

Anthracene dicarboxyl acid 가교제를 활용한 효소연료전지의 산화극의 포도당 산화반응 향상

현규환 · 지정연 · 권용재[†]

서울과학기술대학교 에너지환경대학원
01811 서울특별시 노원구 공릉로 232
(2018년 9월 13일 접수, 2018년 11월 6일 수정본 접수, 2018년 11월 27일 채택)

Enhancement of Glucose Oxidation Reaction in Enzyme Biofuel Cell Utilizing Anthracene Dicarboxyl acid Cross-linker

Kyuhwan Hyun, Jungyeon Ji and Yongchai Kwon[†]

Graduate School of Energy and Environment, Seoul National University of Science and Technology,
232, Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul, 01811, Korea

(Received 13 September 2018; Received in revised form 6 November 2018; accepted 27 November 2018)

요 약

본 연구에서는 효소연료전지의 율속 반응인 산화극의 효소반응 강화 및 효소 담지량을 증가시키기 위하여 안트라센 가교제를 도입하였다. CNT/PEI 담지체에 가교 처리된 글루코오스 산화효소(GOx)를 전기적인 극성을 이용하여 결합시켰다(AC[CNT/PEI/GOx]). 본 촉매의 성능을 확인하기 위하여 전기화학 평가가 수행되었으며, 성능 비교를 위해 가교제 처리를 하지 않은 CNT/PEI/GOx 촉매도 같이 전기화학 테스트를 진행하였다. 전기화학적 특성 평가들을 통해 글루코오스 산화효소 담지량이 증가한 것을 확인하였으며, 라인위버-버크 방정식 통해 AC[CNT/PEI/GOx] ($K_m : 0.73 \text{ mM}$)가 가교제 처리를 하지 않은 CNT/PEI/GOx ($K_m : 1.71 \text{ mM}$) 보다 우수한 성능을 지닌 것을 확인했다. 또한, 완전지 성능 평가 결과 최대 전력 밀도(Maximum power density, MPD)도 상승($21.2 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 에서 $72.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$)로한 것을 볼 수 있었는데 이를 통해 글루코오스 산화효소 담지량 및 전자전달능력이 향상되었다는 것을 재확인 하였다.

Abstract – In this study, an anthracene cross-linker is introduced to enhance the catalytic activity of glucose oxidase (GOx) based catalysts and to increase the amount of enzyme loading. The crosslinked GOx is bonded with the CNT/PEI support using the electrostatic interaction (AC[CNT/PEI/GOx]). Electrochemical evaluations are done to evaluate the performance of this catalyst and the performance of CNT/PEI/GOx catalyst is also measured as a control. According to the measurements, it is confirmed that the amount of loaded GOx increases, while K_m value calculated by Lineweaver–Burk plot shows that AC[CNT/PEI/GOx] ($K_m : 0.73 \text{ mM}$) is superior to CNT/PEI/GOx ($K_m : 1.71 \text{ mM}$) without cross-linking reaction. Based on these effects, it is demonstrated that the maximum power density of the enzymatic biofuel cell using AC[CNT/PEI/GOx] increases from $21.2 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ to $72.4 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

Key words: Glucose oxidase, Cross linker, Enzymatic fuel cell, Glucose oxidation reaction

1. 서 론

포도당 산화효소(Glucose oxidase, GOx)는 포도당(Glucose)과 선택적으로 반응하는 효소로 저렴한 가격, 우수한 환원전위(-0.33 V vs. SHE) 때문에 바이오 연료전지 촉매로 많은 연구가 진행되고 있

다[1-3]. 특히, GOx 내부 활성인자(Co-factor)로부터 전자전달 능력 개선에 대한 연구가 주를 이루는데 GOx의 활성인자는, 펩타이드로 구성되어 있는 GOx 내부에 존재하여 전자의동이 활발하지 못하다. 이 때문에, GOx를 촉매로 사용하기 위해서는 GOx내 생성된 전자를 이동시킬 방법이 필요하다[4]. 대표적인 전자 전달 방법은 간접전자전달(Mediated Electron Transfer, MET), 직접전자전달(Direct Electron Transfer, DET)이 있다. 간접전자전달의 경우 전자전달 매개체를 활용하는 방식이다. 전자전달 매개체는 GOx의 활성인자-전극 간 전자 교환을 도와주는 물질로 약간의 과전압이 발생하지만 빠른 전자 전달 속도를 갖는다는 장점이 있고 직접전자전달의 경우, GOx의 활성인

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kwony@seoultech.ac.kr

‡이 논문은 서울과학기술대학교 김래현 교수의 정년을 기념하여 투고되었습니다. This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

자가 직접 전극으로 전자전달을 하는 방법으로 간접전자전달 대비 전류는 낮지만 낮은 과전압을 형성하여 연료전지 구동 시, 높은 개시전압(Open circuit voltage, OCV)을 가질 수 있다는 특징을 지니고 있다[4].

또한, 전자전달을 강화하기 위해서 효소 간 전자 이동경로를 만드는 것뿐만 아니라 전극에 붙어있는 효소의 절대량을 늘리는 것도 중요하다. 특히, GOx를 직접 전극에 붙이는 것은 물리적으로 한계가 존재한다[5]. 이전 연구에서 효소의 담지량을 늘리기 위해 Layer-by-Layer (LbL) 합성을 통하여 효소를 2배까지 담지 하였다. 하지만 이러한 방법도 3배 이상 쌓인 효소는 전자이동 경로가 불확실하여 전극까지 전자를 전달하지 못하는 현상이 발생되었다[3]. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법이 가교제를 활용하는 것이다. 가교제는 효소 간 연결을 통해 효소의 담지량을 늘려주고(Cross-linked enzyme aggregates, CLEA), 전극과 직접 연결되지 않은 효소도 가교제를 통해 전자 전달이 될 수 있게 전자이동 경로를 형성시켜준다[6].

본 연구에서 우리는 전자 비편제가 큰 Anthracene dicarboxyl acid (AC) 가교제를 통해 촉매에 효소 담지량을 늘려 반응 전류 확대 및 효소 간 전자전달 속도를 향상 시켜주는 연구를 진행하였다. AC를 적용한 촉매(AC[CNT/PEI/GOx])의 성능 비교를 위해 가교제를 첨가하지 않은 CNT/PEI/GOx 및 전자 비편제가 상대적으로 작은 Terephthalic acid (TC)를 가교제로 사용한 TC[CNT/PEI/GOx] 촉매와 대조실험을 진행하였으며, 전기화학 측정 및 연료전지 모사 구동을 통해 AC[CNT/PEI/GOx]의 우수성을 입증하였다.

2. 실험방법

2-1. 시약 및 기기

Multiwall Carbon nanotube (Carbon Nano - material Technology Co., Ltd.), Polyethyleneimine (PEI) (50 wt% solution in water, MW 750,000), Glucose oxidase (Sigma Aldrich G7141), glucose (Sigma Aldrich, ACS reagent) Anthracene dicarboxyl acid (Sigma Aldrich), Terephthalic acid (Sigma Aldrich), Nafion (Sigma Aldrich 70160) (기기) 삼전극 실험을 위해 정전위기(CHI 720, CH Instrument, USA)를 사용하였다. 작업 전극 Rotate Disk Electrode (AFE5T050GC, Pine, USA), 상대전극 Pt wire, 기준전극 Ag/AgCl 전극 (NaCl 3.0 M)을 사용했다.

2-2. 합성 방법

이전에 연구한 CNT/PEI에 가교제를 첨가한 GOx 용액을 반응시켜 촉매를 제조하였다.[3] Cross Linking (CL)[CNT/PEI/GOx]의 합성방법을 간단하게 요약하면 다음과 같다. CNT/PEI를 합성하기 위해 CNT 20 mg을 PEI 10 ml (2.5 mg/ml)에 넣어 준다. 이후 분산을 위해 10분간 sonication을 가해준 뒤 2시간동안 강하게 교반시켜준다. CNT와 결합하지 않거나 약하게 붙어있는 PEI를 제거하기 위해 원심분리기, 증류수를 활용해 2번 씻어준다. GOx 5 ml (5 mg/ml)에 가교제 5 ml (10 mmol)를 넣고 2시간 동안 교반시킨다. 이렇게 만들어진 AC[GOx]를 CNT/PEI에 1 ml (2.0 mg/ml)를 첨가한 후 충분히 CNT/PEI와 GOx 붙을 수 있게 2시간정도 교반시켜준다. GOx 합성 또한, 약하게 붙어있거나, 결합하지 않은 GOx를 제거하기 위해 원심분리기, 증류수를 활용해 2번 씻어준다[3].

2-3. 전기화학 측정

2-3-1. 반전지 측정

각 가교제로 만들어진 촉매의 특성 평가를 위해 삼전극 테스트를 진행하였다. 만들어진 촉매를 작업전극에 담지하여 특성 평가를 진행하였다. 제조된 촉매에 1 ml의 증류수를 넣고 피펫을 이용하여 10.0 μ l를 작업전극의 Glass carbon 위에 올려준 후 1시간 정도 다 마를 때까지 건조시킨다. 다 마른 후, 피펫을 이용해서, Nafion 용액(0.5%) 7 μ l를 작업전극 위에 추가적으로 올려준 다음 약 20분 정도 nafion 용액이 다 마를 때까지 건조시킨 후 사용하였다. 전해질은 0.01 M Phosphate 완충용액(PBS, pH 7.4)을 사용하였다. 실험 조건에 따라 공기, 질소를 주입하였다.

2-3-2. 완전지 측정

촉매의 완전지상 성능평가를 위해 반응면적 1.0 cm^2 크기의 완전지를 제작하였다. 산화극(Anode)은 탄소전극(Glass carbon electrode, GCE)을 사용했으며, 연료의 혼합을 방지하기 위해 Nafion 212 분리막을 사용하였다. 분리막의 한쪽 방향에는 1.0 cm^2 의 Pt/C 상용 촉매를 분무하여 환원극 촉매로 사용하였으며, 산화극에는, GCE에 측정하고자 하는 촉매 10 μ l을 담지 및 1시간 건조 후 산화극으로 사용하였다. 연료로는 산화극에는 공기를 50 cc/min로 주입한 30 mM의 포도당 용액(0.01 M PBS, pH 7.4), 환원극에는 산소 50 cc/min를 기체로 공급하였다.

3. 결과 및 토론

3-1. 촉매제조 및 반전지 평가

Fig. 1은 합성된 CNT/PEI/GOx 및 CL[CNT/PEI/GOx]의 개략도이며 합성은 다음과 같이 진행되었다. GOx는 단백질로 이루어진 물질로 외벽에 아민기(-NH₂)가 존재한다[3]. GOx 용액에 카복실산(-COOH)이 두 개인 가교제를 첨가해줄 경우 가교제의 카복실산과 GOx의 아민기가 펩타이드 결합을 하게 되고 가교제는 글자 그대로 GOx 사이에서 가교(架橋)역할을 하게 된다[6].

이렇게 만들어진 CL[GOx]와 PEI는 전기적인 극성 차를 통해 CL[CNT/PEI/GOx]로 합성되어진다. GOx의 등전점(Isoelectric point)은 약 5.6 부근으로 중성 전해질 조건에서 음전하를 나타내며, PEI의 등전점은 10.4정도로 중성 전해질 조건에서 양전하를 나타내기 때문이다[3,4].

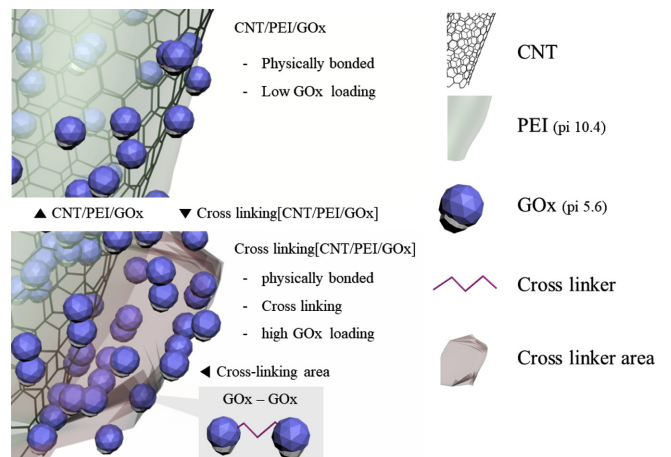


Fig. 1. Schematics showing the chemical structure of CNT/PEI/GOx and CL[CNT/PEI/GOx] catalysts.

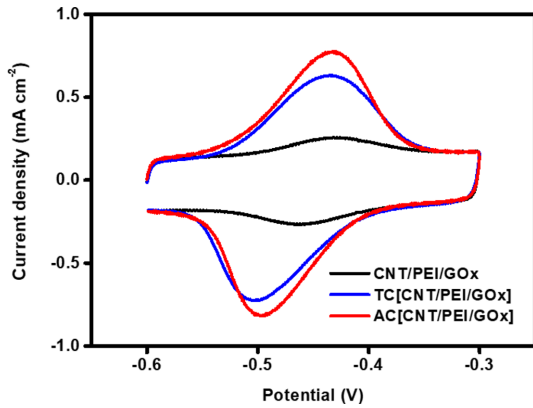


Fig. 2. Cyclic voltammograms of CNT/PEI/GOx, TC[CNT/PEI/GOx] and AC[CNT/PEI/GOx]. For the tests, 0.01 M PBS (pH 7.4) was used under N₂ saturated state and a scan rate was 50 mv/s.

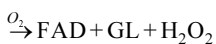
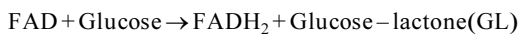
Table 1. Peak current density for each catalyst

Sample	Current density [uW cm ⁻²]
CNT/PEI/GOx	0.31
TC[CNT/PEI/GOx]	1.07
AC[CNT/PEI/GOx]	1.22

각 합성된 CL[CNT/PEI/GOx]의 산화-환원 반응을 조사하기 위해 순환주사전류(Cyclic Voltammogram)를 활용하였다. GOx의 환원전위는 -0.46 V (vs. Ag/AgCl) 부근이기 때문에 주사범위는 -0.6~ -0.3V영역에서 주사속도 50 mV/s에서 측정하였으며 전체 결과는 Fig. 2, 피크 전류는 Table 1에 나타났다.

측정 결과, 예상했던 것과 같이 모든 촉매는 -0.46 V 부근에서 산화환원전위를 나타냈다. 가교제를 사용한 촉매는 CNT/PEI/GOx 대비 전류량은 3~4배(TC: 1.07 mA/cm², AC: 1.22 mA/cm²)증가하였는데 이는 가교제를 사용한 촉매가 GOx, PEI 간 물리적으로 결합한 촉매보다 다량의 GOx가 담지 되어 전자전달이 증가한 것으로 해석할 수 있으며, 전극과 거리가 멀리 담지 된 효소에서 안정적으로 전자를 전극으로 가지고 올 수 있음을 의미한다[7].

이렇게 두껍게 담지 된 GOx 층이 Glucose 반응이 활발하게 일어나는지 비교하기 위하여 추가적인 순환주사전압전류법(Cyclic Voltammogram)을 진행하였다. 본 실험을 진행하기 위해 전해질에 공기를 주입하였는데 GOx가 Glucose와 반응하기 위해서는 O₂가 필요하기 때문이다. 이와 관련된 반응 메커니즘 다음과 같다[3].



주사 속도는 50 mV/s이고 전해질은 공기가 포화된 Phosphate 완충 용액(PBS, pH 7.4)이다. 전해질에 glucose를 0 mM부터 20 mM까지 점차 추가하면서 -0.6 V에서 -0.3 V에 환원 피크 변화를 관찰하였다. 측정된 결과를 Fig. 3에 도시하였다.

Glucose 농도 0~4 mM 사이에서는 농도가 증가함에 따라 급격하게 반응성이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 특히, 가교제를 첨가한 촉매는 첨가하지 않은 촉매 대비 동일 포도당 농도에서 3~4배까지 나온 것을 볼 수 있다. 이러한 반응성을 수치적으로 나타내기 위해 라인 위버-버크 방정식(Lineweaver-Burk equation) 활용하여 도시 및 Km 값을 계산하였다[3].

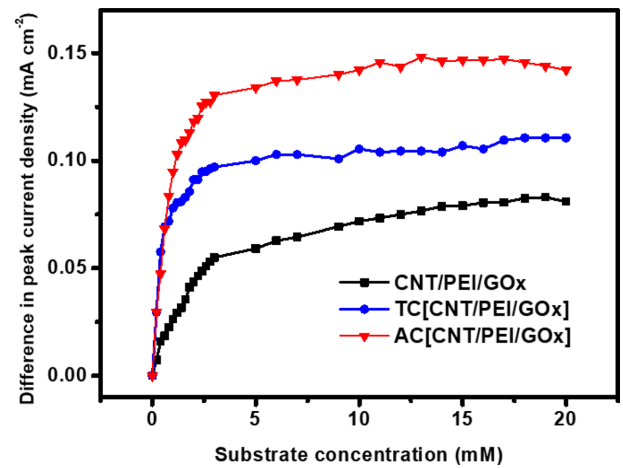


Fig. 3. A correlation of substrate concentration and difference in peak current density for measuring Km of CNT/PEI/GOx, TC[CNT/PEI/GOx] and AC[CNT/PEI/GOx]. For the tests, Lineweaver-Burk equation was used, while 0.01 M PBS (pH 7.4) was used under air saturated state and a scan rate was 50 mv/s.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

V_{max}는 최대 전류량을 의미하며, K_m은 효소의 반응속도와 관련된 상수로 작을수록 효소의 활성도가 높음을 의미한다. 상기 결과와 같이 K_m 값은 CNT/PEI/GOx, TC[CNT/PEI/GOx], AC[CNT/PEI/GOx] 순으로 1.71, 0.38, 0.73 mM로 측정되었다. 가교제를 사용한 촉매가 Glucose 반응 측면에서도 CNT/PEI/GOx 대비 더 우수하다는 것을 의미하는 결과를 나타냈다. 다만 AC[CNT/PEI/GOx]가 TC[CNT/PEI/GOx]보다 높은 K_m 값을 나타내었는데, 이는 AC[CNT/PEI/GOx]가 TC[CNT/PEI/GOx] 대비 많은 촉매 담지되어 높은 V_{max}를 나타내나, 외각 촉매의 전자전달력 부족으로 K_m 값은 약간 높게 측정된 것으로 해석할 수 있다.

Fig. 4는 임피던스 분광법(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)를 통해 전해질저항(Rs)과 전하전달 저항(Rct) 측정한 그림이다. 측정된 결과는 나이키스트 도법을 활용하여 복소평면에 나타내었고

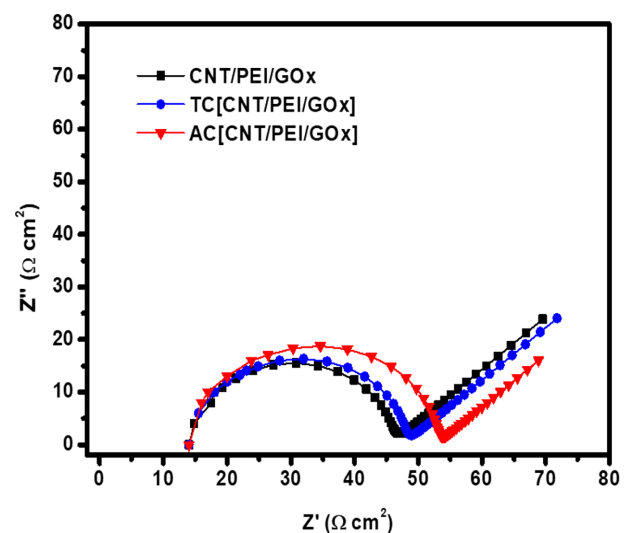


Fig. 4. Nyquist plots of CNT/PEI/GOx, TC[CNT/PEI/GOx] and AC[CNT/PEI/GOx].

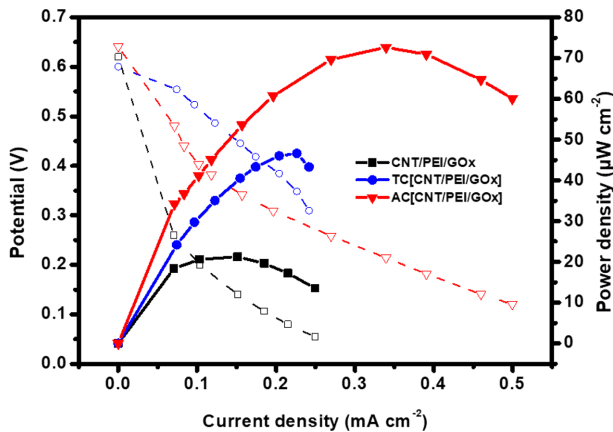


Fig. 5. Polarization curves of the enzymatic biofuel cells using CNT/PEI/GOx, TC[CNT/PEI/GOx] and AC[CNT/PEI/GOx] catalysts.

등가회로는 삼전극 테스트의 형태를 표현해 줄 수 있는 Randle's 등가회로를 활용하였다[3,4].

Fig. 4의 X축 시작 저항은 전해질저항 의미하는데 동일한 삼전극 형태이기 때문에 전해질 저항($14 \Omega\text{cm}^2$)이 같은 것을 확인할 수 있다. 촉매는 반원의 형태를 나타내고 있는데 반원의 지름은 전자전달 저항을 의미한다. CNT/PEI/GOx, TC[CNT/PEI/GOx], TC[CNT/PEI/GOx] 각각 Rct는 $33.08, 34.84, 39.79 \Omega\text{cm}^2$ 로 나타났다. 여기서 가교제를 첨가한 촉매가 지름이 더 큰 것을 확인할 수 있는데 이것은 전극 계면에 저항이 큰 효소(GOx)가 다량 존재하여 임피던스가 더 크게 나타난 것으로 해석할 수 있다[4].

3-2. 원전지 평가

AC[CNT/PEI/GOx]촉매의 원전지상에서 산화극 성능을 평가를 위해 환원극에는 산소와 반응성이 뛰어난 Pt/C 촉매를 사용하였다[4].

Fig. 5는 CNT/PEI/GOx, TC[CNT/PEI/GOx], AC[CNT/PEI/GOx]의 분극전도를 나타낸 그림이다. 모든 촉매는 동일한 효소가 담지 됨에 따라 $0.6\text{--}0.64 \text{ V}$ 부근의 OCV를 나타냈다. 하지만, MPD 값은 순서대로 $21.2, 46.6, 72.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 로 측정되었는데, 이는 가교제를 사용한 촉매는 가교제의 효과에 의해 GOx의 절대량이 많음을 뜻하면서, 담지된 효소가 대부분이 전자전달을 수행함을 보여주는 것을 의미한다. 즉, CLEA가 안정적으로 형성되었으며 전자 전달이 원활하게 일어난다는 것을 재확인 시켜주는 결과였다[8].

4. 결 론

우리는 CNT/PEI/GOx 촉매 제조 과정에서 GOx 효소에 가교제를 첨가하여 효소 담지량을 극대화시키는 방법을 연구하였다. CV 측정 결과, 가교제를 첨가한 AC[CNT/PEI/GOx] 촉매가 CNT/PEI/GOx 대비 4.1배 전류가 높게 나온 것을 확인 하였으며, 이를 통해, 가교제를

사용할 경우 담지체(CNT/PEI)에 더 많은 효소가 붙고 안정적으로 전자전달을 하는 것을 확인하고 EIS 측정을 통해 GOx가 다량 담지된 것을 재확인 하였다. 라인위버-버크 방정식을 통해 K_m 계산 결과, 0.723 값으로 Glucose와 초기반응성이 좋은 것으로 평가되었으며, 원전지 성능 평가 결과 또한 $72.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 로 CNT/PEI/GOx 대비 3.4배 높은 값을 나타내어 효소 연료전지의 산화극 촉매로 활용 가능성을 나타내는 결과였다.

감 사

이 논문은 2018년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행한 연구입니다(No.NRF-2018R1D1A109036711).

References

- Ivnitski, D., Branch, B., Atanassov, P. and Apblett, C., "Glucose Oxidase Anode for Biofuel Cell Based on Direct Electron Transfer," *Electrochem Commun.*, **8**(8), 1204-1210(2006).
- Mecheri, B., D'Epifanio, A., Geracitano, A., Campana, P. T., and Licocchia, S., "Development of Glucose Oxidase-based Bioanodes for Enzyme Fuel Cell Applications," *J. Appl. Electrochem.*, **43**(2), 181-190(2013).
- Hyun, K. H., Han, S. W., Koh, W. G. and Kwon, Y., "Fabrication of Biofuel Cell Containing Enzyme Catalyst Immobilized by Layer-by-layer Method," *J. Power Sources*, **286**, 197-203(2015).
- Ahn, Y., Chung, Y. and Kwon, Y., "Performance Evaluation of Biofuel cell using Benzoquinone Entrapped Polyethyleneimine-Carbon nanotube supporter Based Enzymatic Catalyst," *Korean Chem. Eng. Res.*, **55**(2), 258-263(2017).
- Hyun, K., Han, S. W., Koh, W. G. and Kwon, Y., "Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase Immobilized on Carbon Nanotube for Improving Glucose Sensing," *Int. J. Hydrog. Energy*, **40**(5), 2199-2206(2015).
- Sheldon, R. A., Schoevaart, R. and Van Langen, L. M., "Cross-linked Enzyme Aggregates (CLEAs): A Novel and Versatile Method for Enzyme Immobilization (a review)," *Biocatal. Biotransformation*, **23**(3-4), 141-147(2005).
- Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P. G., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A., "Preparation, Optimization, and Structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)," *Biotechnol. Bioeng.*, **87**(6), 754-762(2004).
- Chung, Y., Hyun, K. and Kwon, Y., "Fabrication of Biofuel Cell Improved by π -conjugated Electron Pathway Effect Induced from a New Enzyme Catalyst Employing Terephthalaldehyde," *Nanoscale*, **8**, 1161-1168(2016).