

젖산 산화효소-카탈라아제-미토콘드리아 전극 제작 및 특성 분석

시킴\* · 마니칸단 키에르티 부산\* · 최영봉\*\*\* · 김창준\*\*\*\*†

\*경상국립대학교 화학공학과 및 그린에너지 연구소

\*\*경상국립대학교 나노신소재융합공학과

\*\*\*단국대학교 코스메디컬소재학과

(2024년 6월 18일 접수, 2024년 7월 7일 수정본 접수, 2024년 7월 7일 채택)

Fabrication and Characterization of Lactate Oxidase-catalase-mitochondria Electrode

Ke Shi\*, Keerthi Booshan Manikandan\*, Young-Bong Choi\*\*\* and Chang-Joon Kim\*\*\*\*†

\*Department of Chemical Engineering and RIGET

\*\*Department of Materials Engineering and Convergence Technology, Gyeongsang National University,  
501 Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam, 52828, Korea

\*\*\*Department of Cosmedical & Materials, College of Bio-convergence, Dankook University,  
119, Dandae-ro, Dongnam-gu, Cheonan, Chungnam, 31116, Korea

(Received 18 June 2024; Received in revised from 7 July 2024; Accepted 7 July 2024)

요 약

젖산 전극은 환자의 건강상태와 스트레스 수준, 및 운동전수의 피로도를 실시간으로 모니터링하는 젖산 센서 또는 젖산 연료전지 전극으로 활용될 수 있다. 본 연구에서는 젖산 산화효소, 카탈라아제, 미토콘드리아로 구성된 고성능 전극을 제작하고 전극의 표면분석 및 전기화학적 특성을 조사하였다. 단일벽 탄소나노튜브로 개질된 탄소종이(CP-SWCNT)는 개질 전보다 전기 전도성이 크게 향상되었다. 젖산 산화효소, 카탈라아제, 그리고 미토콘드리아가 부착된 전극(CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito)은 젖산 산화효소와 카탈라아제가 부착된 전극에 비하여 많은 전류를 생산하였다. 빌리루빈 산화효소(BOD)가 부착된 전극(CP-SWCNT-BOD)이 생산하는 환원전류량은 전해질의 산소 존재 유무에 따라 크게 영향을 받았다. CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito (anode)와 CP-SWCNT-BOD (cathode)로 구성된 연료전지는 133  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 로 방전 시 0.2 V의 셀 전위를 유지하며 29  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 의 전력을 생산하였다. 본 연구결과는 미토콘드리아가 젖산 센서 및 연료전지 성능 향상에 필수적인 생체물질임을 시사한다.

**Abstract** – The lactate electrode can be utilized either as an electrode for lactate sensor to monitor the patient's health status, stress level, and athlete's fatigue in real time or lactate fuel cell. In this study, we fabricated a high-performance electrode composed of lactate oxidase, catalase, and mitochondria, and investigated the surface analysis and electrochemical properties of this electrode. Carbon paper modified with single-walled carbon nanotubes (CP-SWCNT) had significantly improved electrical conductivity compared to before modification. The electrode to which lactate oxidase, catalase, and mitochondria were attached (CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito) produced a higher current than the electrode to which lactate oxidase and catalase were attached. The amount of reduction current produced by the bilirubin oxidase (BOD)-attached electrode (CP-SWCNT-BOD) was greatly affected by the presence or absence of oxygen in the electrolyte. The fuel cell composed of CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito (anode) and CP-SWCNT-BOD (cathode) produced maximum power (29  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) at a discharge current density of 133  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . From this study, we had proved that mitochondria is essential for improving lactate sensor and fuel cell performance.

Key words: Lactate oxidase, Catalase, Mitochondria, Carbon paper, Single-walled carbon nanotubes, Hybrid electrode

1. 서 론

†To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: cj\_kim@gnu.ac.kr

\*Ke Shi and Keerthi Booshan Manikandan, contributed equally to this work.  
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.

젖산은 스트레스, 심부전, 저산소 상태 등 다양한 신체 상태를 나타내는 중요한 생체지표 물질이다[1,2]. 스트레스 상태에서 해당작용(glycolysis)의 대사속도가 미토콘드리아의 TCA 회로 대사속도를 초과하게 되어 피루브산(pyruvate)이 축적된다. 이 피루브산은

결국 젖산으로 전환되어 혈액으로 이동한다[3]. 과도한 운동을 하는 운동선수들은 혈중 젖산 농도가 급격히 증가하며, 이로 인해 피로와 근육경직을 경험한다[4]. 이러한 현상을 바탕으로 신체 내 젖산 농도를 검출하는 센서를 개발하면 환자의 건강상태와 스트레스 수준, 운동선수의 피로도를 실시간으로 모니터링할 수 있으며, 문제에 신속히 대응할 수 있다. 또한, 땀 속 젖산을 이용한 연료전지를 개발하면 웨어러블 디바이스의 전원 공급원으로 활용될 수 있다. 이러한 이유로 젖산 센서 또는 연료전지 개발을 위한 연구가 활발하게 진행 중이다[5,6].

그러나 젖산 산화효소만을 사용하는 기존 젖산 센싱 전극은 몇 가지 한계가 있다. 첫째, 젖산 산화효소는 젖산을 피루브산과 과산화수소( $H_2O_2$ )로 전환한다[1,7,8]. 젖산이 완전 산화된다면 이론적으로 12개의 전자가 생성될 수 있지만[9], 젖산 산화효소는 젖산 1 몰당 2개의 전자만 생성하고, 부산물인 과산화수소로 인해 전극의 성능이 감소할 수 있다. 본 연구팀은 젖산 산화효소와 카탈라아제(catalase)로 구성된 이효소 전극을 개발하였고 이효소 전극은 기존 전극보다 우수한 성능을 보였다[10]. 둘째, 생성물 농도가 일정 수준을 초과하면 젖산 산화효소가 저해를 받아 반응속도가 감소한다. 미토콘드리아를 도입한다면, 생성물인 피루브산을 더욱 완전히 산화시켜 피루브산의 소모도 증진 및 전자 생산을 증가시킬 수 있다. 미토콘드리아는 피루브산을 아세틸-CoA로 전환하고 TCA 사이클을 통해  $CO_2$ 와 에너지 분자를 생성한다[11]. 따라서 젖산 산화효소, 카탈라아제, 미토콘드리아가 조합되면 과산화수소 제거, 생성물의 지속적 사용을 통한 효율적인 전자 생성과 효소 활성을 유지할 수 있다(Fig. 1).

본 연구에서는 젖산 산화효소, 카탈라아제, 미토콘드리아로 구성된 전극을 제작하고 전극의 전기화학적 특성을 분석하여 전극 성능 향상을 확인하였다. 전극의 전기전도도를 향상시키기 위해 탄소종이 표면에 단일벽 탄소나노튜브(single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)를 부착하였다. 효소 활성점 부위에서 전극으로 전자를 전달하는 전자전달체로 산화·환원 고분자를 사용하였다. 이를 통해 젖산 산화반응에서 발생하는 과산화수소를 효과적으로 제거하고 피루브산의 소모를 촉진하여 전자생성을 높일 수 있었다.

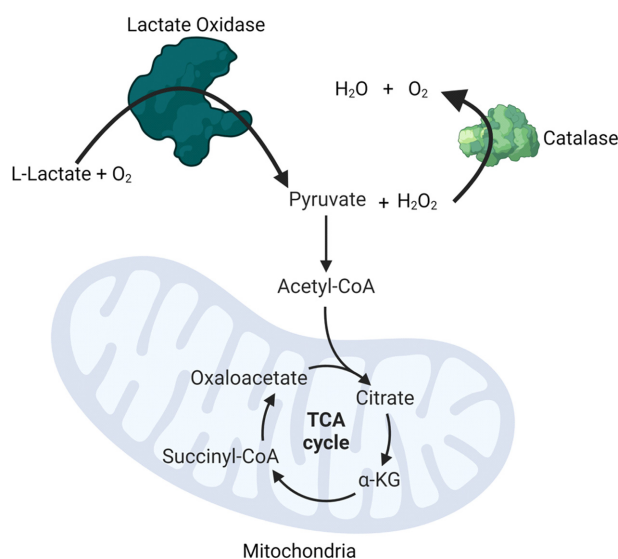


Fig. 1. Schematic representation of lactate oxidation through cooperation between lactate oxidase, catalase, and mitochondria.

## 2. 실험

### 2-1. 실험 재료

*Aerococcus viridans* 유래 젖산 산화효소(lactate oxidase, LOx, 제품번호 L9795), Bovin liver 유래 카탈라아제(catalase, Cat, 제품번호 C1345), *Myrothecium verrucaria* 유래 빌린루빈 산화효소(bilirubin oxidase, BOD, 제품번호 B0390), Poly(ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDGE, 평균분자량 = 500, 제품번호 475696), 젖산나트륨(sodium-L-lactate, 제품번호 L7022) 및 고순도의 기타 염류들을 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, USA)에서 구입하였다. 미토콘드리아(mitochondria, Mito) 생산을 위하여 한국 미생물 보존센터(Seoul, Korea)에서 효모균(*Saccharomyces cerevisiae*, KCCM 11351)을 분양받았다. 배지용 효모 추출액(yeast extract), 펩톤, 아가(agar) 등을 Difco사 (Detroit, USA)에서 구입하였다. (주)위즈맥(Seoul, Korea)에서 탄소종이(HCP-020N)를 구입하였고 PVC 필름(두께, 200  $\mu m$ )과 3M 사(St. Paul, USA)의 양면테이프를 오피스디포(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 카복시기로 기능화된 단일벽 탄소나노튜브(carboxylic-acid-functionalized single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)를 사용하였다. 제조사 정보(Sigma-Aldrich 사, 제품 번호 652490)와 발표된 논문[12]에 따르면, 개별 SWCNTs의 평균 지름은  $1.4 \pm 0.1$  nm 이고 번들 차원(bundle dimension)은  $4-5$  nm  $\times$   $0.5-1.5$  nm이다. 본 연구팀은 anode와 cathode 용 전자전달체로 각각 poly(N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)2Cl] $^{+2+}$  (PVI-Os-dme)와 poly (N-vinylimidazole)-[Os(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)2Cl] $^{+2+}$  (PAA-PVI-Os-dCl)를 실험실에서 합성하여 사용하였다. PVI-Os-dme와 PAA-PVI-Os-dCl의 표준 산화·환원 전위는 0.14와 0.36 V (vs. Ag/AgCl)로 알려졌다[13,14].

### 2-2. 탄소종이 표면을 SWCNTs로 개질

양면테이프의 한쪽 면에 PVC 필름을 부착하고 다른 면에는 적당한 크기(3 cm  $\times$  0.3 cm)로 자른 탄소종이(carbon paper, CP)를 부착하였다. 전극은 세 부분으로 구분되었는데, 아랫부분(0.5 cm  $\times$  0.3 cm)과 윗부분은 각각 SWCNTs/효소 고정화와 전위차계(potentiostat)의 연결부위로 사용되었다. 중간 부분을 PVC 필름으로 감싸서 탄소종이가 용액과 접촉하는 것을 방지하였다. 10 mg의 SWCNTs를 유리 시험관에 넣고 10 mL의 증류수를 첨가하였다. SWCNTs 분산액을 포함한 유리 시험관을 40 kHz에서 작동하는 초음파 세척기(160 HT, soniclean Pty Ltd., Seoul, Korea)에서 96 W로 3 시간 동안 초음파 처리하였다. 초음파 처리는 음향 공동화에 의해 높은 전단력을 유도하며, 이는 SWCNT 번들에 균열을 일으킨다. 이러한 균열에서 SWCNT 표면이 수용액에 노출됨으로써 수용상에서 SWCNTs의 분산성이 향상되는 것으로 알려졌다[15,16]. 초음파 처리된 SWCNTs 분산액을  $1,106 \times g$ 로 10분간 원심분리하여 침전된 펠릿을 제거하고 SWCNTs가 균일하게 분산된 상등액을 회수하였다. 상등액(SWCNT 용액) 20  $\mu L$ 를 CP 아랫부분 표면에 도포한 후 상온에서 2시간 건조시켜 SWCNTs로 개질된 CP 전극(CP-SWCNT)을 제작하였다.

### 2-3. 효모균 배양 및 미토콘드리아 회수

고체배지에서 배양된 콜로니를 백금으로 긁어 YM broth(yeast extract 3.0 g/L, malt extract 3.0 g/L, peptone 5.0 g/L, dextrose 10.0 g/L)

50 mL가 담긴 500 mL 배플 삼각플라스크에 접종한 후 진탕배양기 (SI-400R/S, JeioTech, Daejeon, Korea)에서 30 °C, 200 rpm으로 중균배양 하였다. 배양액 OD<sub>600</sub>가 0.6~0.8에 도달한 후 배양액 2.0 mL를 YPG media (yeast extract 3.0 g/L, peptone 5.0 g/L, glycerol 1.14 g/L) 20 mL가 담긴 250 mL 배플 삼각플라스크에 접종하여 30 °C, 200 rpm으로 본 배양을 실시하였다. 배양액 OD<sub>600</sub>가 10.0~15.0에 도달한 후 배양을 종료하고 배양액을 4 °C, 8,000 rpm으로 원심분리하였다. 회수된 세포 펠렛으로부터 미토콘드리아를 분리 정제하기 위해 abcam 사(Cambridge, UK)의 Yeast Mitochondria Isolation Kit (ab178779)를 사용하였다. 분리·정제된 미토콘드리아를 storage buffer에 분산시킨 후 1.5 mL E-튜브에 20 µL씩 분주하였고, 이를 -70 °C 냉동고에 보관하였다. Thermo Fisher사(USA)에서 구입한 MitoTracker™ Deep Red FM (500 nM) 또는 Rhodamine 123 (1 µM)을 시료에 첨가한 후, 염색시약이 미토콘드리아 막 내부로 충분히 침투하여 염색할 수 있도록 상온에서 20분간 방치하였다. 이후 공초점 주사현미경(confocal microscopy, Nikon AX+Ni-E, Nikon, Yokohama, Japan)을 사용하여 염색된 시료 속의 미토콘드리아를 관찰하였다.

#### 2-4. (개질) 탄소종이 기반 효소-미토콘드리아 전극 제작

CP-SWCNT 표면에 LOx와 Cat이 동시에 부착된 전극(CP-SWCNTs-LOx-Cat)을 제작하였다. 10 mM phosphate buffer saline (PBS, pH 7.0)에 용해된 LOx (125 U/mL), Cat (1 mg/mL), PEGDGE (40 mg/mL), 및 PVI-Os-dme (10 mg/mL)를 2:2:4:1의 부피비로 잘 혼합하고 혼합액 20 µL를 CP-SWCNT 표면에 도포하였다. 이를 상온에서 2시간 건조시키고 4 °C에서 12시간 보관한 후 사용하였다. LOx, Cat, 및 Mito가 함께 부착된 전극(CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito)을 제작하였다. LOx (250 U/mL), Cat (1 mg/mL), PEGDGE (40 mg/mL), 분리·정제된 Mito 용액, PVI-Os-dme (10 mg/mL)를 2:1:1:4:1의 부피비로 잘 혼합하였다. 혼합액 20 µL를 CP-SWCNT 표면에 도포하고 이를 상온에서 2시간 건조, 4 °C에서 12시간 보관 후 사용하였다. BOD가 부착된 전극(CP-SWCNT-BOD)을 제작하였다. 10 mM PBS 용액에 잘 용해된 BOD (250 U/mL), PEGDGE (40 mg/mL), 및 PAA-PVI-Os-dme (10 mg/mL)를 4:4:1의 부피비로 잘 혼합하고 혼합액 20 µL를 CP-SWCNT 표면에 도포하였다.

#### 2-5. SWCNTs, 효소, 또는 미토콘드리아로 개질된 탄소종이 표면 분석

에너지 분산형 X-선 분광기(Energy dispersive X-ray spectroscopy, EDS)가 장착된 전계방사형 주사현미경(Field-emission scanning electron microscopy (Fe-SEM), Apero 2S, Thermo Fisher Scientific, UAS)을 사용하여 개질된 탄소종이 표면을 관찰하였다. 시료를 카본 테이프에 올려놓고 0.1 mbar 압력에서 sputter coater (208HR, Cressington Scientific Instruments, UK)를 사용하여 시료를 Pt로 코팅하였다.

#### 2-6. 전극의 전기화학적 특성 분석

전극 셀은 효소 전극(작업 전극), Pt wire(대전극), 그리고 기준전극인 Ag/AgCl (LF-2, Innovative Instruments Inc., Tampa, USA)로 구성되었다. 순환 전압전류법(cyclic voltammetry, CV)을 이용하여 전극의 전기화학적 특성을 평가하였다. 20 mM 젖산나트륨이 첨가된 10 mM PBS (pH 7.0) 10 mL에 전극들을 담그고 -0.4 ~ 0.6 V 전압 범위에서 20 mV/s의 주사속도(scan rate)로 anode 분석을 수

행하였다. 반면 질소 또는 산소로 30분간 퍼지한 10 mM PBS (pH 7.0) 10 mL에 전극들을 담그고 0.0 ~ 0.6 V 전압 범위에서 20 mV/s의 주사속도(scan rate)로 cathode 분석을 실시하였다. 두 번의 반복실험 평균값을 구하여 CV 곡선을 도시하였다. CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito (anode), cathode, 그리고 전해질 10 mL로 구성된 연료전지를 구성하였다. 전해질은 산소로 포화된 50 mM 젖산나트륨이 첨가된 10 mM PBS (pH 7.0)이다. 모든 전기화학 실험은 상온에서 전위차계(potentiostat, CH Instruments, model 660D, Houston, USA)를 사용하여 수행되었다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. 미토콘드리아 이미지 분석

Fig. 2는 MitoTracker™ Deep Red((a)&(b)) 또는 Rhodamine 123((c) & (d))으로 염색 후 두 가지 배율(×600, ×1000)에서 관찰된 미토콘드리아의 공초점 주사현미경 이미지이다. 염색된 시료의 공초점 주사현미경 이미지로 부터 시료 내에 미토콘드리아가 존재한다는 것을 알 수 있다. 친유성, 양이온성 염료인 MitoTracker™ Deep Red는 미토콘드리아 외막을 통과하여 내막 단백질의 thiol 기(-SH)와 공유결합을 형성한다. 염색된 미토콘드리아에서 발광되는 형광 강도는 미토콘드리아의 내부로 침투된 염료 농도에 좌우된다[17]. MitoTracker™ Deep Red로 온전한 미토콘드리아(live mitochondria)를 염색하여 볼 수 있는 반면, 막 전위가 손상된 미토콘드리아는 염색되지 않아 관찰되지 않는다. Rhodamine 123도 미토콘드리아 막에 잘 결합하는 친유성 염료이다. 막전위가 손상되지 않은 활성화된 미토콘드리아는 Rhodamine 123을 잘 축적하여 형광발광을 유도한다[18]. MitoTracker™ 또는 Rhodamine으로 염색된 시료 이미지로부터 시료 중에 온전한 미토콘드리아가 존재함을 알 수 있다.

#### 3-2. 전극 개질 및 표면 분석

FE-SEM/EDS 분석을 통해 탄소종이의 표면을 개질하기 전·후의

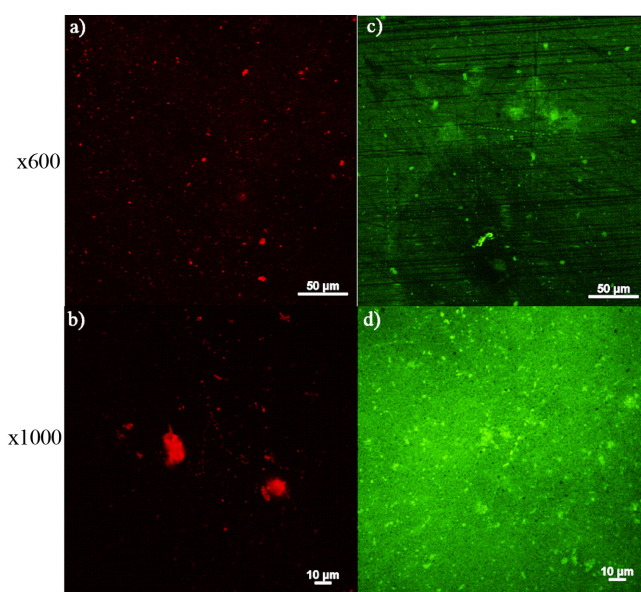


Fig. 2. Confocal microscopic images of stained mitochondria using (a) & (b) MitoTracker Deep Red and (c) & (d) Rhodamine 123 at different magnification (×600 and ×1,000).



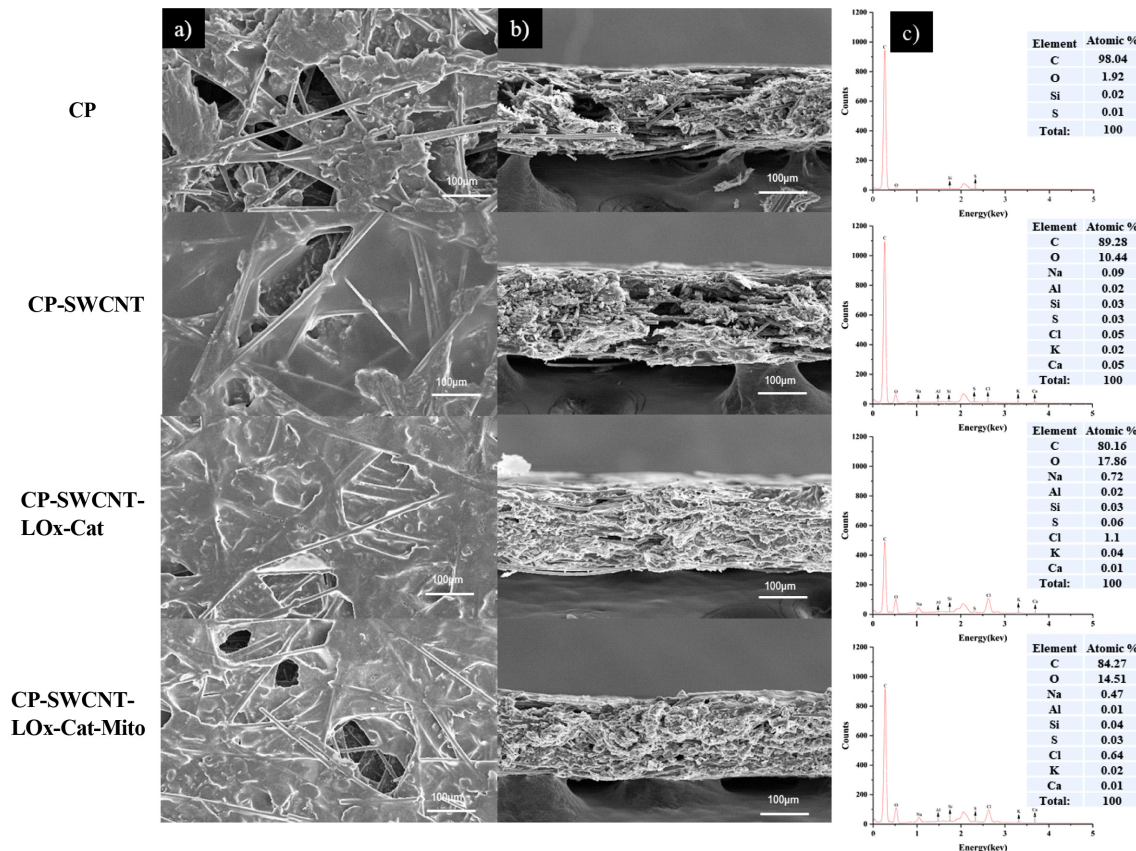


Fig. 3. (a) Surface-view and (b) cross-sectional view of SEM images and (c) corresponding EDS elemental mapping of bare and modified carbon papers.

형태학적 및 화학적 조성 변화를 조사하였다. 탄소종이와 SWCNTs로 개질된 탄소종이(CP-SWCNT)의 표면 및 단면 이미지를 Fig. 3(a)&(b)에 각각 나타내었다. SEM 분석결과에 따르면, 탄소종이는 탄소 플레이크와 탄소섬유가 무작위적으로 연결되어있으며, 다양한 크기의 세공이 존재하는 것으로 관찰되었다. 또한, SWCNTs는 탄소종이 표면 전체에 균일하게 분산되었을 뿐만 아니라, 세공 틈새에도 침투하여 잘 부착된 것이 확인되었다. EDS를 이용한 화학적 조성분석에 따르면(Fig. 3(c)), CP-SWCNT는 CP 대비 소량의 Na, Al, Cl, K가 추가로 검출되었으며, 이는 SWCNTs에 존재하는 불순물에 기인한 것으로 알려졌다[19]. 특히, SWCNTs 부착 후 탄소 원자 퍼센트는 98.04%에서 89.28%로 감소한 반면, 산소 원자 퍼센트는 1.92%에서 10.44%로 증가하였다. 즉, O/C 비율이 0.02에서 0.12로 증가하였는데, 이는 카르복실기(-COO-) 및 카르보닐기(-CO-)와 에테르기(-C-O-C-) 때문인 것으로 추정된다[20-24]. 이러한 결과는 SWCNTs가 탄소종이에 효과적으로 부착되었다는 것을 시사한다.

한편, CP-SWCNT와 비교하여 CP-SWCNT-LOx-Cat의 표면에서는 두꺼운 필름 층이 관찰되었으며, 단면 이미지에서는 세공 사이가 막혀 있는 것으로 보였다. 화학적 조성 분석 결과, CP-SWCNT 대비 CP-SWCNT-LOx-Cat의 탄소 원자 비율은 80.16%로 감소하였고, 산소 원자 비율은 17.86%로 증가하였다. 이는 CP-SWCNT 표면에 젖산 산화효소와 카탈라아제가 부착되어 O/C 비율이 0.22로 증가했음을 나타낸다. 젖산 산화 효소와 카탈라아제는 주로 단백질과 탄수화물로 구성된 효소이다. 단백질을 구성하는 펩티드 결합의

카보닐 기(-CO-)와 구성 성분인 아미노산에 존재하는 산소, 그리고 단백질의 주요 구성 성분인 탄수화물에 존재하는 다양한 산소 유도체 때문에 두 효소에 의한 산소 원자 비율이 증가한 것으로 추정된다. 또한 나트륨(0.72%)과 클로린 원자 함량(1.2%)이 눈에 띄게 증가하였는데, 이는 효소를 용해시킨 PBS 버퍼 용액의 성분에서 기인한 것으로 추측된다[25]. 이는 젖산 산화효소와 카탈라아제가 CP-SWCNT 표면에 부착되어 CP-SWCNT-LOx-Cat이 잘 제작되었음을 시사한다.

CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito 표면에서도 CP-SWCNT-LOx-Cat 표면과 유사한 형태학적 특성이 관찰되었다. 그러나 CP-SWCNT-LOx-Cat에 비하여 탄소원자 함량(84.27%)은 높은 반면 산소원자 함량(14.51%)은 낮았는데, 이는 O/C 비율이 0.17로 감소하였음을 나타낸다. 미토콘드리아는 세포 소기관으로 내용물들이 지질로 구성된 세포막에 둘러싸여 있고 단백질들이 세포막에 결합되어 있다[26]. 지질의 주성분은 탄소인데, CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito 표면 탄소함량이 CP-SWCNT-LOx-Cat보다 높은 것은 미토콘드리아의 상대적으로 높은 탄소함량에 기인한 것으로 추론된다. 이는 CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito가 잘 제작되었음을 시사한다. 바이오센서 제작에 널리사용되는 PEGDGE를 이용하여 CP 표면에 효소와 미토콘드리아를 고정화하였다. PEGDGE에 포함된 에폭시기가 효소의 아미노기와 반응하여 효소가 고정화된다는[27,28]. 또한, 탄소종이에 있는 세공들이 효소-미토콘드리아 복합체를 포획하여 고정화가 더욱 견고하게 이루어지는 것으로 판단된다.

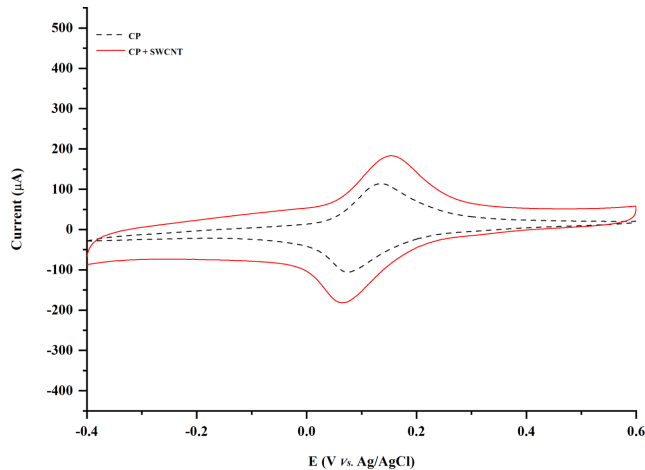


Fig. 4. Cyclic voltammograms for CP and CP-SWCNT in PBS (10 mM, pH 7.0) recorded at the scan rate of 20 mV/s.

### 3-3. SWCNTs로 개질된 탄소종이 전극의 전기화학적 특성

탄소 나노튜브가 전극의 전도성에 미치는 영향을 분석하기 위해 원래의 탄소종이(CP)와 탄소나노튜브(SWCNTs)로 개질된 탄소종이(CP-SWCNTs)의 전기화학적 특성을 비교 조사하였다. 그 결과를 나타내는 CV 곡선이 Fig. 4에 표시되어 있다. 이 곡선에서 0.1-0.2 V 범위의 전위에서 한 쌍의 증가된 산화·환원 피크가 관찰되었으며, 이들 피크의 산화·환원 전위 평균값이 CP에서는 71 mV, CP-SWCNT에서는 80 mV로 측정되었다. 이 측정값과 전자전달체인 PVI-Os-dme의 표준 환원전위(140 mV) [13,14]를 감안하면, 관찰된 피크가 PVI-Os-dme의 산화·환원 피크와 일치한다고 할 수 있다.

특히, CP-SWCNT에서 산화·환원 전류피크의 강도가 원래의 CP에 비해 더 높았는데, 이는 SWCNTs가 전극의 전기전도성을 크게 향상시켰음을 시사한다. SWCNTs가 전극의 전자전달저항(charge transfer resistance,  $R_{ct}$ )을 월등히 감소시킨 결과가 보고되었다[29]. 이는 SWCNTs의 높은 전도성이 전극 성능을 개선할 수 있다는 기존 연구 결과들[30]과 일치한다. 따라서 SWCNTs로 개질된 탄소종이는 고성능 전극 재료로서의 가능성을 보여준다. 이러한 결과는

SWCNTs를 이용한 전극 제조 분야에서의 고성능화를 제안하는 데 기여할 수 있다.

### 3-4. 전극 개질 및 표면 분석

Fig. 5(a)는 CP-SWCNT-LOx-Cat의 CV 곡선을 보여준다. 젖산이 첨가되지 않은 전해질 용액에서 전극이 생성하는 전류의 산화·환원 전위는 약 0.05-0.15 V (vs. Ag/AgCl)이었으며, 0.12 V (vs. Ag/AgCl)에서 피크 산화 전류(273  $\mu$ A)가 관찰되었다. 젖산이 첨가되지 않은 전해질에 비해 젖산을 첨가했을 때 산화 피크전위(anodic peak potential)의 변화는 없었으나, 피크 산화전류의 세기는 436  $\mu$ A로 급격히 증가하였다. 이는 젖산이 첨가되지 않은 전해질에서의 수치보다 1.6배 높은 것으로, 전극이 젖산을 기질로 사용하며 전류를 효과적으로 생성한다는 것을 의미한다. 이 결과는 전극에 고정화된 젖산 산화효소와 카탈라아제가 젖산 산화반응을 촉진하고 생성되는 과산화수소의 양을 최소화하여 효율적으로 전류를 생성시킬 수 있음을 시사한다.

CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito의 CV 곡선을 Fig. 5(b)에 나타내었다. CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito도 CP-SWCNT-LOx-Cat과 유사하게 젖산 첨가에 반응하여 젖산이 첨가되지 않은 전해질에서보다 더 많은 산화 전류를 생성하였다. 젖산이 첨가된 전해질에서 CP-SWCNT-LOx-Cat과 CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito가 생성하는 전류를 비교하였다. 두 전극은 동일한 전위에서 산화·환원 피크전류를 나타내었고 CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito가 생성하는 산화전류의 세기(463  $\mu$ A)는 CP-SWCNT-LOx-Cat이 생성하는 산화 전류보다 높은 값을 보였다. 본 결과는 CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito 전극의 성능이 CP-SWCNT-LOx-Cat 전극보다 더 우수함을 시사한다. 이러한 우수한 성능은 CP-SWCNT-LOx-Cat 표면에 미토콘드리아가 추가되어 전극의 생화학적 성능이 향상되었기 때문으로 해석될 수 있다.

CP-SWCNT-LOx-Cat의 젖산 산화효소는 젖산을 산화시켜 피루브산과 과산화수소를 생성하며, 생성된 과산화수소는 카탈라아제에 의해 물과 산소로 전환된다. 한편, CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito는 젖산 산화효소의 촉매작용으로 생성된 피루브산이 미토콘드리아로 이동하여 아세틸Co-A로 전환된 후 구연산 회로에 의하여 더욱 산화되고 분해된다. 이론적으로 젖산을 완전히 산화시키는 시스템은

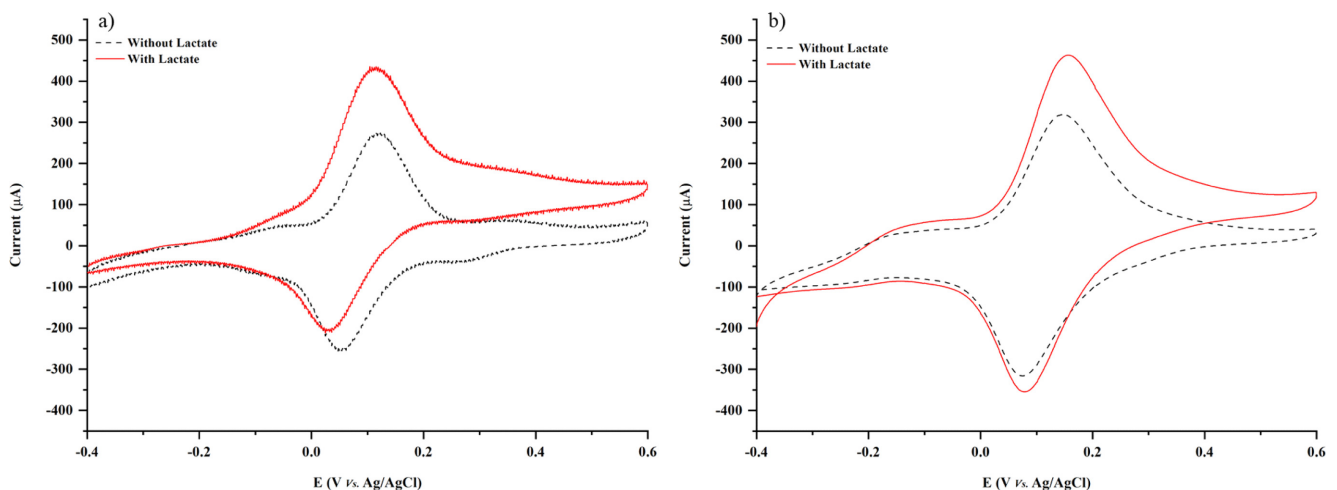


Fig. 5. Cyclic voltammograms for (a) CP-SWCNT-LOx-Cat and (b) CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito in PBS (10 mM, pH 7.0) with or without sodium-L-lactate (20 mM) recorded at the scan rate of 20 mV/s.

젖산을 피루브산으로 산화시키는 시스템보다 6배나 많은 전류를 생산할 수 있다[31]. 그러나 젖산 산화효소와 미토콘드리아로 구성되어 젖산을  $\text{CO}_2$ 로 완전히 산화시킬 것으로 예상되는 CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito는 실제로 젖산 1몰당 2개의 전자만을 생산하는 CP-SWCNT-LOx-Cat보다 10% 높은 전류만 생산하였다. 이는 피루브산의 미토콘드리아로의 이동을 방해하는 물질전달 장벽, 생성된 전자의 미토콘드리아 막 관통을 방해하는 막 저항, 미토콘드리아에서 발생된 전자의 전극으로의 이동 방해 등 전극 성능에 영향을 미치는 여러 방해 요소를 때문인 것으로 추측된다[32,33]. 전극의 성능을 이론값에 가깝게 향상시키기 위해서는 이러한 문제점들을 해결하기 위한 추가적인 연구가 필요하다.

### 3-5. CP-SWCNT에 BOD가 부착된 cathode 제작 및 성능 평가

효소 연료전지는 anode 뿐만 아니라 환원극인 cathode도 필요하기 때문에 CP-SWCNT 표면에 BOD, PEGDGE, 및 PAA-PVI-Os-dCl로 구성된 혼합액을 도포한 cathode(CP-SWCNT-BOD)를 제작하였다. PBS 용액에서 CV 분석을 통하여 cathode의 전기화학적 특성을 조사하였고 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 0.3 V(vs. Ag/

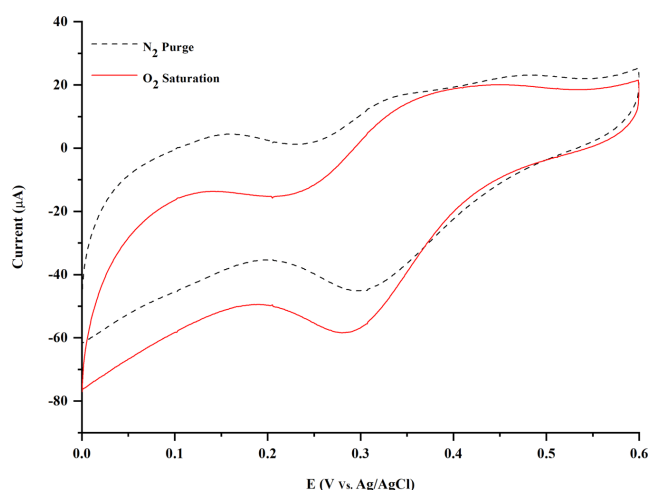


Fig. 6. Cyclic voltammograms for CP-SWCNT-BOD in PBS (10 mM, pH 7.0) purged with  $\text{N}_2$  or saturated with  $\text{O}_2$  recorded at the scan rate of 20 mV/s.

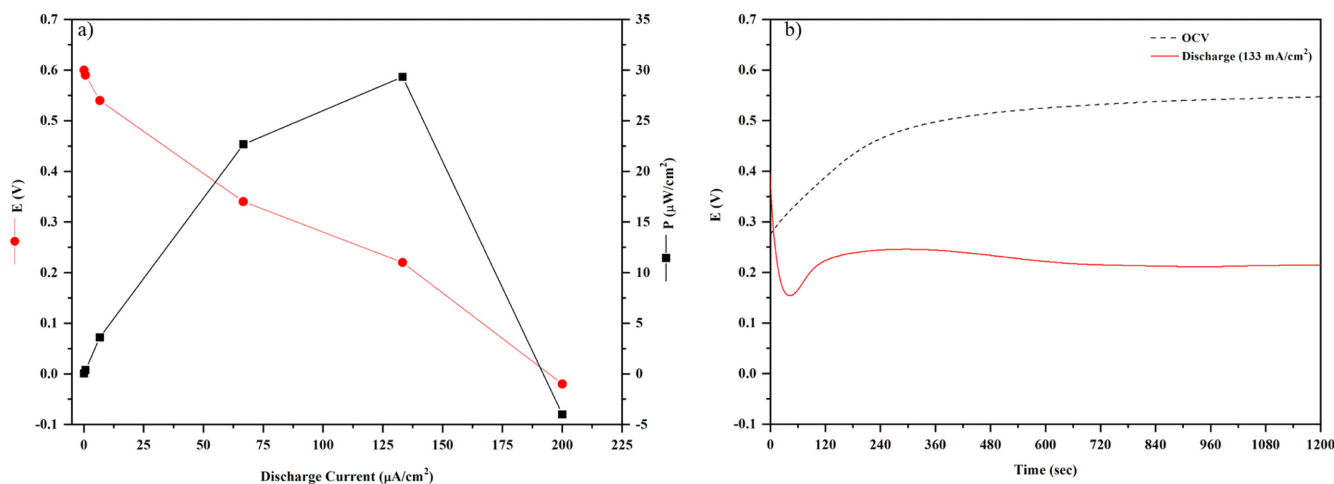


Fig. 7. (a) Cell voltage and power density curves under different discharge current; (b) time profiles of the cell voltage under discharge.

AgCl) 근처의 전위에서 환원전류 피크가 관찰되었는데, 이는 전자 전달체인 PAA-PVI-Os-dCl의 환원전위에 해당한다[14]. 질소로 퍼지하여 산소가 제거된 전해질에서 약한 환원전류가 관찰된 반면, 산소로 포화된 전해질에서는 전극이 생산하는 환원 전류 세기가 급격히 증가하였다. 본 결과는 cathode가 전자 싱크(sink)로서 효과적으로 작동하기 위해서는 전해질에 충분한 양의 산소를 공급해야 한다는 것을 시사한다. Anode로부터 생성된 전자는 cathode를 통하여 PAA-PVI-Os-dCl을 환원시키고 환원된 PAA-PVI-Os-dCl은 BOD 촉매작용으로 산소가 물로 환원되는 반응에 전자를 공급하며 자신은 산화된다[14].

### 3-6. 연료전지 제작 및 성능 평가

CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito와 CP-SWCNT-BOD를 각각 anode와 cathode로 사용하는 셀을 제작하고 이의 성능평가를 수행하였다. 셀의 회로를 개방하고 전류가 흐르지 않은 상태에서 측정하였다. 전압은 일정 시간 증가하였고 360 sec 이후 0.53 V (vs. Ag/AgCl)로 일정하게 유지되었고 그 값을 개방회로 전압(open circuit voltage, OCV)으로 결정하였다. 한편, 전지 셀로부터 0.007~200  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  전류를 방전시키며 셀의 전압을 측정하였다. 전류 방전이 시작된 후 셀 전압은 지속적으로 증가하다 정상상태에 도달하여 일정값을 유지하였다. 본 실험에서는 정상상태의 셀 전압 값을 이용하여 I-V 곡선을 작성하였다. Fig. 7(a)에 나타냈듯이, 방전 전류량을 증가시키며 따라 셀 전압은 서서히 감소하였고 방전전류 밀도가 133  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  이상에서는 셀 전압이 급격히 감소하였다. 셀 전력량( $P=I \times V$ )은 방전 전류밀도 증가에 따라 증가하다 방전전류 밀도 133  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 에서 최대 전력값인 29  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 에 도달하였고 이때 셀 전압은 0.2 V였다. 전류방전 시 시간에 따른 셀 전압 변화가 Fig. 7(b)에 나타나 있다. 기존 젖산 연료전지가 생산하는 전력은 수  $\text{mW}/\text{cm}^2$ 으로 보고되었으며[5,34], 이는 본 연구팀이 개발한 전극이 생산하는 전력보다 높은 값이다. 연료전지의 성능은 anode뿐만 아니라 cathode, 전자전달체 종류, 전해질 및 산소 공급 등 다양한 요소에 의해 영향을 받는다. 언급하였듯이, 이러한 요소 외에도, 미토콘드리아에서 전극으로의 전자전달이 저해를 받는 것으로 여겨진다. 향후 전극 최적화와 미토콘드리아로부터 전극표면으로의 전자전달이 개선된다면 연료전지의 성능은 더욱 향상될 것이다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 탄소종이-탄소나노튜브 표면에 젖산 산화효소, 카탈라아제, 및 미토콘드리아가 동시에 부착된 하이브리드 전극을 제작하고 이의 전기화학적 특성을 분석하고 이를 anode로 사용하는 연료전지 성능을 분석하였다. SWCNTs로 개질된 탄소종이는 개질 전보다 월등히 높은 전기전도성을 나타내었다. 젖산 산화효소, 카탈라아제, 및 미토콘드리아로 구성된 전극(CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito)은 젖산 산화효소와 카탈라아제로 구성된 전극(CP-SWCNT-LOx-Cat)보다 높은 산화전류를 생성하였다. BOD가 부착된 전극(CP-SWCNT-BOD)은 질소로 퍼지된 전해질에서보다 산소로 포화된 전해질에서 더 많은 환원 전류를 생산하였다. CP-SWCNT-LOx-Cat-Mito와 CP-SWCNT-BOD를 각각 anode와 cathode로 사용하는 연료전지는 방전전류 133  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 에서 최대값인 29  $\text{mW}/\text{cm}^2$ 의 전력을 생산하였다.

#### 감 사

이 성과는 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2020R1F1A1054433, 2021RIS-003)

#### References

1. Rathee, K., Dhull, V., Dhull, R. and Singh, S., "Biosensors Based on Electrochemical Lactate Detection: A Comprehensive Review," *Biochem. Biophys. Rep.*, **5**, 35-54(2016).
2. Madden, J., Vaughan, E., Thompson, M., Riordan, A. O., Galvin, P., Lacopino, D. and Teixeira, S. R., "Electrochemical Sensor for Enzymatic Lactate Detection Based on Laser-scribed Graphitic Carbon Modified with Platinum, Chitosan and Lactate Oxidase," *Talanta*, **246**, 123492(2022).
3. Derbyshire, P. J., Barr, H., Davis, F. and Higson, S. P., "Lactate in Human Sweat: A Critical Review of Research to the Present Day," *J. Physiol. Sci.*, **62**, 429-440(2012).
4. Chung, M., Fortunato, G. and Radacsi, N., "Wearable Flexible Sweat Sensors for Healthcare Monitoring: A Review," *J. R. Soc. Interface*, **16**, 20190217(2019).
5. Shitanda, I., Takamatsu, K., Niiyama, A., Mikawa, T., Hoshi, Y., Itagaki, M. and Tsujimura, S., "High-power Lactate/ $\text{O}_2$  Enzymatic Biofuel Cell Based on Carbon Cloth Electrodes Modified with MgO-templated Carbon," *J. Power Sources*, **436**, 226844(2019).
6. Bandodkar, A. J., You, J.-M., Kim, N.-H., Gu, Y., Kumar, R., Mohan, A. M. V., Kurniawan, J., Imani, S., Nakagawa, T., Parish, B., Parthasarathy, M., Mercier, P. P., Xu, S. and Wang, J., "Soft, Stretchable, High Power Density Electronic Skin-based Biofuel Cells for Scavenging Energy from Human Sweat," *Energy Environ. Sci.*, **10**, 1581-1589(2017).
7. Choi, H., Yeo, M., Kang, Y., Kim, H. J., Park, S. G., Jang, E., Park, S. H., Kim, E. and Kang, S., "Lactate Oxidase/Catalase-Displaying Nanoparticles Efficiently Consume Lactate in The Tumor Microenvironment to Effectively Suppress Tumor Growth," *J. Nanobiotechnol.*, **21**, 5(2023).
8. Andrus, L. P., Unruh, R., Wisniewski, N. A. and McShane, M. J., "Characterization of Lactate Sensors Based on Lactate Oxidase and Palladium Benzoporphyrin Immobilized in Hydrogels," *Bio-sensors*, **5**, 398-416(2015).
9. Sokic-Lazic, D., Andrade, A. R. D. and Minter, S. D., "Utilization of Enzyme Cascade for Complete Oxidation of Lactate in an Enzymatic Biofuel Cell," *Electrochim. Acta*, **56**, 10772-10775(2011).
10. Shi, K., Selvarajan, V., Yang, Y.-Y. and Kim, C.-J., "Fabrication and Characterization of Carbon Nanotube-modified Carbon Paper-based Lactate Oxidase-catalase Electrode," *Korean Chem. Eng. Res.*, **61**, 1-8(2023).
11. McKee, T. and McKee J. R., *Biochemistry: The Molecular Basis of Life*, 5<sup>th</sup> ed., Oxford, New York, NY (2013).
12. Pichardo, S., Gutierrez-Praena, D., Puerto, M., Sanchez, E., Grilo, A., Camean, A. M. and Jos, A., "Oxidative Stress Response to Carboxylic Acid Functionalized Single Wall Carbon Nanotubes on the Human Intestinal Cell Line Caco-2," *Toxicol In Vitro*, **26**, 672-677(2012).
13. Timur, S., Haghighi, B., Tkac, J., Pazarlioglu, N., Telefoncu, A., and Gorton, L., "Electrical Wiring of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* with Osmium Redox Polymers," *Bioelectrochemistry*, **71**, 38-45(2007).
14. Kim, H.-H., Mano, N., Zhang, Y., and Heller, A., "A Miniature Membrane-less Biofuel Cell Operating under Physiological Condition at 0.5 V," *J. Electrochem. Soc.*, **150**, A209-A213(2003).
15. Zaib, Q. and Ahmad, F., "Optimization of Carbon Nanotube Dispersions in Water Using Response Surface Methodology," *ACS Omega*, **4**, 86-92(2019).
16. Koh, B. and Cheng, W., "The Impact of Sonication on the Surface Quality of Single-Walled Carbon Nanotubes," *Pharm. Nanotechnol.*, **104**, 2594-2599(2015).
17. Neikirk, K., Marshall, A. G., Kula, B., Smith, N., Leblanc, S., and Hinton Jr., A., "MitoTracker: A Useful Tool in Need of Better Alternatives," *Eur. J. Cell Biol.*, **102**, 151371(2023).
18. Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., and Lenaz, G., "Rhodamine 123 As a Probe of Mitochondrial Membrane Potential: Evaluation of Proton Flux Through  $F_0$  during ATP Synthesis," *Biochim. Biophys. Acta*, **1606**, 137-146(2003).
19. Manke, et al., "Effect of Fiber Length on Carbon Nanotube-Induced Fibrogenesis," *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 7444-7461(2014).
20. Zhang, Y., Selvarajan, V., Shi, K. and Kim, C.-J., "Fabrication and Characterization of Glucose-Oxidation-Trehalase Electrode Based on Nanomaterial-Coated Carbon Paper," *RSC Adv.*, **13**, 33918-33928(2023).
21. Cai, B., Li, M., Zhou, J., Tan, L., Li, D. and Ao, Z., "Effect of Oxygen-Containing Functional Groups at SWCNT on the Formation of Sodium and Lithium Dendrites," *Surf. Interfaces.*, **40**, 103074(2023).
22. Khan, N., Anwer, A. H., Ahmad, A., Sabir, S., Sevda, S. and Khan, M. Z., "Investigation of CNT/PPy-Modified Carbon Paper Electrodes Under Anaerobic and Aerobic Conditions for Phenol Bioremediation in Microbial Fuel Cells," *ACS Omega*, **5**, 471-480(2020).
23. Kuznetsova, A. et al., "Oxygen-containing Functional Groups on Single-wall Carbon Nanotubes: NEXAFS and Vibrational Spectroscopic Studies," *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 10699-10704(2001).
24. Benko, Aleksandra. et al., "Covalently Bonded Surfaces Functional Groups on Carbon Nanotubes: From Molecular Modeling to Practical Applications," *Nanoscale*, **13**, 10152-10166(2001).



25. Barreca, D., Neri, G., Scala, A., Fazio, E., Gentile, D., Rescifina, A. and Piperno, A., "Covalently Immobilized Catalase on Functionalized Graphene: Effect on the Activity, Immobilization Efficiency, and Tetramer Stability," *Biomater. Sci.*, **6**, 3231-3240(2018).
26. Willey, J. M., Sherwood, L. M. and Woolverton, C. J., Prescott, Harley, and Klein's Microbiology, 7<sup>th</sup> ed., McGraw-Hill, New York, NY(2008).
27. Jayakumar, K., Bennett, R. and Leech, D., "Electrochemical Glucose Biosensor Based on an Osmium Redox Polymer and Glucose Oxidase Grafted to Carbon Nanotubes: A Design-of-Experiments Optimisation of Current Density and Stability," *Electrochim. Acta.*, **371**, 137845(2021).
28. Vasylieva, N., Barnych, B., Meiler, A., Maucler, C., Pollegioni, L., Lin, J.-S., Barbier, D. and Marinesco, S., "Covalent Enzyme Immobilization by Poly(Ethylene Glycol) Diglycidyl Ether (PEGDE) for Microelectrode Biosensor Preparation," *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 3993-4000(2011).
29. Alhansa, R., Singhb, A., Singhala, C., Naranga, J., Wadhwa, S. and Mathurb, A., "Comparative Analysis of Single-walled and Multi-walled Carbon Nanotubes for Electrochemical Sensing of Glucose on Gold Printed Circuit Boards," *Mater. Sci. Eng.*, **C90**, 273-279(2018).
30. Yuwen, et al., "Carbon Nanotubes: A Powerful Bridge for Conductivity and Flexibility in Electrochemical Glucose Sensors," *J. Nanotechnol.*, **21**, 320(2023).
31. Sokic-Lazic, D., Andrade, A. R. and Minter, S. D., "Utilization of Enzyme Cascades for Complete Oxidation of Lactate in an Enzymatic Biofuel Cell," *Electrochim. Acta.*, **56**, 10772-10775(2011).
32. Mannella, C. A. and Wang, Q., "Permeability of the Mitochondrial Outer Membrane to Organic Cations," *Biochim. Biophys. Acta.*, **981**, 363-366(1989).
33. Nishikawa, M., Nojima, S., Akiyama, T., Sankawa, U. and Inoue, K., "Interaction of Digitonin and Its Analogs with Membrane Cholesterol," *J. Biochem.*, **96**, 1231-1239(1984).
34. Shitanda, I., Hirano, Kai, Loew, N., Watanabe, H., Itagaki, M. and Mikawa, T., "High-performance, Two-step/Bi-enzyme Lactate Biofuel Cell with Lactate Oxidase and Pyruvate Oxidase," *J. Power Sources*, **498**, 229935(2021).

#### Authors

**Ke Shi:** Master's course, Department of Chemical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Republic of Korea; 1105759178@qq.com

**Keerthi Booshan Manikandan:** Master's course, Department of Chemical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju, 52828, Republic of Korea; keerthibooshan@gnu.ac.kr

**Young-Bong Choi:** Professor, Department of Cosmedical & Materials, Dankook University, Cheonan, 3116, Republic of Korea; chem0404@dankook.ac.kr

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