

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2020.12.2.081>

ISSN 2383-5400 (Online)

식용 제비집으로부터 비극성 비드기술을 활용한 시알산의 분리정제방법에 관한 연구

A Study on Purification Process of Sialic Acid from Edible Bird's Nest Using Affinity Bead Technology

김동명^{1,*}, 정주영², 이형곤³, 권용성⁴, 백진홍⁵, 한인석⁶

Dong-Myong Kim^{1,*}, Ju-Yeong Jung², Hyung-Kon Lee³, Yong-Sung Kwon⁴, Jin-Hong Baek⁵, In-Suk Han⁶

¹수석연구원, (주)케이제이엠바이오 바이오연구소, 서울시 서초구 사임당로17, 06649, 대한민국

²선임연구원, (주)케이제이엠바이오 바이오연구소, 서울시 서초구 사임당로17, 06649, 대한민국

³책임연구원, (주)케이제이엠바이오 바이오연구소, 서울시 서초구 사임당로17, 06649, 대한민국

⁴대표이사, (주)케이제이엠바이오, 서울, 06649, 대한민국

⁵상무이사, (주)김정문알로에, 서울, 06649, 대한민국

⁶교수, 유타대학교 공과대학 화학공학과, 살크레이크, 84112, 미국

^{1,2,3,4}Biotechnology Research Institute, KJM Bio Ltd, 17 Saimdang-ro, Seocho-gu, Seoul 06649, Republic of Korea

⁵R&D Center of Aloe, Kim Jung Moon Aloe Ltd, Seoul 06649, Republic of Korea

⁶Department of Chemical Engineering, College of Engineering, The University of Utah, 84112, USA

(Received 6 October 2020, Revised 27 November 2020, Accepted 1 December 2020)

Abstract Sialic acid, which is contained in about 60-160 mg/kg in the edible bird's nest (EBN), is known to facilitate in the proper formation of synapses and improve memory function. The objective of this study is to extract effectively the sialic acid from edible bird's nest using affinity bead technology (ABT). After preparing the non-polar polymeric bead "KJM-278-28A" having a porous network structure, and then desorbed sialic acid was concentrated and dried. The analysis of the physicochemical properties of bead "KJM-278-28A" showed that the particle size was 400-700 μm, the moisture holding capacity was 67-70%, the surface area (BET) was 705-900 m²/g, and the average pore diameter 70-87 Å. The adsorption capacity of the bead "KJM-278-28A" for sialic acid was shown a strong physical force to bind sialic acid to the bead surface of 400 mg/L. In addition, as a result of analyzing the adsorption and desorption effects of sialic acid on water, ethanol, and 10% ethanol on the bead, it was confirmed that desorption effectively occurs from the beads when only ethanol is used. As a result of HPLC measurement of the separated sialic acid solution, a total of four sialic acid peaks of N-acetyl-neuraminic acid (Neu5Ac), α,β-anomer of Neu5Ac and N-glycoly-neuraminic acid were identified. Through these results, it was confirmed that it is possible to separate sialic acid from EBN extract with efficient and high yield when using ABT.

Keywords : ABT(Affinity Bead Technology), Sialic acid, Polymer, Bead, Purification process, Edible bird's nest

* Corresponding author

Phone: 82-10-8164-4524 Fax: 82-2-405-6154

E-mail: hapyvirus@naver.com

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

1. 서 론

식용 제비집(Edible Bird's Nest)은 동남아시아 지역에 주로 서식하는 ‘금사연(金絲燕, Swiftlet, 학명 *Aerodramus fuciphagus*)’이라 불리는 작은 바다제비의 타액으로 만들어진 동지를 말한다. 제비집은 모양이 완전하고 동지가 크고, 두껍고, 색이 희고, 반투명하며, 밑바닥이 작고, 제비 깃털이 적게 든 것이 상품품이다. [1,2]. 제비집에 약 60-160 mg/kg 가량의 농도로 함유되어 있는 시알산(sialic acid)은 9개의 탄소 골격을 가지는 뉴라민산(neuraminic acid)의 아실 유도체의 총칭으로 현재 동물계에 20여종 이상이 알려져 있다 [3]. N-아세틸뉴라민산(N-acetylneuraminic acid)

이라고도 알려져 있는 시알산은 일반적으로 글리코시드 결합을 통해 N-아세틸갈락토사민(N-acetylgalactosamine, GalNAc)을 형성하는데, 이 화합물은 시냅스의 적절한 기능에 중요한 역할을 하며 기억 개선에 도움을 주는 것으로 알려져 있다 [4-7]. 시알산의 구조는 Figure 1과 같으며 α형과 β형의 두 가지 이성질체를 가지고 있다. 본 연구에서는 수용성인 N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac)와 N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)를 분리정제 하고자 하였으며 그 구조식은 Figure 2와 같다. 현재까지의 연구결과로부터 얻어진 시알산은 분리정제 방법이 용이하지 않고 수율이 낮은 문제점이 있어 이를 해결하기 위하여 시알산의 분리정제에 관한 연구가 진행되어 왔다 [3,4,8].

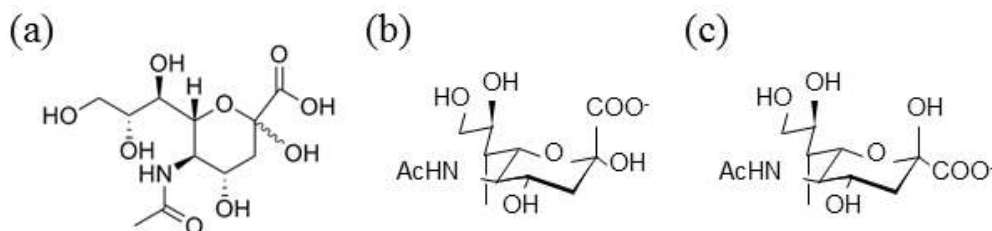


Figure 1. Isomer structure formulations of sialic acid separated from edible bird's nest extract. (a) sialic acid (N-acetylneuraminic acid); (b) α-anomer; (c) β-anomer.

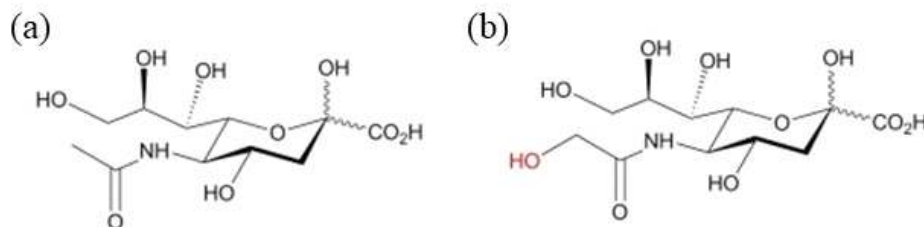


Figure 2. Water-soluble structure formulations of sialic acid. (a) N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac); (b) N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc).

고분자 비드는 보통 기능기(functional group)를 결합할 수 있는 천연 또는 합성 고분자로 정의된다. 이러한 고분자 비드는 고분자 시약(polymeric reagents), 이온교환수지촉매(ion exchange resin catalysts), 고분자지지 상간이동촉매(polymer-supported phase transfer catalysts) 등에 널리 이용되어 왔다 [9-12]. 다공성 구조(macroporous or macroreticular)의 비드는 미세입자들과 그들 사이의 세공으로 이루어져 있으며 건조 상태에서도 세공과 내부 표면적을 갖고 있어 용매에 따른 팽윤에 관계없이 효과적으로 사용할 수 있다 [13,14]. 본 연구에서 사용된 비극성

고분자 비드는 ABT (Affinity Bead Technology, 친화성 비드기술)를 수행하기 위해 사용되었으며 ABT는 특정 성분을 분리정제하기 위한 방법으로 특정 성분과 비드를 결합시킨 후 비드를 분리하고, 특정 성분이 결합된 비드에서 특정 성분을 탈착(흡착된 물질이 흡착 계면(界面)으로부터 떨어지는 현상)시킴으로써 특정 성분을 분리정제 할 수 있는 기술을 의미한다 [11,12]. 일반적으로 시알산은 물 추출, 알코올 추출 및 초음파 추출과 같은 방법을 통해 제비집으로부터 추출되어 왔고, 현재까지 본 연구자들은 제비집으로부터 시알산을 CO₂ 초임계 유체추출, 겔 크

로마토그래피, 한외 여과 및 흡착 방법으로 분리정제를 진행하여 왔다 [15,16]. 본 연구에서는 비이온성 비드를 이용한 분리정제방법을 제안하고자 하였다. 이러한 비이온성 비드는 기존의 이온성 비드에 비하여 공정 단가가 낮을 뿐만 아니라 용매 소모량이 적고 비드의 구조가 이상적으로 여러 작용기들을 비드에 이용할 수 있다는 장점이 있다. 또한, 흡착 및 탈착이 용이하고 재생을 통해 반복적인 사용이 가능하여, 생산성이 높고 환경오염을 극소화 할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 비극성 고분자 비드 "KJM-278A-28" 비드를 제조하고 선택적인 실험대상으로서 제비집 추출물로부터 시알산의 흡착 평형, 반응속도(kinetics) 및 칼럼 이동특성(column dynamics)을 실험하여 "KJM-278A-28" 비드의 사용 적합성을 입증하였다. 또한, "KJM-278A-28" 고분자 비드를 이용하여 정제한 시알산의 흡착 효율 및 화학적 특성을 분석함으로써 본 연구의 기술적인 내용을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

실험용 시료는 제비집 추출물과 그로부터 취득한 시알산을 공시재료로 하였다. 제비집 추출물은 한양대학교 의과대학, 시알산은 동 대학의 화학과로부터 구입하여 사용하였다.

고분자 비드입자를 제조하기 위해서 사용한 폴리비닐알콜(Hayachi Pure Chem. Ind., Japan, #500), 톨루엔(Tokyo Kasei, Japan), 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN, Tokyo Kasei, Japan) 등은 모두 특급 시약이며 구입한 그대로 사용하였다. 단량체인 스티렌(Kanto Chem. Co. Japan)과 디비닐벤젠(Tokyo Kasei, Japan, 55% m- and p-isomers)은 특급 시약으로 1% 수산화나트륨 수용액으로 중합억제제를 제거한 후 다시 증류수로 세 번 세척하여 사용하였다. 흡착 및 탈착제로서 증류수, 아세트니트릴 및 초산을 준비하였고, 다른 모든 시약은 품질이 확보된 시약 등급이었다. 표준 시료와 HPLC용의 증류수, 아세트니트릴, 초산은 모두 미국 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

2.2 비드입자의 제조

현탁중합을 이용하여 고분자 비드입자를 구형으

로 합성하였다. 환류냉각기, 질소주입구, 서로 다른 위치에 두 날개를 가진 교반기가 달린 1,200 mL 실린더형 반응기가 사용되었다. 수용액상은 현탁 안정제인 폴리비닐알콜을 포함하는 증류수 900 mL이었다. 폴리비닐알콜의 양은 수용액상의 1%가 사용되었다.

단량체가 포함되어 있는 유기상은 단량체인 스티렌(2.0%), 가교제인 디비닐벤젠(5.0%), 세공형성제인 톨루엔(5.0%) 및 중합 개시제인 AIBN이 들어 있는 100 mL 용액이다. AIBN의 양은 모든 실험에서 0.5 g이 사용되었다. 중합반응기에 수용액상을 넣고 40°C에서 폴리비닐알콜을 완전히 녹인 후 유기상을 넣었다. 약 1 시간 동안 현탁입자를 안정화 시킨 다음 온도를 80°C로 올려 12 시간 동안 질소 분위기에서 중합하였다. 중합 후에 고분자 비드입자를 여과하여 수집한 다음 증류수와 아세톤으로 깨끗이 세척하였다. 세척한 후 soxhlet 추출장치에서 12 시간 이상 아세톤으로 추출하여 고분자 내에 있는 미반응 단량체와 불순물을 완전히 제거하여 "KJM-278A-28" 비드 입자로 명명하여 사용하였다. "KJM-278A-28" 비드 입자는 공기 중에서 미리 건조시킨 후 진공오븐에서 24 시간 동안 80°C에서 건조시켰다. 건조된 "KJM-278A-28" 비드 입자는 데시케이터에 보관하였으며 사용하기에 앞서서 다시 한 번 진공건조오븐에서 건조시켜 실험에 사용하였다.

2.3 비드입자의 물리화학적 특성 분석

"KJM-278A-28" 비드 입자의 수분 함량은 110°C에서 72 시간 동안 진공오븐(Convection Oven, Sanyo, Japan)에서 건조 시에 발생한 시료의 중량 감소분으로 측정하였다 [15,16]. 산술적인 평균 입자 직경은 침지한 "KJM-278A-28" 비드 입자를 광학 현미경(Optinity KB-200i, Korea Lab Tech, Korea)을 이용하여 sorting하여 측정하였다. 또한, 질소 흡착 및 탈착은 76.8-80.5°C에서 흡착장치(Adsorbent Mixture 130, Microtoms Ltd, USA)를 이용하여 측정하였고 표면적은 Brunauer Emmett and Teller (BET) 방법[17]을 이용하여 계산하였다. 공극 직경은 Barrett-Joyner-Halenda (BJH) 공극 크기 분포 방법[18]을 이용하여 얻었다. 또한, "KJM-278A-28" 비드 입자의 표면 형상은 Field emission scanning electron microscope (FE-SEM, SUP-RASS VP, Carl Zeiss, Germany)로 분석하였다.

평형 실험은 일정한 온도(25.2°C)로 유지되는 항온기에서 소정 량의 흡착제를 흡착 용액(약 600 mg/L)와 접촉하면서 수행하였다. 흡착제의 건조 기반 중량은 115.2°C의 진공 오븐에서 48 시간 동안 건조시킨 후에 측정하였다. 평형에 도달한 후, 용액 상태로 유지된 시알산의 농도를, 0.015 µm UF 막 필터를 이용한 여과 후에 432 nm에서 UV 분광광도계(UV-160A, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다. "KJM-278A-28" 비드의 흡착 능력은 다음 식 (1)에 따라 구하였다.

$$q = \frac{(C_0 - C) V}{W} \tag{1}$$

이 식에서, C_0 및 C 는 각각 시알산의 초기 및 평형 액상 농도(mg/L)이며, V 는 용액의 체적이고, W 은 사용된 흡착제의 질량이다.

또한, 칼베리형(carberry-type) 회분식 흡착조에서 흡착 반응속도 실험을 수행하여 농도 감쇠 곡선을 구하였다. 스테인레스 스크린으로 구성된 4개의 케이지(cage)에 흡착 비드 입자를 로딩하고 그 케이지를 회전축에 부착하여 용액과의 양호한 접촉이 가능하도록 하였다. 모든 실험은 약 500 rpm에서 수행하였다. 흡착실험을 위한 컬럼은 내경이 0.01 m이고 길이가 0.3 m인 유리관으로 내경 대 길이를 1 : 10 으로서 하여 Figure 3의 우측 그림과 같이 설치하였다. 컬럼에 "KJM-278A-28" 비드를 채우고 유리 비드로 지지하며 그 용액을 컬럼 내로 위쪽으로 주입하였다. 채널링(channeling)을 방지하고 컬럼을 통한 그 용액의 분산을 향상시키기 위하여 작은 유리 비드로 이루어진 두 개의 층을 컬럼의 상부 및 하부 영역에 채웠다. 모든 충전(packing) 과정은 컬럼 내에 기포가 발생하는 것을 방지하기 위하여 증류수가 있는 상태에서 수행하였고, 시료를 30 분 간격으로 여러 번 채취하였다. 공급용액은 5 L 용량의 유리탱크에서 제조하여 항온수조에 고정시키고 컬럼에 연결한 후에 정량펌프(HS-600DP, Labsup, Korea)를 이용하여 일정한 유량으로 조절하였다. 실험의 시작 시에 실험 시스템의 갑작스런 장애를 방지하기 위하여 컬럼의 층(bed)에 물을 채우고 실험 시작 약 2 시간 전에 상기의 수용액과 동일한 유속으로 증류수를 컬럼에 공급하면서 컬럼을 온도 조절기가 구비된 수조를 이용하여 일정 온

도로 유지하였다.

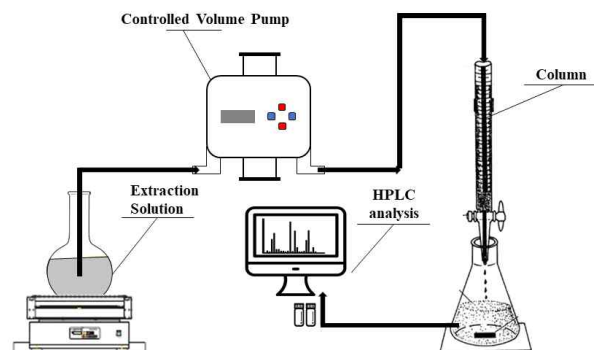


Figure 3. Schematic diagram of solution flow of adsorption column for adsorption experiment of bead "KJM-278A-28".

탈착 실험을 위한 탈착제로는 순수한 증류수, 에탄올 및 증류수와 에탄올의 혼합액(10% 에탄올)을 준비하였다. 탈착용액의 pH를 조절하기 위해서 pH meter (Mettler Toledo S220, Swiss)를 이용하였다. 이때 용매의 pH에 따른 탈착량을 알아보기 위해서 pH 3, 7, 10의 세 조건에서 실험을 진행한 결과, pH에 따른 탈착량의 큰 변화는 없었다(data not shown). 따라서 pH의 변화는 고려하지 않고 진행하였다. 또한 탈착 과정 이후 시료분석을 위해 컬럼에 남아 있는 부유물 및 불순물 제거를 위해 0.45 µm hydrophilic syringe filter (ADVANTEC, Toyo Roshi Kaisha, Japan)를 사용하였다.

2.4 시알산의 순도측정 및 고형화

시알산의 순도를 측정하기 위해 Fukuda 등[19]의 방법에 따라 제비집으로부터 시알산 용출액을 회수하여 pH 7.0으로 조정한 후, 고형분이 60 brix 이상이 될 때까지 회전 감압증발기(A-1000S, Tokyo Rikaki, Japan)로 농축한 후, -80°C에서 진공 동결건조기(FDV-2100, Eyela, Japan)에서 완전히 건조시켜서 고형화하였다. 순도 측정에는 초고속액체크로마토그래피(UFLC XR HPLC System w/LC-20AD xr, Shimadzu, Japan)가 사용되었다. 분석조건은 Zorbax XDB-C18 컬럼(4.6 mm × 250 mm, 5 µm)을 이용하여 수행하였고 두 개의 이동상은 1% 아세트니트릴-증류수 및 1% 초산-아세트니트릴이 사용되었다. 유속은 1.0 mL/min, 컬럼 온도는 25°C로 유지하여 분리제한 시알산(주입량; 20 µL)을 254 nm의 파장에서 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서 사용된 비극성 고분자 비드 "KJM-278A-28"은 Figure 4과 같이 다공성 망상구조 (pore network)로써 디비닐 벤젠(divinylbenzene)과 스티렌(styrene)의 가교 결합으로 형성되었다. 두 가지 배율에서 비드의 표면 형상을 분석한 FE-SEM 이미지는 Figure 5에 나타내었다. 비드는 전체적으로 일정한 크기의 구형이었으며, 약간의 응집 (aggregation) 현상이 관찰되었다.

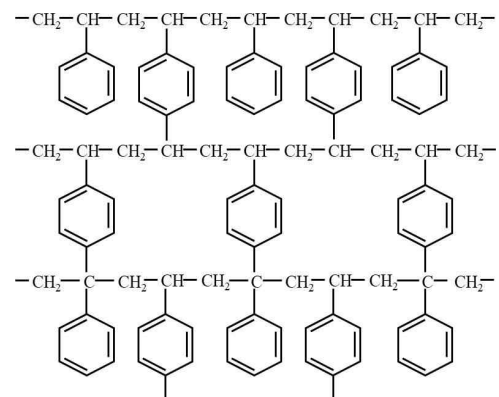


Figure 4. Pore network structure formulation of bead "KJM-278A-28".

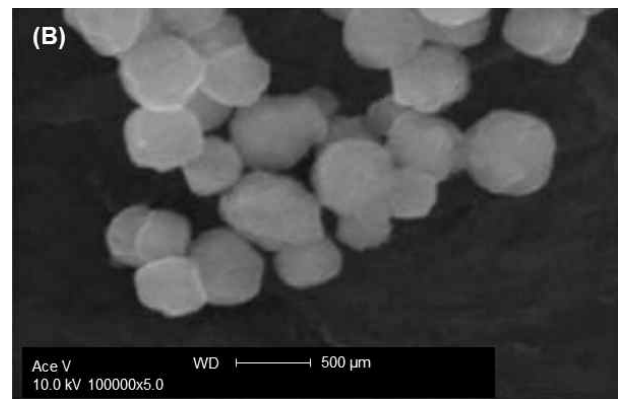
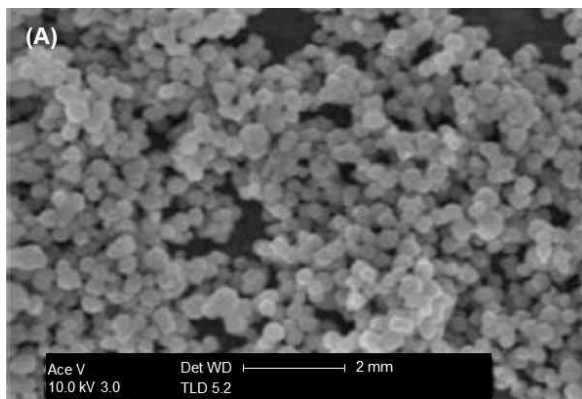


Figure 5. Field emission scanning electron microscope image of bead "KJM-278A-28". (A)×100,000 (B)×500,000.

이전의 연구 결과에 제시되어 있는 "KJM-278A-28" 비드입자의 물리화학적 특성 분석은 Table 1에 나타내었다[15,16]. 산술적인 평균 입자 직경 범위는 400-700 μm이었다. 또한, BJH 공극 크기 분포 방법을 이용하여 얻은 "KJM-278A-28" 비드의 평균 공극 직경은 각각 70-87 Å이었다. Lee 등[20]의 연구에서는 일반적으로 사용되는 고분자 흡착제(polymer adsorbent) 중 공극 구조를 가지는 XAD-1600 (Rohm and Haas Co., USA)의 물리화학적 특성이 보고된 바 있다. 본 연구에서 사용된 "KJM-278A-28"과의 비교를 위해 Table 1에 함께 표시하였다. 두 고분자 비드 간에 가장 큰 차이점은 친수성 혹은 소수성 특성이며, 그 외에 입도, 입자 밀도, 입자 공극율, 수분보유력, 표면장력, 평균 공극 크기 및 비중 부분에서는 유사한 특성을 보였다.

Table 1. Physicochemical properties of bead "KJM-278A-28" and bead "XAD-1600"

	Unit	Bead "KJM-278A-28"	Bead "XAD-1600"
Chemical structure	-	Aromatic styrenedivinylbenzene	Aromatic styrenedivinylbenzene
Hydrophobicity	-	Hydrophobic	Hydrophilic
Particle size	μm	400-700	350-450
Particle density	m ³ /kg	450-462	459
Particle porosity	-	0.51-0.72	0.55
Moisture holding capacity	%	67-70	69
Surface area (BET)	m ² /g	705-900	840
Average pore diameter	Å	70-87	63
Average pore volume	cm ³ /g	1.2-2.5	-
Specific gravity	-	1.02-1.06	1.04

본 연구의 주요한 기술적 내용은 시알산을 선택적으로 흡착하는 비드인 "KJM-278A-28" 비드를 사용함으로써 반복적인 실험결과를 최적 조건으로 적용할 수 있는 비이온성 고분자 비드를 채택하여 사용한 것이다. 제비집 추출물로부터 시알산을 분리정제하기 위하여 "KJM-278A-28" 비드를 최적의 비이온성 고분자 비드임을 밝히고 이전의 연구 결과와 같은 공극 망상구조와 물성임을 재확인하였다[15,16].

일반적으로 합성 고분자 흡착 비드에의 흡착은 흡착제와 비드 사이의 강제 분산을 통해 이루어지므로 흡착 능력은 흡착 비드와 흡착제의 특성에 의존하게 된다[21]. 흡착 등온선은 흡착제에 대한 가장 기본적인 유익한 자료로 알려져 있으며 흡착 과정을 분석 및 디자인하기 위한 모델 예측에 중요한 것으로 판단된다. 표면상에 흡착된 농도와 벌크 상에서의 평형 농도 사이의 상관관계를 설명하기 위하여 다수의 순수 성분 등온선이 제시되었다. 또한, 이들 식들은 흡착제의 흡착 능력 및 흡착 상에서의 흡착 에너지에 대한 정보를 제공하기 위해서도 사용될 수 있다. 일반적으로 잘 알려진 흡착 등온선에는 Langmuir[22], Freundlich[23], Sips[24] 모델 등이 있으며, 이들은 흡착제 또는 흡착질의 흡착성능과 흡착메커니즘을 규명하는데 있어 필수적으로 활용되고 있다. 이 중 Langmuir 모델은 일반적으로 단분자층 흡착 및 화학적 흡착을 가정하여 나타낸 것으로 아래와 같이 표현된다.

$$q_e = \frac{q_m k_L C_e}{1 + k_L C_e} \tag{2}$$

여기서 q_m 은 최대 흡착량(mg/g), k_L 은 Langmuir 상수(L/mg), C_e 는 평형 농도(mg/L)이다. 적합한 흡착 등온 모델을 확인하기 위하여 "KJM-278A-28" 비드 상에서의 시알산의 흡착 평형 데이터를 분석하였다.

등온선 파라미터들은 변형된 Levenberg-Marquardt 법(IMSL routine DUNSLF)에 기초하여, 실험적 흡착량과 예측 흡착량 사이의 평균 편차(%)를 최소화함으로써 구하였다. 객체 함수(object function)인 E(%)는 아래 (3)식과 같이 실험적 결과와 예측 결과 사이의 평균 편차(%)를 나타낸다.

$$E(\%) = 100/n \sum_{k=1}^n [q_{exp,k} - q_{cal,k}/q_{exp,k}] \tag{3}$$

이때 n 은 실험 데이터의 수, $q_{exp,k}$ 는 실험적 흡착 능력, $q_{cal,k}$ 는 계산된 흡착 능력을 의미한다. Figure 6의 실선은 Langmuir 등온선 파라미터($q_m=623$ mg/g, $k_L=5.893 \times 10^{-3}$ L/mg)를 이용하여 예측한 결과를 나타내며 3회 반복 시험결과, R^2 이 0.9920으로 나타나 모두 $R^2 \geq 0.9$ 이상의 결과를 확인할 수 있었고 Langmuir 등온흡착식에 잘 부합되는 것으로 평가되었다.

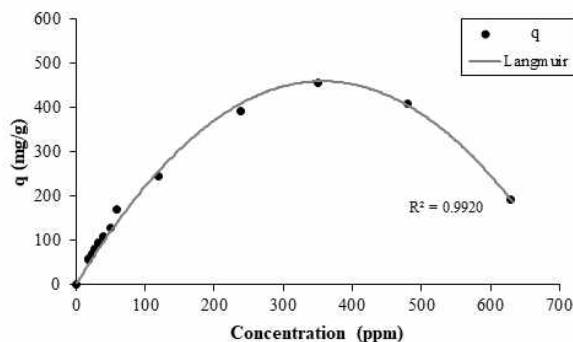


Figure 6. Isothermal curve of bead "KJM-278A-28". The line is the prediction result using the isotherm parameter applied to the equation.

흡착 반응속도 특성은 흡착제에 대한 기본적인 정보로서 시알산의 반응속도 데이터를 아래 (4)식의 유사 2차 모델(pseudo-second-order model)을 이용하여 분석하였다.

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2 (q_e - q_t)^2 \tag{4}$$

이때 q_t 는 시간 t에서의 흡착량(mmol/g), q_e 는 평형상태에서의 흡착량(mmol/g), k_2 는 유사 2차 속도 상수(g/mmol·min)이다. "KJM-278A-28" 비드의 선형 선도에 대한 2차 모델의 관계 계수는 $R^2=0.9906$ 로 3회 반복 시험결과, 모두 $R^2 \geq 0.9$ 이상의 결과를 확인할 수 있었고 1에 매우 근접하였으며, 이러한 결과는 본 연구에서 사용된 고분자 비드의 흡착 반응 속도가 유사 2차 모델을 통해 성공적으로 설명될 수 있다는 것을 의미한다(Figure 7). 또한, q_e 및 k_2 의 구해진 속도 상수는 각각 81.21 mmol/g 및 0.34×10^{-3} g/mmol·min의 범위 내에 있었다.

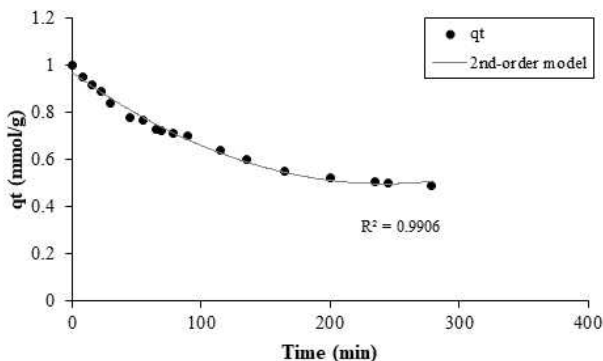


Figure 7. A similar quadratic model for the reaction rate of sialic acid in bead "KJM-278A-28".

극성 혹은 비극성 흡착질에 대한 시알산의 흡·탈착 특성을 확인하기 위해, "KJM-278A-28" 비드 상에서의 세 가지 종류의 용매(증류수 단독, 에탄올 단독, 증류수와 에탄올의 혼합액)에 대한 흡착 및 탈착 곡선을 작성하였다 (Figure 8). 이때 선행연구에서 resin을 이용해 유효성분을 분리하는 과정 중 흡착 단계의 용매로 10% 에탄올이 사용되었음을 참고하여 본 연구의 증류수와 에탄올의 혼합 용매로 10% 에탄올을 채택하였다[25]. 그 결과, 시알산이 흡착된 "KJM-278A-28" 비드로부터 에탄올만을 이용한 탈착이 10% 에탄올 혹은 증류수만을 이용하는 경우보다 빠르게 발생하는 것이 확인되었다. 일반적으로 흡착제의 성공 여부는 경제적인 관점에서 흡착제의 재생(탈착) 단계에 의존한다[24]. 흡착제로부터의 흡착질의 재생은 두 개의 알려진 방법들 중 하나를 통해 달성되며 그 중 한 가지 방법은 흡착조에서 물리적 조작 조건을 변화시켜서 흡착제와 용질 사이의 평형 상호작용을 저하시키는 것으로서, 일반적으로 로딩된 흡착제의 재생(혹은 탈착)은 시간 및 에너지가 소모되는 공정이다. 이러한 탈착 공정을 위해 용매 또는 pH 조정과 같은 기술들이 현재까지 널리 사용되어 왔으나, 몇몇의 단점을 가지고 있다. 특히 유기용매를 이용하여 활성탄의 90% 이상의 탈착율을 얻기 위해서는 활성탄 질량(kg)보다 최소 150배 이상의 부피(L)로 용매를 처리해야 하기 때문에 효율적인 재생이 이루어지지 못하다는 것이 보고된 바 있다[26]. 또한, 극성 피흡착물의 경우 용매의 pH에 의해 탈착 정도가 상당히 영향을 받는 것으로 알려져 있다[27-29]. 그러나 본 연구에서 사용된 고분자 흡착제 비드의 경우 탈착 과정에서 pH 변화에 따른

탈착량의 변화를 보이지 않았다는 점에서 하나의 의의를 찾을 수 있었다. 이러한 흡착제의 재생 방법을 선택하는 것은 흡착질 및 흡착제 모두의 물리화학적 특성에 의존한다. 흡착질은 물리화학적 힘을 통해 흡착제에 결합되므로 재생 과정에서는 이러한 힘에 반하는 조건이 있어야 한다[30]. 본 연구에서 사용된 비이온성 고분자 흡착제인 "KJM-278A-28" 비드의 경우, 비극성 용매 환경에서 시알산을 비드 표면에 결합시키는 물리적인 힘이 강한 특성이 있었다. Figure 8에서 점선으로 표시한 바와 같이 시알산이 흡착된 "KJM-278A-28" 비드로부터 에탄올만을 이용한 탈착이 10% 에탄올 혹은 증류수만을 이용한 것보다 더욱 빠르게 일어났다. 이러한 결과는 본 연구의 비이온성 고분자 비드인 "KJM-278A-28" 비드에 대한 에탄올의 친화성이 시알산의 친화력보다 더욱 크다는 것을 의미한다. 이를 통해 실제 제비집 추출물로부터 시알산을 효율적이고 높은 수율로 보다 친화력이 있는 소재를 분리정제하여 사용이 가능함을 알 수 있었다.

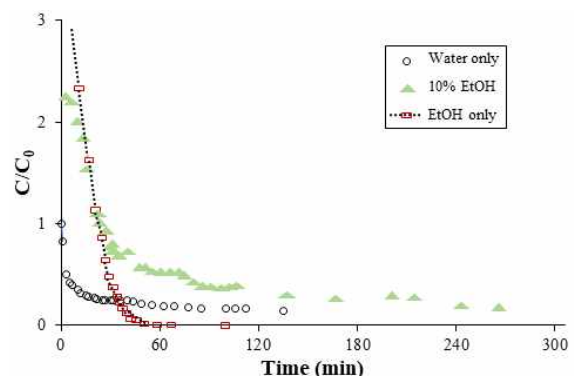


Figure 8. Desorption curve of sialic acid by various adsorbents (water only, ethanol only and 10% ethanol in water) in bead "KJM-278A-28" column which is the affinity bead technology. C₀ means initial concentration of sialic acid; C means equilibrium concentration of sialic acid.

시알산은 일반적으로 산가수분해, 효소가수분해, 이온교환(ion-exchange) 크로마토그래피, 셀룰로스 크로마토그래피 방법으로 분리정제되며, 그 외에도 thin-layer 크로마토그래피 방법 등이 이용되는 것으로 알려져 있다[31]. 본 연구에서 사용한 ABT 분리정제 기술의 경우 친화성 비드가 충전된 칼럼에서 흡착과 탈착 반응을 진행시켜 4가지의 시알산을 선택적으로 분리하였다. ABT 기술을 적용하여 분리

정제한 시알산 용액의 순도를 분석한 결과는 Figure 9에 나타내었다. 시알산 용액의 HPLC 크로마토그램은 4개의 명백한 시알산 흡착 peak를 나타내었다. Neu5Ac의 경우 21.8 min, Neu5Ac- α 의 경우 25.2 min, Neu5Gc의 경우 35.3 min, Neu5Ac- β 의 경우 44.8 min의 retention time에서 peak가 관찰되었다. 또한, 시알산 이외의 다른 이물질들은 흡착 peak가 대부분 사라진 것을 보았을 때, 4가지 시알산의 상대 peak는 친화력이 높은 "KJM-278A-28" 비드를 처리 후에 명백히 증가했다는 것을 알 수가 있었다. 제비집에서 시알산을 분리정제한 내용이 보고된 선행 문헌은 없었다. 대신 bovine submandibular gland mucin (BSM) 으로부터 산가수분해 방식으로 시알산을 분리정제한 HPLC chromatogram과 비교해 보았을 때, Neu5Gc 및 Neu5Ac 흡착 peak 외에도 10-20 min 사이에서 상대 peak 면적이 10% 이상에 달하는 이물질 피크가 검출되었다[32]. 이러한 결과와 비교해 보았을 때 ABT기술을 적용한 시알산의 분리정제 방법은 선택성 높은 목표 성분의 분리정제가 가능한 것으로 사료되었다. 추후 후속 연구를 통해 기존에 이용되고 있는 방법을 이용한 제비집으로부터 시알산의 분리정제 결과와 ABT기술을 적용한 분리정제 결과 간의 비교가 필요할 것으로 사료된다.

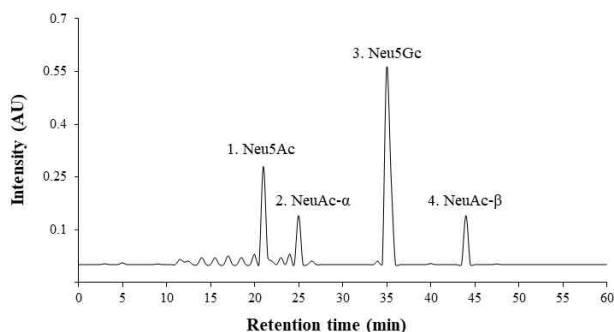


Figure 9. HPLC chromatogram of sialic acid after separation by bead "KJM-278A-28" which is the affinity bead technology. 1: N-acetyl-neuraminic acid (Neu5Ac); 2: α -anomer of Neu5Ac (NeuAc- α); 3: N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc); 4: β -anomer of Neu5Ac (NeuAc- β).

본 연구에서는 시알산을 기능성 소재로 사용할 수 있도록 제비집 추출물을 분리 정제함에 있어서 기존 기술의 문제점을 해결하기 위하여 비이온성 비드를 이용한 분리정제방법을 개발하고자 하였다. Figure 10에 나타낸 바와 같이 1) 제비집 추출물을

수득하는 단계, 2) 공극 망상 구조를 가지는 비이온성 고분자 비드를 흡착제로 제비집 추출물로부터 시알산을 흡착하는 단계, 3) 비이온성 비드에 흡착된 시알산을 탈착제로서 탈착하는 단계, 4) 탈착된 시알산을 농축하여 고형화 하는 단계로 나누어 상용화 공정을 완성하였다. 이온성 고분자 비드에 비하여 비이온성 고분자 비드가 조작에너지가 상대적으로 낮을 뿐만 아니라 반복적으로 재생 및 사용이 가능하기 때문에 "KJM-278A-28" 비드는 제비집의 시알산 분리정제에 적합한 친화성 비드 기술(ABT)임을 확인할 수 있었다. 또한, 흡착 및 탈착이 용이하고 재생하여 반복적인 사용이 가능하여 저렴한 비용으로 분리정제가 가능하고 생산성이 높으며 환경오염을 극소화 할 수 있을 것으로 기대된다. 추후 scale-up 연구를 통하여 비드흡착 방법이 실제 대량생산 범위로 확대 적용될 수 있을지 판단하는 것이 필요할 것으로 사료되었다.

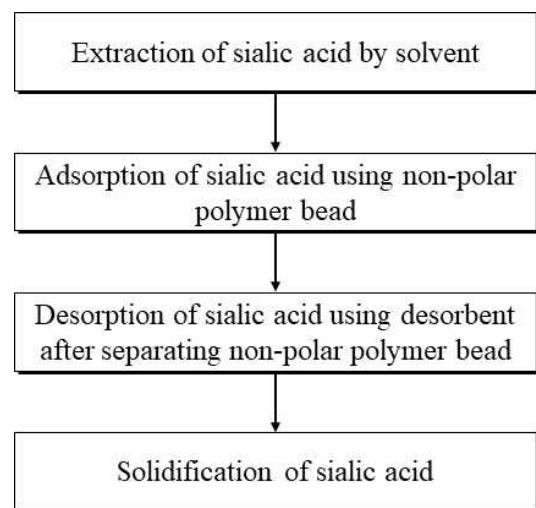


Figure 10. Process flow diagram of affinity bead technology (ABT).

감사의 글

본 논문은 2018년도 한국산업기술진흥원의 지원(과제번호: N0001395)과 2020년도 중소벤처기업부의 지원(과제번호: S2953529)으로 기술개발 지원사업의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

1. Chantler, P. 2010. Swifts: a guide to the swifts and

- treeswifts of the world, Second Edition. Pica Press, Connecticut, pp 150-152.
2. Matsukawa, N., Matsumoto, M., Bukawa, W., Chiji, H., Nakayama, K., Hara, H. and Tsukahara, T. 2011. Improvement of bone strength and dermal thickness due to dietary edible bird's nest extract in ovariectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 590-592.
 3. Marni, S., Marzura, M., Norzela, A., Khairunnisak, M., Bing, C. and Eddy, A. 2014. Preliminary study on free sialic acid content of edible bird nest from johor and kela ntan. *MJVR.* **5**, 9-14.
 4. Careena, S., Sani, D., Tan, S. N., Lim, C. W., Hassan, S., Norhafizah, M., Kirby, B. P., Ideris, A., Stanslas, A., Basri, H. B., and Lim, C. T. S. 2018. Effect of edible bird's nest extract on lipopolysaccharide-induced impairment of learning and memory in wistar rats. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **18**, 1-7.
 5. Colombo, J. P., Garcia, R. C., Guesry, P. and Rey, J. 2003. Potential effects of supplementation with amino acids, choline or sialic acid on cognitive development in young infants. *Acta Paediatr.* **92**, 42-46.
 6. Goh, D. L. M., Chua, K. Y., Chew, F. T., Liang, R. C. Seow, T. K., Ou, L. K., Yi, F. C. and Lee, B. W. 2001. Immunochemical characterization of edible bird's nest allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **107**, 1082-1088.
 7. Kathan, R. H. and Weeks, D. I. 1969. Structure studies of colocalia mucoid: I. Carbohydrate and amino acid composition. *Arch. Biochem.* **134**, 572-576.
 8. Hidalgo, A., Burgos, V., Viola, H., Medina, J. and Argibay, P. 2006. Differential expression of glycans in the hippocampus of rats trained on an inhibitory learning paradigm. *Neuropathology.* **26**, 501 - 507.
 9. Hodge, P. and Sherrington, D. C. 1980. Polymer supported reactions in organic synthesis. Wiley, New York, pp 1-92.
 10. Hodge, P. and Sherrington, D. C. 1988. Synthesis and separations using functional polymers. In: Hodge, P. (ed s), Polymersupported reagents. Wiley, New York, pp 84-194.
 11. Mathur, N. K., Narang, C. K. and Williams, R. E. 1980. Polymers as aids in organic chemistry. In: Mathur, N. K. (eds), Determination of functionalization in polymer supports. Academic Press. New York, pp 37-51.
 12. Ford, W. T. 1986. Polymeric reagents and catalysts: an overview. *Amer. Chem. Soc.* **308**, 1-16.
 13. Jacobelli, H., Bartholin, M. and Guyot, A. 1979. Styrene divinyl benzene copolymers. I. Texture of macroporous copolymers with ethyl 2 hexanoic acid in diluent. *J. Appl. Polym. Sci.* **23**, 927-939.
 14. Wiczorek, P. P., Ilavsky, M., Kolarz, B. N. and Dusek, K. 1982. Mechanical behavior and structure of single beads of homogeneous and macroporous styrene - divinylbenzene copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **27**, 277-288.
 15. Kim, D. M., Jung, J. Y., Lee, H. K. and Kwon, Y. S. 2020. *Korea Patent* 10-2020-0012156.
 16. Kim, D. M., Jung, J. Y., Lee, H. K. and Kwon, Y. S. 2020. *Korea Patent* 10-2020-0049340.
 17. Brunauer, S., Emmett, P. H. and Teller, E. 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 309-319.
 18. Barrett, E. P., Joyner, L. G. and Halenda, P. P. 1951. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 373-380.
 19. Fukuda, F., Umematsu, T., Hamada, A., Akiya, S., Komatsu, N. and Okubo, S. 1974. The polysaccharide from *Lampteromyces Japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* **23**, 1955-1959.
 20. Lee, J. W., Shim, W. G. and Ko, J. Y. 2004. Adsorption equilibria, kinetics, and column dynamics of chlorophenols on a nonionic polymeric sorbent, XAD-1600. *Sep. Sci. Technol.* **39**, 2041-2065.
 21. Lim, Y. H., Lee, K. M., Lee, H. S. and Jo, Y. M. 2010. Adsorption capacity of CO₂ adsorbent with the pretreatment temperature. *J. Korean Soc. Atmos. Environ.* **26**, 286-297.
 22. Langmuir, I. 1918. The adsorption of gases on plane surface of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* **40**, 1361-1403.
 23. Freundlich, H. M. F. 1906. Over the adsorption in solution. *J. Phys. Chem.* **57**, 385-470.
 24. Sips, R. 1948. On the structure of a catalyst surface. *J. Chem. Phys.* **16**, 490-495.
 25. Lai, S., Chen, R. and Suen, S. 2003. Adsorption separation for the extracts from *Ginkgo biloba* leaves using intermediate polarity resins. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **26**, 2941-2960.
 26. Kim, S., Oh, Y. J. 2000. Effect of initial adsorbed amount, temperature, and pH on the desorption of phenol from activated carbon by organic solvents. *J. Korean Soc. Environ. Eng.* **22**, 1985-1994.
 27. Grant, T. M. and King, C. J. 1990. Mechanism of irreversible adsorption of phenolic compounds by activated carbons. *Ind. Eng. Chem. Res.* **29**, 264-271.
 28. Leng, C. C. and Pinto, N. G. 1996. An investigation of the mechanisms of chemical regeneration of activated carbon. *Ind. Eng. Chem. Res.* **35**, 2024-2031.
 29. Kilduff, J. E. and King, C. J. 1997. Effect of carbon adsorption surface properties on the uptake and solvent regeneration of phenol. *Ind. Eng. Chem. Res.* **36**, 1603-1613.
 30. Shin, C.S., Kim, K. H. and Won, J. I. 2001. Adsorption characteristics of ACF for the removal of VOCs in the PCB manufacturing process. *J. Korean Soc. Atmos. Environ.* **17**, 67-74.
 31. Schliebs, R. and Arendt, T. 2011. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav. Brain Res.* **221**, 555-563.

32. Lennarz, W. and Hart, G. 1994. Guide to techniques in glycobiology. In: Reuter, G. and Schauer, R. (eds), Determination of sialic acids, Academic Press, California, pp 168-199.