

## Laccase-탄소나노튜브 적층을 통한 효소 연료전지의 cathode 성능 향상

왕 설\*<sup>‡</sup> · 김창준\*<sup>\*,\*\*,\*†</sup>

\*경상국립대학교 화학공학과 및 그린에너지 연구소

52828 경상남도 진주시 진주대로 501

\*\*경상국립대학교 나노신소재융합공학과

52828 경상남도 진주시 진주대로 501

<sup>‡</sup>현재: 안강대학교 화학 및 화학공학과

725000, 산시성 안강시 옥재로 92호

(2022년 4월 12일 접수, 2022년 5월 30일 수정본 접수, 2022년 5월 30일 채택)

## Enhancement of Electrochemical Performance of Cathode by Optimizing Laccase-Carbon Nanotubes Layers for Enzymatic Fuel Cells

Xue Wang\*<sup>‡</sup> and Chang-Joon Kim\*<sup>\*,\*\*,\*†</sup>

\*Department of Chemical Engineering and RIGET

\*\*Department of Materials Engineering and Convergence Technology, Gyeongsang National University

501 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, 52828, Korea

<sup>‡</sup>Present address: School of Chemistry and Chemical Engineering, Ankang University

No. 92, Ycai Road, Ankang, Shaanxi, 725000, China

(Received 12 April 2022; Received in revised form 30 May 2022; Accepted 30 May 2022)

### 요 약

당, 알코올, 유기산 및 아미노산 등과 같은 다양한 유기물에 포함된 화학에너지를 전기에너지로 전환시키는 효소 연료전지의 성능은 anode 뿐만 아니라 cathode에도 큰 영향을 받는다. 본 연구의 목적은 laccase 기반의 고성능 cathode 전극을 개발하는데 있다. 효소, 전자전달체 및 탄소나노튜브로 구성된 효소 복합체를 제조하고 이를 전극 표면에 다층으로 부착하며 층수 및 탄소나노튜브의 첨가 유무가 전극 성능에 미치는 영향을 조사하였다. 전극 표면에 효소-전자전달체(Lac-(PVI-Os-dCl))의 층수가 증가할수록 전극에서 발생하는 환원 전류량이 증가하였다. 탄소나노튜브가 첨가된 효소-전자전달체 복합체 전극(Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl))이 Lac-(PVI-Os-dCl) 전극에 비하여 1.7배 많은 환원 전류를 생성하였다. Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl)과 Lac-(PVI-Os-dCl)의 비율을 변화시키며 적층한 전극들에서 2층의 Lac-(PVI-Os-dCl)과 2층의 Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl)으로 구성된 전극이 가장 많은 양의 환원 전류( $10.1 \pm 0.1 \mu\text{A}$ )를 생성하였다. 단일 층의 Lac-(PVI-Os-dCl)로 구성된 cathode를 사용하는 셀과 최적화된 cathode를 사용하는 셀의 최대 생산 전력밀도는 각각  $0.46 \pm 0.05$ 와  $1.23 \pm 0.04 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 였다. 본 연구 결과는 전극 표면에 laccase, 전자전달체 및 탄소나노튜브로 구성된 복합체의 적층 최적화를 통해 cathode 및 이를 이용하는 효소 연료전지의 성능을 향상시킬 수 있음을 시사한다.

**Abstract** – The performance of enzymatic fuel cells that convert chemical energy contained in various organic molecules such as sugar, alcohol, organic acids, and amino acids into electrical energy is greatly affected by the cathode as well as the anode. This study aimed to develop a laccase-based cathode with high performance. An enzyme composite composed of an laccase, redox mediator, and carbon nanotubes was immobilized on the surface of electrode in multiple layers, and the effect of the number of layers and the presence or absence of carbon nanotubes on electrode performance was investigated. As the number of layers of the enzyme-mediator (Lac-(PVI-Os-dCl)) on the electrode surface increased, the amount of reduction current generated at the electrode increased. The enzyme-carbon nanotube-mediator composite electrode (Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl)) generated a current 1.7 times greater than that of the Lac-(PVI-Os-dCl). It was found that the largest amount of current ( $10.1 \pm 0.1 \mu\text{A}$ ) was generated in the electrode composed of two layers of Lac-(PVI-Os-dCl) and two layers of Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl) in the evaluation of electrodes with different ratio of Lac-

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: cj\_kim@gnu.ac.kr

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.

SWCNTs-(PVI-Os-dCl) and Lac-(PVI-Os-dCl). The maximum power density of the cell using the cathode composed of a single layer of Lac-(PVI-Os-dCl) and the cell using the optimized cathode were  $0.46 \pm 0.05$  and  $1.23 \pm 0.04 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , respectively. In this study, it was demonstrated that the performance of cathode and the enzymatic fuel cell using the same can be improved by optimizing the layers of composites composed of laccase, redox mediator, and carbon nanotubes on the electrode surface.

**Key words:** Enzymatic fuel cells, Cathode, Laccase, Carbon nanotubes, Multilayer

## 1. 서 론

효소 연료전지는 효소를 사용하여 당, 알코올, 유기산 및 아미노산 등과 같은 다양한 유기물에 포함된 화학에너지를 전기에너지로 변환시킨다[1]. 효소 연료전지는 유기물이 산화되어 전자를 생성하는 anode와 전자와 양성자로 산소를 환원시켜 물을 생성하는 cathode로 구성된다[2]. 효소 연료전지의 성능은 anode 뿐만 아니라 cathode 에도 큰 영향을 받는다[1]. 효소 연료전지의 성능 향상을 위한 대부분의 연구가 anode 개발에 편중되어 cathode 성능향상을 위한 연구 결과가 상대적으로 많지 않다. 다중구리 산화효소(multicopper oxidase)인 laccase (Lac)은 cathode 효소로 널리 이용되는데, 이는 Lac의 활성점 전위( $\sim 0.78 \text{ V vs. SHE at neutral pH}$ )가  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  산화·환원쌍의 전위에 근접할 정도로 높기 때문이다. Lac의 활성점에는 4개의 구리가 분포되어 있다. T1-Cu 지점은 소수성 포켓(hydrophobic pocket)으로 단백질 표면 근처에 위치하여 전극과 함께 전자 공여체로 작용하는 기질로부터 전자를 받아들인다[3]. 물리적 흡착, 졸-겔법에 의한 포괄(encapsulation), 공유결합 등 다양한 방법으로 Lac이 고정화된 효소 전극이 개발되었다[4]. Lac의 T1-Cu 지점이 전극 표면을 향하도록 배향(orientation) 된다면 효소-전극 간 직접적 전자전달(direct electron transfer, DET)이 가능하다[5,6]. 그러나 DET의 전자전달 속도가 낮아 이를 극복하기 위한 다양한 시도가 이루어졌다[4,5,7]. 전자전달체를 사용하는 간접 전자전달(mediated electron transfer, MET)이 DET 보다 우수하다고 알려졌다[8]. ABTS와 osmium 기반의 산화·환원 고분자가 cathode 전자전달체로 널리 사용되고 있다[8-10]. 확산형 전자전달체인 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)는 전해질에 용해된 상태로 사용되는 반면 osmium 기반 고분자 전자전달체는 전극 표면에 Lac과 동시 고정화(coimmobilization)되어 사용된다[9, 10]. MET 전극 시스템에서 고정화된 효소와 전자전달체 담지량 조절을 통하여 전극의 성능을 향상시킬 수 있다. 즉, 효소 담지량이 증가함에 따라 반응속도도 증가하므로 고밀도의 Lac이 고정화된 전극이 단일층 Lac이 부착된 전극보다 더욱 빠르게 산소를 환원시킬 것이다. 그런데 Lac은 절연체(insulator)이므로 Lac 담지량을 증가시킬 때

따라 전극으로부터 Lac의 T1-Cu 지점으로부터의 전자전달 저항도 함께 증가할 것이다. 그러나 탄소나노튜브와 같이 전기전도성이 우수한 물질을 Lac 층에 도입한다면 이러한 문제를 해소함으로써 전극의 성능을 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구팀은 기존 연구에서 포도당 산화효소(glucose oxidase, GOx)와 단일벽 탄소나노튜브(single-walled carbon nanotubes, SWCNTs) 담지량을 최적화함으로써 anode의 성능을 극대화시켰다[11]. 본 연구는 이의 일환으로 효소 연료전지의 cathode로 사용되는 Lac 전극의 성능을 향상시키는 데 그 목적이 있다. 이를 위하여 다층의 Lac-전자전달체 또는 Lac-SWCNTs-전자전달체 복합체를 고정화시킨 전극을 제작하고 순환 전류법(cyclic voltammetry, CV)으로 전극의 산화·환원 특성을 조사하였고 연료전지 셀에서 최적화 전극의 성능을 평가하였다.

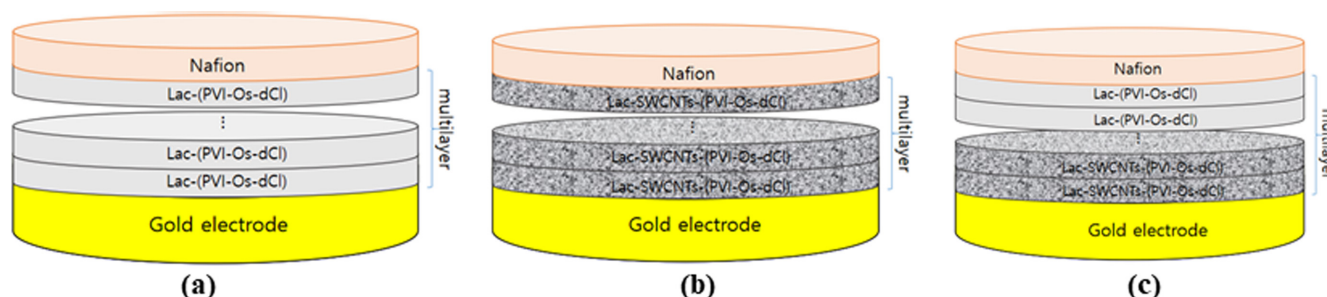
## 2. 실험

### 2-1. 실험 재료

*Agaricus bisporus* 유래 Lac (6.2 U/mg)와 *Aspergillus niger* 유래 GOx (59 unit/mg)를 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, USA)에서 구입하였고 재조합 trehalase (TREH, 4200 U/mL, 303 U/mg)는 Megazyme 사(Wicklow, Ireland)에서 구입하였다. Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDGE,  $M_{n,av} \sim 500$ ), carboxylic acid-functionalized SWCNTs (product No. 652490), 기타 시약들을 Sigma-Aldrich 사(Saint Louis, USA)에서 구입하였다. Fluka 사(Steinheim, Germany)에서 포도당을 구입하였고 아가로오즈는 Promega 사(Madison, USA)에서 구입하였다. 단국대학교 김혁한 교수팀으로부터 입수한 Poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethoxy-2,2'-bipyridine) $_2$ Cl] $^{+2}$  (PVI-Os-dmo)와 Poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dichloro-2,2'-bipyridine) $_2$ Cl] $^{+2}$  (PVI-Os-dCl)를 각각 anode와 cathode용 전자전달체로 사용하였다.

### 2-2. 전극 제작 및 특성 분석

Lac이 고정화된 여러 종류의 cathode를 제작하였다(Fig. 1). Lac



**Fig. 1.** (a) Laccase-based electrodes with different layers of (a) laccase-(PVI-Os-dCl), (b) laccase-SWCNTs-(PVI-Os-dCl), and combination of two.

과 전자전달체가 단일 층으로 부착된 전극(Lac-(PVI-Os-dCl))을 제작하였다. Lac (5 mg/mL), PVI-Os-dCl (10 mg/mL), PEGDGE (10 mg/mL)를 4:4:1 (v/v)로 혼합하였다. 혼합용액 2  $\mu$ L를 표면적이 0.02 cm<sup>2</sup>인 금 전극(MF-2014, BASI, West Lafayette, USA) 표면에 도포하고 상온에서 1시간 동안 방치하여 건조시켰다. 다음은 두 층의 효소-전자전달체가 부착된 전극((Lac-(PVI-Os-dCl))<sub>2</sub>)을 제작하였다. Lac-(PVI-Os-dCl) 표면에 Lac, PVI-Os-dCl 및 PEGDGE로 구성된 혼합용액 2  $\mu$ L를 도포하고 상온에서 건조시켰다. 상기과정을 반복하여 복층의 효소-전자전달체가 고정화된 cathode (Lac-(PVI-Os-dCl))<sub>n</sub>, n=2~6를 제작하였다. 복층의 Lac, SWCNTs 및 전자전달체가 고정화된 cathode를 제작하였다. 전극 제조에 사용될 SWCNTs 용액을 제조하기 위하여 carboxylic acid-functionalized SWCNTs 5 mg을 유리 시험관에 넣고 5 mL의 MES buffer (pH 6.0)를 첨가한 후 40 kHz에서 작동하는 초음파 세척기(160 HT, soniclean Pty Ltd., Seoul, Korea)에서 96 W로 3시간 동안 초음파 처리하였다. 이를 원심분리기에서 1,106  $\times$  g로 10분간 회전시킨 후 상등액을 회수하였다. 상등액에는 SWCNTs가 균일하게 분산되었고 SWCNTs 농도는 350  $\mu$ g/mL였다[12]. 회수된 SWCNTs 용액(상등액)과 Lac (10 mg/mL)를 1:1 (v/v)로 혼합한 Lac-SWCNTs 혼합용액을 제조하였다. Lac-SWCNTs 혼합액, PVI-Os-dCl (10 mg/mL) 및 PEGDGE (10 mg/mL)를 4:4:1의 부피비로 혼합시킨 후 혼합용액 2  $\mu$ L를 전극 표면에 도포하고 상온에서 1시간 동안 건조시켜 Lac, SWCNTs 및 전자전달체가 부착된 전극(Lac-SWCNT-(PVI-Os-dCl))을 제작하였다. 두 층의 효소-SWCNTs-전자전달체 복합체가 부착된 전극((Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl))<sub>2</sub>)을 제작하기 위하여 단일층 Lac-SWCNT-(PVI-Os-dCl) 전극 표면에 Lac, SWCNTs, PVI-Os-dCl 및 PEGDGE로 구성된 혼합 용액 2  $\mu$ L를 도포하고 상온에서 건조시켰다. 상기과정을 반복하여 복층의 Lac-SWCNTs-전자전달체 복합체가 부착된 cathode (Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl))<sub>n</sub>, n=2~6를 제작하였다. 제작된 모든 cathode 전극 표면을 나피온(nafion) 용액(5 wt%) 4  $\mu$ L로 도포한 후 전극의 특성을 조사하였다.

연료전지에 사용된 anode는 트레할로스를 연료로 사용하여 전자를 생산하는 전극으로 트레할로스를 포도당으로 분해하는 TREH, 생성된 포도당을 산화시켜 전자를 생성시키는 GOx, 생성된 전자를 전극으로 전달하는 전자전달체인 PVI-Os-dmo, 전자전달을 촉진하는 SWCNTs, TREH와 GOx를 분리시키는 agarose로 구성되었다. 즉, 금전극 표면에 세 개 층의 GOx-(PVI-Os-dmo)-SWCNTs 복합체와 3개 층의 GOx-(PVI-Os-dmo)가 순차적으로 적층되었다. 마지막 층 표면에는 agarose-TREH 혼합액을 도포하였다. 본 연구에서 사용된 anode는 기존 논문[11]에서 (GOx-(PVI-Os-dmo)-SWCNTs)<sub>3</sub>-(GOx-(PVI-Os-dmo))<sub>3</sub>/Aga-TREH로 명시되었고 이의 제작 방법 및 성능이 자세히 설명되었다.

### 2-3. 전극 특성 분석

Cathode의 특성 분석을 위한 전극 셀은 작업전극, 대전극 및 기준전극으로 구성되었다. 작업전극은 Lac이 고정화된 전극이고 대전극은 Pt wire이며 기준전극은 Ag/AgCl (saturated KCl)이다. 산소로 포화된 PBS 용액(pH 7.0) 8 mL에서 20 mV/s의 주사속도(scan rate)로 CV 분석을 실시하였다. PBS 조성은 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>이다. 모든 전기화학 실험을 상온에서 전위차계(potentiostat, CH Instruments, model 660D, Houston, USA)를 사용하여 수행하였다.

### 2-4. 연료전지 제작 및 성능 평가

연료전지는 TREH와 GOx가 부착된 anode와 Lac이 부착된 cathode가 담긴 반응조로 구성되었다(Fig. 2). 두 종류의 cathode가 테스트 되었는데, 타입 I cathode는 단일층의 Lac-(PVI-Os-dCl)이 고정화된 전극이고 타입 II는 최적화된 cathode (2층의 Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl)과 2층의 Lac-(PVI-Os-dCl))이다. 반응조에는 산소로 포화된 30 mM의 트레할로스가 첨가된 PBS 용액(pH 7.0) 8 mL를 채웠다. 연료전지로부터 일정량의 전류(5~50 nA)를 방전시키며 셀 전압을 측정하여 I-V 곡선을 작성하였다.

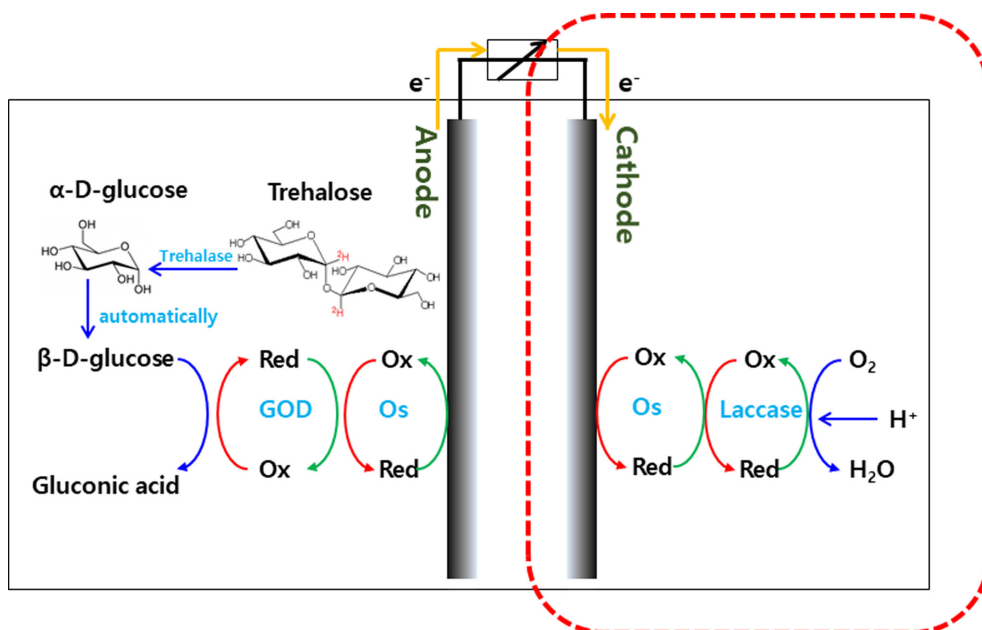


Fig. 2. Schematic diagram of the proposed enzymatic fuel cells using laccase-based cathode.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. Lac 층 변화에 따른 전극의 전기화학적 특성

Fig. 3은 다른 수의 Lac-전자전달체 층이 부착된 전극의 CV 그래프를 보여준다. 준가역 전류피크(quasi-reversible current peak)가 0.3과 0.34 V (vs. Ag/AgCl)에서 관찰되었다. 이는 전형적인 산화·환원 반응의 결과로 발생하는 산화·환원쌍(redox couple) 피크들로서, 대전극에서 cathode로 이동한 전자에 의해 PVI-Os-dCl이 환원된 후 산소를 환원시키는데 필요한 전자를 Lac에 제공하며 자신은 산화되기 때문이다[13]. 이러한 산화·환원 반응의 결과로 0.3 V와 0.34 V에서 나타나는 전류 피크는 각각 PVI-Os-dCl의 환원 전류와 산화 전류를 나타낸다[14]. Cathode의 성능이 우수할수록 anode에서 전달된 전자를 빠르게 환원시킬 수 있다. 본 연구팀은 전극 표면에 부착되는 Lac-(PVI-Os-dCl) 층의 수를 증가시키며 전극에서 발생하는 환원 전류값 변화를 관찰하였다. Fig. 3(a)에 보듯이, 담지된 Lac-(PVI-Os-dCl) 층수가 증가할수록 산화·환원 피크의 세기도 증가하였다. CV 데이터로부터 환원 피크전류(peak current) 값을 추출하고 이를 Lac-(PVI-Os-dCl) 층 수에 따라 도시하였다. Fig. 3(b)에 보듯이, Lac-(PVI-Os-dCl) 층수 증가에 따라 전극에서 발생하는 환원 전류값도 선형적으로 증가하였으나 5개 층 이후 전류값 증가 기울기가 둔화되었다. 일반적으로 효소 담지량 증가에 따라 반응속도가 증가하여 환원 전류량이 증가할 수 있다. 효소-전자전달체 적층 수 증가에 따라 절연체인 효소의 담지량은 증가하지만 단위 층당 전자전달 활성을 갖는 전자전달체 양은 상대적으로 감소한다고 알려졌다[15]. 한편, osmium 기반 고분자 전자전달체와 Lac으로 구성된 필름의 층수를 변화시키며 전극의 전기화학적 특성을 조사한 실험을 통하여, Scodeller 등 [9]은 전극 표면에 효소-전자전달체 필름 층 증가에 따라 물질전달 저항도 동시에 증가하기 때문에 일정 층 이상에서는 환원 전류량 증가가 없었다고 보고하였다. 본 실험에서도 6개의 층으로 구성된 Lac-전자전달체 전극의 단위 층당 환원전류 생성량이 눈에 띄게 감소하였다. 이는 Lac 담지량의 증가에 따른 전극저항의 증가 또는 물질전달 저항 증가로 인한 효소 비활성(specific activity) 감소에 기인한 것으로 판단되었다.

#### 3-2. SWCNTs에 의한 전자전달 속도 향상

Lac의 주성분인 단백질은 절연성 물질(insulator)이므로 전자가 전극 표면에서 Lac 단백질층을 통과하여 활성점으로 이동하는 것이 어렵다[16]. 특히 효소 층이 두터울수록 전자의 이동의 어려움은 더욱 심화될 것이다[17]. 따라서 전극 표면에 Lac 층의 증가는 기질의 물질전달과 전자전달을 모두 방해하기 때문에 이 두 가지 사항을 모두 고려한 효소 전극 설계가 필요하다. 상기에서 언급하였듯이 전극 표면에 Lac-전자전달체 적층을 통하여 생성되는 전류량을 증가시킬 수 있었다. 본 연구팀은 전극 표면에 고밀도의 Lac을 집적하면서 전자전달 저항을 최소화시킬 수 있다면 전극 성능이 더욱 향상될 수 있을 것으로 예상하였다. 이를 위하여 부도체인 Lac 층에 전자 전도성이 높은 SWCNTs를 삽입하여 Lac에 의한 절연 효과를 상쇄시키고자 하였다. 또한 전극 표면에 적층되는 SWCNTs가 삽입된 효소-전자전달체(Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl))의 층수를 변화시키며 그 성능을 평가하였다. Fig. 4는 Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl) 적층 전극의 CV 그래프와 이로부터 추출된 환원 전류값을 나타낸다.

적층 수에 따라 생성되는 환원 전류량은 Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl) 전극과 Lac-(PVI-Os-dCl) 전극이 비슷한 거동을 보였다. 즉, Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl) 층수가 증가할수록 전극에서 발생하는 환원 전류량도 증가하였다. 그런데 Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl) 전극이 동일한 양의 Lac이 담지된 Lac-(PVI-Os-dCl) 전극보다 더 강한 환원 전류를 생성하는 것이 주목되었다. Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl) 복합체 전극이 생성한 최대 전류량( $7.7 \pm 0.7 \mu\text{A}$ )은 Lac-(PVI-Os-dCl) 전극이 생성한 최대 전류량( $4.6 \pm 0.1 \mu\text{A}$ )보다 1.7 배 높았다. 본 실험 데이터는 전극 표면에 Lac-전자전달체의 적층 수가 증가함에 따라 전극에서 Lac으로의 전자전달 저항도 함께 증가하지만 SWCNTs가 전자전달 저항을 현저히 낮춰줌으로써 고밀도 Lac 전극의 성능을 향상시키는데 기여함을 시사한다. Ding 등은 glassy carbon electrode에 Lac과 ZnCr-ABTS가 고정화된 전극에서 효소(Lac), 전자전달체(ZnCr-ABTS) 및 SWCNTs의 삽입(intercalation)을 통해 전극 표면에서 효소 필름의 안정성과 전자전달능이 향상되었다고 보고하였다[18]. SWCNTs의 도입으로 GOx[11, 19], 빌리루빈 산화효소 전극 [20]의 성능이 향상된 사례도 보고되었다. 이는 SWCNTs가 다양한 효소 전극의 전자전달 성능을 향상시키는데 사

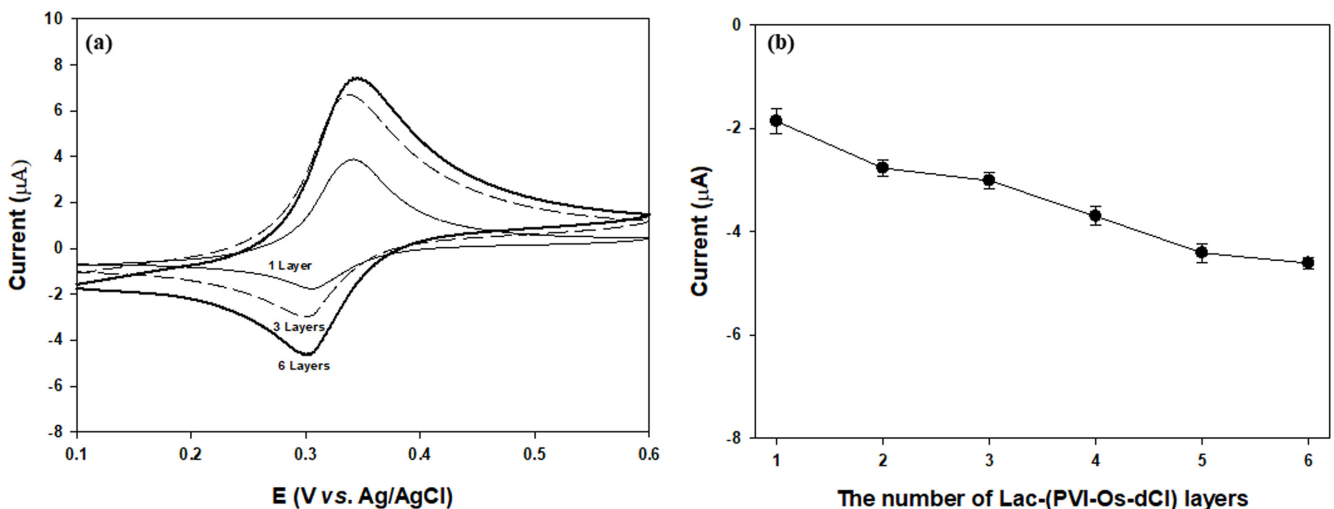


Fig. 3. (a) Cyclic voltammograms and (b) magnitude of cathodic peak current, extracted from cyclic voltammograms for electrodes with different numbers of Lac-(PVI-Os-dCl) layers.

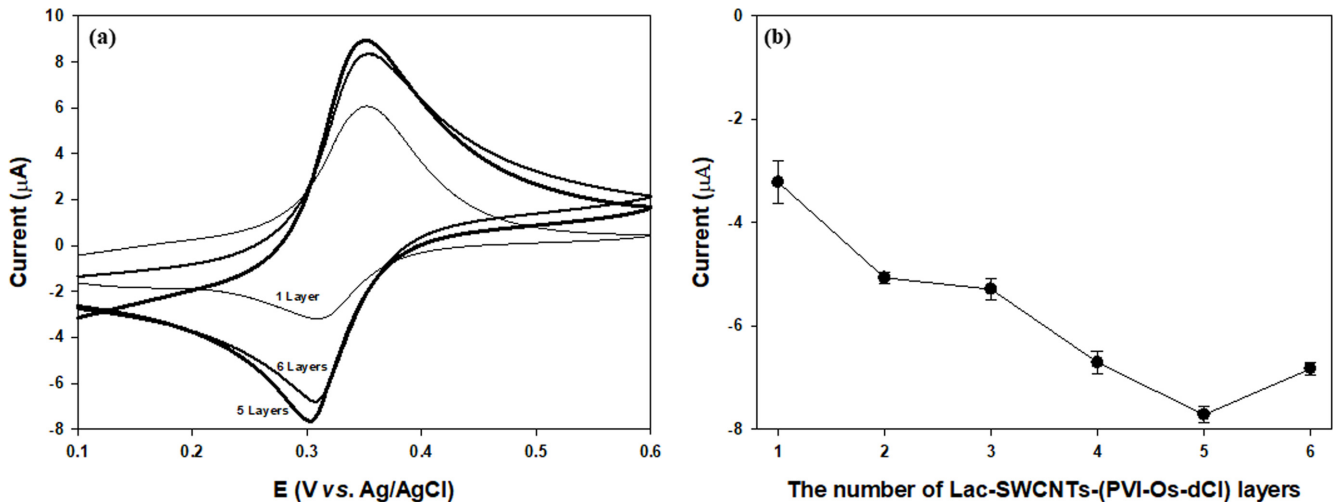


Fig. 4. (a) Cyclic voltammograms and (b) magnitude of cathodic peak current, extracted from cyclic voltammograms for electrodes with different numbers of Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl) layers.

용될 수 있음을 보여준다.

효소 층에서 SWCNTs는 전자전달의 대체 경로를 제공하는 것으로 여겨진다. 전자는 SWCNTs를 통하여 오스늄 산화-환원 센터에서 멀리 떨어진 산화-환원 센터로 이동할 수 있다는 주장이 제기되었다[19]. 본 실험결과는 SWCNTs와 효소-전자전달체의 결합을 통해 효소 전극 성능이 향상되는 것을 시사한다. 그런데 Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl)을 6층으로 증가시켰을 경우 생성되는 전류량이 오히려 감소하였다. 이는 아마도 효소 담지량을 일정량 이상으로 증가시킬 경우 물질전달 저항이 급격히 증가하여 효소의 비활성이 오히려 감소하기 때문인 것으로 판단된다.

### 3-3. Lac-전자전달체와 Lac-전자전달체-SWCNTs 적층 최적화

전극 표면에 Lac-SWCNTs-전자전달체 복합체의 과도한 적층은 물질전달 저항을 증가시켜 효소의 활성 감소를 초래할 수 있다. SWCNTs는 고밀도 Lac 전극의 전자전달 저항을 낮춤으로써 전극 성능 향상에 기여하였으나 가격이 비싸다는 단점이 있다. 따라서 적은 양의 SWCNTs를 사용하며 전자전달저항을 낮추고 효소의 활성감소를 최소화한 전극 제조를 목표로 하였다. 먼저, 물질전달 저항을 최소화하기 위하여 전극 표면에 4층의 효소 복합체를 고정화하였다. 다음, Lac-(PVI-Os-dCl)과 Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl)의 비율을 변화시키며 제작한 전극의 전류 생성량을 조사하였다. Table 1에 나타냈듯이, Lac과 전자전달체만으로 구성된 전극((Lac-PVI-Os-dCl)<sub>4</sub>)과 3층의 Lac-전자전달체와 1층의 Lac-전자전달체-SWCNTs 복합체로 구성된 전극((Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl))<sub>1</sub>-(Lac-PVI-Os-dCl)<sub>3</sub>)은 비슷한 양의 환원 전류(7.7±0.2 ~ 7.9±0.1 μA)를

생성하였다. 반면, 2층의 Lac-전자전달체와 2층의 Lac-전자전달체-SWCNTs 복합체로 구성된 전극((Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl))<sub>2</sub>-(Lac-PVI-Os-dCl)<sub>2</sub>)에서 가장 많은 양의 환원 전류(10.1±0.1 μA)가 생성되었다. Lac-전자전달체-SWCNTs 복합체의 비율을 증가시키더라도 생성되는 전류량은 더 이상 증가하지 않았다. 이는 전도성이 우수한 SWCNTs 첨가로 인하여 효소 전극 표면에서 전자전달 속도가 향상되지만 일정량 이상의 SWCNTs는 더 이상의 효과가 없음을 보여준다. 본 연구결과로부터 최소량의 SWCNTs를 사용하고 물질전달 저항과 전자전달 저항의 최소화된 최적 전극은 (Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl))<sub>2</sub>-(Lac-PVI-Os-dCl)<sub>2</sub>임을 알 수 있다.

### 3-4. 연료전지에서 cathode 성능 평가

다른 cathode를 사용하는 두 타입의 연료전지 셀을 제작하였다. 타입 I 셀의 cathode는 1층의 Lac-전자전달체로 구성된 반면 타입 II 셀의 cathode는 최적화된 전극((Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl))<sub>2</sub>-(Lac-PVI-Os-dCl)<sub>2</sub>)이다. 트레할로스가 첨가되고 산소로 포화된 전해질에서 두 타입의 연료전지를 테스트하였다. 셀로부터 전류를 방전시켰을 때 일정 시간 후 셀 전압은 정상상태에 도달하였다.

방전전류에 따른 두 연료전지의 정상상태 셀 전압을 도출하였다. 방전 전류량 증가에 따라 타입 I의 셀 전압은 점진적으로 감소하였다(Fig. 5(a)). 방전전류와 셀 전압값을 이용하여 셀의 전력밀도를 계산하였다. 방전전류 값이 30 nA에서 셀 전압은 0.27±0.03 V였고 셀 전력밀도는 최대치인 0.46±0.05 μW/cm<sup>2</sup>였다. Fig. 5(b)는 타입 II 셀에 대한 I-V 곡선이다. 방전되는 전류밀도를 증가시키면서도 불구하고 셀 전압은 거의 일정하게 유지되었다. 그러나 50 nA의 전류로 방전시켰을 때 셀 전압은 급격히 감소하였다. 일반적으로 효소 연료전지 셀 전압은 이론값보다 낮게 측정되는데, 이는 작동과정에서 다양한 손실이 발생하기 때문이다. 손실의 주요 원인은 전자전달에 대한 에너지 장벽(활성화 손실), 접촉저항 등과 같은 전자전달에 대한 저항(Ohmic losses) 및 물질전달 저항에 기인한 기질의 농도 손실 등이다. 특히 방전 전류량이 클 때 물질전달 저항으로 인하여 전극표면 근처에 큰 농도기울기가 형성되어 전극의 성능이 감소하는데 이는 궁극적으로 셀 전압을 떨어뜨리는 주요 원인이 된다[21].

Table 1. Cathodic current of electrodes with different numbers of Lac-(PVI-Os-dCl) or Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl) layers

Electrodes	Peak current (μA)
(Lac-(PVI-Os-dCl)) <sub>4</sub>	7.7±0.2
(Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl)) <sub>1</sub> -(Lac-(PVI-Os-dCl)) <sub>3</sub>	7.9±0.1
(Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl)) <sub>2</sub> -(Lac-(PVI-Os-dCl)) <sub>2</sub>	10.1±0.1
(Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl)) <sub>3</sub> -(Lac-(PVI-Os-dCl)) <sub>1</sub>	9.6±0.2
(Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl)) <sub>4</sub>	9.5±0.4

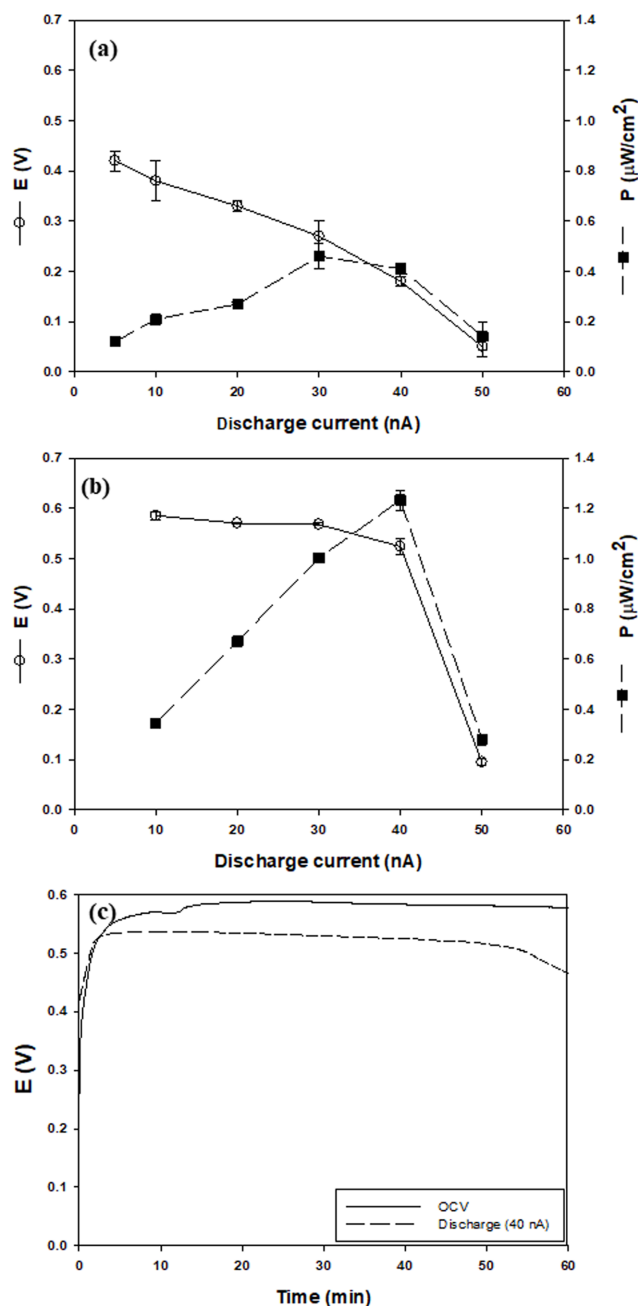


Fig. 5. Cell voltage and cell power density curves under different discharge currents for EFCs using (a) Lac-(PVI-Os-dCl) or (b) (Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl))<sub>2</sub>-(Lac-(PVI-Os-dCl))<sub>2</sub> as cathode. Anode was consisted of glucose oxidase, SWCNTs, Os-based redox polymers, trehalase, and agarose. Measurements were performed in PBS (pH 7.0) supplemented with 30 mM trehalose with slow shaking. The electrolyte was saturated with oxygen before use.

따라서 50 nA의 전류 방전 시, anode와 cathode에서 각각 트레할로스 산소의 큰 농도 손실이 발생하여 셀 전압이 급격하게 감소한 것으로 판단된다. 타입 II 셀로부터 방전시키는 전류가 40 nA 일 때 최대 셀 전력인  $1.23 \pm 0.04 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 를 얻었는데, 이때 셀 전압은  $0.52 \pm 0.12 \text{ V}$ 였다. 타입 II가 생산하는 최대 전력량은 타입 I이 생산하는 최대값의 2.67 배에 해당한다. Fig. 5(c)에 보듯이, 타입 II 셀의 개방회로전압(OCV, open circuit voltage)은 0.58 V 근처에서 일정

하게 유지되었다. 셀로부터 40 nA의 전류를 방전시킬 때 셀 전압은 0.52 V 근처를 유지하였다. 이는 연료전지가 매우 안정적으로 작동하고 있음을 보여준다. 본 결과는 cathode가 효소 연료전지 성능에 큰 영향을 미친다는 것을 시사한다. 향후 cathode 전극의 효소개량, 우수한 전자전달체 발굴, 전도성이 뛰어난 나노물질 개발, 및 셀 시스템 개선을 통하여 연료전지의 성능을 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 기대한다.

#### 4. 결 론

금 전극 표면에 고정화된 Lac-(PVI-Os-dCl) 층수 증가에 따라 전극에서 발생하는 환원 전류량도 증가하였는데 6개 층의 Lac-(PVI-Os-dCl)로 구성된 전극에서 가장 많은 양의 환원 전류가 생산되었다. Lac-(PVI-Os-dCl) 층에 SWCNTs가 포함된 전극이 SWCNTs가 포함되지 않은 전극보다 더 많은 환원 전류를 생성하였다. Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl) 복합체 전극이 생성한 최대 전류량( $7.7 \pm 0.7 \mu\text{A}$ )은 Lac-(PVI-Os-dCl) 전극이 생성한 최대 전류량( $4.6 \pm 0.1 \mu\text{A}$ )의 1.7 배였다. 최적화 실험에서 2층의 Lac-(PVI-Os-dCl)과 2층의 Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl) 복합체로 구성된 전극((Lac-SWCNTs-(PVI-Os-dCl))<sub>2</sub>-(Lac-(PVI-Os-dCl))<sub>2</sub>)이 가장 많은 양의 환원 전류( $10.1 \pm 0.1 \mu\text{A}$ )를 생성하였다. Cathode를 바꿔가며 연료전지를 제작하고 그 성능을 평가하였다. 단일 층의 Lac-(PVI-Os-dCl)로 구성된 cathode를 사용한 셀의 최대 생산 전력밀도는  $0.46 \pm 0.05 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 인 반면 최적화된 cathode를 사용하는 셀의 최대 생산 전력밀도는  $1.23 \pm 0.04 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 였다. 본 연구는 전극 표면에 laccase, 전자전달체, 및 SWCNTs로 구성된 복합체를 layer-by-layer 방법으로 최적 적층함으로써 laccase 기반 cathode의 성능을 향상시킬 수 있음을 보여준다.

#### 감 사

이 성과는 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2020R1F1A1054433, 2017R1D1A1B03029032).

#### References

- Martinez-Ortiz, J., Flores, R. and Vazquez-Duhalt, R., "Molecular Design of Laccase Cathode for Direct Electron Transfer in a Biofuel Cell," *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 2626-2631(2011).
- Xiao, X., Xia, H., Wu, R., Bai, L., Yan, L., Magner, E., Cosnier, S., Lojou, E., Zhu, Z. and Liu, A., "Tackling the Challenges of Enzymatic (Bio)Fuel Cells," *Chem. Rev.*, **119**, 9509-9558(2019).
- Zhao, C., Gai, P., Song, R., Chen, Y., Zhang, J. and Zhu, J., "Nanostructured Material-Based Biofuel Cells: Recent Advances and Future Prospects," *Chem. Soc. Rev.*, **46**, 1545-1546(2017).
- Kadam, A. A., Saratale, G. D., Ghodake, G. S., Saratale, R. G., Shahzad, A., Magotra, V. K., Kumar, M., Palem, R. R. and Sung, J., "Recent Advances in the Development of Laccase-Based Biosensors via Nano-Immobilization Technique," *Chemosensors*, **10**, 58(2022).
- Yu, S. and Myung, N. V., "Recent Advances in the Direct Electron Transfer-Enabled Enzymatic Fuel cells," *Front. Chem.*, **8**, 620153 (2021).
- Hussein, L., Rubenwolf, S., Stetten, F. V., Urban, G., Zengerie,

- R., Kruger, M. and Kerzenmacher, S., "A Highly Efficient Buckypaper-Based Electrode Material for Mediatorless Laccase-Catalyzed Dioxygen Reduction," *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 4133-4138(2011).
7. Gentil, S., Pailley, P. R., Sancho, F. Robert, V., Mekmouche, Y., Guallar, V., Tron, T. and Goff, A. L., "Efficiency of Site-Specific Clicked Laccase-Carbon Nanotubes Biocathodes Towards O<sub>2</sub> Reduction," *Chemistry*, **26**, 4798-4804(2020).
8. Gu, Y., Yuan, L., Jia, L., Xue, P. and Yao, H., "Recent Developments of a Co-Immobilized Laccase-Mediator System: A Review," *RSC Adv.*, **11**, 29498-29506(2021).
9. Scodeller, P., Carballo, R., Szamocki, R., Levin, L., Forchiasin, F. and Calvo, E. J., "Layer-by-Layer Self-Assembled Osmium Polymer-Mediated Laccase Oxygen Cathodes for Biofuel Cells: The Role of Hydrogen Peroxide," *J. AM. Chem. Soc.*, **132**, 11132-11140(2010).
10. Szamocki, R., Flexer, V., Levin, L., Forchiasin, F. and Calvo, E. J., "Oxygen Cathode Based on a Layer-by-Layer Self-Assembled Laccase and Osmium Redox Mediator," *Electrochim. Acta*, **132**, 11132-11140(2010).
11. Wang, X., Zhang, Y. Q., Kim, H.-K. and Kim, C.-J., "Separate Immobilization of Glucose Oxidase and Trehalase, and Optimization of Enzyme-Carbon Nanotube Layers for the Anode of Enzymatic Fuel Cells Utilizing Trehalose," *Electrochim. Acta*, **392**, 138974(2021).
12. Wang, X., Kim, J. H., Khang, D., Kim, H.-K. and Kim, C.-J., "Fabrication of Optimally Configured Layers of SWCNTs, Gold Nanoparticles, and Glucose Oxidase on ITO Electrodes for High-Power Enzymatic Biofuel Cells," *Korean J. Chem. Eng.*, **36**, 1172-1183(2019).
13. Mishra, A., Bhatt, R., Bajpai, J. and Bajpai, A. K., "Nanomaterials Based Biofuel Cells: A Review," *Int. J. Hydrog. Energy*, **46**, 19085-19105(2021).
14. Shin, H. and Kang, C., "Co-Electrodeposition of Bilirubin Oxidase with Redox Polymer through Ligand Substitution for Use as an Oxygen Reduction Cathode," *Bull. Korean Chem. Soc.*, **31**, 3118-3122(2010).
15. Zhao, W., Xu, J.-J. and Chen, H.-Y., "Multilayer Membrane via Layer-by-Layer Deposition of Organic Polymer Protected Prussian Blue Nanoparticles and Glucose Oxidase for Glucose Biosensing," *Langmuir*, **21**, 9630-9634(2005).
16. Lalaoui, N., David, R., Jamet, H., Holzinger, M., Goff, A. L. and Cosnier, S., "Hosting Adamantane in the Substrate Pocket of Laccase: Direct Bioelectrocatalytic Reduction of O<sub>2</sub> on Functionalized Carbon nanotubes," *ACS Catal.*, **6**, 4259-4264(2016).
17. Joshi, P. P., Merchant, S. A., Wang, Y. and Schmidtke, D. W., "Amperometric Biosensors Based on Redox Polymer-Carbon-Nanotube-Enzyme Composites," *Anal. Chem.*, **77**, 3183-3188(2005).
18. Ding, S.-N., Holzinger, M., Mousty, C. and Cosnier, S., "Laccase Electrodes Based on the Combination of Single-Walled Carbon Nanotubes and Redox layered Double Hydroxides: Toward the Development of Biocathode for Biofuel Cells," *J. Power Sources*, **195**, 4714-4717(2010).
19. Wang, Y., Joshi, P. P., Hobbs, K. L., Johnson, M. B. and Schmidtke, D. W., "Nanostructured Biosensors Built by Layer-by-Layer Electrostatic Assembly of Enzyme-Coated Single-Walled Carbon Nanotubes and Redox Polymers," *Langmuir*, **22**, 9776-9783(2006).
20. Shin, H. and Kang, C., "Enhanced Performance of the Wired-Bilirubin Oxidase Oxygen Cathode with Incorporation of Carboxylated Single-Walled Carbon Nanotubes," *Electrochim. Acta*, **115**, 599-606(2014).
21. Osman, M. H., Shah, A. A. and Walsh, F. C., "Recent Progress and Continuing Challenges in Bio-fuel Cells. Part I: Enzymatic Cells," *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 3087-3102(2011).

#### Authors

**Xue Wang:** Associate Professor, School of Chemistry and Chemical Engineering, Ankang University, Ankang, 725000, China; wx\_0064@163.com

**Chang-Joon Kim:** Professor, Department of Chemical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Korea; cj\_kim@gnu.ac.kr