

트레할로스 연료전지용 이효소-전자전달체 고정화 전극의 제작 및 전기화학적 특성 분석

장연청 · 김민지 · 모니샤 · 김창준[†]

경상국립대학교 화학공학과 및 그린에너지 연구소
52828 경상남도 진주시 진주대로 501
(2026년 5월 29일 접수, 2026년 6월 20일 수정본 접수, 2026년 7월 2일 채택)

Fabrication and Electrochemical Characterization of Immobilized Bienzyme-Mediator Electrodes for Trehalose Fuel Cell

YanQing Zhang, Minji Kim, Monisha Aravazhi Anandan and Chang-Joon Kim[†]

Department of Chemical Engineering and RIGET, Gyeongsang National University
501 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, 52828, Korea
(Received 29 May 2026; Received in revised from 20 June 2026; Accepted 2 July 2026)

요 약

본 연구에서는 단일벽 탄소나노튜브(single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)로 개질된 탄소종이 전극을 기반으로, 포도당 산화효소(GOx)-트레할로스 분해효소(TREH)가 고정화된 anode와 빌리루빈 산화효소(BOD)가 고정화된 cathode로 구성된 트레할로스 연료전지를 제작하고 그 성능을 평가하였다. 특히, ferrocene methanol (FcMeOH)과 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)를 각각 anode와 cathode에 효소와 함께 고정화하였다. 주사전하원미경-에너지분산형 분광분석을 통해, SWCNTs, 효소 및 전자전달체가 전극 표면에 성공적으로 도입되었음을 확인하였다. Cyclic voltammetry 분석에서는 0.2 V 부근에서 FcMeOH의 산화전류 피크가 관찰되었으며, SWCNTs가 도입된 전극(CP-SWCNT)에서 더 강한 산화전류가 나타났다. 또한 생화학적 분석에서도 CP-SWCNT 전극에 고정화된 GOx가 더 높은 효소 활성을 보였다. 전기화학 임피던스 분광법 분석에서는 SWCNT 도입에 따라 전하전달 저항이 감소하고 전자전달 특성이 향상됨을 확인하였다. GOx-TREH 이효소 전극은 트레할로스 존재 시 높은 산화전류를 생성하였고, BOD 기반 cathode는 산소 포화 조건에서 높은 환원 전류를 보였다. 최종적으로 제작된 트레할로스 연료전지는 약 0.6 V의 개방회로 전압과 최대 $11.7 \pm 0.9 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 의 전력밀도를 나타내어, SWCNTs 기반 전극 개질, 효소 및 전자전달체 고정화 전략이 연료전지 성능 향상에 효과적임을 입증하였다.

Abstract – In this study, a trehalose enzymatic fuel cell was fabricated and evaluated using carbon paper electrodes modified with single-walled carbon nanotubes (SWCNTs), consisting of a glucose oxidase (GOx)-trehalase (TREH)-immobilized anode and a bilirubin oxidase (BOD)-immobilized cathode. In particular, ferrocene methanol (FcMeOH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) were co-immobilized with the enzymes on the anode and cathode, respectively. SEM-EDS analysis confirmed the successful introduction of SWCNTs, enzyme, and electron transfer mediator onto the electrode surfaces. Cyclic voltammetric analysis revealed a distinct oxidation peak of FcMeOH near 0.2 V, and the SWCNT-modified electrode (CP-SWCNT) exhibited a higher oxidation current than the bare CP. In addition, biochemical analysis demonstrated that GOx immobilized on the CP-SWCNT electrode showed higher enzymatic activity. EIS analysis indicated that the introduction of SWCNTs reduced the charge transfer resistance and improved the electron transfer properties of the electrode. The GOx-TREH bienzyme electrode generated a high oxidation current in the presence of trehalose. In addition, the BOD-based cathode exhibited a high reduction current under oxygen-saturated conditions. The fabricated trehalose enzymatic fuel cell exhibited an open-circuit voltage of approximately 0.6 V and a maximum power density of $11.7 \pm 0.9 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, demonstrating that the

[†]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.

SWCNT-based electrode modification and enzyme/electron transfer mediator immobilization strategy were effective for improving enzymatic fuel cell performance.

Key words: Trehalose fuel cell, Single-walled carbon nanotubes, Enzyme-mediator co-immobilization, Cascade enzyme reaction, Ferrocene methanol

1. 서 론

효소 연료전지(enzymatic fuel cell, EFC)는 당 및 아미노산과 같은 생체분자를 연료로 이용하여 전기를 생산할 수 있어, 생체의료기기 및 웨어러블 전자소자의 전원으로 주목받고 있다[1]. 기존에는 포도당과 같은 단당류를 이용하는 단일 효소 전극이 주로 연구되어 왔으나, 실제 환경에서 보다 풍부하게 존재하는 이당류나 올리고당과 같은 다양한 당을 연료로 활용하기 위해서는 다효소 cascade 기반 전극 시스템 개발이 필요하다[2].

트레할로스는 버섯 및 효모와 같은 미생물과 곤충에 널리 분포할 뿐만 아니라, 밀, 쌀 등 일부 곡류를 포함한 식물체에도 존재하는 대표적인 비환원성 이당류이다[3]. 트레할로스는 높은 화학적 안정성과 우수한 생체적합성을 지니고 있어, 효소 연료전지에서 활용 가능한 유망한 연료 물질로 간주된다[4]. 그러나 트레할로스는 직접적인 전기화학적 산화가 어려워 트레할로스 분해효소(trehalase, TREH)에 의해 포도당으로 가수분해된 후, glucose oxidase (GOx)에 의해 산화되는 연속적인 효소반응(cascade reaction)을 필요로 한다[4,5]. 이러한 다효소 cascade 시스템에서는 반응 중간체의 생성과 생성된 전자의 효율적인 전극 전달이 전체 성능을 결정짓는 핵심 요소이며, 동시에 다중 효소 구조로 인해 전자전달 저항이 증가할 수 있다[6,7].

당을 이용하는 효소 기반 연료전지에서 전자전달을 촉진하기 위해 ferrocene 계열의 화합물과 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) 같은 확산형 전자전달체가 널리 사용된다. 본 연구팀은 기존 연구에서 ferrocene-methanol (FcMeOH)과 ABTS를 각각 anode와 cathode 전자전달체로 사용한 분리형 전해질 셀 구조의 트레할로스 연료전지 시스템을 개발하고 그 성능을 보고한 바 있다[8]. 이러한 전자전달체는 효소 반응에서 생성된 전자를 효과적으로 전극에 전달함으로써 전류 및 전력 밀도를 향상시키는 것으로 보고되었다[9]. 그러나 확산에 의존하는 전자전달 방식은 효소-전극 간 거리 증가에 따라 전자전달 효율이 감소할 수 있으며, 전자전달체의 교차 확산을 방지하기 위해 분리형 전해질 셀 구조가 요구되므로 소형 연료전지 구현에 한계가 있다.

언급한 문제를 해결하기 위하여, 확산형 전자전달체를 효소와 함께 전극 표면에 고정화하는 연구가 주목받고 있다[10,11]. 전자전달체의 고정화는 효소-전자전달체-전극 간의 전자전달 거리를 최소화함으로써 보다 빠르고 효율적인 전자전달 경로를 형성할 수 있게 한다. 또한 단일 전해질 기반에서 작동 가능한 시스템 구현이 가능하므로, 소형 연료전지 시스템 개발에 유리한 장점을 제공한다[12,13]. 그럼에도 불구하고 확산형 전자전달체의 고정화는 쉽지 않으며, 관련 연구도 제한적으로 보고되었다. Ferrocene 유도체나 ABTS와 같은 확산형 전자전달체는 대부분 저분자 물질로, 전극 표면에 단순 흡착될 경우 전해질로 쉽게 용출되어 장기 구동 시 전류 감소와 안정성 저하를 초래할 수 있다[14,15]. 또한 전자전달체는 효소와의 비특이적 상호작용으로 활성 저해를 일으킬 수 있으며, 고정화 과정에서 효소-전자전달체-전극 간 거리와 배향이 적절히 제어되지 않

으면 전자전달 효율이 감소할 수 있다. 더불어 고정화된 상태에서는 전자전달체의 이동이 제한되어 전자전달 속도가 감소하거나 전기화학적 특성이 변화할 수 있다[14,15]. 따라서 전자전달체의 이탈을 억제하고, 효율적인 전자전달 경로와 장기 안정성을 동시에 확보할 수 있는 고정화 전략이 요구된다.

본 연구에서는 단일벽 탄소나노튜브(single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)로 개질된 탄소종이 전극을 기반으로, GOx-TREH와 빌리루빈 산화효소(bilirubin oxidase, BOD)가 각각 부착된 anode와 cathode로 구성된 연료전지를 제작하고 성능을 평가하였다. 특히, 확산형 전자전달체인 FcMeOH와 ABTS를 각각 효소와 함께 anode와 cathode 표면에 고정화할 수 있는 방법을 개발하였다. 전자전달체와 효소의 안정적인 고정화를 위해 poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDGE)를 가교제로 사용하고, 젤라틴을 도입하여 생체친화적인 3차원 매트릭스를 형성하였다. 이를 통해 전자전달체의 이탈을 억제하고 효소의 구조적 안정성을 향상시키고자 하였다. 제조된 전극의 전기화학적 특성과 트레할로스 연료전지 성능을 체계적으로 평가함으로써, 전자전달체 고정화 전략이 다효소 cascade 기반 연료전지의 전자전달 효율 및 출력에 미치는 영향을 조사하였다.

2. 실험

2-1. 실험 재료

Megazyme (Wicklow, Ireland)으로부터 재조합 트레할로스 분해효소(E-TREH, 4,200 U/mL, 303 U/mg)를 구입하였다. E-TREH는 고농도의 황산암모늄(3.2 M) 현탁액 상태로 공급되므로, 이를 탈염해서 사용하였다. 먼저, MWCO (molecular weight cut-off)가 12~14 kDa인 투석막(Spectra/Por®, Spectrum Labs, USA)에 TREH 용액을 넣어 투석하였다. 염이 제거된 효소용액을 Amicon Ultra® 원심 여과필터(MWCO 10 kDa, Millipore, Ireland)를 사용하여 농축하였다. *Aspergillus niger* 유래 포도당 산화효소(glucose oxidase, GOx; 100,000 units/g), *Myrothecium verrucaria* 유래 빌리루빈 산화효소(bilirubin oxidase, BOD), potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄), sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), disodium hydrogen phosphate (Na₂HPO₄), citric acid monohydrate, ABTS, FcMeOH, sodium citrate tribasic dihydrate, 젤라틴(젤 강도 300 g, Bloom), poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDGE, Mn_{av}: ~500), carboxylic acid로 기능화된 SWCNTs 등은 Sigma-Aldrich 사(MO, USA)에서 구입하였다. 제조사 정보 및 이전 연구[16]에 따르면 SWCNTs는 electric arc discharge 방법으로 제조되었으며 탄소 함량은 80~90%, 금속 불순물(Ni)은 5~10% 수준이다. 이후 질산 처리로 정제되었으며 carboxylic acid 기능을 갖는 형태로 제공되었다. SWCNTs의 평균 직경은 1.4±0.1 nm이며 bundle 크기는 4~5 nm × 0.5~1.5 nm이다. 별도 언급이 없는 한 모든 용액은 탈이온수(18.2 MΩ·cm)로 제조하였다. 탄소 종이(carbon paper, CP; HCP-020N)는 WizMAC (Seoul, Korea)에서 구입하였으며, polyvinyl

chloride (PVC) 필름(두께 200 μm)은 Office Depot (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

2-2. SWCNTs로 CP 전극 개질

양면테이프의 한쪽 면에 PVC 필름을 부착하고 다른 면에는 적당한 크기로 자른 CP를 부착하였다. 이렇게 제작되면 탄소종이가 쉽게 부러지지 않고 유연성 있는 장점이 있다. CP 전극은 세 부분으로 구분되는데, 아랫부분($0.5\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$)은 효소 고정화를 위해 노출되었고, 중간 부분($3\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$)을 PVC 필름으로 감싸서 CP가 용액과 접촉하는 것을 방지하였다. 윗부분은 전위차계(potentiostat)의 연결부위로 사용되었다. CP 표면을 SWCNTs로 개질하였다. 증류수 6 mL를 포함하는 유리 시험관에 SWCNTs 6 mg을 넣고, 초음파 세척기(160HT, Soniclean Pty Ltd., Seoul, Korea)에서 3시간 동안 초음파처리하여 SWCNTs를 잘 분산시켰다. 이를 25°C에서 1,106×g로 10분간 원심분리 후, 회수된 상등액을 CP 개질에 사용하였다. UV/Vis 분광광도계를 이용하여 측정된 결과 상등액 내의 SWCNT 농도는 650 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 상등액 30 μL 를 노출된 CP 표면(0.15 cm^2)에 떨어뜨린 후 실온에서 2시간 건조하여 CP-SWCNT 전극을 제조하였다.

2-3. 전자전달체가 고정화된 효소 전극 제작

CP 및 CP-SWCNT 기반 anode를 제작하였다. GOx 전극을 제작하기 위하여, FcMeOH 용액(1~4 mM), GOx 용액(20 mg/mL), PEGDGE 용액(10 mg/mL)을 4:4:1의 부피비로 혼합하여 전극 제조용 용액을 준비하였다. 혼합액 10 μL 를 CP 또는 CP-SWCNT 표면에 도포한 후, 실온에서 2시간 동안 건조하였다. 이후, TREH 용액(420 U/mL)과 젤라틴 용액(20 mg/mL)을 1:1의 부피비로 혼합하였다. 해당 혼합액 10 μL 를 GOx 전극(CP-SWCNT-FcMeOH-GOx) 표면에 도포하고, 상온에서 2시간 건조하여 GOx와 TREH로 구성된 이 효소(bi-enzyme) 전극(CP-SWCNT-FcMeOH-GOx-TREH)을 제작하였다.

동일한 방법으로 CP-SWCNT 기반 cathode를 제작하였다. BOD 용액(250 U/mL), ABTS 용액(20 mM), PEGDGE 용액(10 mg/mL)을 4:4:1의 부피비로 혼합한 후, 혼합액 10 μL 를 CP-SWCNT 표면에 도포하였다. 이어서 젤라틴 용액(10 mg/mL) 10 μL 를 추가로 도포한 후 실온에서 건조하여 cathode를 완성하였다.

2-4. 효소전극의 전기화학 특성 및 연료전지 성능

전기화학 측정을 위하여 작업전극, 대전극, 및 기준전극으로 구성된 3전극 시스템을 사용하였다. 작업전극으로는 효소전극을 사용하였으며, 대전극과 기준전극으로는 각각 Pt wire와 Ag/AgCl 전극(saturated KCl, LF-2, Innovative Instruments Inc., Tampa, FL, USA)을 사용하였다. 순환 전압전류법(cyclic voltammetry, CV)은 8 mL의 전해질 용액에서 25 mV/s의 주사속도(scan rate)로 수행하였다. Anode 특성 평가를 위한 전해질은 30 mM 포도당 또는 30 mM 트레할로스가 포함된 10 mM PBS (pH 6.0)를 사용하였으며, cathode 분석에는 10 mM PBS를 사용하였다. 전하전달 저항을 측정하기 위하여 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 를 포함한 PBS (10 mM, pH 7.0) 용액에서 전기화학 임피던스 분광법(Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS)을 수행하였다. EIS 측정은 0.1 Hz에서 100 kHz의 주파수 범위에서, 5 mV의 교류 신호를 인가하여 수

행하였다. 모든 전기화학 실험은 상온에서 전위차계(potentiostat, CH Instruments, model 660D, Houston, USA)를 사용하여 수행하였다.

연료전지는 GOx와 TREH가 고정화된 anode (CP-SWCNT-FcMeOH-GOx-TREH)와 BOD가 고정화된 cathode (CP-SWCNT-ABTS-BOD), 그리고 두 전극이 담기는 반응조로 구성되었다. 반응조에는 30 mM 트레할로스가 포함된 산소 포화 상태의 10 mM PBS (pH 7.0) 용액 8 mL를 채웠다. 연료전지의 성능은 일정 전류 방전 조건에서 셀 전압을 측정하여 I-V 곡선을 도출함으로써 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 전극의 표면 분석 및 원소 조성

Fig. 1에 CP, CP-SWCNT, CP-SWCNT-FcMeOH 및 CP-SWCNT-FcMeOH-GOx 전극의 표면 및 단면에 대한 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM) 이미지와 각 전극 표면의 원소 분포를 에너지 분산형 X선 분광법(EDS)으로 분석한 스펙트럼 결과를 제시하였다. CP-SWCNT-FcMeOH는 CP-SWCNT 표면에 전자전달체인 FcMeOH가 부착된 전극을 나타낸다. Table 1에 EDS 분석으로부터 얻어진 각 전극의 원소 조성을 원자 백분율(atomic %)로 정리한 정량분석 결과를 나타내었다.

CP 전극의 경우, 탄소 점유가 서로 얽혀 다공성 네트워크를 형성하는 전형적인 탄소종이 구조가 관찰되었다. 또한 EDS 분석 결과에서는 탄소(C) 성분만이 검출되어, 해당 전극이 탄소 기반 물질로 이루어져 있음을 확인하였다. CP-SWCNT 전극에서는 탄소 점유 표면에 SWCNTs가 코팅됨에 따라 표면이 보다 거칠고 불균일한 형태로 변화한 것이 확인되었다. 단면 이미지에서도 SWCNT 네트워크가 탄소 점유 표면을 따라 형성된 구조가 관찰되었다. 이러한 구조적 변화는 전극의 비표면적을 증가시키고 전자 전달에 유리한 환경을 제공할 것으로 판단된다. EDS 분석 결과에서는 탄소 이외에도 산소(O)와 니켈(Ni) 성분이 검출되었으며, 이는 SWCNT 표면의 산소 함유 작용기 및 합성 과정에서 사용된 촉매의 잔존 성분에 기인한 것으로 판단된다[16]. CP-SWCNT-FcMeOH 전극에서는 FcMeOH의 도입에 따라 CP-SWCNT 네트워크 사이에 추가적인 층이 관찰되었으며, 보다 조밀한 표면 구조가 나타났다. EDS 분석 결과에서는 Fe 성분외에 Na, P, Cl, K가 추가적으로 검출되었는데, 이는 FcMeOH가 용해된 버퍼 성분에 기인한 것으로 판단된다. Fe 성분은 FcMeOH의 ferrocene 구조에서 유래한 것으로, 전자전달체인 FcMeOH가 전극 표면에 성공적으로 도입되었음을 시사한다. 마지막으로 CP-SWCNT-FcMeOH-GOx 전극에서는 효소 고정화에 의해 표면이 더욱 불균일해지고 두꺼운 층이 형성된 것이 관찰되었다. 이는 GOx가 전극 표면에 성공적으로 고정화되었음을 보여준다.

3-2. FcMeOH 담지량과 SWCNTs 도입에 따른 GOx 전극의 생화학 및 전기화학적 특성 변화

Fig. 2는 FcMeOH의 담지량과 SWCNTs 도입에 따른 탄소종이 전극의 전기화학적 특성과 자유 또는 고정화 GOx의 효소 활성 변화를 나타낸다. 전극의 CV 실험에서 0.2 V 부근의 뚜렷한 산화 피크가 관찰되었는데(Fig. 2(a)), 이는 기존에 보고된 FcMeOH/FcMeOH⁺ redox couple의 특성 전위와 일치한다[10,11]. FcMeOH

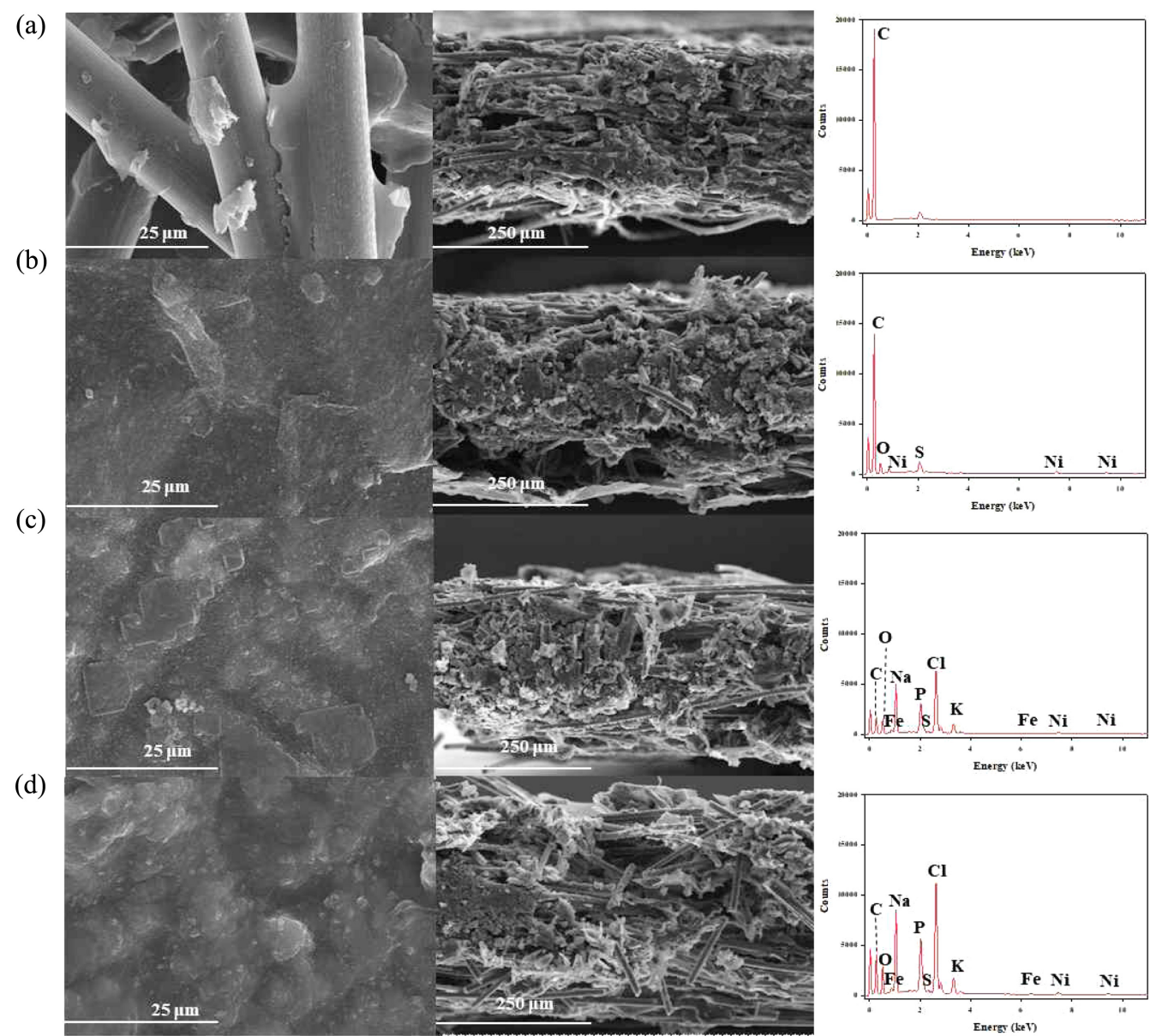


Fig. 1. SEM images of the surface and cross sections of (a) CP, (b) CP-SWCNT, (c) CP-SWCNT-FcMeOH, and (d) CP-SWCNT-FcMeOH-GOx. Corresponding EDS mappings of the electrode surfaces are also shown.

Table 1. Surface elemental composition (atomic %) of the electrodes determined by EDS analysis

Element	Atomic %			
	CP	CP-SWCNT	CP-SWCNT-FcMeOH	CP-SWCNT-FcMeOH-GOx
C	100	87.13	63.96	67.83
O		12.25	18.27	17.62
Na			8.12	6.65
P			2.10	1.73
S		0.07	0.07	0.07
Cl			5.89	4.88
K			1.03	0.81
Fe			0.15	0.11
Ni		0.55	0.41	0.31
Total	100	100	100	100

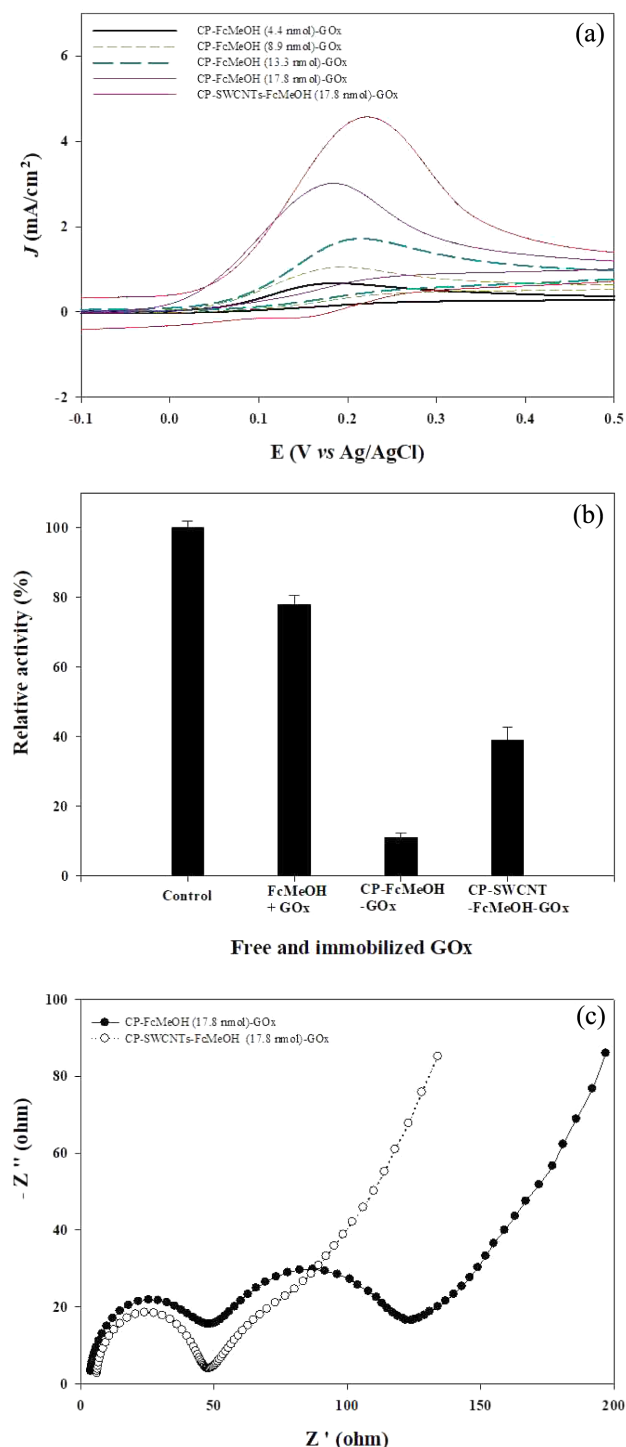


Fig. 2. (a) Cyclic voltammograms of CP or CP-SWCNT electrodes immobilized with GOx and different amounts of FcMeOH. (b) Relative activities of free GOx and GOx immobilized on CP and CP-SWCNT with FcMeOH (17.8 nmol). (c) EIS spectra of CP and CP-SWCNT electrodes immobilized with GOx and FcMeOH (17.8 nmol).

담지량 증가에 따라 약 0.2 V 부근의 산화 피크의 크기가 증가하는 경향을 보였는데, 이는 고정화된 FcMeOH가 효소 반응에서 생성된 전자를 전극으로 전달하는 전자전달체로 잘 작동하고 있음을 의미한다. 또한 동일 양(17.8 nmol)의 FcMeOH가 부착된 전극에서 CP-

SWCNT-FcMeOH-GOx 전극은 CP-FcMeOH-GOx 전극에 비해 더 많은 산화 전류를 생성하였다. 이는 SWCNTs의 높은 전기전도도와 넓은 비표면적이 전극과 효소 사이의 전자전달 향상에 기여하고 있음을 의미한다[17].

효소활성 분석 결과(Fig. 2(b)), 자유 상태의 GOx가 가장 높은 활성을 나타냈으며, 전극에 고정화된 효소 활성은 감소하였다. 이는 고정화 효소가 자유 효소에 비해 물질전달 제한의 영향을 더 크게 받기 때문이다[18]. 한편, SWCNTs가 도입된 전극에서는 상대적으로 높은 효소 활성이 유지되었는데, 이는 SWCNTs가 효소 고정화 과정에서 효소의 구조를 안정적으로 유지시키는 동시에, 높은 비표면적과 유리한 나노구조 특성으로 인해 기질 접근성이 향상되었기 때문인 것으로 해석된다[19,20].

Fig. 2(c)는 FcMeOH(17.8 nmol)와 GOx가 고정화된 CP와 CP-SWCNT 전극의 EIS 분석을 통해 얻은 Nyquist plot이다. CP-FcMeOH-GOx 전극에서는 두 개의 반원이 관찰되었다. 일반적으로 전자전달체 기반 효소 전극의 Nyquist plot에서는 전기화학적 이중층 충전 및 전자전달 저항(charge transfer resistance, R_{ct})에 의해 원점에서 벗어난 반원 형태가 나타난다. 반원의 수는 서로 다른 전기화학적 과정의 존재를 의미한다[21]. 본 연구에서 사용된 탄소종이는 섬유 기반의 3차원 다공성 구조를 가지므로, 전해질이 전극 표면뿐만 아니라 내부 세공까지 침투할 수 있다. 이러한 다공성 구조는 전극/전해질 계면 외에도 전극 내부에 추가적인 계면층(interfacial layer)을 형성하게 되며, 복잡한 전자전달 거동을 유도한다[22-24]. 따라서 CP-FcMeOH-GOx 전극에서 관찰된 두 개의 반원은 두 단계의 전하 전달 과정에 기인하는 것으로 해석된다. 고주파 영역의 첫 번째 반원은 전극 표면과 FcMeOH 사이의 전하 전달 과정과 전기화학적 이중층 충전과 관련된 것으로 판단된다. 반면, 두 번째 반원은 다공성 내부 및 FcMeOH-GOx 고정화층 내부에서의 전자이동과 이온확산 저항에 기인한 것으로 판단된다[22-25]. 이는 CP 전극의 상대적으로 낮은 전기전도도와 제한된 비표면적으로 인해 FcMeOH 층과 효소층 사이의 전하 전달이 비효율적으로 이루어져, 각 계면 반응이 분리된 임피던스 특성으로 나타났기 때문으로 해석된다. 반면, CP-SWCNT-FcMeOH-GOx 전극에서는 하나의 반원만이 관찰되었다. 이는 SWCNTs 도입에 따라 전극의 전기전도도와 비표면적이 증가하여 전극, FcMeOH, 그리고 GOx 층 사이의 전자 전달 경로가 보다 효율적으로 형성되었음을 의미한다. 그 결과, CP 전극에서 분리되어 나타났던 두 단계의 전하 전달 과정이 하나의 통합된 전기화학 반응 과정으로 나타나게 되며, 이에 따라 단일 반원의 임피던스 특성이 관찰된 것으로 판단된다. 또한 CP-SWCNT-FcMeOH-GOx 전극에서의 반원 직경은 CP-FcMeOH-GOx 전극보다 작게 나타났으며, 이는 전극 계면에서의 전하 전달 저항이 감소하였음을 의미한다[26]. 이러한 결과는 SWCNT의 높은 전기전도도와 넓은 비표면적이 FcMeOH 및 GOx 층과 전극 사이의 전자 전달을 효과적으로 촉진함을 시사한다.

3-3. GOx-TREH 이효소 기반 전극의 전기화학적 특성

Fig. 3(a)는 CP-SWCNT-FcMeOH 전극 표면에 GOx를 부착한 후, 그 상부에 젤라틴과 TREH 혼합액을 코팅하여 제조한 이효소(bi-enzyme) 전극(CP-SWCNT-FcMeOH-GOx-TREH)의 CV 결과를 나타낸다. 트레할로스가 없는 조건에서는 약 0.2 V (vs. Ag/AgCl) 부근에서 비교적 낮은 산화 전류(약 0.7 mA/cm²)가 관찰되었으나,

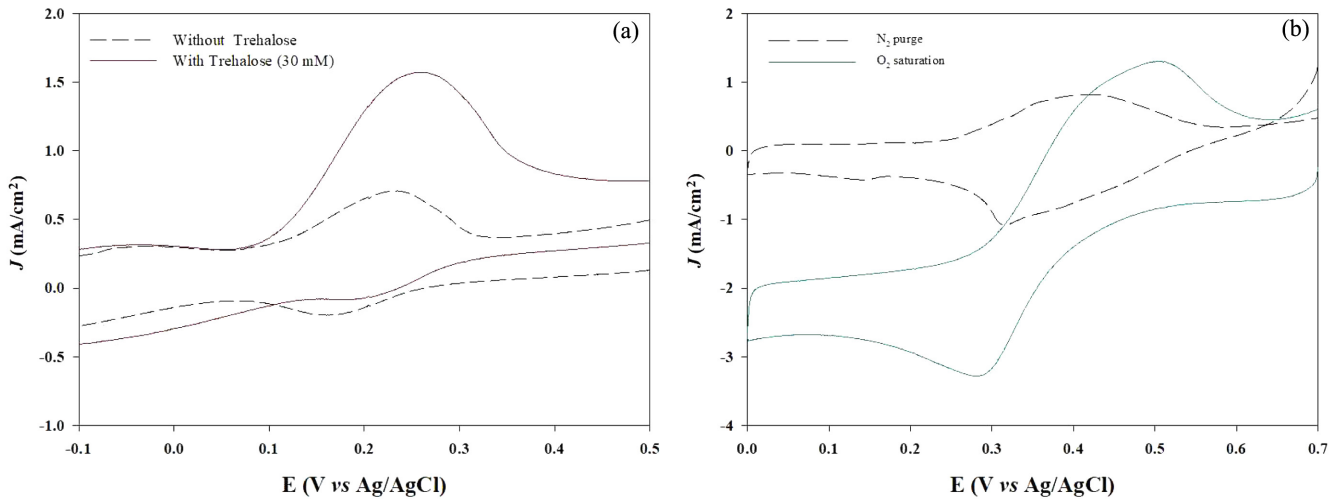


Fig. 3. Cyclic voltammograms of (a) CP-SWCNT-FcMeOH (17.8 nmol)-GOx-TREH with and without trehalose and (b) CP-SWCNT-ABTS (88.9 nmol)-BOD in 10 mM PBS (pH=6.0).

30 mM 트레할로스 첨가 시 동일 전위에서 산화 전류가 1.6 mA/cm²까지 현저히 증가하였다. 본 결과는 CP-SWCNT-FcMeOH-GOx-TREH 전극에서 TREH와 GOx가 안정적으로 고정화되어 연속적인 효소 반응이 효과적으로 진행됨을 보여준다. 즉, TREH에 의해 트레할로스가 가수분해되어 포도당이 생성되고, 생성된 포도당은 GOx에 의해 산화된다. 이 과정에서 발생한 전자는 전극에 고정화된 FcMeOH를 통해 전달되고, SWCNT 네트워크를 통해 전극으로 신속히 이동한다. 그 결과 트레할로스 첨가 시 전극에서 산화 전류가 크게 증가하는 것이다.

효소 연료전지는 anode뿐만 아니라 cathode도 필요하다. 이를 위해 cathode 용 효소와 전자전달체로 각각 BOD와 ABTS를 사용하였다. BOD는 다중구리 산화효소 (multi-copper oxidase)로 anode에서 cathode로 전달된 전자가 ABTS에 의해 BOD로 전달되는데, BOD는 받은 전자를 사용하여 산소를 물로 환원시킨다[27]. GOx/FcMeOH 고정화와 동일한 방법으로, PEGDGE를 사용하여 CP-SWCNT 표면에 BOD와 ABTS를 고정화하였고 그 표면을 젤라틴으로 도포하

였다. Fig. 3(b)는 전해질 내 산소 유무에 따른 CP-SWCNT-ABTS (88.9 nmol)-BOD (1.1 U) 전극의 전기화학적 거동을 나타낸 것이다. 0.3 V (vs. Ag/AgCl) 근처에서 환원 피크가 관찰되었는데, 이는 ABTS^{•+}/ABTS 산화·환원 쌍에 기인한 것으로 판단된다. 본 연구의 전기화학 측정은 pH 6.0에서 수행되었으며, 관찰된 환원 전위는 pH 7.0 조건에서 보고된 ABTS^{•+}/ABTS 산화·환원 쌍의 전위와 유사한 경향을 나타내었다[28]. N₂ purge 조건에서는 비교적 낮은 환원 전류 밀도가 나타났는데, 이는 ABTS 매개체의 산화·환원 반응에 기인하는 배경 전류로 판단된다. 반면 O₂ 포화 조건에서는 환원 전류가 크게 증가하였으며, 최대 약 -3 mA/cm² 수준의 환원 전류가 관찰되었다. 이는 BOD에 의한 환원 반응이 산소의 유무에 크게 영향받는 것을 보여준다. 즉, 산소 부재 시 BOD에 의한 환원 반응은 일어나지 않은 반면, 산소가 존재하는 경우에는 전극에 고정화된 BOD가 산소 환원 반응을 촉매화하는 것으로 해석된다. 또한 ABTS는 전극과 효소 사이의 전자전달 매개체로 작용하며, PEGDGE 기반 고정화 방법으로 BOD와 ABTS가 전극 표면에 잘 부착하여 안정

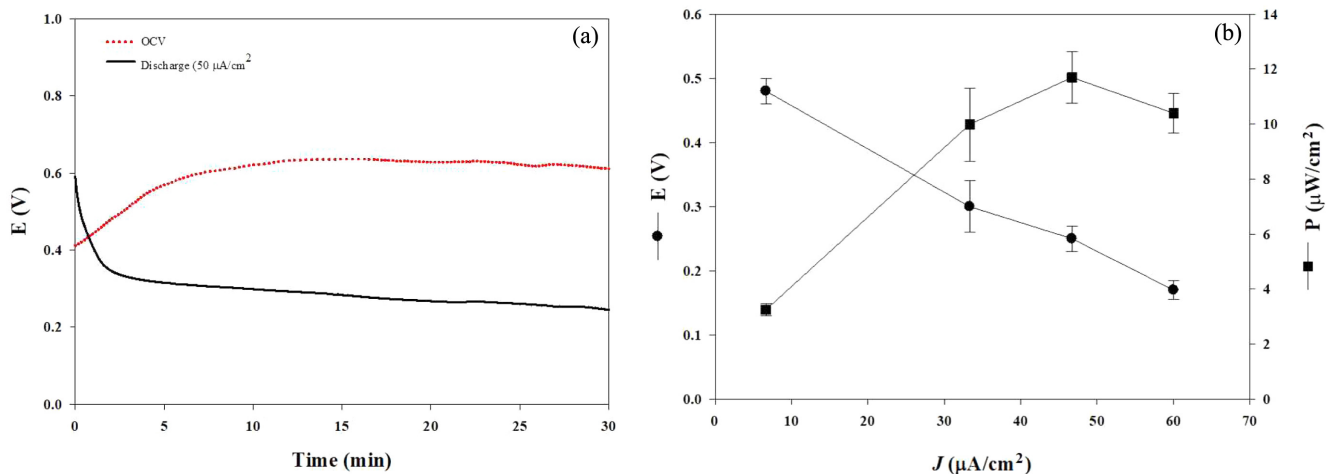


Fig. 4. (a) Time profiles of cell voltage under discharge currents for the EFC consisting of CP-SWCNT-FcMeOH-GOx-TREH (anode) and CP-SWCNT-ABTS-BOD (cathode) and (b) cell voltage and cell power density curves under different discharge currents.

적으로 작동함을 보여준다.

Fig. 3의 결과는 각 전극에서 트레할로스의 효소적 분해/산화 반응과 BOD에 의한 산소 환원 반응이 효과적으로 일어남을 보여준다. 이는 본 연구에서 제작한 전극 시스템이 트레할로스 연료전지의 anode와 cathode로 안정적으로 작동할 수 있음을 시사한다.

3-4. 연료전지 제작 및 성능 평가

CP-SWCNT-FcMeOH-GOx-TREH를 anode로, CP-SWCNT-ABTS-BOD를 cathode로 구성한 연료전지를 제작하고 그 성능을 평가하였다. Fig. 4(a)에 나타난 바와 같이, 셀의 개방회로 전압(open circuit voltage, OCV)은 약 0.6 V로 측정되었다. 셀로부터 일정량의 전류($50 \mu\text{A}/\text{cm}^2$)를 방전시킴에 따라, 셀 전압은 초기 OCV 값에서 점차 감소하여 정상상태에 도달한 후 일정값을 유지하였다. 본 연구에서는 정상상태에서의 셀 전압 값을 이용하여 I-V 곡선을 도시하였다. 또한 방전전류와 셀 전압값을 이용하여 셀의 전력량(Power, $P=V \times I$)을 계산하였다.

Fig. 4(b)는 방전전류 변화에 따른 셀 전압의 변화를 나타낸 것이다. 방전 전류량이 증가함에 따라 셀 전압은 점진적으로 감소하는 경향을 보였으며, 셀 전력은 증가하다가 최대값 이후 소폭 감소하는 경향을 나타내었다. 방전 전류밀도 $47 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 에서 셀 전압은 $0.25 \pm 0.02 \text{ V}$ 였으며, 이때 셀 전력은 최대값인 $11.7 \pm 0.9 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 였다. 이는 anode와 cathode 각각에 최적인 전해질을 적용하고, 두 전해질을 분리된 용기에 배치한 연료전지 시스템과, FcMeOH와 ABTS를 전해질에 첨가하여 확산형 전자전달체로 사용하는 이상적인 시스템[9]에서 보고된 셀 전력의 약 50% 수준에 해당한다. 한편, 본 연구에서 제안한 시스템은 전자전달체와 효소가 고정화된 두 전극을 단일 전해질 용기 내에서 작동하는 구조로, 기존의 분리형 시스템에 비해 성능은 낮으나 실용적인 연료전지 구성을 제공한다. 또한 트레할로스를 연료로 사용하는 기존 연료전지[4,29,30]와 비교하여도 유사한 성능을 나타내었으며, 향후 양 전극의 성능을 추가적으로 개선할 경우 전체 연료전지의 성능 향상이 가능할 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 SWCNTs로 개질된 탄소종이 전극 기반의 트레할로스 연료전지를 제작하고 그 전기화학적 특성을 평가하였다. GOx-TREH 기반 anode와 BOD 기반 cathode를 제작하고, 전자전달체인 FcMeOH와 ABTS를 각각 anode와 cathode에 고정화하였다. GOx-TREH 이효소 시스템은 트레할로스 존재 시 효과적인 cascade 반응을 통해 높은 산화전류를 생성하였으며, 고정화된 FcMeOH와 ABTS는 효소와 전극 사이의 전자전달을 효과적으로 매개하였다. 또한 SWCNTs의 도입은 효소-전자전달체 시스템의 전자전달 특성을 향상시켜 나노구조 기반 전극 설계가 효소 연료전지 전극의 성능 향상에 효과적임을 보여주었다. 제작된 연료전지는 약 0.6 V의 개방회로전압과 최대 $11.7 \pm 0.9 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 의 전력밀도를 나타내었다. 이러한 결과는 SWCNT 기반 전극 개질과 효소-전자전달체 동시 고정화 전략이 효소 연료전지 전극의 성능 향상에 효과적임을 보여준다. 또한 본 연구 결과는 단일 전해질 기반에서 작동 가능한 안정적인 시스템 구현 가능성을 제시하며, 향후 다효소 cascade 반응 기반 연료전지 시스템 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

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

References

- Xia, 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).
- Moehlenbrock, M. J., Toby, T. K., Pelster, L. N. and Minter, S. D., "Metabolon Catalysts: an Efficient Model for Multi-enzyme Cascades at Electrode Surfaces," *ChemCatChem.*, **3**, 561-570(2011).
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D. and Zhang, Y., "Trehalose Metabolism and Signaling," *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**, 417-441(2008).
- Nawab, S., Sha, C., Shah, S. B., Keerio, H. A., Zhu, Z. and Yong, Y., "Trehalose-powered Membraneless Enzymatic Fuel Cell Based on Flexible Alginate Composite Hydrogel Bioelectrodes," *Process. Biochem.*, **153**, 18-25(2025).
- Rasmussen, M., West, R., Burgess, J., Lee, I. and Scherson, D., "Bifunctional Trehalose Anode Incorporating Two Covalently Linked Enzyme Acting in Series," *Anal. Chem.*, **83**, 7408-7411(2011).
- Lee, Y. S., Lim, K. and Minter, S. D., "Cascaded Biocatalysis and Bioelectrocatalysis: Overview and Recent Advances," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **72**, 467-488(2021).
- Hwang, E. T. and Lee, S., "Multienzymatic Cascade Reactions via Enzyme Complex by Immobilization," *ACS Catal.*, **9**, 4402-4425(2019).
- Zhang, Y., Selvarajan, V., Shi, K. and Kim, C.-J., "Fabrication and Characterization of Glucose-oxidase-trehalose Electrode Based on Nanomaterial-coated Carbon paper," *RSC Adv.*, **13**, 33918(2023).
- U.S., J., Rewatkar, P. and Goel, S., "Miniaturized Polymeric Enzymatic Biofuel Cell with Integrated Microfluidic Device and Enhanced Laser Ablated Bioelectrodes," *Int. J. Hydrog. Energy.*, **46**, 3183-3192(2021).
- Shan, D., Yao, W. and Xue, H., "Electrochemical Study of Ferrocenemethanol-modified Layered Double Hydroxides Composite Matrix: Application to Glucose Amperometric Biosensor," *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 432-437(2007).
- Raad, F. A., Picot, P., Barriet, E., Caer, S. L., Schaming, D., Sicard, L. and Thill, A., "Redox Behavior of Ferrocene-methanol Encapsulated in Hydrophobic Nanotubes," *Appl. Clay Sci.*, **276**, 107909(2025).
- Ariga, K., Rezki, M., Suzuki-Nagata, K., Mikawa, T. and Tsujimura, S., "MOF-based Hybrid Electrodes for Multi-enzyme Cascade Reaction with Stabilized Mediator Immobilization," *Chem. Commun.*, **61**, 12309-12312(2025).
- Rezki, M. and Tsujimura, S., "Hybrid Bioelectronic Interfaces with Supramolecularly Immobilized Redox Mediators for Ultra-stable and High-performance Enzyme Electrodes," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **17**, 44101-44111(2025).
- Takeda, K., Minegishi, Y., Lundin, S. T. B., Yoshida, A., Nishina, Y., Nishihara, H., and Itoh, T., "Quinone-Based Mediator Immobilized Mesoporous Electrodes for Bioelectrocatalysis of Glucose Dehydrogenase," *ACS Appl. Bio Mater.*, **9**(3), 1365-1373

- (2026).
15. Das, P., Das, M., Chinnadayala, S. R., Singha, I. M. and Goswami, P., "Recent Advances on Developing 3rd Generation Enzyme Electrode for Biosensor Applications," *Biosens. Bioelectron.*, **79**, 386-397(2016).
 16. Pichardo, S., Gutierrez-Praena, D., Puerto, M., Sanchez, E., Grilo, A., Camean, A. M., and Jos, A., "Oxidative Stress Responses to Carboxylic Acid Functionalized Single Wall Carbon Nanotubes on the Human Intestinal Cell Line Caco-2," *Toxicol. In Vitro*, **26**, 672-677(2012).
 17. Wang, X., Kim, J. H., Choi, Y. B., Kim, H.-H 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).
 18. Sheldon, R. and Pelt, S. V., "Enzyme Immobilization in Biocatalysis: Why, What and How," *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 6223-6235(2013).
 19. Wang, L., Xu, Rong, Chen, Y. and Jiang, R., "Activity and Stability Comparison of Immobilized NADH Oxidase on Multi-walled Carbon Nanotubes, Carbon Nanospheres, and Single-walled Carbon Nanotubes," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **69**, 120-126(2011).
 20. Asuri, P., Bale, S. S., Pangule, R. C., Shah, D. A., Kane, R. S. and Dordick, J. S., "Structure, Function, and Stability of Enzymes Covalently Attached to Single-Walled Carbon Nanotubes," *Langmuir*, **23**, 12318-12321(2007).
 21. Loew, N., Ofuji, T., Shitanda, I., Hoshi, Y., Kitazumi, Y., Kano, K., and Itagaki, M., "Cyclic Voltammetry and Electrochemical Impedance Simulation of the Mediator-type Enzyme electrode Reaction Using Finite Element Method," *Electrochim. Acta.*, **367**, 137483(2021).
 22. Gao, P., Kasama, T., Shin, J., Huang, Y., and Miyake, R., "A Mediated Enzymatic Electrochemical Sensor Using Paper-based Laser-induced Graphene," *Biosensors.*, **12**, 995(2022).
 23. Lasia, A., "Impedance of Porous Electrodes," *Curr. Opin. in Electrochem.*, **54**, 101764(2025).
 24. Mei, B., Lau, J., Lin, T., Tolbert, S. H., Dunn, B. S., and Pilon, L., "Physical Interpretations of Electrochemical Impedance Spectroscopy of Redox Active Electrodes for Electrical Energy Storage," *J. Phys. Chem. C*, **122**, 24499-24511(2018).
 25. Torrigino, F., Nagel, M., Hartmann, M., and Herkendell, K., "Electrochemical Impedance Spectroscopy As a Characterization Method for Enzymatic Fuel Cell Bioanodes," *ChemElectroChem.*, **11**, e202400329(2024).
 26. Han, J., Hwang, S., and Kim, J. H., "Electrochemical Impedance Spectroscopy Analysis of Plasma-treated, Spray-coated Single-walled Carbon-nanotube Film Electrodes for Chemical and Electrochemical Devices," *Microchemical J.*, **188**, 108446(2023).
 27. Thangavel, B., Venkatachalam, G. and Shin, J. H., "Emerging Trends of *Bilirubin Oxidases* at the Bioelectrochemical Interface: Paving the Way for Self-Powered Electrochemical Devices and Biosensors," *ACS Appl. Bio. Mater.*, **7**, 1381-1399(2024).
 28. Thomas, J. H., Drake, J. M., Paddock, J. R., Conklin, S., Johnson, J. and Seliskar, C. J., "Characterization of ABTS at a Polymer-modified Electrode," *Electroanal.*, **16**, 547-555(2004).
 29. Rasmussen, M., Ritzmann, R. E., Lee, I., Pollack, A. J., and Scherson, D., "An Implantable Biofuel Cell for a Live Insect," *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 1458-1460(2012).
 30. Shoji, K., Akiyama, Y., Suzuki, M., Hoshino, T., Nakamura, N., Ohno, H., and Morishima, K., "Insect Biofuel Cells using Trehalose Included in Insect Hemolymph Leading to an Insect-mountable Biofuel Cell," *Biomed. Microdevices*, **14**, 1063-1068(2012).

Authors

YanQing Zhang: Master course, Department of Chemical Engineering, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, 52828, Korea; nvhyun@163.com

Monisha Aravazhi Anandan: Master course, Department of Chemical Engineering, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, 52828, Korea; akmonisha7@gmail.com

Minji Kim: Undergraduate course, Department of Chemical Engineering, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, 52828, Korea; sandy76885@gmail.com

Chang-Joon Kim: Professor, Department of Chemical Engineering, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, 52828, Korea; cj_kim@gnu.ac.kr