

출원번호통지서

출원일자 2024.10.15
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(PDPA244481)
출원번호 10-2024-0140372 (접수번호 1-1-2024-1118923-50)
(DAS접근코드E666)
출원인명칭 강원대학교산학협력단(2-2004-008857-1)
대리인성명 파도특허법인 유한회사(9-2021-100021-9)
발명자성명 권정훈 정의국 진기찬 유혜민
발명의명칭 전자전달 능력이 향상된 산화환원-활성 페리틴 및 효소 기반 전극, 그 제조방법 및 그 응용

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로
홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가
까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하
여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터☎ 1544-8080)에
문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <https://www.kipo.go.kr-지식재산제도>

【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【참조번호】 PDPA244481

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 강원대학교산학협력단

【특허고객번호】 2-2004-008857-1

【대리인】

【명칭】 파도특허법인 유한회사

【대리인번호】 9-2021-100021-9

【지정된변리사】 양석주

【발명의 국문명칭】 전자전달 능력이 향상된 산화환원-활성 페리틴 및 효소 기반 전극, 그 제조방법 및 그 응용

【발명의 영문명칭】 REDOX-ACTIVE FERRITIN AND ENZYME BASED ELECTRODE WITH FACILE ELECTRON TRANSFER AND MANUFACTURING METHOD THEREOR AND APPLICATION THEREOF

【발명자】

【성명】 권정훈

【성명의 영문표기】 Cheong Hoon Kwon

【주민등록번호】 780623-2XXXXXX

【우편번호】 25908

【주소】 강원특별자치도 삼척시 마달길 215, 105동 1301호

【발명자】

【성명】 정의국
【성명의 영문표기】 Eui Guk Jung
【주민등록번호】 740319-1XXXXXX
【우편번호】 25495
【주소】 강원특별자치도 강릉시 가작로 78, 107동 501호

【발명자】

【성명】 진기찬
【성명의 영문표기】 Gee Chan Jin
【주민등록번호】 990930-1XXXXXX
【우편번호】 12467
【주소】 경기도 가평군 설악면 명장길 73-7

【발명자】

【성명】 유혜민
【성명의 영문표기】 Hye Min Yu
【주민등록번호】 991210-2XXXXXX
【우편번호】 25916
【주소】 강원특별자치도 삼척시 대학로 83, 505호

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1711179917
【과제번호】 2022R1A2C1009690

【부처명】 과학기술정보통신부

【과제관리(전문)기관명】 한국연구재단

【연구사업명】 개인기초연구(과기정통부)

【연구과제명】 고전도성 효소층 기반 섬유형 바이오 연료전지 개발 및 융합형 구동 시스템 구축

【과제수행기관명】 강원대학교삼척산학협력단

【연구기간】 2023.03.01 ~ 2024.02.29

【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 파도특허법인 유한회사 (서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】 0 면 46,000 원

【가산출원료】 40 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 10 항 676,000 원

【합계】 722,000원

【감면사유】 전담조직(50%감면)[1]

【감면후 수수료】 361,000 원

【첨부서류】 1. 기타첨부서류[개별위임장]_1통

1 : 기타첨부서류

[PDF 파일 첨부](#)

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

전자전달 능력이 향상된 산화환원-활성 페리틴 및 효소 기반 전극, 그 제조 방법 및 그 응용{REDOX-ACTIVE FERRITIN AND ENZYME BASED ELECTRODE WITH FACILE ELECTRON TRANSFER AND MANUFACTURING METHOD THEREOR AND APPLICATION THEREOF}

【기술분야】

【0001】 본 발명은 전자전달 능력이 향상된 산화환원-활성 페리틴 및 효소 기반 전극, 그 제조방법 및 그 응용에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

【0003】 바이오 연료전지(Biofuel cell, BFC)는 다양한 휴대형 또는 이식형 개인화 의료 기기에서 효과적인 오프-그리드 전력 생산을 위한 유망한 지속 가능하고 재생 가능한 에너지 솔루션으로 상당한 주목을 받았다. 최근 발전에도 불구하고, 바이오 연료전지는 여전히 실제 구현을 방해하는 중대한 과제에 직면해 있으며, 가장 시급한 두 가지는 비교적 낮은 전력 출력과 제한된 작동 안정성이다. 이러한 과제는 주로 효소와 전극 사이의 전자 전달의 비효율성과 장기 작동 중에 효소가 호스트 표면으로부터 분리되거나 비활성화되는 경향 때문이다. 중요한 점은 이러한 문제가 전자 전달이 발생하는 전극 내 인터페이스의 구조와 밀접하게 관련되어 있다는 것이다.

【0004】 바이오 연료전지 음극(anode)에서 일반적으로 사용되는 효소인 글루코스 옥시다아제(Glucose oxidase, GOx)는 절연 단백질 쉘 아래 약 7 내지 15 Å에 활성 부위(플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드, FAD)가 있다. 이러한 구조적 특징은 효율적인 전자 전달에 대한 상당한 에너지 장벽을 나타내며, 보다 높은 전력 출력을 위해 로딩량이 증가함에 따라 더욱 두드러진다. 이러한 과제를 해결하기 위해 산화환원 매개체를 도입하여 깊게 내장된 FAD 센터로의 전자 전달을 용이하게 하기 위한 노력이 증가하고 있다. 바람직하게는, 매개체가 전극 내로 모든 구성(예컨대, 효소/호스트 전극 및 효소/효소)을 연결함에 따라, 계면에서 전자 전달을 위한 운동 장벽(또는 물리적 갭)을 최소화한다. 즉, 균일하게 통합된 매개체에 의해 형성된 잘 구성된 전자 호핑 네트워크는 효소의 촉매 효율을 개선하여 바이오 연료전지의 더 높은 출력과 비용 효율성을 가져올 수 있다. 그러나, 대부분의 매개체 전자 전달(MET) 시스템은 종래 간단한 블렌딩 또는 효소 및 폴리머 링커와의 기계적 혼합을 통해 호스트 전극 상에 활성 복합체를 형성함으로써, 산화환원 매개체를 통합하였다. 이러한 접근 방식은 종종 인접한 구성들 사이의 충분한 상호 작용을 보장하지 못하여, 구조적 안정성 및 최적의 계면 간격을 유지하는 데 어려움이 있었다. 특히, 매개체 내의 벌크형의 폴리머 물질의 응집적인 특성은 이러한 문제를 더욱 악화시켜 잠재적으로 전자 전달 효율을 방해하였다. 또한, 널리 사용되는 오스뮴 및 루테튬 기반 폴리머는 상당한 독성 위험을 초래하여, 반복적인 작동 중에 이러한 물질이 생물학적 시스템으로 누출되면 특히 의료 분야에서 심각한 안전 문제가 발생할 수 있다. 따라서, 안정적인 상호 작용과 견고한 구조적 무결성을 갖춘 생체

적합성 산화환원 매개체를 통합한 적절한 계면 설계는 효소 기반 양극 내에서 전자 전달 특성을 최적화하는 데 중요하다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

【0006】 본 발명은 지지체; 및 상기 지지체 상에 형성되고, 양이온화된 페리틴 및 효소를 포함하는 효소층 어셈블리가 반복된 복합구조를 포함하는, 전자전달 능력이 향상된 전극 등을 제공하고자 한다.

【0007】 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

【과제의 해결 수단】

【0009】 본 발명은 지지체; 및 상기 지지체 상에 형성되고, 양이온화된 페리틴 및 효소를 포함하는 효소층 어셈블리가 반복된 복합구조를 포함하는, 전자전달 능력이 향상된 전극을 제공한다.

【0010】 상기 지지체는 표면이 카르복실기로 기능화된 지지체일 수 있다.

【0011】 상기 지지체는 표면이 카르복실기로 기능화된 평판형 전도성 지지체일 수 있다.

【0012】 상기 양이온화된 페리틴은 양이온성 아민기로 기능화된 페리틴일 수 있다.

【0013】 상기 효소는 글루코스 옥시다아제일 수 있다.

【0014】 상기 지지체 및 상기 양이온화된 페리틴과, 상기 양이온화된 페리틴 및 상기 효소는 각각 정전기적 인력을 통해 결합될 수 있다.

【0015】 상기 효소층 어셈블리는 5회 내지 50회 반복되고, 총 두께는 40 nm 내지 100 nm일 수 있다.

【0016】 본 발명의 일 구현예로, (a) 지지체를 준비하는 단계; 및 (b) 상기 지지체 상에 양이온화된 페리틴 및 효소를 포함하는 효소층 어셈블리가 반복된 복합구조를 형성하는 단계를 포함하는, 전자전달 능력이 향상된 전극의 제조방법을 제공한다.

【0017】 본 발명의 다른 구현예로, 상기 전극을 포함하는 바이오 연료전지를 제공한다.

【0018】 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 전극을 포함하는 바이오 센서를 제공한다.

【발명의 효과】

【0020】 본 발명은 전자전달 능력이 향상된 산화환원-활성 페리틴 및 효소 기반 전극으로서, 지지체; 및 상기 지지체 상에 형성되고, 양이온화된 페리틴 및

효소를 포함하는 효소층 어셈블리가 반복된 복합구조를 포함하는 것을 특징으로 한다. 즉, 본 발명에 따른 전자전달 능력이 향상된 전극은 양이온화된 페리틴을 산화 환원 매개체 및 링커로 사용함에 따라, 폴리머 링커를 배제할 수 있고, 이에 따라 전자전달 능력을 최적화시킬 수 있어 성능이 우수하고, 지속적인 사용에도 그 성능을 유지할 수 있어 내구성 역시 우수하다.

【0021】 따라서, 본 발명은 고성능 및 내구성이 요구되는 바이오 연료전지, 바이오 센서 등에 다양하게 활용 가능하다.

【도면의 간단한 설명】

【0023】 도 1은 (양이온화된 페리틴/GOx) 다층 필름의 단계적 어셈블리 및 기능의 개략도를 나타낸 것이다. 양이온화된 페리틴(적색)은 GOx(녹색) 및 전극 기판 사이 전자 매개체 역할을 하였다. 포도당의 존재 하에, GOx는 포도당을 글루코노락톤으로 전환하여 전자(e^-)를 방출하고, 이러한 전자는 페리틴을 통해 전극으로 전달되어 전자 전달 효율을 향상시켰다. GOx 및 양이온화된 페리틴의 교차 층을 가진 다층 구조는 전자 흐름을 위한 매우 조직화된 경로를 제공하여 바이오 음극 응용 분야에서 최적 전기화학적 성능을 촉진하였다.

도 2는 n-FGOx 다층의 제조를 나타낸 것이다. (a) 1 내지 10의 이중층 수 (n)를 갖는 n-FGOx 다층의 UV-vis 흡수 스펙트럼. 삽입은 277nm에서 흡수 값을 보여주며, 거의 선형적인 성장을 보여주었다. (b) 이중층 수에 따른 n-FGOx 다층의

QCM 분석. (c) 경사형 FE-SEM 이미지(우)로부터 얻은 n-FGOx 다층의 이중층 수에 따른 필름 두께. (d) 30-FGOx 다층의 평면 및 횡단면 FE-SEM 이미지와 S 및 Fe 원자에 대한 에너지 분산 X선 분광법(EDS)을 사용한 대응 원소 매핑.

도 3은 양이온화된 페리틴의 전기화학적 특성을 나타낸 것이다. (a) PBS 용액에서 300 mmol L^{-1} 포도당에서 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 mV s^{-1} 의 다양한 주사 속도로 기록된 FTO 전극 상에 양이온화된 페리틴의 순환 전압 전류 그래프. 스캔 속도에 따른 양이온화된 페리틴의 (b) 음극 및 (c) 양극 피크 전류 밀도는 표면 제어 전자 전달 공정을 나타내었다. (d) $\log(v)$ 의 함수로서 전위 값($\Delta E_p: |E_{pc} - E_{pa}|$)의 변화. 이 경우 v , E_{pc} 및 E_{pa} 는 각각 스캔 속도, 양극 피크 전위 및 음극 피크 전위를 나타내었다. 삽입은 다른 스캔 속도에 따른 음극 피크 전위 추세의 확대된 그래프를 보여주었다.

도 4는 n-FGOx 음극에 대한 CV 및 EIS 나이퀴스트 플롯을 나타낸 것이다. (a), (c), 및 (e): 다른 포도당 농도(0, 10, 50, 100 및 300 mmol L^{-1})에서 기록된 n-FGOx 음극의 이중층 수에 따른 산화 전류 밀도. (b), (d), 및 (f): n-FGOx 음극의 대응 나이퀴스트 플롯. 삽입은 각 나이퀴스트 플롯의 고주파 영역을 나타내었다.

도 5는 n-FGOx 음극의 전류 반응 및 표면 형태 간의 관계를 나타낸 것이다. (a) 0.6V에서 기록된 포도당 농도의 함수로서 n-FGOx 음극의 정규화된 전류 밀도. (b) 0(배어 기관), 10, 20 및 30의 다양한 이중층 수를 갖는 n-FGOx 음극의 평면 FE-SEM 이미지.

도 6은 30-FGOx 및 슬러리 캐스트 FGOx 음극의 전기화학적 특성을 비교한 것이다. 다른 포도당 농도(0, 10, 50, 100 및 300 mmol L⁻¹)의 0.6 V에서 (a) 30-FGOx 및 (b) 슬러리 캐스트 FGOx 음극에 대한 정규화된 전류 밀도. (c) 30-FGOx 및 (d) 슬러리 캐스트 FGOx 음극에 대한 대응 나이퀴스트 플롯. (e) 30-FGOx 및 슬러리 캐스트 FGOx 음극 모두의 나이퀴스트 플롯으로부터 파생된 대표적인 등가 회로 모델. (f) 각 음극에 대한 어드미턴스 플롯. 확산 제한 공정에서 전하 전달 제한 공정으로의 전하 전이 거동인 무릎 주파수는 30-FGOx 음극의 경우 59Hz, 슬러리 캐스트 음극의 경우 41Hz에서 기록되었다.

도 7은 전기화학적 내구성 시험을 나타낸 것이다. (a) 전기화학적 측정을 위한 전원 공급 장치에 연결된, 작동 전극, 기준 전극(Ag/AgCl) 및 상대 전극으로 구성된 3전극 설정의 개략도. 삽입은 연장된 전기화학적 작동 후의 30-FGOx 음극의 표면을 보여주었다. (b) 50시간 연속 작동에서 10 mmol L⁻¹의 포도당 존재 하에 30-FGOx 및 슬러리 캐스트 음극의 안정성 시험. 30-FGOx 전극은 초기 전류 밀도 (7.8 $\mu\text{A cm}^{-2}$)의 85%를 유지하는 반면, 슬러리 캐스트 FGOx는 49%(4.0 $\mu\text{A cm}^{-2}$)만을 유지하여 30-FGOx 전극의 우수한 안정성 및 내구성을 보여주었다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

【0024】 본 발명자들은 생리적으로 양성인 조건 하에 정전기적 인력에 의해 유도된 LbL 스핀 어셈블리를 통해 구성된 생체적합성 산화환원 활성 분자 링커를 가진 고성능 효소(즉, GOx) 기반 바이오 음극을 제공하고자 한다. 이를 위해, 페리

틴 분자를 산화환원 매개체 및 링커로 사용하여 기존의 벌크형 폴리머 링커를 사용하지 않고 모든 전극 구성을 단단히 통합하여, 효소 부하가 증가하더라도 내부 저항을 최소화하였다. 페리틴은 주로 철($\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$) 산화 환원 반응을 통해 철 이온을 저장하고 방출하는 역할로 알려져 있지만, 그 고유한 특성은 효소 및 전극 사이의 전자 전달을 용이하게 하는 데 활용될 수 있었다. 또한, 페리틴 표면 상에 친수성 기능적 부분, 특히, 아민기는 GOx와 강력한 상호 작용을 허용하였다. 이러한 간단하고 효과적인 제작 공정은 각 구성(즉, 양이온화된 페리틴 및 음으로 하전된 GOx)의 균일한 분포로 호스트 전극 상에 매끄럽고 컴팩트한 활성층을 제공하여, 전자 전달 속도론, 변환 효율, 그리고 구조적 무결성을 향상시켰다. 특히, 본 발명자의 접근 방식은 LbL 어셈블리 공정 동안 증착된 층의 수 및/또는 그 농도를 간단히 조절하여 각 구성의 로딩량을 정확하게 조절할 수 있었다. 이러한 특징은 이식형 응용 분야에서 임상적 문제가 될 수 있는 매개체 과부하를 방지하는 데 도움이 되었다.

【0026】 LbL-조립된 (양이온화된 페리틴/GOx) $_n$ 다층의 전류 밀도는 n-FGOx로 표시되며, 이중층 수(n)에 따라 점차 증가하여 300 mmol L⁻¹ 포도당이 존재할 때 n=30(75 ± 1.9 nm 두께)에서 36.4 $\mu\text{A cm}^{-2}$ (GOx를 기준으로 ~2.9 $\mu\text{A mg}^{-1}$)의 최대 값에 도달하였다. 얻은 전류 수준은 나노 및 생물의학 센서 및 자가 구동 장치와 같은 저전력 장치에 전력을 공급하기에 충분하여 생체의학적 응용 분야에 대한 접근 방식의 실용적인 실행 가능성을 강조하였다. 특히, FGOx 기반 음극은 뛰어난 작

동 안정성을 보였으며, 50시간 연속 작동 후에도 10 mmol L^{-1} 포도당에서 초기 전류 밀도의 약 84.7%를 유지하였다. FGOx 음극의 이러한 지속적인 성능은 안정적이고 내구성 있는 전원이 필요한 분야에서 장기 사용할 수 있는 잠재력을 분명히 보여주었다. 이러한 혁신적인 LbL 접근법은 효과적인 전자 전달 및 높은 작동 안정성을 모두 제공함으로써 BFC 및 바이오 센서를 포함한 다양한 생체적합성 장치를 위한 고성능 바이오 음극 개발을 위한 기반을 제공하였다(도 1). 효소 고정화 기술을 이용하여 나노구조의 형태로 전극 표면과 결합함으로써, 페리틴 기반 효소층 구조는 전류 생성 성능을 크게 향상시켰다. 페리틴 기반 효소층 어셈블리의 견고하고 생체적합한 특성은 특히, 지속 가능하고 효율적인 에너지 생성이 필요한 분야에서 떠오르는 기술에 광범위하게 적용할 수 있는 잠재력을 더욱 뒷받침하였다.

【0027】

【0028】 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

【0030】 전자전달 능력이 향상된 전극

【0032】 본 발명은 지지체; 및 상기 지지체 상에 형성되고, 양이온화된 페리틴 및 효소를 포함하는 효소층 어셈블리가 반복된 복합구조를 포함하는, 전자전달 능력이 향상된 전극을 제공한다.

【0034】 먼저, 본 발명에 따른 효소전극은 지지체를 포함하고, 상기 지지체는 전도성 지지체일 수 있다.

【0035】 상기 지지체는 전도성을 부여하기 위한 것으로, 당업계 적용가능한 공지된 기판을 적용할 수 있고, 평판형 전도성 지지체일 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서는 Au-Si 웨이퍼를 사용하였다.

【0036】 특히, 상기 지지체의 표면은 양이온화된 페리틴과 정전기적 상호작용을 하기 위해, 카르복실기로 기능화될 수 있다. 이러한 카르복실기는 후술하는 양이온화된 페리틴과 정전기적 인력을 통해 결합될 수 있다. 구체적으로, 상기 지지체 표면의 카르복실기는 상기 양이온화된 페리틴의 양이온화된 작용기(특히, 양이온성 아민기)와 정전기적 상호작용을 할 수 있다. 이때, 상기 지지체의 표면을 카르복실기로 기능화시키기 위해, 상기 지지체의 표면에 하이드록시기를 노출시킨 상태에서, 폴리에틸렌이민 용액의 처리 후, 트리카르발릴산 용액을 처리할 수 있다. 이때, 폴리에틸렌이민의 NH기와 트리카르발릴산의 COOH기는 서로 수소 결합을 이룰 수 있다.

【0038】 다음으로, 본 발명에 따른 효소전극은 상기 지지체 상에 형성되고, 효소층 어셈블리가 반복된 복합구조를 포함하고, 상기 효소층 어셈블리는 양이온화된 페리틴 및 효소를 포함한다.

【0039】 상기 양이온화된 페리틴은 산화환원-활성을 가진 것으로, 상기 양이온화된 페리틴을 적용함에 따라, 폴리머 링커를 배제할 수 있다. 상기 페리틴을 양이온화시키기 위해, 양이온성 아민기($-\text{NH}_3^+$)로 기능화시킬 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서는 페리틴에 N,N-디메틸-1,3-프로판디아민을 결합하여 페리틴을 양이온화시켰다.

【0040】 한편, 상기 효소는 생리적 조건(pH 7.4 및 온도 36.5°C) 하에서 음으로 하전된 것으로, 글루코스 옥시다아제, 카탈라아제 및 헤모글로빈으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있고, 효소의 안정성 유지 측면을 고려하면, 절연 단백질 쉘 아래 약 7 내지 15 Å에 활성 부위(플라빈 아데닌 디뉴클레오타이드, FAD)를 가진 글루코스 옥시다아제인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

【0041】 상기 양이온화된 페리틴 및 상기 효소는 서로 정전기적 인력을 통해 결합될 수 있다. 구체적으로, 상기 양이온화된 페리틴의 양이온화된 작용기(특히, 양이온성 아민기)는 상기 효소의 카르복실기와 정전기적 상호작용을 할 수 있다.

【0043】 상기 효소층 어셈블리 각 층을 기준으로, 상기 양이온화된 페리틴 및 상기 효소의 로딩량은 각각 $0.2 \mu\text{g cm}^{-2}$ 내지 $1.0 \mu\text{g cm}^{-2}$ 및 $0.01 \mu\text{g cm}^{-2}$ 내지 $0.1 \mu\text{g cm}^{-2}$ 일 수 있고, 각각 $0.2 \mu\text{g cm}^{-2}$ 내지 $0.5 \mu\text{g cm}^{-2}$ 및 $0.02 \mu\text{g cm}^{-2}$ 내지 $0.08 \mu\text{g cm}^{-2}$ 인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

【0045】 상기 복합구조는 상기 효소층 어셈블리가 층별(Layer by layer, LbL) 어셈블리 기술, 특히, 스핀 보조 층별 어셈블리 기술을 통해 반복될 수 있고, 구성 간의 정전기적 상호작용에 따라 단순히 구분된 층상 구조가 아닌 혼합된 구조를 가질 수 있다. 상기 반복 횟수는 두께 및 전자전달 능력을 최적화시키기 위한 것으로, 5회 내지 50회일 수 있고, 20회 내지 50회인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 반복 횟수에 따라, 상기 복합구조의 총 두께는 40 nm 내지 100 nm일 수 있고, 60 nm 내지 100 nm인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 이때, 반복 횟수 및 두께가 너무 적은 경우에는 구성 간의 정전기적 반발로 인해 표면 피복이 충분하지 아니하여 전류 밀도가 낮아지는 한계가 있다.

【0047】 전자전달 능력이 향상된 전극의 제조방법

【0049】 본 발명은 (a) 지지체를 준비하는 단계; 및 (b) 상기 지지체 상에 양이온화된 페리틴 및 효소를 포함하는 효소층 어셈블리가 반복된 복합구조를 형성하는 단계를 포함하는, 전자전달 능력이 향상된 전극의 제조방법을 제공한다.

【0051】 먼저, 본 발명에 따른 전극의 제조방법은 지지체를 준비하는 단계 [(a) 단계]를 포함한다.

【0052】 상기 지지체는 전도성 지지체일 수 있고, 상기 지지체 재질에 대해서는 전술한바 있으므로, 중복 설명을 생략하기로 한다.

【0053】 특히, 상기 지지체의 표면은 양이온화된 페리틴과 정전기적 상호작용을 하기 위해, 카르복실기로 기능화될 수 있다. 이러한 카르복실기는 후술하는 양이온화된 페리틴과 정전기적 인력을 통해 결합될 수 있다. 구체적으로, 상기 지지체 표면의 카르복실기는 상기 양이온화된 페리틴의 양이온화된 작용기(특히, 양이온성 아민기)와 정전기적 상호작용을 할 수 있다. 이때, 상기 지지체의 표면을 카르복실기로 기능화시키는 방법에 대해서는 전술한바 있으므로, 중복 설명을 생략하기로 한다.

【0055】 다음으로, 본 발명에 따른 효소전극의 제조방법은 상기 지지체 상에 양이온화된 페리틴 및 효소를 포함하는 효소층 어셈블리가 반복된 복합구조를 형성하는 단계[(b) 단계]를 포함한다.

【0056】 상기 효소층 어셈블리는 양이온화된 페리틴 및 효소를 포함하는 것으로, 상기 효소층 어셈블리에 대해서는 전술한바 있으므로, 중복 설명을 생략하기로 한다.

【0057】 또한, 상기 복합구조는 상기 효소층 어셈블리가 층별 어셈블리 기술, 특히, 스핀 보조 층별 어셈블리 기술을 통해 반복될 수 있고, 구성 간의 정전기적 상호작용에 따라 단순히 구분된 층상 구조가 아닌 혼합된 구조를 가질 수

있다. 상기 반복 횟수는 두께 및 전자전달 능력을 최적화시키기 위한 것으로, 5회 내지 50회일 수 있고, 20회 내지 50회인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 반복 횟수에 따라, 상기 복합구조의 총 두께는 40 nm 내지 100 nm일 수 있고, 60 nm 내지 100 nm인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 이때, 반복 횟수 및 두께가 너무 적은 경우에는 구성 간의 정전기적 반발로 인해 표면 피복이 충분하지 아니하여 전류 밀도가 낮아지는 한계가 있다.

【0059】 전자전달 능력이 향상된 전극의 응용

【0061】 본 발명은 상기 전극을 포함하는 바이오 연료전지 또는 바이오 센서를 제공한다.

【0063】 본 발명에 따른 바이오 연료전지 또는 바이오 센서는 상기 효소전극을 포함하는데, 상기 효소전극에 대해서는 전술한바 있으므로 중복 설명을 생략하기로 한다.

【0064】 상기 바이오 연료전지 또는 바이오 센서에 있어서, 상기 전극은 음극(anode)으로 작용할 수 있다. 한편, 상기 바이오 연료전지 또는 바이오 센서에 적용가능한 양극(cathode)으로 제2 지지체 및 상기 제2 지지체 상에 형성된 Pt층을 사용할 수 있다. 이때, 제2 지지체는 앞서 언급한 지지체와 마찬가지로, 전도성 재

질일 수 있다. 한편, 제2 지지체는 표면이 아민기로 기능화될 수 있고, Pt 층은 스퍼터링 등 공지의 방법에 의해 증착될 수 있다.

【0066】 상기한 바와 같이, 본 발명은 전자전달 능력이 향상된 산화환원-활성 페리틴 및 효소 기반 전극으로서, 지지체; 및 상기 지지체 상에 형성되고, 양이온화된 페리틴 및 효소를 포함하는 효소층 어셈블리가 반복된 복합구조를 포함하는 것을 특징으로 한다. 즉, 본 발명에 따른 전자전달 능력이 향상된 전극은 양이온화된 페리틴을 산화환원 매개체 및 링커로 사용함에 따라, 폴리머 링커를 배제할 수 있고, 이에 따라 전자전달 능력을 최적화시킬 수 있어 성능이 우수하고, 지속적인 사용에도 그 성능을 유지할 수 있어 내구성 역시 우수하다.

【0067】 따라서, 본 발명은 고성능 및 내구성이 요구되는 바이오 연료전지, 바이오 센서 등에 다양하게 활용 가능하다.

【0069】 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

【0071】 [실시예]

【0072】 재료

【0073】 전자 전달을 향상시키는 데 사용되는 산화환원 활성 단백질 복합체인 양이온화된 페리틴은 Sigma-Aldrich(미국)에서 구입하였다. 아스퍼질러스 니이거(*Aspergillus niger*)로부터 유래된 GOx는 활성이 236 U mg^{-1} 이며, Amano Enzyme Inc.(일본)에서 구입하였다. 이러한 효소는 포도당의 산화를 촉진하고 전자 전달을 용이하게 하는 능력으로 인해 BFC 응용 분야에 필수적이다. 전극 제작을 위한 전도성 기판으로 사용되는 금-실리콘(Au-Si) 웨이퍼도 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 모든 실험 절차에서 높은 순도를 보장하기 위해 Milli-Q 탈이온수(Millipore, Tokyo, Japan)를 사용하여 염화나트륨(NaCl) 용액을 제조하였다. LbL 어셈블리 공정을 용이하게 하기 위해 폴리전해질로 사용되는 분지형 폴리에틸렌이민(PEI, $M_w \sim 800 \text{ g mol}^{-1}$)은 LbL 어셈블리 공정 동안 최적의 pH 조건을 유지하기 위한 완충제로 사용된 트리카르발릴산(TC)과 함께 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

【0075】 Au-Si 웨이퍼의 표면 처리

【0076】 Au-Si 웨이퍼의 표면 처리가 어셈블리의 초기 층으로 양이온화된 페리틴을 후속 도입하기 위한 안정적인 기초를 구축하는 데 필수적이었다. 먼저, Au-Si 웨이퍼를 RCA 용액에 10분 동안 담가 표면 오염 물질을 제거하였고, 유기 잔류물을 산화시키고 하이드록실기를 노출시킴으로써 음전하 표면을 생성하였다. 이러한 처리로 후속 코팅 단계를 위한 깨끗하고 반응성 있는 표면이 보장되었다. 그 다음, 웨이퍼를 1 mg mL^{-1} 의 폴리에틸렌이민(PEI) 용액에 6시간 동안 침지시켰다. 이러한 단계에서, PEI의 양전하 아민(NH_2)기 및 Au-Si 웨이퍼 상에 음전하 하이드록실

(OH⁻)기 사이의 정전기적 및 수소 결합 상호작용을 통해 웨이퍼 표면에 PEI 코팅을 형성하였다. PEI 코팅 단계 후, 웨이퍼를 탈이온수(DW)로 철저히 린스하여 약하게 흡착된 PEI 분자를 제거하였고, 균일하고 안정적인 층을 확보하였다. 양이온화된 페리틴을 도입하기 위해, 웨이퍼를 1 mg mL⁻¹의 트리카르발릴산(TC) 용액에 6시간 동안 침지시켰다. 이러한 단계에서, 이전에 흡착된 PEI 층의 NH기 및 TC의 카르복실기 사이에 수소 결합이 발생하여 PEI 층이 더욱 안정화되고 후속 LbL 어셈블리를 위한 추가 기능기를 도입하였다. 마지막으로, 웨이퍼를 탈이온수로 다시 린스하여 느슨하게 결합된 TC를 제거한 다음 공기 흐름으로 건조하였다. 이러한 공정을 통해 깨끗하고 기능화된 Au-Si 웨이퍼 표면을 생성하였고, BFC 음극(anode) 제조의 다음 단계에서 산화환원 활성 단백질 및 효소의 어셈블리를 위해 준비하였다.

【0078】 n-FGOx 다층 필름의 제조

【0079】 양이온화된 페리틴 및 GOx의 다층 필름은 스핀 보조 LbL 어셈블리 기술을 사용하여 전처리된 Au-Si 웨이퍼에 구성되었다. 먼저, 양이온화된 페리틴 용액을 기판 상에 떨어뜨리고 회전시켜 재료를 고르게 분산시켰으며, 얇고 균일한 페리틴 층을 형성하였다. 그다음, GOx 층을 동일한 드롭 및 스핀 공정으로 페리틴 코팅된 기판에 증착시켜 (양이온화된 페리틴/GOx)₁ 이중층을 형성하였다. 이러한 공정은 원하는 수의 다층을 형성하기 위해 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30회 반복하였다. 각 스핀 LbL 사이클은 양이온화된 페리틴 또는 GOx가 포함된 용액을 정확하게 적용한 다음, 웨이퍼를 회전시켜 정전기적 상호 작용 및 수소 결합을 통해 각 층의 균

일한 확산 및 접착을 보장하였다. GOx 용액에서 NaCl 농도는 증착 거동을 조절하기 위해 최적화하였다. UV-vis 분광법은 NaCl 농도를 0에서 0.5mmol L⁻¹로 증가시키면 10-FGOx 다층 필름의 277nm에서 흡광도가 향상되어 다층 내에 활성 물질의 로딩이 보다 높음을 나타내었다. 이는 NaCl이 흡착 용액의 이온 강도를 조절할 수 있으며, 이는 다층의 증착 거동 및 형태에 모두 영향을 미친다는 것을 시사하였다. 이러한 공정은 고도로 정렬된 다층 구조를 생성하며, 산화환원 활성 페리틴 및 효소 GOx 층의 교대 증착을 신중하게 제어하여 BFC 응용 분야에서 최적의 전자 전달 효율을 보장하였다.

【0081】 슬러리 캐스트 FGOx 음극의 제조

【0082】 종래 슬러리 캐스트 FGOx를 제조하기 위해, 효소, 산화환원 매개체 및 가교제를 균일하게 혼합하였고, 성분이 침전되지 않고 용액에 남아 있도록 하였다. 음극 촉매는 GOx(41중량%), 양이온화된 페리틴(52중량%) 및 폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르(PEGDGE, 7중량%)의 가교 부가물로부터 제조하였다. 가교제의 최적 농도 선택은 이전 연구에 자세히 설명된 바와 같이, BFC 전극의 전류 밀도 및 장기 안정성 모두에 대한 포괄적인 평가를 기반으로 하였다. 이러한 최적화 공정은 효과적인 가교 및 효소 유지를 촉진하기 위해 24시간 동안 4℃의 제어된 온도에서 수행하였다.

【0084】 특성화

【0085】 n-FGOx 다층 Au-Si 웨이퍼 전극의 표면 및 단면 형태는 전계 방출 주사 전자 현미경(FE-SEM, Hitachi S4800, 일본)을 사용하여 분석하여 다층 구조 및 그 균일성에 대한 자세한 이미지를 제공하였다. LbL 증착 공정 중 n-FGOx 다층의 성장 거동은 UV-vis 분광법(Lambda 365+, Perkin Elmer) 및 석영 수정 마이크로저울(QCM, QCM 200, SRS, USA) 측정을 사용하여 조사하였다. 층당 로딩 질량(ΔM)은 Sauerbrey 방정식을 사용하여 LbL 증착 중 QCM 센서의 주파수 변화(ΔF)로부터 계산하였다:

$$\text{【0086】 } \Delta F(\text{Hz}) = -\frac{2F_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \cdot \Delta M$$

【0087】 여기서 F_0 는 공진 주파수(~5MHz), A 는 센서의 활성 영역(cm^2), ρ_q 는 석영 수정의 밀도(2.65 g cm^{-3}), μ_q 는 석영의 전단 모듈러스($2.95 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$)이다. 이러한 방정식은 다음과 같이 단순화된다:

$$\text{【0088】 } \Delta F(\text{Hz}) = -56.6 \cdot \Delta M$$

【0089】 여기서 ΔM_A 는 단위 면적당 질량(ng cm^{-2})이다.

【0091】 전기화학적 측정

【0092】 작동 전극으로 (양이온화된 페리틴/GOx)_n Au-Si 웨이퍼, Ag/AgCl 기준 전극 및 백금(Pt) 상대 전극으로 구성된 3전극 전기화학적 시스템을 사용하였다. 작동 전극을 준비하기 위해, n-FGOx 어셈블리 Au-Si 웨이퍼의 상단을

구리선에 단단히 연결하여 안정적인 전기적 접촉을 보장하였다. 순환 전압 전류법(CV) 측정은 전기화학분석기(Ivium-n-Stat, Ivium Technologies, Netherlands)를 사용하여 $-0.6\sim+0.6\text{V}$ 의 전위 범위에서 수행하였다. 전기화학 임피던스 분광법(EIS) 시험은 0.01V 의 섭동 진폭을 사용하여 $0.2\text{Hz}\sim 100\text{kHz}$ 의 주파수 범위에서 수행하였다. 임피던스의 실수(Z') 및 허수(Z'') 구성을 나타내는 결과 나이퀴스트 플롯은 Z View 소프트웨어(버전 2.8d, Scribner Associates Inc., USA)를 사용하여 분석하였다.

【0093】 모든 실험은 전기화학 셀에서 정지(교반되지 않음) 조건 하에 $36.5\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 인산 완충 식염수(PBS) 용액(20 mmol L^{-1} 의 인산 및 140 mmol L^{-1} 의 NaCl, pH 7.4) 50 mL를 사용하여 배치 모드로 수행하였다. 작동 전극(음극)과 상대 전극(양극) 사이 거리는 약 1cm로 유지하였고, 전극을 분리하는 데 멤브레인을 사용하지 않았다. 이러한 설정은 BFC 구성 간의 직접적인 상호 작용을 허용하였다.

【0095】 Warburg 임피던스 계수 플롯

【0096】 각 곡선의 기울기는 Warburg 임피던스 계수(σ_w)를 나타내며, 이는 다음 방정식을 적용하여 저주파 영역의 임피던스 스펙트럼에서 결정할 수 있었다:

$$\text{【0097】 } Z' = R_s + R_{ct} + \sigma_w \omega^{-0.5},$$

【0098】 여기서 R_s 는 등가 직렬 저항(ESR), R_{ct} 는 전하 전달 저항, ω 는 각 주파수이다.

【0099】 상기 Warburg 계수(σ_w)는 시스템에서 이온 확산 한계를 반영하며, 그 값은 저주파 영역의 플롯의 선형 영역에서 추출할 수 있었다.

【0101】 실시예 1: 다층 n-FGOx 복합 필름의 제작

【0102】 생체의학적 응용 분야에 적합한 포유류의 생리적 조건을 고려하여, 전극 제작 및 전기 화학적 시험을 포함한 모든 공정은 pH 7.4 및 온도 36.5°C에서 수행되었다. 이러한 조건 하에, 등전점이 4.3 내지 4.8 사이인 GOx는 음전하를 띠었다. 본 발명의 핵심 측면은 페리틴 분자를 효율적인 전자 전달을 용이하게 하는 산화환원 활성 매개체로 사용할 뿐만 아니라 종래 절연성 폴리머 바인더 필요 없이 구조적 무결성을 유지하는 링커로 사용하는 것이었다. 이를 달성하기 위해, 페리틴은 생리적 pH에서 양전하를 부여하는 N,N-디메틸-1,3-프로판디아민(DMPA)과 결합하여 기능화되었다. 그다음, 양이온화된 페리틴을 정전기적 인력 기반 스핀 어셈블리 공정을 사용하여 음전하 GOx 분자와 LbL 어셈블리하였다. 이러한 LbL 공정은 다층 복합 박막의 형성을 정밀하게 제어하여 각 구성의 균질한 통합을 보장하였다.

【0103】 UV-vis 분광법 및 석영 수정 마이크로저울(QCM) 측정을 사용하여 페리틴/GOx 다층(즉, n-FGOx)의 증착 거동을 정성적 및 정량적으로 분석하였다. 페리틴 및 GOx의 특징적인 UV-vis 스펙트럼은 페리틴의 수화 산화철 및 GOx의 플라빈기로 인해 거의 중첩되므로, 277nm에서 흡수 강도의 변화를 관찰하여 필름 성장을 모니터링하였다(도 2a). 피크 강도는 n-FGOx 다층의 이중층 수가 1에서 10으로 증가함

에 따라 규칙적으로 증가하였고, 복합 필름 내에서 각 구성의 통합에 대한 정확한 제어를 나타내었다. LbL 공정 중 각 층의 정확한 증착은 페리틴의 경우 $0.37 \pm 0.04 \mu\text{g cm}^{-2}$ 및 GO_x의 경우 $0.05 \pm 0.01 \mu\text{g cm}^{-2}$ 의 로딩량을 보여주는 QCM 측정을 통해 추가로 검증되었다(도 2b).

【0104】 n-FGO_x 다층 필름의 두께는 이중층 수에 따라 선형적으로 증가하여, 전계 방출 주사 전자 현미경(FE-SEM) 측정에 근거하여, 30개 이중층(즉, 30-FGO_x)의 경우 약 77nm에 도달하였다(도 2c). 이 경우, 각 이중층의 평균 두께는 약 2.5nm로 추정할 수 있으며, 이는 페리틴 분자의 일반적인 직경인 약 12nm보다 상당히 작았다. 이는 n-FGO_x 복합 필름이 단순한 층상 구조가 아닌 혼합 구조를 가지고 있으며, 이는 전방향 3차원(3D) 전자 호핑 네트워크의 형성에 보다 유리하다는 것을 나타내었다. 또한, 형성된 30-FGO_x 필름의 원소 매핑 이미지는 모든 구성이 눈에 띄는 응집이나 분리 없이 균일하게 분포되어 있음을 명확히 보여주었다(도 2d). 특히, 스핀 LbL 어셈블리는 구심력 및 공기 전단력으로 인해 매끄러운 표면 형태 및 컴팩트 필름 밀도(0.67 g cm^{-3})를 생성하였고, 효율적인 전자 전달 속도 및 높은 반응성을 촉진하였다. 이러한 구조적 특성으로 인해 FGO_x 필름은 다양한 웨어러블 및 이식형 나노 및 마이크로 의료 기기에 적합하였다.

【0106】 실시예 2: n-FGO_x 복합 필름의 전기화학적 특성

【0107】 순환 전압 전류법(CV)을 사용하여 300mmol L^{-1} 의 포도당이 존재하는 불소 도핑된 산화주석(FTO) 전극에 고정된 양이온화된 페리틴의 전기화학적 거동을 $1\sim 200\text{ mV s}^{-1}$ 의 스캔 속도에서 평가하였다(도 3a). 전압 전류 그래프는 페리틴 코어 내 철 착물(페리하이드라이트)의 산화환원 반응으로부터 유래된 잘 정의된 산화 및 환원 피크를 보여주며, 포도당에 대한 매우 가역적인 전기화학적 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 페리틴이 BFC 시스템 내에서 전자 전달을 효과적으로 매개할 수 있음을 시사하였다. 스캔 속도가 증가함에 따라, 음극(-0.17 V 중심) 및 양극(-0.41 V 및 -0.56 V 사이) 피크와 관련된 전류 밀도가 비례적으로 증가하여, 전기화학적 반응이 표면 산화환원 제어 프로세스임을 나타내었다(도 3b 및 3c). 보다 높은 스캔 속도에서 산화-환원 갭(ΔE_p)이 넓어지는 것은 운동 과전압이 증가하고 전자 전달 속도가 빨라지는데 기인할 수 있었다(도 3d).

【0108】 이러한 결과에 근거하여, CV 및 전기화학 임피던스 분광법(EIS)을 통해 n-FGOx 복합 필름의 전기화학적 특성을 조사하였다. 도 4는 인산 완충 식염수(PBS) 용액에서 0 내지 300 mmol L^{-1} 의 다양한 포도당 농도에서 n-FGOx의 이중층 수에 따른 CV 프로파일 및 대응되는 나이퀴스트 플롯을 보여주었다. 이중층 수 및 포도당 농도가 증가함에 따라, 응답 전류 밀도는 정기적으로 증가하여 30-FGOx 전극의 경우 300 mmol L^{-1} 에서 $40\text{ }\mu\text{A cm}^{-2}$ 의 가장 높은 값에 도달하였다(도 4a, c, e). n-FGOx의 이러한 향상된 촉매 활성은 이중층 수(n)가 증가함에 따라 효소 로딩이 보다 높아진 데 기인할 수 있으며, 이는 효율적인 포도당 상호작용 및 전자 전달을 위한 보다 큰 활성 표면적을 초래하였다. n-FGOx 전극의 내부 저항은 효소(예컨대,

GOx)의 절연 특성으로 인해 이중층 수가 증가함에 따라 증가하는 경향이 있지만(도 4b, d 및 f), 전극 구성이 균일하게 분포된 박막 구조는 전기화학적 스위칭 중 전자 전달 동역학을 극복하는 데 매우 유리하다는 점에 주목할 가치가 있었다. 예를 들어, 30-FGOx 음극의 경우, 가장 작은 반원이 300 mmol L⁻¹의 포도당에서 관찰되었는데, 이는 전극이 이러한 조건 하에, 심지어, 가장 높은 출력 전류 밀도에서도 가장 효율적인 전자 전달을 보인다는 것을 시사하였다. 보다 높은 농도에서 향상된 포도당 산화는 다층 구조 때문일 가능성이 높으며, 이는 보다 많은 활성 부위를 제공하고 효소 및 전극 사이의 빠른 전자 전달을 용이하게 하였다. 특히, GOx/GOx 및/또는 GOx/호스트 전극 계면을 연결하는 균일하게 통합되고 양이온화된 페리틴은 전극 내에서 효율적인 전자 흐름을 위한 지속적이고 강력한 경로를 생성하여 전통적인 바이오 음극 설계에서 일반적으로 관찰되는 잠재적 손실을 크게 최소화하였다.

【0109】 또한, 안정한 철 착물 코어(Fe^{III}/Fe^{II})의 가역적 산화환원 반응으로부터 유래하는 페리틴의 전기화학적 활성은 GOx 기반 음극 전극의 전체 전류 출력에 기여할 수 있었다. 이를 입증하기 위해, PBS에서 포도당 부재 하에 n-FGOx 음극의 전기화학적 거동을 시험하였다. 페리틴 분자 자체에는 일반적으로 포도당과 상호 작용하는 활성 부위나 작용기가 없기 때문에 이러한 시스템의 전류 응답은 페리틴의 기여만을 반영하였다. CV는 n-FGOx 음극의 전류 밀도가 이중층 수의 증가에 따라 정기적으로 증가함을 보여주며, 이는 페리틴의 존재가 n-FGOx 음극의 전기화학적 활성을 향상시킨다는 것을 나타내었다.

【0111】 실시예 3: 다층 증착 거동 및 전류 출력의 상관 관계

【0112】 일반적으로, 전극의 표면 형태는 전기화학 시스템의 출력 성능에 상당한 영향을 미쳤다. 구체적으로, 전극 표면의 매끄럽고 잘 덮인 활성 층은 높은 연료 농도에서도 낮은 과전압으로 보다 효율적인 에너지 변환을 가능하게 하였다.

【0113】 도 5a는 0.6V에서 서로 다른 이중층 수를 갖는 n-FGOx 음극에 대한 전류 밀도 및 포도당 농도(0-300 mmol L⁻¹) 간의 관계를 보여주었다. 결과에 따르면, 이중층 수를 늘리면 전류 밀도가 증가하여 포도당 산화 과정이 향상되었다. 10 및 20-FGOx 음극의 경우, 전류 밀도는 포도당 농도에 따라 점진적으로 증가하였지만, 각각 300 mmol L⁻¹에서 약 8 $\mu\text{A cm}^{-2}$ 및 13 $\mu\text{A cm}^{-2}$ 에서 비교적 낮은 전류 평탄점에 도달하였다. 대조적으로, 30-FGOx 음극은 동일한 포도당 농도에서 약 37 $\mu\text{A cm}^{-2}$ 에 도달하여 상당히 향상된 전류 밀도를 보여, 낮은 이중층 어셈블리에 비해 보다 나은 촉매 성능을 나타내었다. 전기화학적 향상은 보다 높은 효소 고정화에 기인할 수 있으며, 이는 포도당 분자에 대한 보다 나은 접근성과 향상된 전자 전달 동역학을 보장하였다. 이러한 현상은 물에서 희석된 하전된 물질의 정전기적 상호 작용 유도 LbL 어셈블리의 다른 증착 거동으로 설명할 수 있었다.

【0114】 앞서 언급한 바와 같이, 이중층 당 평균 두께는 페리틴 분자의 직경이 ~12 nm인 것과 비교해도, 매우 얇았다(약 2.5 nm). 이는 동일하게 하전된 구성 간의 정전기적 반발로 인해 표면 피복이 충분하지 않기 때문이었다. 따라서, LbL 어셈블리가 눈에 띄는 표면 응집 없이 전극 구성의 균일한 분포를 보장하지만(도 5b), 증착 공정으로 인한 표면 피복의 품질은 성능에 상당한 영향을 미칠 수 있었

다. 구체적으로, 10개 및 20개 이중층의 경우에서 볼 수 있듯이, 전극 상에 FGOx 층의 표면 피복이 충분하지 않으면 활성 부위 및/또는 매개체의 수가 제한되어 효율적인 전자 전달이 방해받고 상대적으로 낮은 전류 밀도로 이어질 수 있었다. 반면, 30-FGOx 음극은 페리틴 및 GOx의 보다 조밀하고 연속적인 층을 가질 수 있어, 보다 나은 표면 피복 및 보다 상호 연결된 산화환원 활성 센터 네트워크를 보장하였다. 또한, 잘 정렬된 나노구조는 전극의 전자 전달 용량을 향상시켜 보다 높은 포도당 농도에서 최대 전위를 증가시켰다. 특히, 30-FGOx 음극의 총 전류 밀도가 지속적으로 증가하는 현상은 효소의 양이 증가함에 따라 포도당 산화 속도가 향상되는 Michaelis-Menten 동역학과 잘 일치하였다. 즉, 충분한 표면 피복이 있는 30-FGOx 음극은 보다 빠르고 효율적인 촉매 회전을 용이하게 하여 높은 포도당 농도에서 보다 높은 최대 전류 밀도를 허용할 가능성이 있었다.

【0115】 표면 형태가 성능에 미치는 영향을 추가 입증하기 위해, 다양한 포도당 농도(0, 10, 50, 100 및 300 mmol L⁻¹)에서 LbL 어셈블리 및 종래 슬러리 캐스팅 공정으로 제조한 FGOx 음극의 전기화학적 반응을 조사하였다. LbL 어셈블리 30-FGOx 음극은 가장 높은 포도당 농도인 300 mmol L⁻¹에서 거의 40 $\mu\text{A cm}^{-2}$ 의 가장 높은 전류 밀도를 나타내었다(도 6a). 그러나, 슬러리 캐스트 FGOx 음극은 각 전극 구성의 유사한 로딩량에도 불구하고, 동일한 포도당 농도에서 약 18.7 $\mu\text{A cm}^{-2}$ 의 상당히 낮은 전류 밀도를 나타내었다(도 6b). 이러한 관찰 결과는 간단한 기계적 혼합 공정으로 인해 전극 내 구성(예컨대, 페리틴 및 GOx) 간의 상호 작용이 충분하지 않아 균일성이 떨어지고 바람직하지 않은 재료 응집이 발생할 수 있음을 분명히

보여주었다. 따라서, 이는 활성 표면적이 낮아지고 궁극적으로 계면에서 효과적인 전자 전달을 방해하였다.

【0116】 중요하게, 전극/전해질 계면에서 전하 확산 특성도 FGOx 음극의 구조적 특징에 의해 상당한 영향을 받는다는 것이었다. 기본적으로, 전해질에서 포도당 분자가 음극으로 쉽게 확산되는 것은 효율적인 에너지 변환을 위한 중요한 요소 중 하나였다. 포도당의 경우, 다중 히드록시기(-OH)는 양이온화된 페리틴에 대한 높은 친화성을 가지고 있으며, 특히, DMPA의 -NH 기와 수소 결합 상호작용을 형성하였다. 따라서, LbL 어셈블리 30-FGOx 음극 내의 균일하게 분포된 페리틴 분자는 음극 표면에서 내부로 포도당 확산을 위한 효과적인 경로 역할을 하여 계면 저항을 크게 줄일 수 있었다. 그러나, FGOx 슬러리의 부분 응집 문제는 포도당과 음전하를 띤 GOx 분자 사이의 정전기적 반발로 인해 더 높은 계면 저항을 초래할 수 있으며, 이는 전극/전해질 계면에서 이온 확산 속도론이 저하되는 결과를 초래하였다. 이를 확인하기 위해, 대표적인 등가 회로에 대한 적합성에서 각 음극에 대한 나이퀴스트 플롯을 얻었다(도 6c-e). 이 경우, 각 음극의 Warburg 선은 포도당 농도가 증가함에 따라 더욱 기울어졌는데, 이는 음극 표면에서 농도 구배가 형성되어 나타나는 전형적인 거동이었다. 그러나, LbL 어셈블리 30-FGOx 음극(Warburg 임피던스 계수 $\sim 273.5 \Omega s^{-0.5}$)은 슬러리 캐스트 음극(Warburg 임피던스 계수 $\sim 173.6 \Omega s^{-0.5}$)보다 훨씬 더 나은 이온 확산 속도를 보였고, 이는 잘 정의된 상호 작용을 갖는 양이온화된 페리틴 및 GOx의 LbL 어셈블리가 효율적인 전하 전달 네트워크 형성을 위한 최적 구조적 특징을 생성한다는 것을 나타내었다. 또한, 30-FGOx 음극은 슬러리 캐

스트 음극(~41 Hz)에 비해 ~59 Hz의 더 높은 무릎 주파수를 보였으며, 이는 전기화학적 작동 중 우수한 물질 전달 특성을 더욱 잘 보여주었다(도 6f).

【0117】

【0118】 실시예 4: n-FGOx 음극의 작동 안정성

【0119】 장기 안정성은 BFC의 실제 구현에서, 특히, 이식형 의료 기기 또는 환경 센서와 같은 연속적 응용 분야에서 중요한 요소이다. n-FGOx 음극의 안정성을 평가하기 위해, 10mmol L⁻¹의 포도당 존재 하에 50시간 크로노암페로메트리 시험을 수행하였다(도 7a). 도 7b에 나타난 바와 같이, 30-FGOx 음극의 전류 밀도는 시간이 지남에 따라 점차 감소했지만, 50시간 연속 작동 후 초기 전류 밀도의 85%를 유지했으며, 이는 최종 전류 밀도 7.8 $\mu\text{A cm}^{-2}$ 에 해당하였다. 이러한 경우, 30-FGOx 음극은 연장된 전기화학적 작동 후 활성층의 부식이나 박리와 같은 눈에 띄는 표면 변화를 보이지 않아 물리적 안정성이 양호함을 나타내었다(도 7a의 삽입). 반면, 슬러리 캐스트 FGOx 음극은 50시간 후 초기 값의 49%(4.0 $\mu\text{A cm}^{-2}$)만 유지하여, 작동 안정성이 좋지 않음을 나타내었다. 슬러리 캐스트 음극에 비해 LbL 어셈블리 30-FGOx 음극의 우수한 전기화학적 유지 안정성은 전극 구성의 균일한 분포로 구조적 무결성을 명확히 보여주었다. 즉, 양전하 페리틴 분자는 음전하 GOx 효소와 안정적인 정전기적 상호 작용을 형성하여 잘 정렬되고 내구성 있는 필름을 형성하였다. 또한, 페리틴 셸은 산화환원 활성 철 코어를 분해로부터 보호하는 반면, 생체 적합성 및 전기활성 특성은 안정성을 손상시키지 않으면서 전자 전달 효율을 향상시켰다.

【0120】 BFC 음극에서 장기 안정성에 대한 필요성은 과장할 수 없었다. 에너지 변환을 위해 효소 반응에 의존하는 장치는 높은 초기 촉매 활성뿐만 아니라, 지속적인 사용에 적합하도록 시간이 지남에 따라 지속적인 성능이 필요하였다. FGOx 음극에 대한 안정성 결과는 양이온화된 페리틴 기반 바이오 음극이 연장된 시간 동안 높은 수준의 효소 활성 및 전자 전달을 유지할 수 있음을 시사하여, 실제 BFC 응용 분야에 적합하였다.

【0122】 본 발명은 정전기 스핀 보조 LbL 어셈블리를 통해 n-FGOx 복합 필름을 성공적으로 제작하였음을 보여주었다. LbL 어셈블리된 n-FGOx는 바이오전자 응용 분야에서, 특히, BFC의 바이오 음극으로서 상당한 잠재력을 보여주었다. 양이온화된 페리틴 및 GOx의 균일한 통합은 UV-vis 분광법, QCM 및 단면 FE-SEM을 이용한 세부적인 특성화를 통해 확인되었다. 이러한 기술은 일관되게 균일한 분포를 보여 복합 필름의 구조적 무결성 및 균일성을 보장하였다.

【0123】 LbL 어셈블리 공정의 정확한 제어는 이중층의 수에 따른 필름 두께의 선형적 증가로 입증되었으며, 30개 이중층에서 약 77nm에 도달하였다. 이러한 예측 가능한 성장은 다층 필름의 재현가능한 구성을 가능하게 하며, 이는 실용적인 응용 분야에 매우 중요하였다. 전기화학적 평가 결과, 30개 이중층이 있는 전극은 주로 효율적인 산화환원 매개체로서 양이온화된 페리틴의 역할로 인해 최적 성능을 보였다. 추가 이중층에 따른 전류 밀도의 증가는 페리틴의 향상된 산화환원 활성이 추가 층으로 인해 약간의 저항 증가보다 더 크다는 것을 보여주었다. 또한, 양이온

화 페리틴은 포도당 농도가 증가함에 따라 선형적으로 반응하는 것으로 나타나 산화환원 매개체로서 효율성이 강조되었으며, 바이오센싱 기술에의 적용 가능성을 확인하였다. 음극에서 준 가역적이고 표면 제어되는 전자 전달 과정은 음극 피크 전류 및 스캔 속도 사이의 선형 관계에서 입증되었고, 페리틴이 효율적인 전자 전달을 촉진하는데 효과적임을 강화하였다. 또한, 다층 음극 구조는 우수한 안정성을 입증하였고, 포도당 용액에 6시간 노출된 후에도 초기 활동의 85%를 유지하였다. 이러한 내구성은 지속적인 성능이 필수적인 실제 바이오 전자 장치에서 장기 사용하는데 중요하였다.

【0125】 요약하면, 본 발명은 바이오 전자 장치를 위한 유망한 산화환원 매개체로서 양이온화된 페리틴의 혁신적인 사용을 확립하였다. 양이온화된 페리틴 및 효소 간의 정전기적 상호 작용은 향상된 전자 전달 특성을 가진 견고한 다층 필름의 구축을 가능하게 하였다. 이러한 발견은 효율적이고 안정적인 바이오 음극 구조의 개발을 위한 강력한 기반을 제공하며, BFC 기술 및 바이오센서 설계에서 상당한 진전을 나타내었다. 페리틴의 고유한 산화환원 특성을 활용하는 것은 고성능, 내구성 있는 바이오 전자 시스템에 대한 탐구에서 우수한 진전을 나타내었다.

【0127】 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을

것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예는 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

【청구범위】

【청구항 1】

지지체; 및

상기 지지체 상에 형성되고, 양이온화된 페리틴 및 효소를 포함하는 효소층 어셈블리가 반복된 복합구조를 포함하는, 전자전달 능력이 향상된 전극.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 지지체는 표면이 카르복실기로 기능화된 지지체인 것을 특징으로 하는, 전자전달 능력이 향상된 전극.

【청구항 3】

제2항에 있어서,

상기 지지체는 표면이 카르복실기로 기능화된 평판형 전도성 지지체인 것을 특징으로 하는, 전자전달 능력이 향상된 전극.

【청구항 4】

제1항에 있어서,

상기 양이온화된 페리틴은 양이온성 아민기로 기능화된 페리틴인 것을 특징

으로 하는, 전자전달 능력이 향상된 전극.

【청구항 5】

제1항에 있어서,

상기 효소는 글루코스 옥시다아제인 것을 특징으로 하는, 전자전달 능력이 향상된 전극.

【청구항 6】

제1항에 있어서,

상기 지지체 및 상기 양이온화된 페리틴과, 상기 양이온화된 페리틴 및 상기 효소는 각각 정전기적 인력을 통해 결합되는 것을 특징으로 하는, 전자전달 능력이 향상된 전극.

【청구항 7】

제1항에 있어서,

상기 효소층 어셈블리는 5회 내지 50회 반복되고, 총 두께는 40 nm 내지 100 nm인 것을 특징으로 하는, 전자전달 능력이 향상된 전극.

【청구항 8】

(a) 지지체를 준비하는 단계; 및

(b) 상기 지지체 상에 양이온화된 페리틴 및 효소를 포함하는 효소층 어셈블리가 반복된 복합구조를 형성하는 단계를 포함하는, 전자전달 능력이 향상된 전극의 제조방법.

【청구항 9】

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 전극을 포함하는 바이오 연료전지.

【청구항 10】

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 전극을 포함하는 바이오 센서.

【요약서】**【요약】**

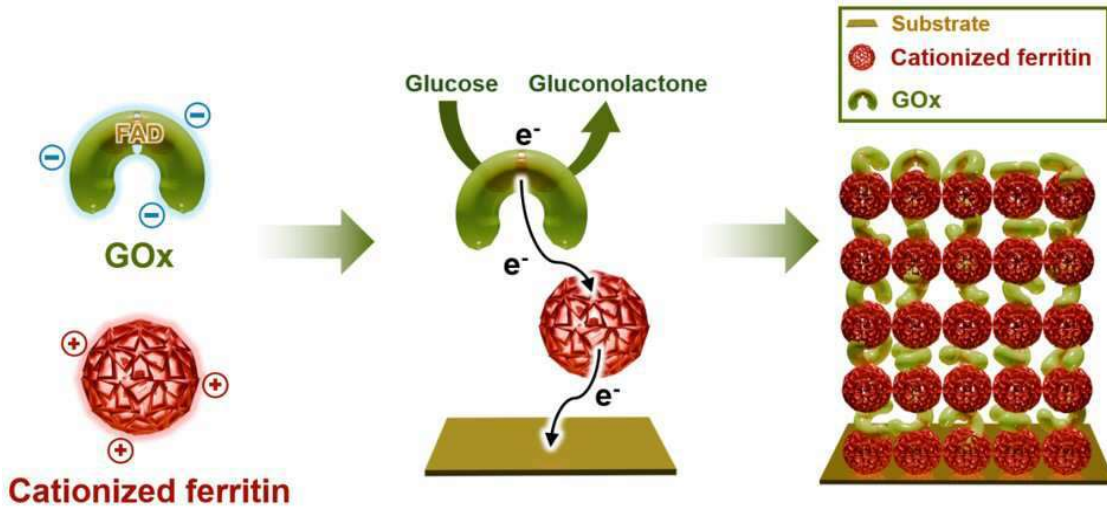
본 발명은 지지체; 및 상기 지지체 상에 형성되고, 양이온화된 페리틴 및 효소를 포함하는 효소층 어셈블리가 반복된 복합구조를 포함하는, 전자전달 능력이 향상된 전극, 그 제조방법 및 그 응용에 관한 것이다.

【대표도】

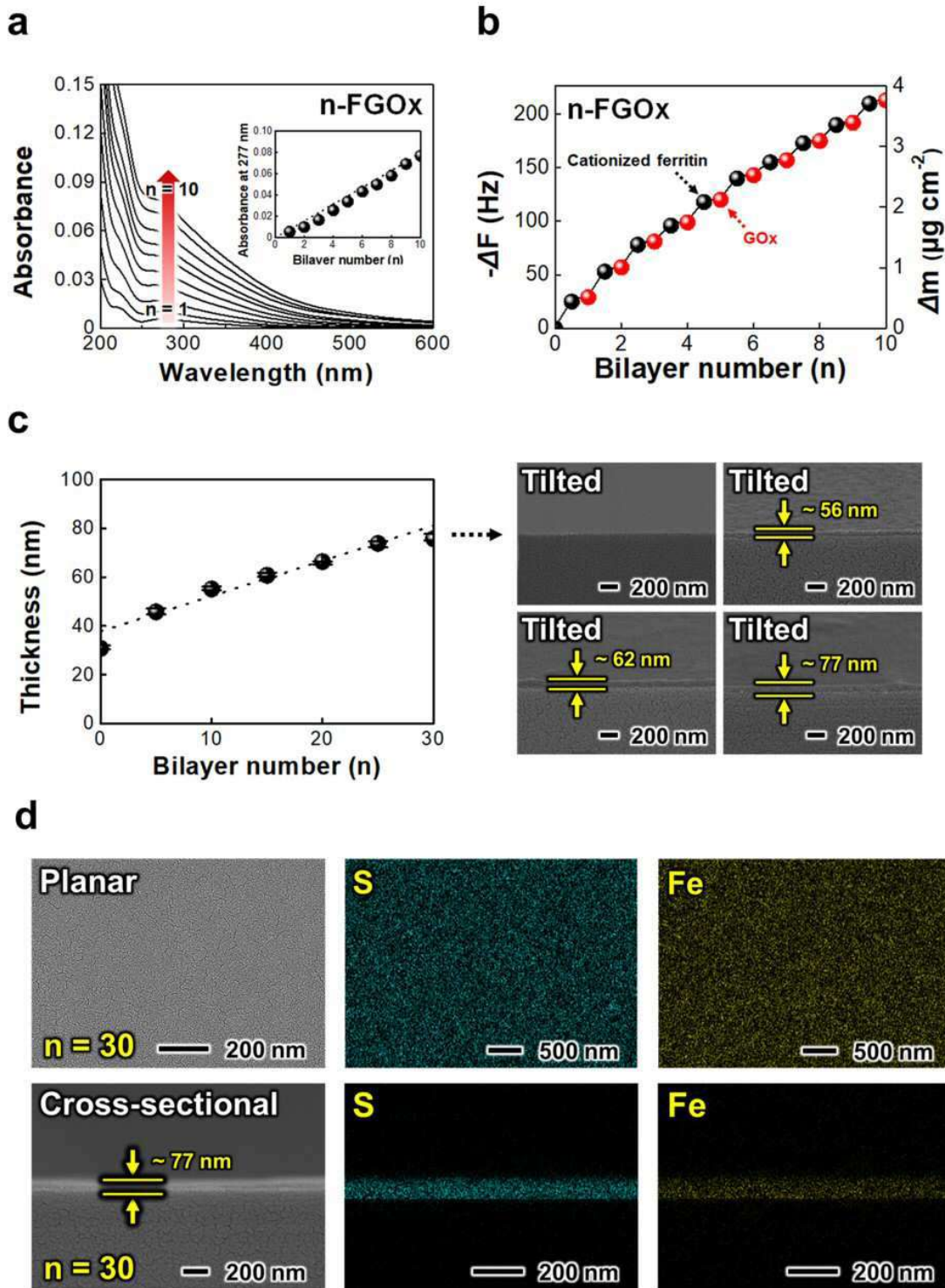
도 1

【도면】

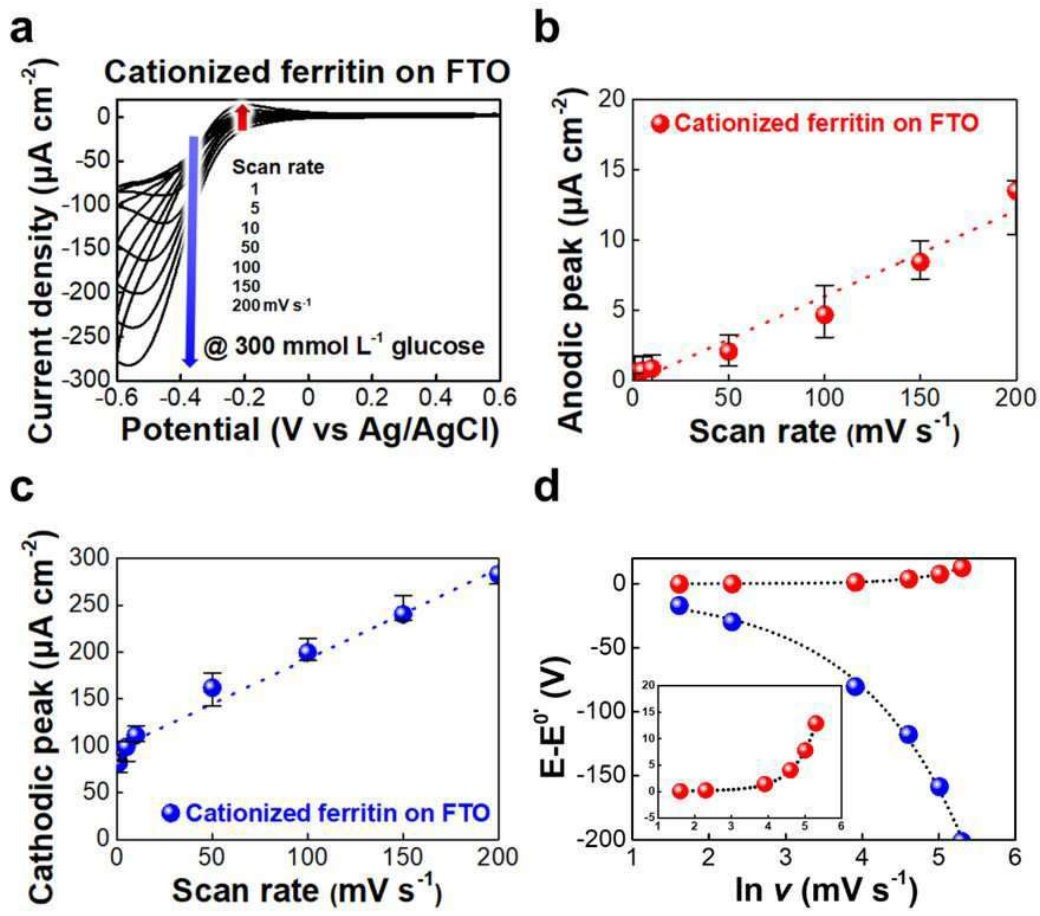
【도 1】



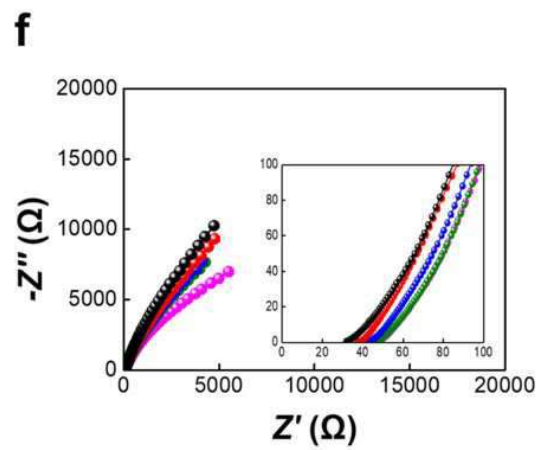
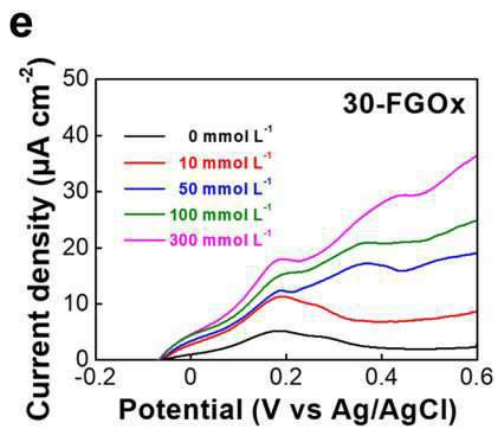
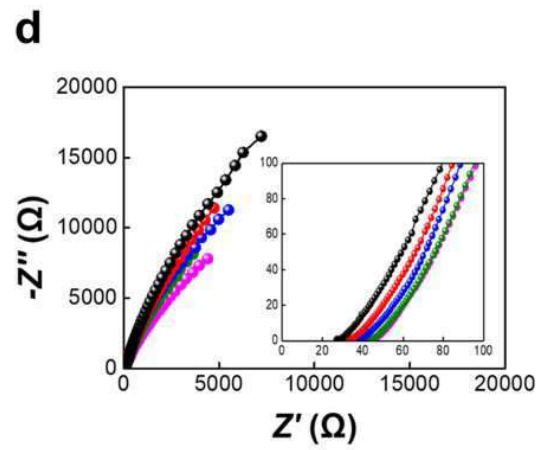
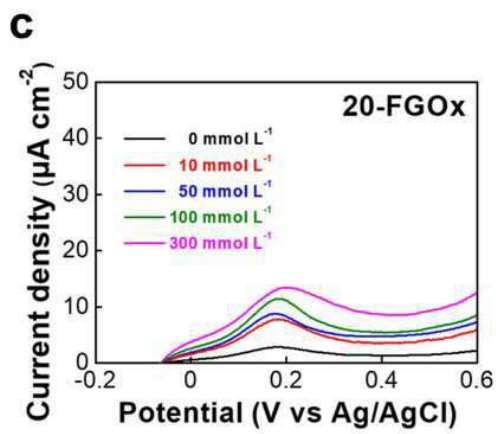
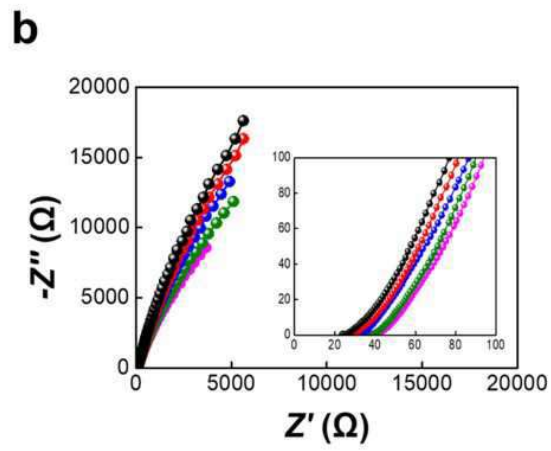
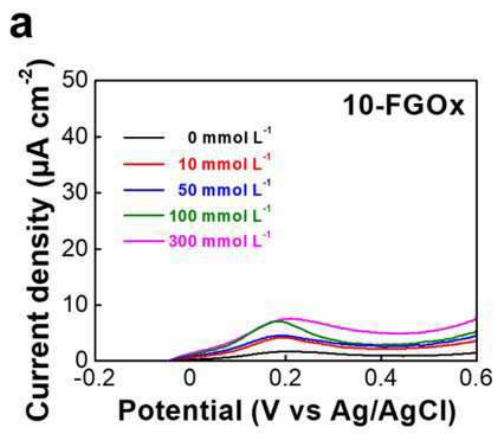
【도 2】



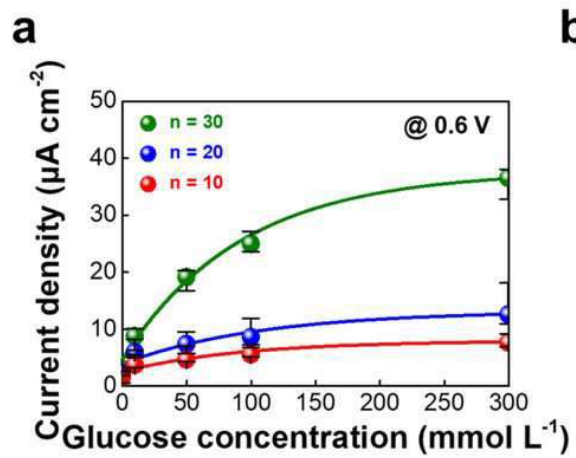
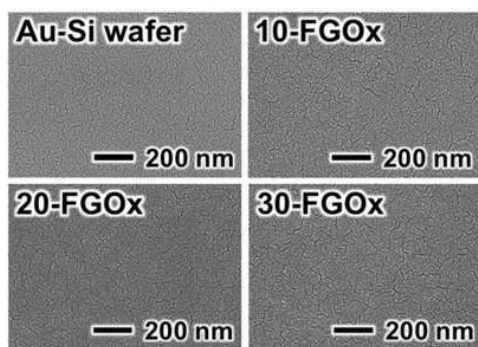
【E 3】



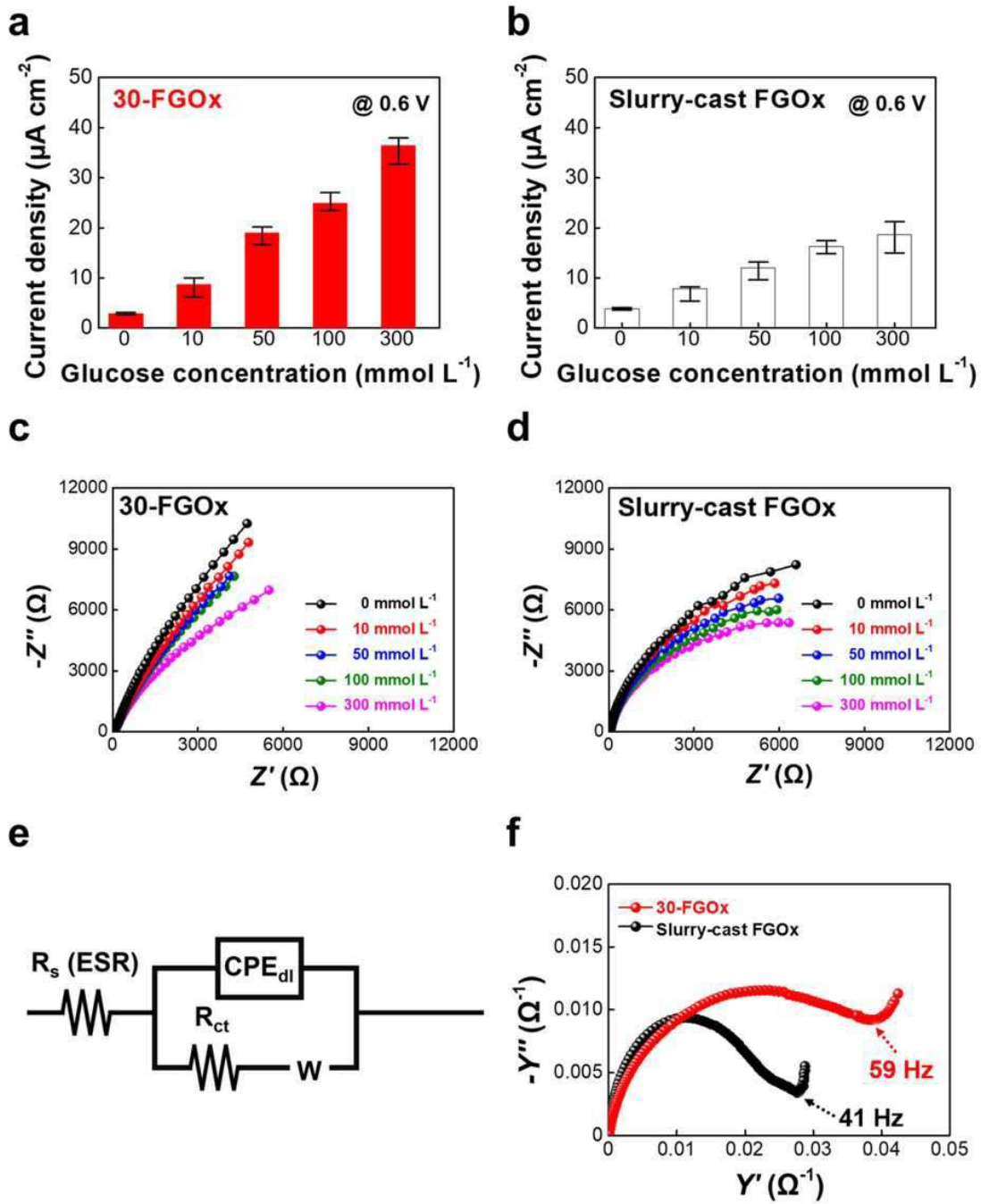
【F 4】



【图 5】

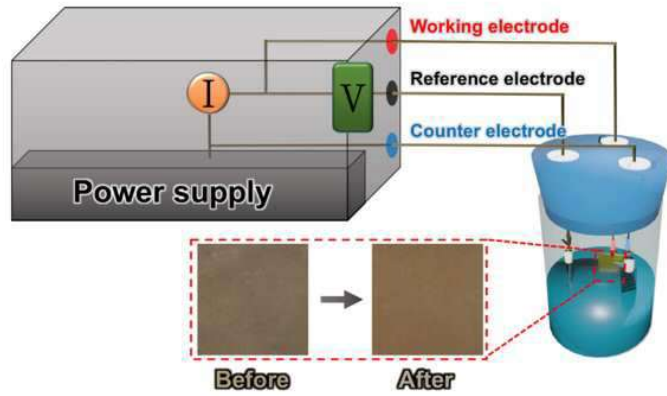
**b**

【도 6】



【도 7】

a



b

