

## 대기압 플라즈마 처리에 의한 Lysozyme 고정화 PU foams의 준비

염영호, 김형원, 명성운, 최호석, 김인호  
충남대학교 공과대학 화학공학과

### Preparation of Lysozyme Immobilized PU foams by an Atmospheric Pressure Plasma Treatment

Young-Ho Yeom, Hyung-Won Kim, Sung-Woon Myung, Ho-Suk Choi, In-Ho Kim  
Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

#### 1. 서론

탄성이 있는 open cell 구조의 폴리우레탄 폼은 광범위한 pore size, 밀도, 탄성, 경도, 신축성 등의 특성을 자유로이 변화시킬 수 있는 소재이다. 특히 분리능, 생체적합성, 단백질 흡착성 등이 우수하여 폴리우레탄 표면에 기능성 관능기 도입을 위한 연구가 많이 진행되고 있다[1-3]. 고분자 표면 개질 방법으로는 코로나 처리, 저온 플라즈마 처리, 이온빔 처리 등의 건식 방법이 있는데 이것들은 그래프팅 중합 반응을 위한 고분자 표면에 radical을 형성시키는 역할을 한다[4]. 이러한 표면 개질 방법 중 플라즈마 방전은 전원극과 접지극 사이에 높은 전압을 가하여 원자나 분자를 이온화시켜 높은 전기장이 발광하는 현상이다. 이것을 대기 중에서 고전압의 방전을 일으켜 기체를 이온화함으로써 생성된 전자들은 고분자 표면의 분자 결합을 끊는 에너지로 작용하여 반응성이 높은 free radical을 형성하여 공기 중 산소와의 반응을 통해 peroxide와 같은 산소를 함유하는 극성 관능기를 고분자 표면에 형성시킨다. 이러한 극성 관능기의 발달로 고분자의 표면 자유에너지를 증가시켜 다른 물질과의 물리-화학적 결합을 향상시킴으로써 특정 관능기 도입 및 중합특성을 향상시킨다[5-7].

따라서, 본 연구에서는 폴리우레탄 폼을 대기압 플라즈마 장치로 처리하여 표면에 고분자 중합의 개시제 역할을 하는 peroxide를 도입한 후 acrylic acid로 그래프팅하여 carboxyl group을 생성하였으며 여기에 lysozyme을 고정화하여 효소 흡착능을 관찰하였다. 본 연구의 궁극적인 목적은 대기압 플라즈마 처리 조건 및 그래프팅 반응 조건에 따른 폴리우레탄 폼의 lysozyme 고정화의 경향성을 알아보고 최적의 반응 조건을 찾는 데 있다.

#### 2. 본론

##### 2-1 시료 및 플라즈마 표면처리

본 연구에 사용된 폴리우레탄 폼은 Urecell Technology에서 생산한 ether type 10 PPI foams를 사용했으며 플라즈마 처리를 위해 메탄올로 세척한 후 오븐에서 건조하였다. 플라즈마 처리는 Plasmart사에서 생산한 30~500W의 전력을 갖는 13.56MHz의 RF 전원으로 플라즈마를 발생시키는 대기압 플라즈마 장치(Atmos)를 이용하여 출력 60, 80, 100W로, 처리 시간은 30, 60, 90, 120sec로 변화시켜 폴리우레탄 폼을 처리하였다(Fig.1). 이때 Ar의 유량은 5ℓ/min이며, foam은 glow discharge 아래 부분에 위치시켰다.

Fig.2는 본 연구에서 플라즈마 처리와 그래프팅 공정 및 효소 고정화 공정의 전체적인 메카니즘을 보여준다.

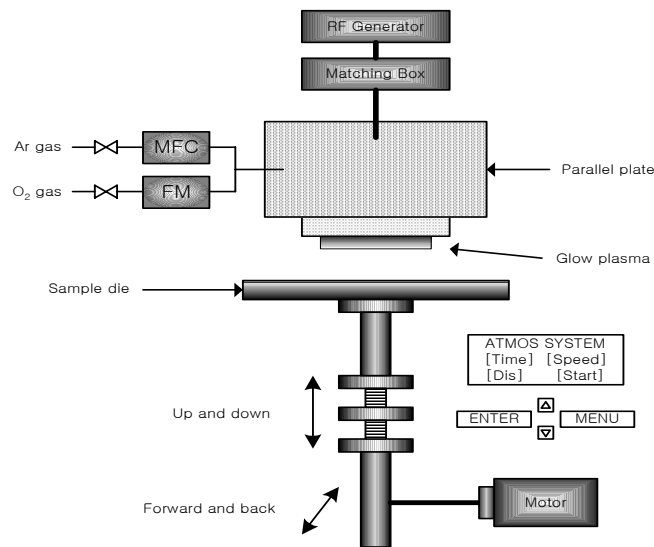


Fig. 1. Schematic diagram of atmospheric pressure plasma reactor

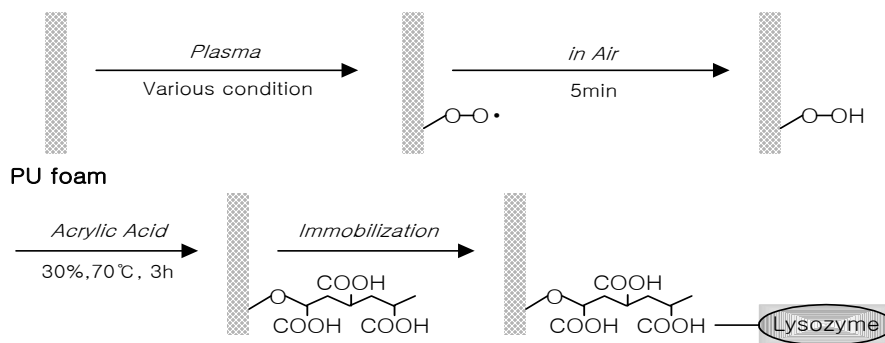


Fig. 2. Overall reaction mechanism

### 2-2 Acrylic Acid Grafting 및 GD(Grafting Degree) 측정

5×1.5×1cm 크기의 우레탄 폼을 공기 중에 5min 동안 노출시켜 hydroperoxide(-OOH)를 형성시킨 다음 증류수와 A.A를 7:3의 비율로 섞은 혼합 용액(30%)에 넣은 후 70°C 항온조에서 3h 동안 그라프팅 반응을 시켰다. 반응 후에 시료를 뜨거운 증류수로 세척하고 ethanol을 용매로 하는 soxhlet extractor에서 24h 동안 잔존하는 homopolymer를 제거하였다. washing이 끝난 폴리우레탄 폼을 오븐에서 완전히 건조시킨 후 무게를 측정함으로써 GD 값을 알아내었다. GD 값은  $GD(\%) = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100$ 을 이용하였으며 여기서  $W_1$ 은 그라프팅 후 세척과 건조가 끝난 다음의 무게이며  $W_0$ 는 그라프팅 전의 폴리우레탄 폼의 무게를 말한다.

Fig.3의 (a)는 대기압 플라즈마 처리 시간의 변화에 따른 GD값의 변화를 나타낸 그래프이며 (b)는 대기압 플라즈마 RF Power에 따른 GD값의 변화를 나타낸 것이다. (a)에서 60sec 동안 플라즈마 조사시에 높은 GD값을 갖으며 더 긴 시간 처리하면 그 값이 감소하는 현상을 확인할 수 있었다. (b)에서는 80W로 처리 시에 가장 낮은 효율을 보임을 명확히 구분할 수 있었으며 RF Power를 높이거나 낮춤에 따라 GD값이 점차적으로 증가함을 보여주고 있다.

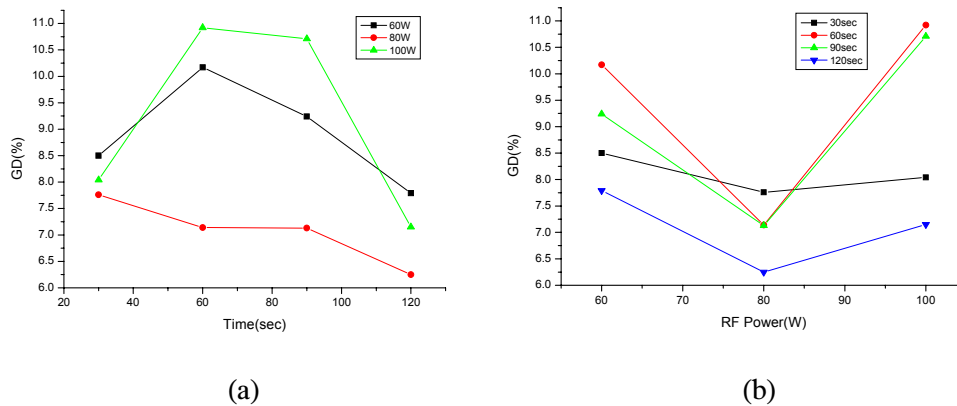


Fig. 3. (a) Variation of the GD with respect to plasma treatment times  
(b) Tendency of the GD by a various plasma RF powers

### 2-3 Lysozyme Immobilization

준비된 폴리우레탄 폼에 0.02M 인산 완충용액(PH 7) 25ml를 넣고 30분 동안 평형 상태가 되도록 한 후 완충용액을 버린다. 여기에 증류수로 10배 희석한 난백 25ml를 주입한 후 30분 동안 담가 놓음으로써 lysozyme을 고정시켰다. 그 뒤 평행 용액인 0.02M 인산 완충용액(PH 7) 25ml로 30분 동안 세척함으로써 폴리우레탄 폼 사이에 걸쳐 있거나 엉긴 단백질을 제거한 뒤 0.02M 인산 완충용액(PH 7)에 녹인 2M NaCl 25ml로 폴리우레탄 폼의 carboxyl group에 순수하게 고정화 된 단백질을 탈착시켰다.

단백질 고정화에 대한 일반적인 분석방법으로 정성적으로 Electrophoresis(15% SDS-PAGE)를 사용하였으며 정량적으로는 Lowry method를 이용하여 폴리우레탄 폼의 단백질 흡착성 및 Lysozyme 흡착능에 대하여 분석해 보았다. 그리고 고정화된 총 단백질 중에서 순수 Lysozyme의 양을 측정하기 위해서 Li-Chan 등의 역가측정법을 이용하였다 [8]. 먼저 Electrophotometer의  $\lambda=450\text{nm}$ 를 갖는 0.066M 인산완충용액(PH 6.24)을 제조한 후 이것을 기준으로 잡았을 때 완충액 100ml에 *M. luteus* 0.015g을 넣어 흡광도 값이 0.6~0.7이 되게 하고, 이 용액 2.5ml에 분취한 시료 0.1ml를 혼합한 후 흡광도 값을 2분간 10초 단위로 측정하여 Lysozyme의 activity를 구하였다. 기준 샘플의 Specific activity를 측정하여 각 시료의 Lysozyme에 대한 Recovery를 계산하였다.

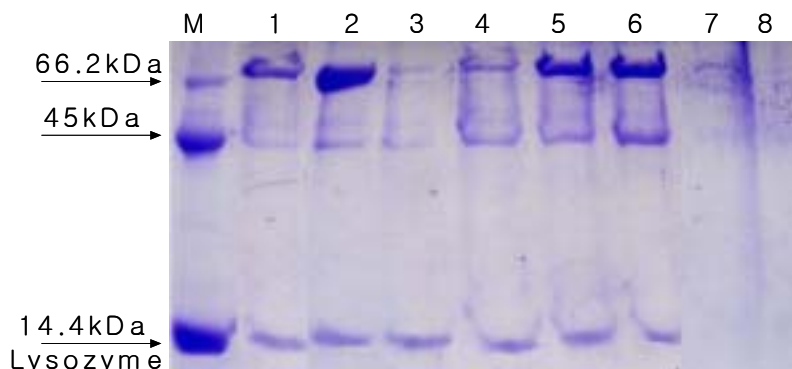


Fig. 4. Image of protein analyzed by Electrophoresis

Fig.4는 폴리우레탄 폼에 고정화되었던 단백질을 분자량에 따라 분리하는 전기영동을

나타내는 자료로서 폴리우레탄 폼이 비교적 많은 양의 단백질과 화학결합을 하였음을 알 수 있으며 특히 Lysozyme의 양도 적지 않음을 관찰할 수 있다. 더욱이 폴리우레탄 필름과 비교하였을 때 현저히 좋은 결과를 보임을 확인할 수 있었다.

**Table 1. Protein assay**

	1	2	3	4	5	6	7	8
Total protein(mg)	28.4	30.2	31.4	36.6	33.0	29.4	0.1	0.1
Recovery(%)	8.9	9.3	9.9	11.5	10.2	9.3	0.05	0.05

**Table 2. Activity and Recovery of the Lysozyme**

	1	2	3	4	5	6	7	8
Total protein(mg)	31875	34405	40625	35750	36125	35250	6500	8375
Specific activity(U/ml)	1275	1329	1625	1430	1445	1410	235	297
Recovery(%)	55.3	57.7	70.5	62.0	62.7	61.2	10.2	12.9

1. 60W, 60sec, 70°C, 30%, 2. 60W, 90sec, 70°C, 30%, 3. 60W, 120sec, 70°C, 30% 4. 80W, 60sec, 70°C, 30%, 5. 80W, 90sec, 70°C, 30%, 6. 80W, 120sec, 70°C, 30%, 7,8. PU film

Table 1.은 Lowry Method를 이용한 폴리우레탄 폼의 총 단백질 고정화율에 대한 정량적인 데이터를 나타내며 film을 이용한 것보다 foam을 사용한 단백질 고정화율이 현저히 높음을 알 수 있으며 power를 높인 플라즈마 처리에 대한 시료의 단백질 수득률이 낮은 power에서 보다 높음을 보여주고 있다. Table 2.는 역가측정법에 의한 Lysozyme만의 고정화율에 대한 데이터를 보여준다. 마찬가지로 foam을 이용한 Lysozyme 고정화가 film을 이용한 것보다 좋게 나타났으며 높은 power로 플라즈마 처리된 시료가 순수 Lysozyme을 더 많이 고정화시켰음을 알 수 있었다.

### 3. 결론

본 연구에서는 플라즈마의 처리 시간과 파워를 변화시켜 폴리우레탄 폼의 표면을 개질한 후 A.A Grafting으로 관능기를 도입하여 단백질 고정화를 수행하였다. 특히 중전의 필름형의 폴리우레탄보다 많은 Lysozyme을 고정화시킬 수 있었으며, 플라즈마 처리 시간과 파워에 따른 GD값의 경향을 살펴볼 수 있었다.

### 참고문헌

1. Kim, Y. J., Kang, I. K., Huh, M. W., Yoon, S. C.: *Biom.* **21**, 121(2000)
2. Lee, J. H., Kim, H. W., Park, P. K., Kim, S. S., Lee, H. B.: *Korea, Polym. J.* **2**, 32(1994)
3. Han, D. K., Park, K. D., Ahn, K. D., Jeong, S. Y., and Kim, Y. H.: *J. Biomed. Mater. Res.:Appl. Biomater.*, **23**(A1), 87(1989)
4. Park, S. J. and Kim, J. S.: *J. Colloid Interface Sci.*, **244**, 336(2001)
5. Seto, F., Fukuyama, K., Muraoka, Y., Kishida, A., and Akashi, M.: *J. Appl. Polym. Sci.*, **68**, 1773(1998).
6. Park, S. J. and Kim, J. S.: *J. Colloid Interface Sci.*, **232**, 311(2000)
7. Park, S. J. and Jin, J. S.: *J. Colloid Interface Sci.*, **236**, 155(2001)
8. Li-Chan, E., Nakai, S., Sim, J., Bragg, D. B., and Lo, K. V.: *J. Food Science.*, **51**, 1032(1986)