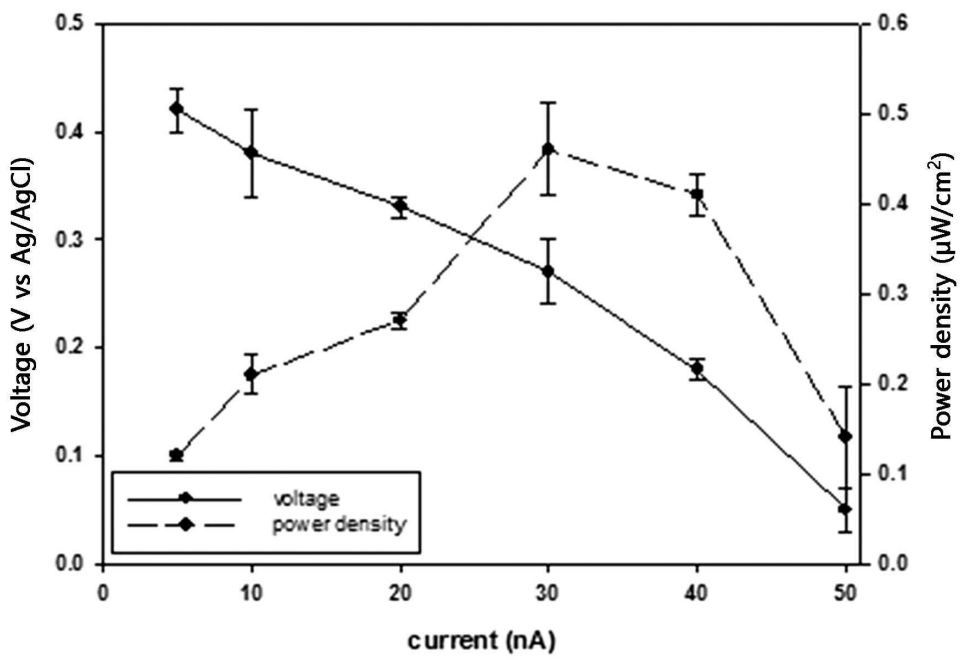
도면21



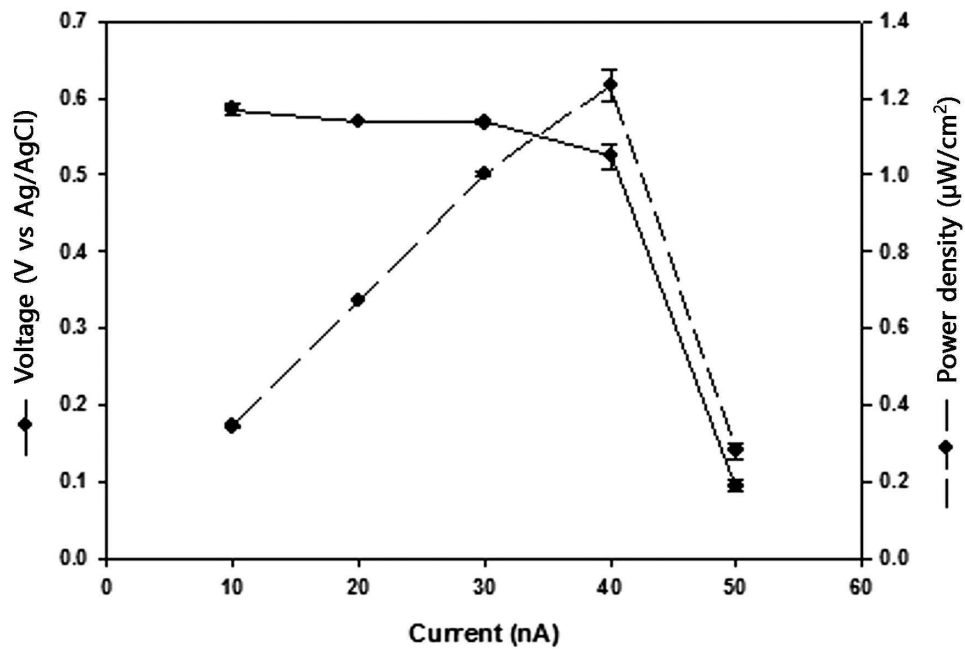
도면22



도면23



도면24



도면25

