

발간등록번호

11-1543000-002089-01

# 벌꿀의 신속 진위 판별 기술 개발 및 검사 방법 표준화 연구 최종보고서

2018. 2. 28

주관연구기관 / 강원대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 바디텍메드(주)  
상지대학교 산학협력단

농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “벌꿀의 신속 전위 판별 기술 개발 및 검사 방법 표준화 연구”(개발기간 : 2014. 11. ~ 2017. 11.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 2. 28.

주관연구기관명 :	강원대학교 산학협력단	(단장)	정재연	(인)
협동연구기관명 :	바디텍메드(주)	(대표)	최의영	(인)
	상지대학교 산학협력단	(단장)	이우철	(인)
참여기관명 :	강원도 보건환경연구원	(원장)	이태준	(인)
	경기도 양평군 농업기술센터	(센터장)	박우영	(인)

주관연구책임자 : 강원대학교 이득찬

세부연구책임자 : 강원대학교 이해익

협동연구책임자 : 바디텍메드(주) 주후돈

협동연구책임자 : 상지대학교 최석호

참여기관책임자 : 강원도 보건환경연구원 한규석

참여기관책임자 : 경기도 양평농업기술센터 김정봉

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	314056-3	해당 단계 연구 기간	2014.11.28 ~ 2017.11.27	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단계)
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구 과 제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	별꽃의 신속 진위 판별 기술 개발 및 검사 방법 표준화 연구			
연구 책임자	이 득 찬	해당단계 참 여 연구원 수	총:   명 내부:   명 외부:   명	해당단계 연구 개발비	정부:   천원 민간:   천원 계:   천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총:   74명 내부:   74명 외부:   0명	총 연구개발비	정부:900,000천원 민간:300,000천원 계:1,200,000천원
연구기관명 및 소속 부서 명	1. 강원대학교 산학협력단 의생명융합학부 2. 상지대학교 산학협력단			1. 바디텍메드(주)	
위탁 연구	1. 강원도 보건환경연구원 2. 경기도 양평농업기술센터				
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서면수: 240페이지	

## < 요약 >

	코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 벌꿀의 진위 판별에 대한 새로운 평가 기술 개발로 벌꿀 소비자 신뢰도 회복</li> <li>● 단클론 항체를 이용한 인조 꿀, 토종 및 양봉 꿀을 판별할 수 있는 신속하고 정확한 판별 키트의 개발에 의해 벌꿀의 품질향상 및 침체된 벌꿀 소비 증대</li> <li>● 사양 꿀 및 인조 꿀(가짜 꿀) 특이성분을 확인하고 이들을 판별할 수 있는 신속하고 정확한 판별기술의 개발 및 분석 방법의 표준화에 의한 유사벌꿀의 불법 유통 방지</li> <li>● 벌꿀 가공품 분류 기준안 개발을 통한 국내 벌꿀 소비 확대</li> <li>● 국내외산 벌꿀 메칠글리옥살 함량 비교 분석에 의한 국내 양봉 산업 대외 경쟁력 제고</li> </ul>				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 인조꿀, 토종 및 양봉꿀 판별 기술 개발                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 양봉꿀과 토종꿀을 공통으로 인식할 수 있는 단클론 항체 개발(생명자원등록 1건, 특허출원 1건, 논문 투고 1건)                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>: 이는 꽃꿀과 인조꿀을 판별할 수 있는 ELISA법 개발 (시제품 1건 제작)</li> </ul> </li> <li>- 양봉 및 토종꿀에 대해 각각 특이적으로 인식할 수 있는 단클론 항체 개발(생명자원등록 2건, 특허출원 1건, 논문 작성중 1건)                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>: 이는 토종꿀과 양봉꿀을 판별할 수 있으며, 혼합꿀의 형태도 판별 가능한 ELISA법 개발</li> </ul> </li> <li>- 단클론 항체 개발에 의한 인조 꿀, 토종 및 양봉꿀 판별 카트리지가 개발(시제품 1건 제작)                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>: 본 연구에서 개발된 3개의 단클론 항체는 하이브리도마 세포로부터 안정적으로 공급할 수 있으며,</li> <li>: 이들 항체를 이용하여 꽃꿀과 인조꿀 판별 및 토종꿀과 양봉꿀을 각각 또는 혼합했을 경우의 꿀도 판별할 수 있는 현장맞춤형 판별키트로 개발</li> </ul> </li> <li>- 토종꿀과 양봉꿀 특이적 프라이머 개발(특허출원 1건, 논문게재 1건)                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>: 개발된 프라이머는 Duplex polymerase chain reaction과 immunochromatographic assay에 이용하여 토종꿀과 양봉꿀을 판별할 수 있는 PCR법으로 개발 하였음</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>● 사양꿀 및 꽃꿀의 판별 기술 개발(논문 작성중 1건)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사양 꿀 특이 성분의 분리 동정                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>: 이 물질을 표준물질로 사양꿀과 꽃꿀을 판별할 수 있는 분석 기술 개발</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 인조꿀, 토종 및 양봉 꿀 판별을 위한 키트 개발로 소비자의 꿀에 대한 신뢰도 회복이 기대됨</li> <li>● 사양꿀과 꽃꿀 판별기술의 개발로 꿀 및 관련 제품의 엄격한 품질 관리가 가능해지므로 꿀의 품질 향상으로 국내 소비 증가 및 세계 시장 진출 기대</li> <li>● 개발된 판별 키트에 대한 기술이전 및 실용화를 통하여 꿀 분석기관 및 소비자에게 관련 상품을 공급하여 손쉬운 품질 평가 기대</li> <li>● 본 연구과제로 개발된 기술을 벌꿀 품질 관리 기준으로 활용하고 이로 인해 벌꿀에 대한 소비자 신뢰도 회복 및 침체된 벌꿀 소비가 증대될 것으로 기대됨</li> </ul>				
중심어 (5개 이내)	사양꿀	인조꿀	양봉꿀	토종꿀	판별키트



## < SUMMARY >

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Recovery of honey consumer's reliability by a new evaluating technique development for discrimination of honey authenticity.</li> <li>● Improvement of honey quality and depressed consumption by developing rapidly and accurately discrimination kit which can determine artificial honey, native bee-honey and foreign bee-honey by using monoclonal antibody.</li> <li>● Check the specific composition of honey and prevent the illegal distribution of similar honey by standardizing the analysis methods and developing the fast and accurate identification techniques to discriminate feeding honey and artificial honey.</li> <li>● Increase of domestic honey consumption by developing classification standard of honey processed product.</li> <li>● Increase competitiveness of domestic beekeeping industry by content analysis of methylglyoxal against domestic and foreign honeys.</li> </ul>	
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Artificial honey, native bee-honey and foreign bee-honey discriminatory technology development.               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Development of monoclonal antibody that can recognize native bee-honey and foreign bee-honey in common : Through this antibody, natural and artificial honey could be determined.</li> <li>- Development of monoclonal antibodies which specifically recognize each of native bee-honey and foreign bee-honey : Through this antibodies, it was able to be distinguished not only native bee-honey and foreign bee-honey but also mixed honey from both of them.</li> <li>- Development of kit by using monoclonal antibodies to identify artificial honey, native bee-honey and foreign bee-honey : Produced antibodies can be stably supplied from hybridoma cells. And developed discrimination kit by using these antibodies could identify the natural honey and artificial honey, native bee-honey and foreign bee-honey and mixed honey.</li> <li>- Development of primers specific to native bee-honey and foreign bee-honey : Developed primers were applied to determination kit of native bee-honey and foreign bee-honey by Duplex polymerase chain reaction and immunochromatographic assay.</li> </ul> </li> <li>● Development of discriminatory technique between feeding honey and artificial honey</li> </ul>	

	<p>- Purification and determination of feeding honey specific compound : As using determined compound, analysis technique was developed to identify feeding honey and natural honey.</p>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Developing kits to identify artificial honey, native bee-honey and foreign bee-honey will restore consumer's reliability of honey.</li> <li>● As developing the artificial honey analysis technologies, strict quality control of honey and related products is enabled. Therefore, it is expected that consumption will grow in Korea and entering to the world market by improving honey quality.</li> <li>● An easy quality assessment is expected by supplying relevant products to honey analyzing agency and consumers through transfer of technologies and commercialization of developed identification kits.</li> <li>● It is expected that the technology developed with this research task will serve as the basis for the quality control of honey, and that will restore consumer confidence in honey and increase honey consumption.</li> </ul>				
Keywords	feeding honey	artificial honey	foreign bee-honey	native bee-honey	analysis kit

## 6. 영문목차

1.	Introduction .....	8
2.	Development Current Situation .....	11
3.	Research Performance and Results .....	15
4.	Research objective Achievement .....	230
5.	Application Plan .....	234
6.	Information of international Science Technique .....	234
7.	Security Level .....	234
8.	Registrated Equipments .....	235
9.	Laboratory Safety Action .....	235
10.	Representative Results .....	238
11.	Miscellaneous .....	238
12.	References .....	239

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	8
2. 국내외 기술개발 현황 .....	11
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	15
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	230
5. 연구결과의 활용계획 .....	234
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	234
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	234
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	235
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	235
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	238
11. 기타사항 .....	238
12. 참고문헌 .....	239

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1-1. 연구개발 목적

- (1) 벌꿀의 진위 판별에 대한 새로운 평가 기술 개발로 벌꿀 소비자 신뢰도 회복
- (2) 단클론 항체를 이용한 인조 꿀, 토종 및 양봉 꿀을 판별할 수 있는 신속하고 정확한 판별 키트의 개발에 의해 벌꿀의 품질향상 및 침체된 벌꿀 소비 증대
- (3) 사양 꿀 및 인조 꿀(가짜 꿀) 특이성분을 확인하고 이들을 판별할 수 있는 신속하고 정확한 판별 기술의 개발 및 분석 방법의 표준화에 의한 유사벌꿀의 불법 유통 방지
- (4) 벌꿀 가공품 분류 기준안 개발을 통한 국내 벌꿀 소비 확대
- (5) 국내외산 벌꿀 메칠글리옥살 함량 비교 분석에 의한 국내 양봉 산업 대외 경쟁력 제고

## 1-2. 연구개발의 필요성

### (1) 양봉산업의 무한한 잠재력

- 최근 꿀벌이 작물의 결실 및 생산에 미치는 영향과 환경·생태적 이해가 높아지면서 꿀벌의 공익적 가치에 대한 관심이 고조되고 있음
- 따라서 현대 양봉은 전통적인 1차 산물의 범위를 벗어나 고부가가치를 창출하고 공익적 가치를 제공하는 산업화 단계에 접어들고 있음
- 국내 양봉 산업의 규모는 전체 농업에서 차지하는 비중에 비해 매우 미흡하지만 농작물 결실을 가능하게 하는 매개체로서의 역할과 다양한 벌꿀의 효과를 고려하면 양봉산업의 가치는 무한한 잠재력을 지니고 있음

### (2) 세계 꿀 생산량 및 수출입 동향

- 세계 꿀 생산량은 중국이 압도적 우위를 점하고 있음(2012년 기준 43만 6천톤, 전세계 생산량의 약 27.4%)
- 한국은 2012년 기준 2만 5천톤으로 전체에서 약 1.6%를 차지함
- 미국의 2011년 벌꿀 수입량은 13만톤에 달하며 수입액은 4억 달러에 달함
- 한국은 2011년 653톤을 수입하였으며 수입액은 450만 달러임.
- 중국의 수출량은 10만톤에 육박하며 반대로 수입량은 2,500톤에 불과함.
- 이러한 통계적 수치는 앞으로 중국과의 농수산물에 관한 FTA 대비하여 새로운 전략이 필요함을 보여줌

### (3) 국내산 꿀의 생산현황 및 문제점

- 국내 꿀벌은 한봉, 토봉, 재래종 등으로 불리는 동양 꿀벌(*Apis cerana*)과 도입 100년이 된 서양 꿀벌(*Apis mellifera*)로 나눌 수 있음
- 동·서양 꿀벌의 사육 전체 농가수는 2008년 34,102호로 유지되고 있으며, 토봉 사육농가는 13,883호, 서양종 사육농가는 20,219호임. 농가당 봉군수는 2008년을 기준으로 동양종은 314,511군으로 농가당 22.7군을 보유하고 있는 반면에 서양종은 1,544,063군으로 농가당 76.4군을 사육하고 있음
- 그러나 많은 농가에서 성실하게 벌을 사육하고 있음에도 불구하고 가짜 꿀 시비에 시달리고 있

어 판매에 있어서 많은 불이익을 가져오고 있음. 이는 채밀하는 농가에게는 커다란 타격이며 국산꿀의 수요 확대에도 큰 걸림돌이 되고 있음

- 또한 최근 인조꿀(소위 가짜꿀)의 유통이 확인된 바 있어 이에 대한 대책이 시급한 실정임
- 벌꿀 생산 농가의 요구에 따라 설탕급여 꿀인 사양꿀의 규격화가 추진 중에 있으나 사양꿀의 판별기술 개발이 선행되어야 품질 인증이 가능하므로 정확하고 적절한 사양꿀 분석기술의 개발이 필요함
- 현재까지의 분석방법에 의해 양질의 벌꿀과 저질 벌꿀의 진부를 구분하지 못함으로써 소비자들은 시중에 유통되고 있는 꿀이 모두가 저질인 것으로 인식하게 되고 그에 따라 소비자들에게 불신이 증대되어 소비가 둔화되고 가격이 하락하는 원인이 되고 있음
- 따라서 국내에서 저평가 되고 있는 국내산 꿀의 신뢰도를 회복시키기 위하여 꿀에 대한 새로운 품질평가 기술 개발 및 규격화가 요구됨

#### (4) 국내·외 관련기술의 현황

- 우리나라의 식품공전상 나타나있는 벌꿀 규격기준에는 성상, 수분, 회분, 산도, 전화당, 자당, HMF, 타르색소, 인공감미료, 이성화당 등이 있음. 그러나 이러한 규격기준은 벌꿀의 품질 기준일 뿐 토종꿀과 양봉꿀, 꽃꿀과 사양꿀, 진짜꿀과 인조꿀의 판별에는 이용될 수 없음
- 벌꿀의 화학적 성분을 분석하여 밀원의 종류, 지역 등을 연구한 예는 많이 있으며 특히 벌꿀 및 로얄제리 등에 존재하는 단백질에 관한 연구는 다양하게 이루어지고 있음
- 로얄 제리에는 다양한 단백질이 존재하며 royal jelly major protein에 관한 연구가 다양하게 수행되어 있음. 벌꿀 속에는 단백질이 약 0.05 ~ 0.15% 함유되어 있으며 밀원이나 지역에 따른 차이점은 없음
- 토종꿀과 양봉꿀에 있어서 주요 단백질의 분자량은 약 3000da 정도가 서로 다른 것으로 나타나 이를 근거로 토종꿀과 양봉꿀의 판별법이 본 과제의 연구진에 의해 개발되었음. 이들 단백질의 펩타이드 서열 분석결과 royal jelly major protein 과 상당히 높은 homology를 가지고 있으나 토종꿀과 양봉의 주요 단백질은 면역학적으로도 서로 다른 특이성을 나타내어 토종꿀과 양봉꿀의 면역학적인 판별법으로 제시된 바 있음
- 그러나, 토종꿀과 양봉꿀의 주요 단백질에 대한 단클론항체에 대한 보고는 아직 검토되지 않고 있으므로 이들에 대한 개발이 시급한 것으로 판단됨. (특허정보넷 키프리스 (<http://www.kipris.or.kr/khome/main.jsp>)를 이용한 키워드(honey protein monoclonal antibody) 검색 결과 특허관련정보가 검색되지 않음)

#### 1-3. 연구개발 범위

##### (1) 인조 꿀, 토종 및 양봉 꿀 판별을 위한 키트 개발

- 양봉 및 토종 꿀 단백질에 대한 단클론 항체 개발
- 단클론 항체를 이용한 꿀판별 키트 개발 및 분석법 매뉴얼화
- 현장 맞춤형 꿀 판별 키트 개발

##### (2) 사양 꿀 판별기술 개발

- 사양 꿀 특이 성분 분석 및 분리·정제
- 사양꿀 특이 성분의 구조 결정
- 사양꿀 특이 성분 분석을 위한 미량 분석 기술 개발 및 매뉴얼화

- 국내외산 벌꿀의 메칠글리옥살 함량 비교 분석

(3) 탄소동위원소비 측정 방법의 표준화

- 수집된 벌꿀의 탄소동위원비 조사
- 벌꿀시료의 탄소동위원소비 반복측정에 의한 오차율을 계산
- 동일 시료에 대한 각 기관별 탄소동위원소비 측정 오차율 확인
- 탄소동위원소비를 이용한 신속진위판별 매뉴얼 개발

(4) 벌꿀 가공품 분류 기준안 개발

- 국내외산 벌꿀 가공품 품질표시 기준에 대한 정보 수집
- 국내외산 벌꿀 가공품 수집 및 품질표시 분석
- 벌꿀 가공품 분류 기준안 제시

## 2. 국내외 기술개발 현황

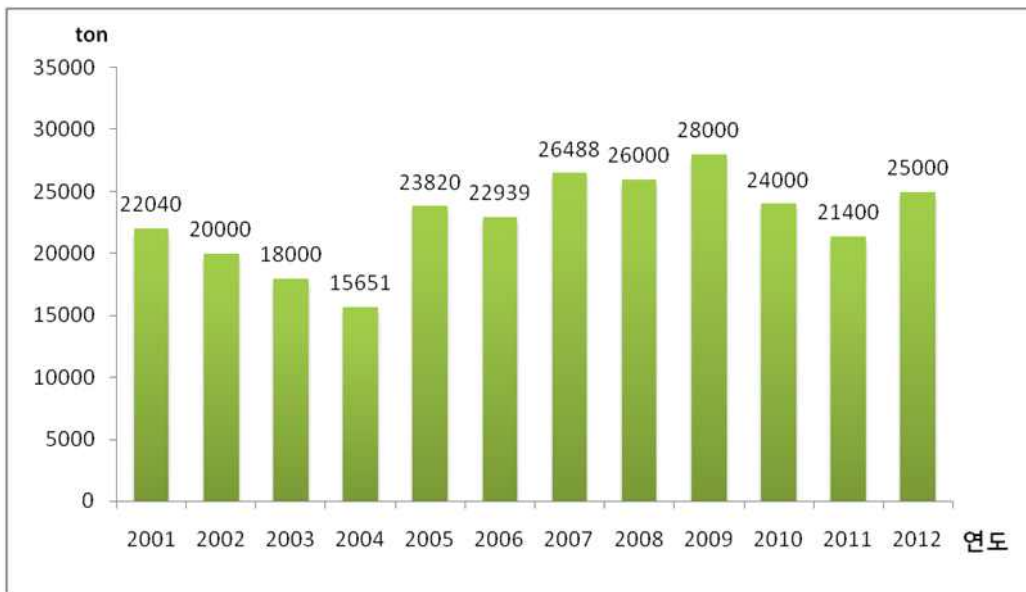
코드번호

D-04

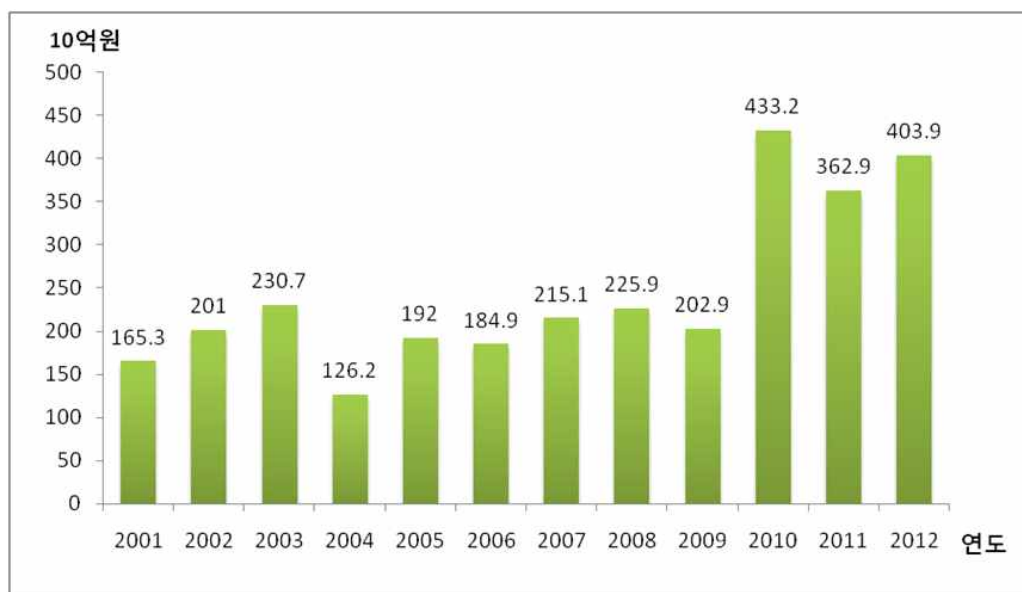
### 2-1. 벌꿀 생산 및 시장현황

#### (1) 국내 벌꿀 생산 및 시장 현황 (세계 농업 2014년 v.167)

- 국내 벌꿀 생산량 추이



- 국내 벌꿀 생산액 추이





● 국내 벌꿀 산업 현황

(단위 : 천 톤, 천 달러)

구분	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
공급량	23.6	26.9	26.7	28.5	24.5	22.1	25.7
생산량	22.9	26.4	26.0	28.0	24.0	21.4	25.0
수입량	0.7	0.5	0.7	0.5	0.5	0.7	0.7
수입액	1,904	1,746	2,535	2,980	3,794	4,546	-
수요량	23.6	36.8	27.6	23.6	24.9	21.0	21.3
소비량	21.0	24.8	25.0	20.6	21.9	19.0	18.8
수출량	2.6	12.0	2.6	3.0	3.0	2	2.5
수출액	10	60	15	23	33	15	-

(2) 국외 벌꿀 생산 및 시장 현황 (세계 농업 2014년 v.167)

● 벌꿀 생산량 상위 16개국 현황 (2012년 기준)

(단위 : 천 톤, kg)

국가	2007	2008	2009	2010	2011	2012	군당 생산량
중국	354	400	402	401	431	436	49.2
터키	74	81	82	81	94	88	14.6
아르헨티나	81	72	62	59	74	76	25.4
우크라이나	68	75	74	71	40	70	-
미국	67	74	66	80	67	67	25.4
러시아	54	57	54	52	60	65	20.0
인도	51	55	55	60	60	61	5.3
멕시코	55	55	56	56	58	59	30.9
이란	47	41	46	47	48	48	13.7
에티오피아	42	42	42	54	40	46	8.8
브라질	35	38	39	38	42	34	30.7
스페인	32	30	32	35	35	30	12.2
캐나다	31	29	32	34	36	29	46.7
탄자니아	28	27	28	29	28	29	10.1
한국	26	26	28	24	21	25	14.6
루마니아	17	20	20	22	24	23	17.8
합계	1,062	1,124	1,118	1,141	1,157	1,184	-

● 벌꿀 생산량 상위 16개국 수출입 현황 (2011년 기준)

(단위 : 톤, 천 달러)

국가	수입량	수입액	수출량	수출액
중국	2,468	12,906	99,988	201,375
터키	-	-	1,103	5,206
아르헨티나	119	357	72,356	223,448
우크라이나	2	16	9,874	27,820
미국	130,495	401,186	6,442	21,480
러시아	5,403	16,219	88	497
인도	859	1,625	28,940	76,377
멕시코	7	45	26,888	90,359
이란	9	47	1,630	7,098
에티오피아	4	26	729	2,433
브라질	-	-	22,399	70,869
스페인	20,655	45,955	18,771	80,280
캐나다	2,843	13,480	9,569	39,446
탄자니아	70	39	579	1,781
한국	653	4,546	2	15
루마니아	1,067	3,657	9,899	41,300

2-2. 개발 기술의 산업화 방향 및 기대효과

(1) 개발 기술의 산업화 방향

● 인조꿀, 양봉꿀, 토종꿀 판별 기술 개발

- 인조꿀, 양봉꿀, 토종꿀을 분별할 수 있는 키트는 매우 간단하게 사용할 수 있게 개발됨으로써 꿀 생산자, 꿀 소비자 그리고 각 검사기관에서 용이하게 사용할 수 있을 것으로 기대됨.
- 인조꿀, 양봉꿀, 토종꿀을 분별함으로써 소비자의 신뢰도를 회복시켜 꿀 소비량을 증대 시키고자 함.
- 인조꿀, 양봉꿀, 토종꿀을 분별함으로써 생산된 꿀의 가치를 올바르게 평가하고 이에 농가의 소득을 증대 시키고자 함.
- 인조꿀, 양봉꿀, 토종꿀을 분별함으로써 품질을 올바르게 평가 받아 수출 가능성을 높혀 양봉 산업의 국가 경쟁력을 향상시킬 수 있을 것으로 전망함.

● 사양꿀 판별 기술 개발

- 사양꿀과 꽃꿀을 분별할 수 있는 신속 간단한 기술을 개발하여 범 검사기관에서 사용이 용이하도록 하고자 함.
- 사양꿀을 꽃꿀과 분별함으로써 소비자의 신뢰도를 회복시켜 꿀 소비량을 향상시키고자 함.
- 사양꿀을 꽃꿀과 분별함으로써 수입꿀과의 경쟁력을 확보하고자 함.

- 사양꿀을 꽃꿀과 분별함으로써 거대한 해외 시장으로의 수출 가능성을 높여 국내 양봉산업의 국가경쟁력을 향상 시킬 수 있을 것으로 전망됨.

(2) 개발 기술의 산업화를 통한 기대효과

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	4,400억원	4,600억원	4,800억원	4,800억원	5,000억원	
경제적 파급효과	400억원	500억원	600억원	600억원	600억원	
부가가치 창출액	400억원	600억원	700억원	700억원	700억원	
합 계	5,200억원	5,700억원	6,100억원	6,100억원	6,300억원	

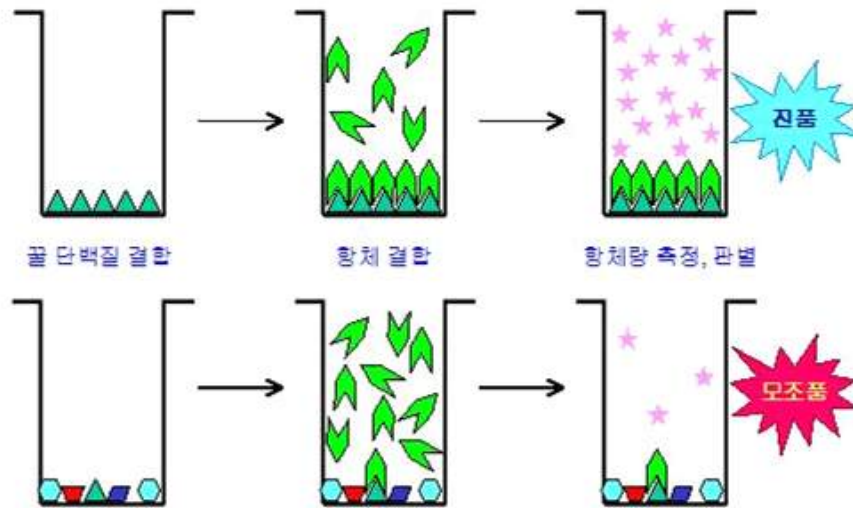
### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

#### 3-1. 연구개발의 추진전략 및 방법

##### (1) 토종꿀 및 양봉꿀, 인조꿀 판별 기술 개발(제1세부과제: 강원대학교 이득찬)

- 토종꿀 및 양봉꿀에 함유된 특이단백질에 대한 단클론 항체를 개발하여 신속 정확한 꿀 판별 키트를 제작
  - 단클론 항체를 이용한 효소면역법 (ELISA법에 의한 키트개발)



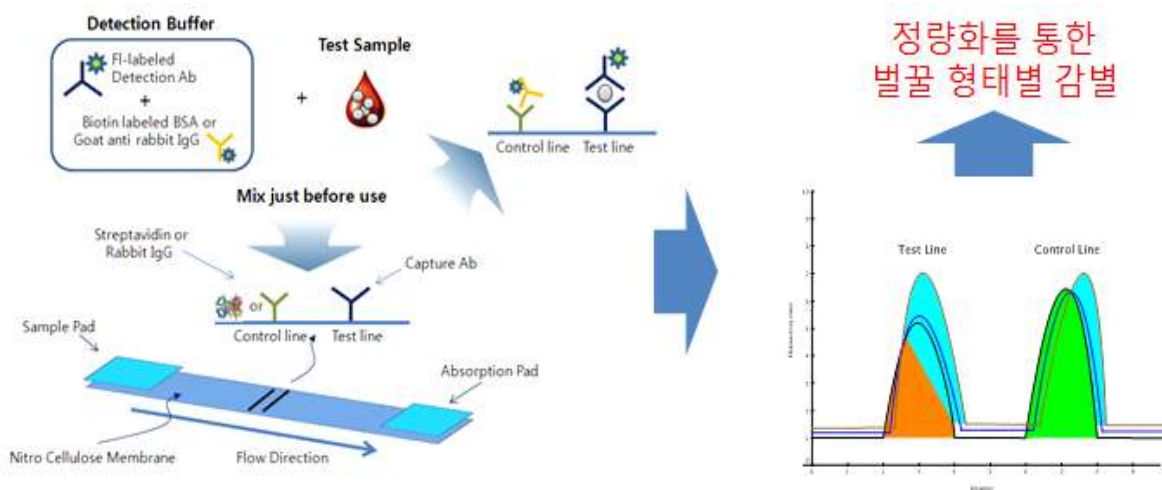
- 개발된 키트는 현장 맞춤형이 될 것이며 이는 현장에서 간단하게 이용하여 명료하게 꿀의 진위여부를 확인 할 수 있음
- 토종꿀과 양봉꿀 단백질을 정제하여 항원으로 이용하고, 마우스 감각에 의한 B세포 생성, myeloma세포와의 융합에 의한 hybridoma세포 제작. 이에 의해 생산된 단클론 항체는 토종꿀, 양봉꿀 특이적으로 반응하는 항체 및 공동으로 인식하는 항체를 확보할 수 있었음.
- 본 과제에 의해 개발된 기술들은 현재까지 특정성분만을 정량적으로 분석하여 판별하는 방법과는 전혀 다른 분석 방법으로 이를 이용하여 최종적으로 벌꿀을 판별할 수 있는 키트를 개발함
  - 본 연구과제에서 개발할 ELISA 및 카트리지 형태의 키트는 토종꿀과 양봉꿀간의 판별 뿐 아니라 가짜꿀도 한번의 분석으로 판별이 가능한 키트로 적용 가능함
  - 본 분석법의 최종산물은 국내 뿐 아니라 국외적으로 이용가능함을 검토함
- 또한 벌꿀 가공품에 대한 기준안 개발
  - 국내외 제품의 포괄적 조사를 통한 결과 도출
  - 대표적으로 일본에서는 벌꿀 가공품이 상용화 되어져 있으므로 일본을 중심으로 중국과 뉴질랜드 시장 또한 조사하여 기초자료를 작성 함

**(2) 사양꿀 판별 기술 개발(제2세부과제: 강원대학교 이해익)**

- 꽃꿀에는 존재하지 않는 사양꿀 특이 성분을 지표물질로 꽃꿀과 사양꿀 판별법 개발
  - 이들의 유도체를 합성하여 사양꿀 특이적인 성분을 분리 정제하여 동정함
  - 다양한 분석기계(TLC-MS interface, HPLC, IR, HRMS, NMR, X-Ray 등) 틀을 이용함으로써 보다 정확한 성분동정을 실시함
  - 동정된 물질을 이용하여 사양꿀 미량분석 기술을 개발하고 표준화함
  - 사양꿀의 실태를 국내의 전반적으로 조사하여 포괄적 기준안을 마련함
- 탄소 동위원소비 측정법의 보정 매뉴얼 개발
  - 탄소동위원소 측정방법과 장비가 검사기관별로 상이한데 기인하여 검사결과에 대한 자료해석이 어려운 실정
  - 따라서 같은 시료를 이용한 검사기관별 검사결과를 바탕으로 탄소동위원소비 측정법의 보정 매뉴얼 개발
- 메칠글리옥살의 함량 분포
  - 메칠글리옥살을 함유하고 있는 뉴질랜드벌꿀을 마누카 꿀로 특성화하고 있는 실정임
  - 국내에서 수집한 꿀의 메칠글리옥살 함량을 HPLC를 이용하여 측정하고 뉴질랜드산 마누카 꿀과 비교함.

**(3) 벌꿀 판별 키트 양산 체계 구축(제1협동과제: 바디텍메드)**

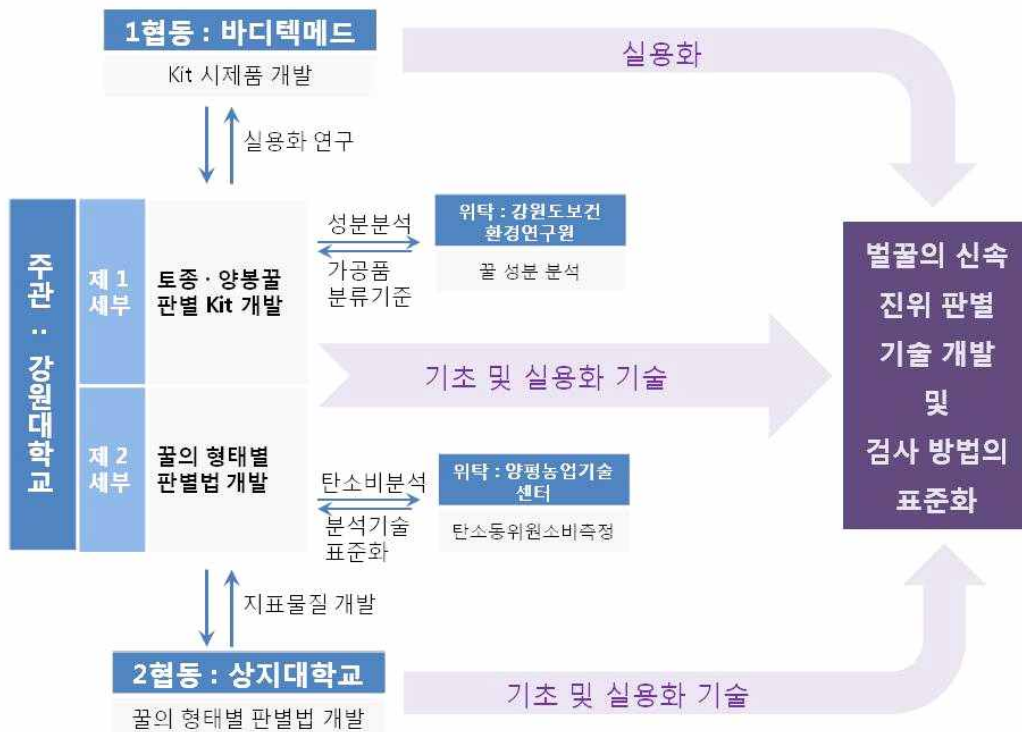
- 현장에서 간단하게 이용할 수 있는 판별키트를 개발하고 이를 양산할 수 있는 체계를 구축함
  - 이들 키트의 개발을 통해 꿀 소비자의 제품에 대한 신뢰도를 향상시키고자 함
  - 단클론항체 기반의 신속한 현장검사가 가능한 카트리지를 개발하고자 함



(4) 탄수화물 및 유전자 기원 특이성분의 벌꿀 판별 지표물질 개발(제2협동과제: 상지대학교)

- 사탕무설탕 특이올리고당 분석에 의한 간이검사 방법의 개발
  - 특이 올리고당의 양봉꿀, 토종꿀, 사양꿀, 사탕수수 설탕, 사탕무 설탕, 전화당, 이성화당에서 분포 조사와 정밀분석 방법과 간이검사 방법의 개발
  - 인조꿀 내 사탕무 설탕의 지표물질로서 betaine의 적합성 결정 및 간이검사 방법의 개발
  - 인조꿀 내 사탕무와 사탕수수 설탕의 각 지표물질로서 raffinose와 theandrose의 적합성 결정 및 정밀분석 방법의 개발
  - 인조꿀 내 전화당과 이성화당의 지표물질로서 difructose anhydride의 간이검사 방법의 개발
- PCR 방법에 의한 양봉꿀과 토종꿀 판별 방법의 개발
  - PCR 방법에 의한 꿀의 특이 DNA 검출법에 대한 사전 연구가 없는 것으로 사료됨.
  - 양봉과 토종벌의 특이 DNA 검출을 위한 유전자의 검색과 primer 염기서열을 결정하고자 함. 대상 유전자로서 major roylal jelly protein 1 gene (MRJP1)와 cytochrome oxidase subunit 1 gene (CO1)을 검색함.
  - 양봉꿀과 토종꿀에서 DNA의 추출하여 Dual PCR 방법을 이용하는 판별법을 개발하고자 함.
  - 벌꿀의 생산 지역 별, 생산시기별에 따라 PCR 법의 정확성 검토함.

3-2. 연구개발의 추진체계



3-3. 연차별 연구개발 목표 및 내용

(1) 1차년도(2014년)

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	제1세부과제 : 토종 및 양봉 꿀 특이적 단클론 항체 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 국내외산 벌꿀 수집</li> <li>● 기존의 노하우에 의한 양봉, 토종 꿀 판별에 의한 시료 선발</li> <li>● 양봉 및 토종 꿀 주요 단백질의 분리 정제</li> <li>● 양봉 및 토종 꿀 주요 단백질에 대한 단클론 항체 제작 시작</li> <li>● 수집꿀의 성분분석 및 벌꿀 가공품에 대한 시료 수집 및 정보(해외사례) 조사에 대한 분석</li> </ul>
	제2세부과제 : 사양 꿀 및 인조 꿀의 특이성분 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 사양 꿀 특이 성분 확인 및 분석</li> <li>● 사탕수수 및 사탕무 기원의 사양꿀 수집</li> <li>● 인조 꿀(가짜 꿀) 특이성분 확인 및 분석</li> <li>● 탄소동위원소비 측정 기준용 시료의 선발</li> <li>● 시료의 탄소동위원소비 반복 측정 및 분석</li> </ul>
	제1협동과제 : 벌꿀 감별을 위한 신속검사 카트리지 설계 및 시약 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 표준시료의 구축 및 검증</li> <li>● Sample pad별 시료처리 능력 검토 및 선정</li> <li>● 고점도 시료의 처리 방법, 시약 최적화</li> <li>● 시료별 검사 조건 확립</li> </ul>
	제2협동과제 : Betaine의 분포 분석 및 벌꿀 판별을 위한 PCR 법 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>● HPLC를 이용한 분석 방법의 선정</li> <li>● 아카시아꿀, 밤꿀, 잡화꿀, 사탕무설탕, 사탕무전화당, 사탕무사양꿀의 분석</li> <li>● SPE와 TLC를 이용한 간이검사 방법의 개발</li> <li>● 벌꿀의 PCR 반응을 위한 DNA 추출 방법의 비교 선발</li> </ul>

1) 제 1세부 과제

가. 국내외산 벌꿀 수집 및 성분 분석

- 국내산 토종 및 양봉 벌꿀 및 수입산 벌꿀, 일본에서 생산된 벌꿀 및 일본으로 수입된 벌꿀 등을 수집하였다. 국내산 토종 벌꿀은 농촌현지를 방문하여 구매하였으며, 국내산 양봉 벌꿀은 강원도 또는 각 지역의 하나로 마트, 농촌현지 등에서 구매하였다. 일본 국내산 벌꿀 및 수입 벌꿀은 일본 현지를 방문하여 농촌지역 또는 마트에서 구매하였다. 수집한 벌꿀의 주 생산년도는 2014년이며, 양봉꿀의 경우 2015년도 생산 벌꿀도 포함되어 있다. 또한 국내산 토종 벌꿀의 수집 개체 수가 현저히 적은 것은 연구의 본격적 시작 시기가 늦은 겨울이었기 때문에 이미 수확 후 판매가 이루어져 시료 확보에 어려움이 있었다.

표. 수집 벌꿀 목록

샘플 번호	샘플 정보	기타
X-001	허니스티 사양벌꿀 (허니스티)	원산지: 국산
X-002	아카시아꿀 (꽃샘식품) A	원산지: 국산
X-003	해아띠 잡화꿀 (가보팜스)	원산지: 국산
X-004	해아띠 아카시아꿀 (가보팜스)	원산지: 국산
X-005	벌꿀아카시아 (오뚜기)	원산지: 국산
X-006	호주유칼리꿀 (CAPILANO)	원산지: 호주
X-007	Premium 잡화꿀 (꽃샘식품)	원산지: 국산
X-008	사양벌꿀 (동아양봉원)	원산지: 국산
X-009	치악산 잡화꿀 (신림농협)	원산지: 국산
X-010	타즈마니아 레더우드꿀 (허니스티)	원산지: 국산
X-011	들꽃꿀 벌꿀 (동아양봉원)	원산지: 국산
X-012	아카시아벌꿀 (동아양봉원)	원산지: 국산
X-013	아나에 꿀 (Sdad. Coop. Apicola de Espane)	원산지: 스페인
X-014	Finest 아카시아꿀 (꽃샘식품)	원산지: 국산
X-015	Premium 아카시아꿀 (꽃샘식품) A	원산지: 국산
X-016	Premium 아카시아꿀 (꽃샘식품) B	원산지: 국산
X-017	Premium L 아카시아꿀 (꽃샘식품)	원산지: 국산
X-018	아카시아꿀 (꽃샘식품) B	원산지: 국산
X-019	Premium L 잡화꿀 (꽃샘식품)	원산지: 국산
X-020	담터 사양벌꿀 (담터)	원산지: 국산
X-021	종근당건강 사양벌꿀 (종근당)	원산지: 국산
X-022	초록원 꿀유자 (초록원)	원산지: 국산
X-023	치악산 아카시아꿀 (신림농협)	원산지: 국산
X-024	동서벌꿀 아카시아꿀 (동서식품)	원산지: 국산
X-025	동서벌꿀 다화꿀 (동서식품)	원산지: 국산
X-026	동강마루 잡화꿀 (영월농협)	원산지: 국산
X-027	동강마루 아카시아꿀 (영월농협)	원산지: 국산
X-028	벌꿀마을 잡화꿀 (서남농협)	원산지: 국산
X-029	벌꿀마을 아카시아꿀 (서남농협)	원산지: 국산



X-030	맛고원 잡화꽃 (신림농협)	원산지: 국산
X-031	강원도 아카시아꽃 (순우리초)	원산지: 국산
X-032	강원도 잡화꽃 (순우리초)	원산지: 국산
X-033	가리왕산 아카시아꽃	원산지: 국산
X-034	가리왕산 잡화꽃	원산지: 국산
X-035	가리왕산 벌꿀	원산지: 국산
X-036	방산 아카시아꽃 (양구농협) A	원산지: 국산
X-037	방산 아카시아꽃 (양구농협) B	원산지: 국산
X-038	정선 아카시아꽃	원산지: 국산
X-039	정선 잡화꽃	원산지: 국산
X-040	아카시아청 (청립)	원산지: 국산
X-041	잡화청 (청립)	원산지: 국산
X-042	아카시아 벌꿀 (자연이 준 선물)	원산지: 국산
X-043	청밀 잡화꽃 (한국양봉농협)	원산지: 국산
X-044	청밀 아카시아꽃 (한국양봉농협) A	원산지: 국산
X-045	한국양봉생꿀 잡화꽃 (한국양봉농협)	원산지: 국산
X-046	광고양봉원 꿀 (광고양봉원)	원산지: 국산
X-047	금주산 잡화꽃 (영중농협)	원산지: 국산
X-048	금주산 아카시아꽃 (영중농협)	원산지: 국산
X-049	고려국산벌꿀 사양벌꿀 (고려인삼주식회사)	원산지: 국산
X-050	오갑산양봉농원 꿀 (오갑산양봉농원)	원산지: 국산
X-051	아카시아꽃	원산지: 국산
X-052	밤꿀	원산지: 국산
X-053	농협안심 야생꽃꿀 (북부농협)	원산지: 국산
X-054	농협안심 아카시아꽃 (북부농협)	원산지: 국산
X-055	맛고원 아카시아꽃 (신림농협)	원산지: 국산
X-056	맛고원 잡화꽃 (신림농협)	원산지: 국산
X-058	아카시아꽃 (청원기수양봉원)	원산지: 국산
X-059	밤꿀 (청원기수양봉원)	원산지: 국산
X-060	사양꽃 (청원기수양봉원)	원산지: 국산
X-061	정선 벌꿀	원산지: 국산
X-062	아카시아꽃 (양구)	원산지: 국산
X-063	잡화꽃 (양구)	원산지: 국산
X-064	Honey Love 잡화꽃 (한국양봉농협)	원산지: 국산
X-065	칠백리 잡화꽃 (상주원예농협)	원산지: 국산
X-066	칠백리 아카시아꽃 (상주원예농협)	원산지: 국산
X-067	산속의 꿀 아카시아꽃 (보은농협)	원산지: 국산
X-068	산속의 꿀 잡화꽃 (보은농협)	원산지: 국산
X-069	청밀 아카시아꽃 (한국양봉농협) B	원산지: 국산
X-070	청밀 잡화꽃 (한국양봉농협) B	원산지: 국산
X-071	하성 야생화꽃 (거창북부농협)	원산지: 국산
X-072	윤상복 벌꿀가족 밤꿀 (에덴양봉원)	원산지: 국산
X-073	윤상복 벌꿀가족 잡화꽃 (에덴양봉원)	원산지: 국산

X-074	윤상복 벌꿀가족 아카시아꿀 (에텐양봉원)	원산지: 국산
X-075	아카시아꿀 (지푸락양봉원)	원산지: 국산
X-076	잡화꿀 (지푸락양봉원)	원산지: 국산
X-077	100% Natural pure honey (1st International Health Foods, HAVERST RAW. NY)	원산지: 미국
X-078	Pure RAW HONEY (Bee flower % Sun Honey co.)	원산지: 미국
X-079	Really Raw Honey (Really Raw honey baltimore, mary land 21224)	원산지: 미국
Y-001	지리산 마천 토종꿀 (마천농협)	원산지: 국산
Y-002	영월 북면 꿀 A	원산지: 국산
Y-003	영월 북면 꿀 B	원산지: 국산
Y-004	영월 북면 꿀 C	원산지: 국산
Y-005	정선 가리왕산 꿀	원산지: 국산
Y-006	체천 꿀	원산지: 국산
Y-007	가리왕산 토종꿀	원산지: 국산
Y-008	덕두원 토종꿀 (덕두원) A	원산지: 국산
Y-009	덕두원 토종꿀 (덕두원) B	원산지: 국산
Y-010	지리산 벌집꿀 (청원기수양봉원)	원산지: 국산
Y-011	정선 꿀	원산지: 국산
Y-012	인제읍 하추리 꿀	원산지: 국산
W-001	중국꿀 A	원산지: 중국
W-002	중국꿀 B	원산지: 중국
W-003	Nectaflor 야생꽃꿀	원산지: 스위스
W-004	Nectaflor 숲꿀	원산지: 스위스
W-005	Nectaflor 벚꽃꿀	원산지: 스위스
W-006	Airborne 클로버꿀	원산지: 뉴질랜드
W-007	Airborne 라타꿀	원산지: 뉴질랜드
W-008	Miel de citronnier 레몬나무꿀	원산지: 프랑스
W-009	Miel de lavande maritime 라벤더꿀	원산지: 프랑스
W-010	Lune de miel 오렌지나무꿀	원산지: 프랑스
W-011	Lune de miel 아카시아꿀	원산지: 프랑스
W-012	Lune de miel 꿀	원산지: 프랑스
W-013	THE FINEST HONEY 아카시아꿀	원산지: 루마니아
W-014	THE FINEST HONEY 클로버꿀	원산지: 캐나다
W-015	THE FINEST HONEY 오렌지꿀	원산지: 멕시코
W-016	THE FINEST HONEY 해바라기꿀	원산지: 루마니아
W-017	THE FINEST HONEY 로즈마리꿀	원산지: 스페인
W-018	THE FINEST HONEY 잡화꿀	원산지: 쿠바
W-019	THE FINEST HONEY 연꽃꿀	원산지: 일본
W-020	THE FINEST HONEY 잡화꿀	원산지: 일본
W-021	THE FINEST HONEY 토치	원산지: 일본
W-022	THE FINEST HONEY 메밀꿀	원산지: 일본
W-023	PETIT HONEY 후쿠라시	원산지: 일본
W-024	PETIT HONEY 굴꿀	원산지: 일본

W-025	PETIT HONEY 아카시아꿀	원산지: 일본
W-026	미즈바시 메밀꿀	원산지: 일본
W-027	미즈바시 토치꿀	원산지: 일본
W-028	미즈바시 연꽃꿀	원산지: 일본
W-029	미즈바시 잡화꿀	원산지: 일본
W-030	PURE HONEY 아카시아꿀	원산지: 일본
W-031	HIGUCHIEN HONEY 잡화꿀	원산지: 일본
W-032	일본 토종 유칼립투스꿀	원산지: 일본
W-033	일본 토종 가미카와꿀	원산지: 일본
W-034	일본 토종 모리꿀	원산지: 일본
W-035	일본 토종 물방울꿀	원산지: 일본

\* 구입시의 정보에 의해 양봉 벌꿀 Y-000, 토종 벌꿀 X-000, 국외수집 벌꿀은 W-000으로 구분하였음.

- 수집 벌꿀 성분 분석을 식품공전에 기재된 분석법에 의해 진행하였으며, 아래와 같은 분석결과를 얻을 수 있었다. (분석된 자료는 추후 개발된 항체에 의한 분석법의 기본자료로 사용될 것임)

표. 수집 벌꿀 성분 분석

샘플 번호	과당 (%)	포도당 (%)	전화당 (%)	자당 (%)	HMF (mg/kg)	수분 (%)	인공감미료	비고
X-001	35.37	32.29	67.65	1.93	13.29	18.3	불검출	
X-002	41.04	25.85	66.89	0.00	12.07	18.8	불검출	
X-003	39.34	24.57	63.91	1.12	9.14	18.0	불검출	
X-004	40.65	27.73	68.38	0.00	14.06	18.9	불검출	
X-005	40.79	25.84	66.63	1.52	8.50	17.8	불검출	
X-006	36.06	30.69	66.76	0.00	46.47	16.8	불검출	
X-007	34.74	28.81	63.55	0.00	19.86	18.2	불검출	
X-008	33.24	28.71	61.94	1.45	4.43	18.8	불검출	
X-009	38.99	23.05	62.04	2.65	2.94	16.7	불검출	
X-010	32.56	26.38	64.00	2.13	24.39	19.1	불검출	
X-011	37.20	25.32	62.52	2.46	3.82	17.9	불검출	
X-012	41.85	28.09	69.93	2.01	5.88	18.4	불검출	
X-013	38.34	31.92	70.26	1.51	31.26	16.9	불검출	
X-014	39.74	26.93	66.67	2.16	12.64	19.1	불검출	
X-015	40.06	27.24	67.29	0.00	21.52	18.8	불검출	
X-016	39.32	26.67	65.99	0.00	6.52	18.9	불검출	
X-017	42.08	26.56	68.64	0.00	4.24	18.6	불검출	
X-018	40.70	26.92	67.62	0.00	13.88	19.1	불검출	
X-019	36.65	25.33	61.98	2.16	0.39	18.6	불검출	

X-020	32.36	27.88	60.23	5.23	25.92	17.6	불검출	
X-021	33.03	29.56	62.59	2.98	32.82	18.2	불검출	
X-022	23.43	21.60	45.03	11.46	43.34	25.0	불검출	
X-023	42.36	26.60	68.96	2.06	23.18	17.3	불검출	
X-024	41.79	28.44	70.23	1.23	35.04	19.1	불검출	
X-025	39.91	28.18	68.09	1.53	27.97	19.6	불검출	
X-026	41.01	27.05	68.06	1.85	9.80	17.8	불검출	
X-027	43.63	27.37	71.00	0.00	9.89	18.1	불검출	
X-028	38.92	25.63	64.55	1.79	22.91	19.7	불검출	
X-029	38.82	26.12	64.93	0.00	36.31	22.9	불검출	
X-030	40.80	27.33	68.13	0.00	15.07	17.3	불검출	
X-031	39.85	29.00	68.85	3.89	18.72	17.4	불검출	
X-032	43.04	29.86	72.90	1.21	15.41	18.7	불검출	
X-033	35.65	27.72	64.22	2.86	9.89	17.2	불검출	
X-034	30.91	24.30	55.21	1.69	0.10	16.3	불검출	
X-035	36.28	27.73	64.00	0.00	12.89	15.4	불검출	
X-036	43.94	30.86	74.80	2.57	12.24	18.6	불검출	
X-037	44.58	31.04	75.62	0.00	12.53	18.7	불검출	
X-038	27.03	18.94	45.97	0.00	4.98	17.7	불검출	
X-039	39.37	27.89	67.26	0.00	45.35	19.1	불검출	
X-040	36.22	28.51	64.74	0.00	24.70	22.7	불검출	
X-041	36.88	24.81	61.69	0.00	31.36	22.8	불검출	
X-042	30.96	25.60	56.55	4.82	2.84	17.4	불검출	
X-043	38.94	28.17	66.84	0.00	13.80	18.2	불검출	
X-044	42.51	28.05	70.56	0.00	3.65	18.3	불검출	
X-045	38.79	27.45	66.25	1.17	15.95	17.8	불검출	
X-046	37.98	28.95	66.93	1.12	11.63	17.7	불검출	
X-047	37.85	25.55	63.39	1.11	17.47	17.8	불검출	
X-048	41.60	26.09	67.69	1.11	34.24	18.9	불검출	
X-049	33.76	29.54	63.30	0.00	6.06	19.0	불검출	
X-050	41.92	27.38	69.30	1.12	30.65	16.6	불검출	
X-051	42.00	26.71	68.72	0.96	4.88	20.2	불검출	
X-052	42.65	20.30	62.95	1.12	33.50	18.1	불검출	
X-053	38.67	25.85	64.52	1.24	16.82	16.8	불검출	
X-054	42.50	27.17	69.67	0.00	3.34	17.9	불검출	
X-055	40.34	27.60	67.94	0.00	2.04	17.3	불검출	
X-056	38.52	27.84	66.36	0.00	16.78	18.1	불검출	
X-057	36.64	24.55	61.19	0.00	15.76	17.0	불검출	
X-058	42.18	26.78	68.96	0.00	3.56	18.4	불검출	

X-059	39.69	24.87	64.56	0.00	8.55	17.1	불검출	
X-060	34.43	29.14	63.57	3.97	0.11	17.7	불검출	
X-061	38.46	26.50	64.96	0.00	19.92	18.3	불검출	
X-062	32.84	26.05	58.89	5.54	2.09	17.3	불검출	
X-063	33.61	27.49	61.10	4.41	1.88	17.0	불검출	
X-064	41.28	26.22	67.50	0.00	12.25	18.7	불검출	
X-065	34.93	25.28	60.22	0.00	1.72	16.7	불검출	
X-066	42.97	25.81	68.78	0.00	5.68	18.9	불검출	
X-067	41.17	24.51	65.68	0.00	12.77	18.7	불검출	
X-068	39.55	21.17	60.72	0.00	8.15	18.3	불검출	
X-069	42.68	24.45	67.13	0.00	3.27	18.6	불검출	
X-070	37.79	27.30	65.09	0.00	20.67	18.6	불검출	
X-071	39.74	25.52	65.26	0.00	17.32	17.8	불검출	
X-072	34.76	27.71	62.47	3.45	0.27	16.5	불검출	
X-073	34.49	29.07	63.56	7.37	0.80	16.1	불검출	
X-074	33.69	27.97	61.67	6.17	1.35	17.5	불검출	
X-075	43.71	28.74	72.45	0.00	1.12	17.8	불검출	
X-076	40.61	22.32	62.94	0.00	25.01	17.9	불검출	
X-077	42.22	26.51	68.73	0.00	15.49	19.1	불검출	
X-078	44.57	27.56	72.13	2.44	15.49	19.2	불검출	
X-079	47.35	29.05	76.40	2.20	5.86	18.1	불검출	
Y-005	40.23	29.48	69.71	2.22	33.02	16.5	불검출	
Y-006	37.54	25.73	63.27	0.00	1.50	19.7	불검출	
Y-007	32.07	25.10	57.17	0.00	0.77	17.1	불검출	
W-001	39.24	35.87	75.11	0.57	28.51	18.4	불검출	
W-002	39.67	36.57	74.34	0.54	57.07	18.4	불검출	
W-003	39.66	30.32	69.98	0.00	54.64	17.0	불검출	
W-004	36.54	28.39	64.93	0.00	32.79	15.9	불검출	
W-005	38.35	29.46	67.81	0.00	47.53	17.6	불검출	
W-006	38.44	35.48	73.91	0.00	63.74	16.1	불검출	
W-007	39.93	38.09	75.85	0.00	48.38	18.5	불검출	
W-008	37.82	31.83	69.65	1.49	37.78	17.4	불검출	
W-009	36.49	31.09	67.59	1.66	3.56	16.8	불검출	
W-010	38.01	31.53	69.54	1.23	9.10	16.2	불검출	
W-011	43.56	29.87	70.07	0.88	29.34	16.1	불검출	
W-012	39.63	32.98	72.61	0.00	32.61	17.7	불검출	
W-023	39.42	27.29	66.71	0.00	47.02	19.4	불검출	
W-024	39.29	31.51	70.80	0.00	12.33	20.5	불검출	
W-025	41.35	26.42	67.77	0.00	5.97	18.6	불검출	
W-026	36.04	33.01	69.05	0.00	54.87	18.1	불검출	

W-027	31.18	37.73	68.91	0.00	7.11	21.3	불검출	
W-028	35.76	33.08	68.84	0.00	6.48	18.6	불검출	
W-029	39.23	29.90	69.13	0.00	7.22	21.7	불검출	
W-030	38.93	28.31	67.24	0.00	8.08	17.6	불검출	
W-031	35.41	32.97	68.38	0.00	175.14	18.8	불검출	
W-032	39.01	31.69	70.71	0.73	17.46	16.6	불검출	
W-033	41.24	32.00	73.23	0.95	18.10	16.6	불검출	
W-034	38.64	32.52	71.16	0.00	12.65	16.5	불검출	
W-035	40.69	31.43	72.11	0.00	20.26	17.4	불검출	

- 수분 (규격기준: 20.0% 이하)

구분	시료수	평균(%)	표준편차	최소	최대	비고
X-시료	79	18.31	1.49	15.40	25.00초과	
Y-시료	3	17.77	1.70	16.50	19.70	
W-시료	25	17.91	1.57	15.90	21.70	
합계	107	18.20	1.51	15.43	25.00초과	

- 인공감미료 (규격기준: 불검출) : 107건 모두 불검출

- 하이드록시메틸푸르푸랄 (규격기준: 80mg/kg 이하)

구분	시료수	평균(mg/kg)	표준편차	최소	최대	비고
X-시료	79	14.41	11.57	0.10	46.47	
Y-시료	3	11.76	18.41	0.77	33.02	
W-시료	25	33.51	35.61	3.56	175.14	
합계	107	18.80	21.25	0.10	175.14	

- 전화당 (규격기준: 60% 이상)

구분	시료수	평균(%)	표준편차	최소	최대	비고
X-시료	79	65.50	5.12	45.03	76.40	
Y-시료	3	63.38	6.27	57.17	69.71	
W-시료	25	70.22	2.77	64.93	75.85	
합계	107	65.40	5.38	45.03	76.40	

- 자당 (규격기준: 7.0% 이하)

구분	시료수	평균(%)	표준편차	최소	최대	비고
X-시료	79	1.40	2.02	ND	11.46	
Y-시료	3	0.74	1.28	ND	2.22	
W-시료	25	0.32	0.53	ND	1.66	
합계	107	1.13	1.82	ND	11.46	

- 벌꿀 단백질은 꿀벌 소화액 기원의 효소류 및 화분 기원의 효소류 그리고 꿀 속에 서식하는 미생물 기원의 것들로 추정된다. 벌꿀의 형성과정을 고려하면 여러 가지 다른 기원의 단백질 중에서 꿀벌 기원의 효소류가 가장 많이 차지할 것이다. 단백질 정량은 신속하고 간편하게 일반적으로 쓰이고 있는 BCA 시약을 이용하여 측정하였다. 이 방법은 화학물질이 단백질과 반응하여 나타나는 발색의 정도를 측정하는 방법이나 이 시료중에 존재하는 단백질을 구성하는 아미노산의 함량 차이 또는 불순물이나 기타 다른 성분의 영향을 받을 수도 있다. 벌꿀중의 단백질을 정량한 결과는 아래와 같다.

표. 수집 벌꿀 단백질 정량

샘플 번호	단백질 (mg/mL)	샘플 번호	단백질 (mg/mL)
X-001	33.4	X-002	39.2
X-003	39.4	X-004	39.8
X-005	45.2	X-006	34.4
X-007	55.6	X-008	28.0
X-009	38.4	X-010	37.3
X-011	40.0	X-012	56.0
X-013	44.0	X-014	41.8
X-015	38.0	X-016	31.0
X-017	39.6	X-018	39.4
X-019	38.8	X-020	33.4
X-021	36.2	X-022	22.8
X-023	34.0	X-024	39.6
X-025	57.4	X-026	41.0
X-027	38.4	X-028	39.4
X-029	37.4	X-030	45.0
X-031	39.2	X-032	38.4
X-033	39.4	X-034	28.2
X-035	38.0	X-036	39.4
X-037	35.4	X-038	36.2
X-039	54.4	X-040	35.4
X-041	31.2	X-042	31.0
X-043	38.6	X-044	54.0
X-045	37.8	X-046	42.8
X-047	57.6	X-048	38.6
X-049	15.6	X-050	36.8
X-051	40.2	X-052	37.8
X-053	39.0	X-054	42.8
X-055	37.6	X-056	34.6
X-058	40.2	X-059	40.0
X-060	35.4	X-061	37.4
X-062	26.4	X-063	29.6

X-064	39.4	X-065	36.6
X-066	40.8	X-067	36.4
X-068	28.0	X-069	32.8
X-070	35.6	X-071	38.4
X-072	39.4	X-073	40.6
X-074	35.8	X-075	42.2
X-076	39.0	X-077	38.6
X-078	50.0	X-079	21.0
Y-001	38.0	Y-002	38.6
Y-003	32.8	Y-004	32.6
Y-005	38.8	Y-006	38.6
Y-007	34.0	Y-008	36.8
Y-009	38.6	Y-010	33.6
Y-011	41.8	Y-012	36.0
W-001	22.0	W-002	22.4
W-003	28.4	W-004	29.4
W-005	22.6	W-006	27.6
W-007	28.0	W-008	23.2
W-009	23.8	W-010	22.2
W-011	28.0	W-012	23.8
W-013	31.8	W-014	26.8
W-015	27.0	W-016	28.2
W-017	24.6	W-018	24.7
W-019	22.6	W-020	22.2
W-021	20.6	W-022	30.8
W-023	25.8	W-024	22.4
W-025	28.8	W-026	29.0
W-027	21.6	W-028	24.4
W-029	25.4	W-030	25.0
W-031	21.6	W-032	23.6
W-033	21.0	W-034	25.0
W-035	27.8		

- 단백질 전기영동(SDS-PAGE) 분석법에 의해 수집한 벌꿀에 대해서 주요단백질의 패턴을 살펴 보았다. 본 연구팀의 기 보고 연구결과에 의하면, 벌꿀의 주요단백질 분자량 차이에 의해 토종 벌꿀과 양봉 벌꿀을 구별할 수 있으므로 수집한 벌꿀을 전수 분석하였다. 꿀의 단백질 외에도 화분의 단백질이 있으면 벌꿀 주요단백질만의 특성을 알 수 없으므로 벌꿀을 증류수에 희석하여 원심분리(10,000×g, 10분)하여 화분 등 이물질을 제거한 후 사용하였다. 토종 벌꿀과 양봉 벌꿀의 주요 단백질이 양적으로 차이가 있으므로, 주요단백질 패턴을 확인하기 위한 본 실험에서는 토종 꿀은 꿀 0.1g을 증류수 0.5ml에 희석하고 양봉 꿀은 0.5g을 증류수 0.5ml에 희석하여 희석배수에 차이를 두었다. 토종 벌꿀로 수집된 샘플 중 SDS-PAGE 결과, 주요 단백질의 분자량이 양봉 벌꿀 주요 단백질의 분자량과 유사한 샘플도 있었으며, 양봉꿀의 주요단백질이 토종 꿀 주요단백질의 분자량과 같은 단백질과 혼재되어 있는 샘플도 존재하였다. 이는 추후 토종과 양봉 꿀 주요 단백질 각각에 대해 특이적으로 인식하는 항체가 개발 되어지면 혼재되어 있는 것에 대한 해석이 가능해 질 것으로 전망된다.



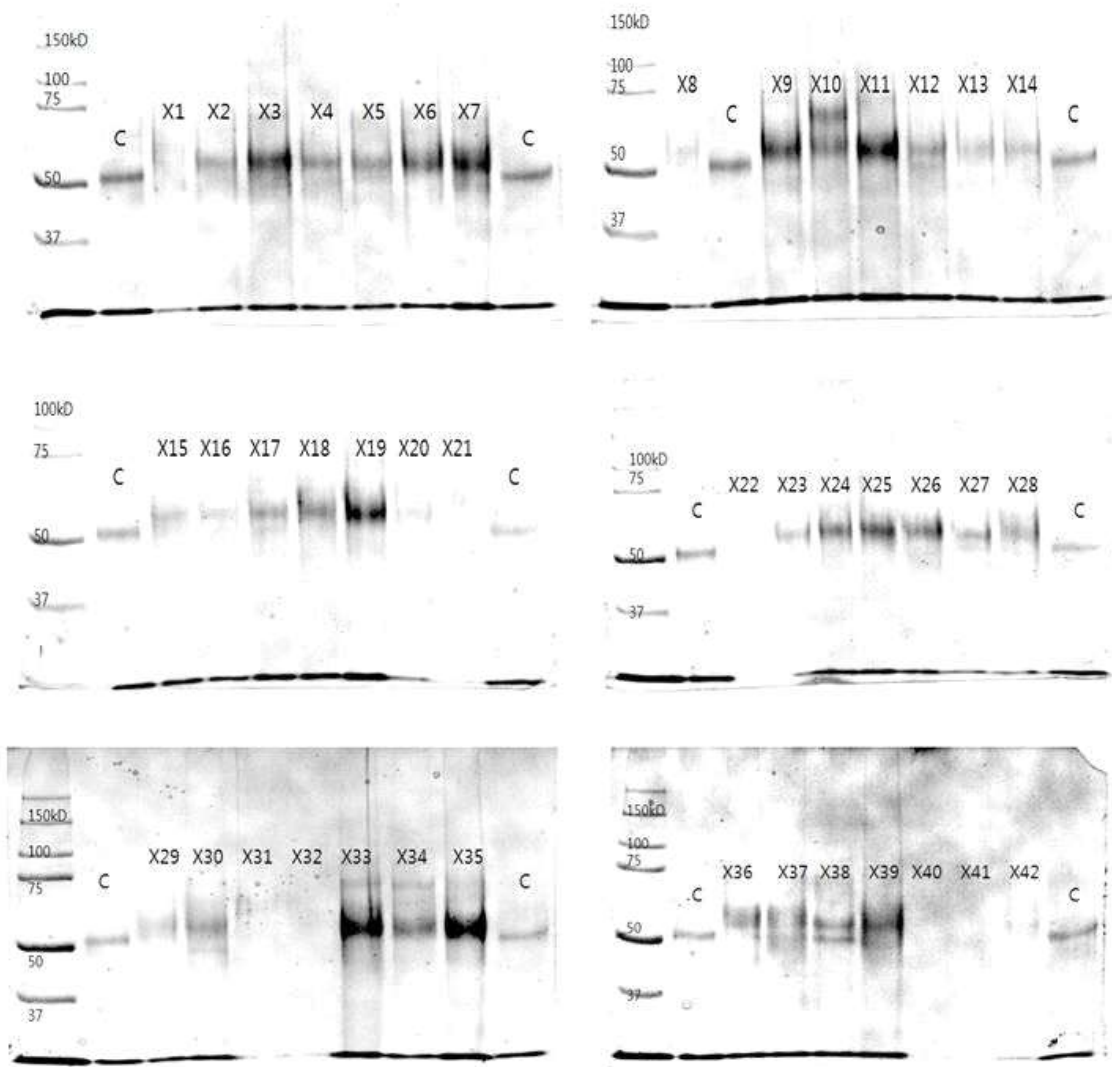


그림. 수집 벌꿀의 단백질 전기영동-1

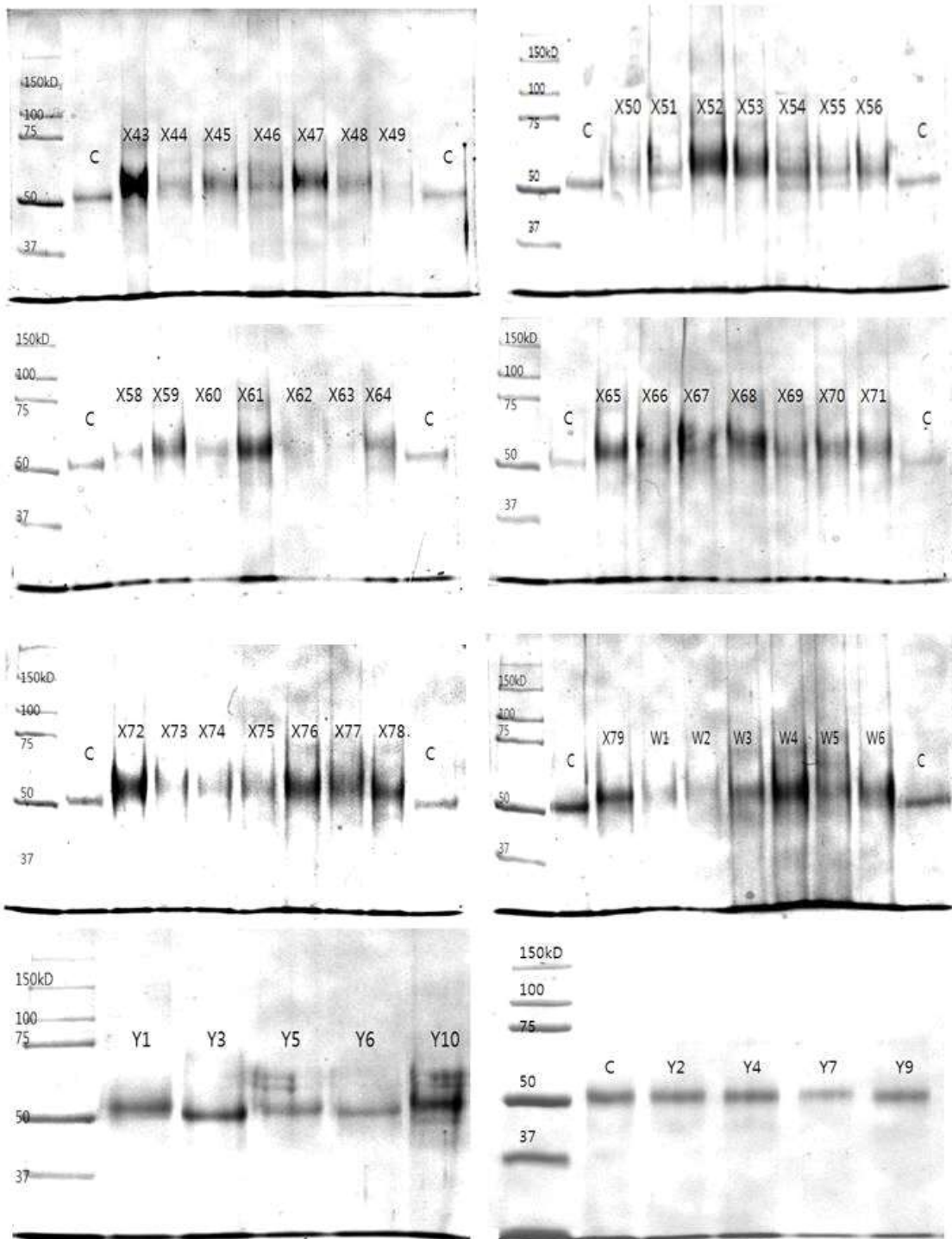


그림. 수집 벌꿀의 단백질 전기영동-2

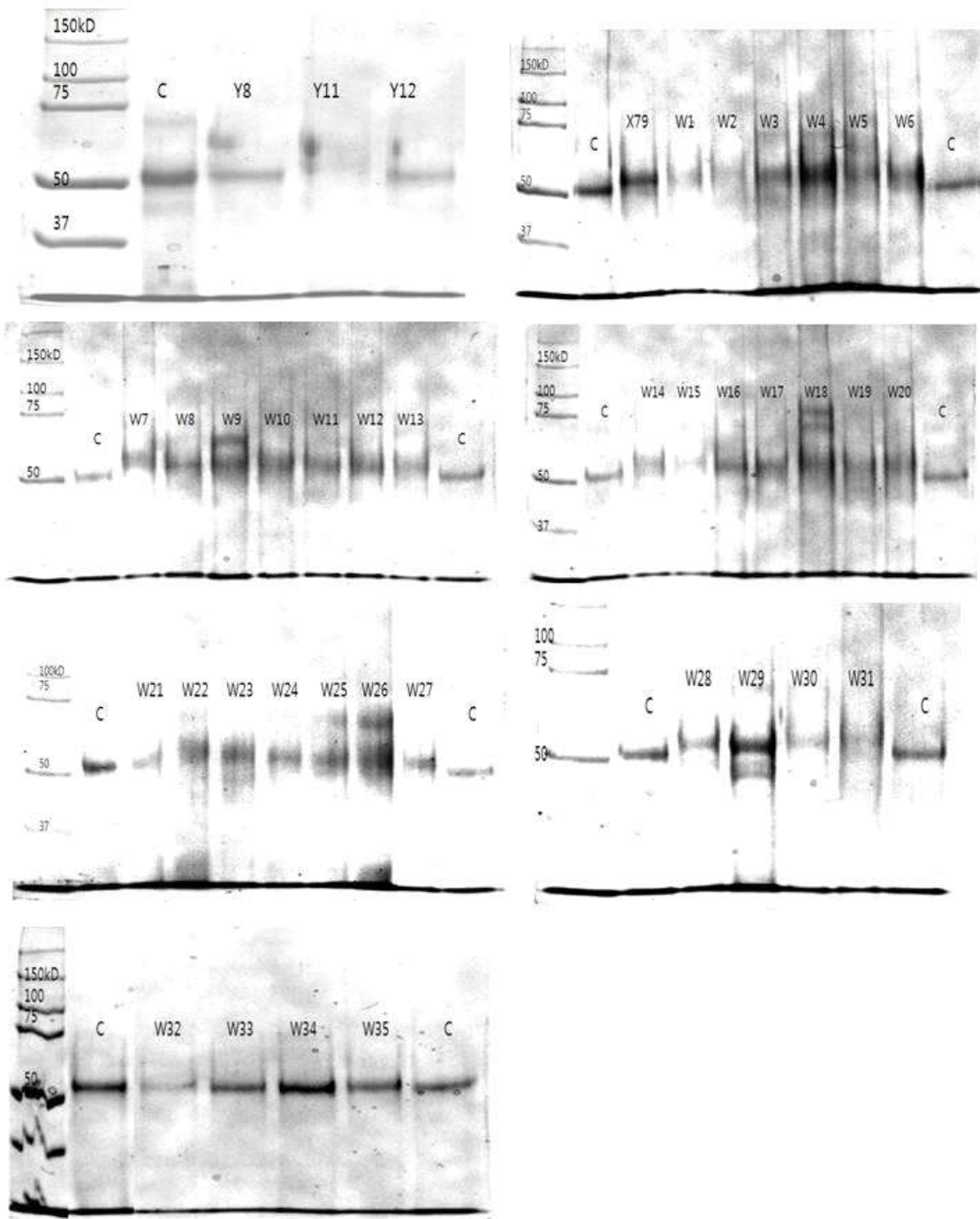
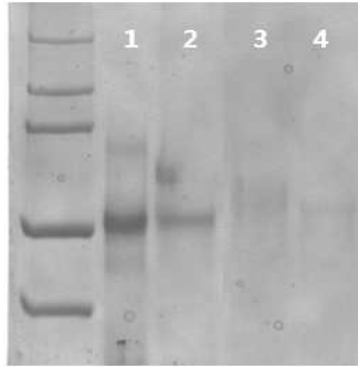


그림. 수집 벌꿀의 단백질 전기영동-3

**나. 토종 및 양봉꿀 주요 단백질을 항원으로 하는 특이적 항체 개발**

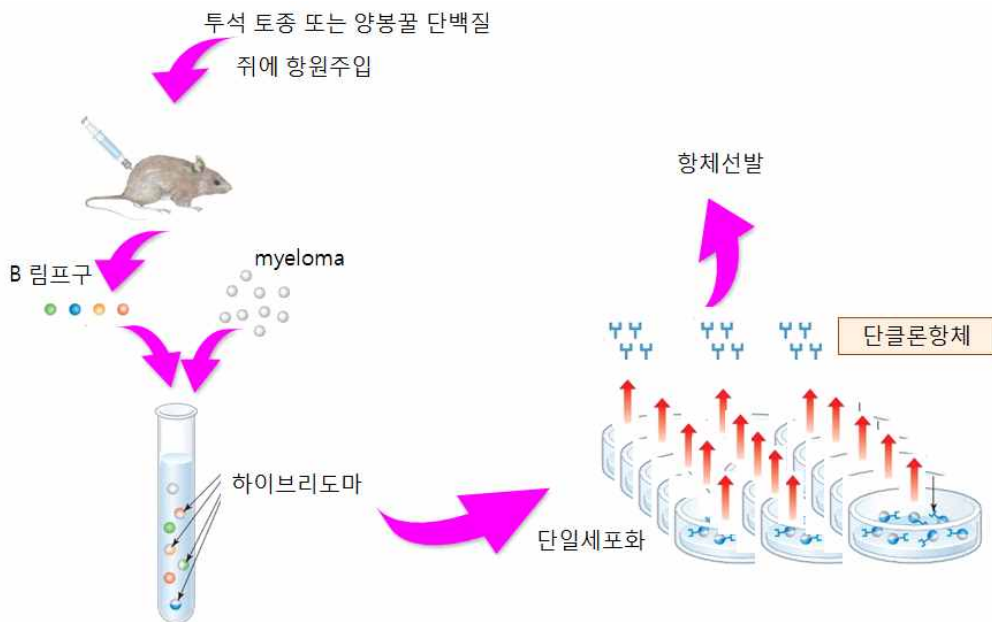
- 국토종 및 양봉 벌꿀을 각각 투석막을 사용하여 증류수에 대해서 24시간 투석하였다. 원심분리 (10,000xg, 10min) 한 후 얻은 상등액을 동결건조 하였으며 이들 분말을 항체 제작을 위한 시료로 이용하였다.



**그림. 투석 벌꿀의 주요단백질 전기영동**

1: 투석 전 토종, 2: 투석 후 토종, 3: 투석 전 양봉, 4: 투석 후 양봉

- 단클론 항체 제작을 위해 투석한 벌꿀 단백질 100ug을 complement freud's adjuvant와 함께 잘 섞어 준 후 BALB/c 마우스에 주입하였다. 2주 뒤에 각각의 항원을 동량 취해서 incomplement freud's adjuvant와 잘 섞어서 각각의 마우스에 재주입하였다. 같은 과정을 1번 또는 2번 더 반복한 후 마우스의 비장으로부터 B세포를 얻었으며 마우스 기원의 myeloma (SP2/0) 세포와의 융합 반응을 실시하였다. 얻어진 하이브리도마 세포에서 항체 형성 여부를 ELISA 방법을 이용하여 검증하였다.



**그림. 단클론 항체 제작과정**

- 최종적으로 토종과 양봉 벌꿀 단백질을 공통적으로 인식하는 항체를 생산하는 4개의 하이브리도마 세포주와 토종꿀 주요단백질 특이적으로 인식하는 항체를 생산하는 2개의 하이브리도마 세포주를 개발하였다. 토종과 양봉 벌꿀 단백질을 공통적으로 인식하는 항체를 생산하는 4개의 하이브리도마 세포는 single colony화 하여 mono-clone을 확보하였다. 토종꿀 특이적 항체 생산 하이브리도마 세포주는 아직 single colony화 되지는 않았다.

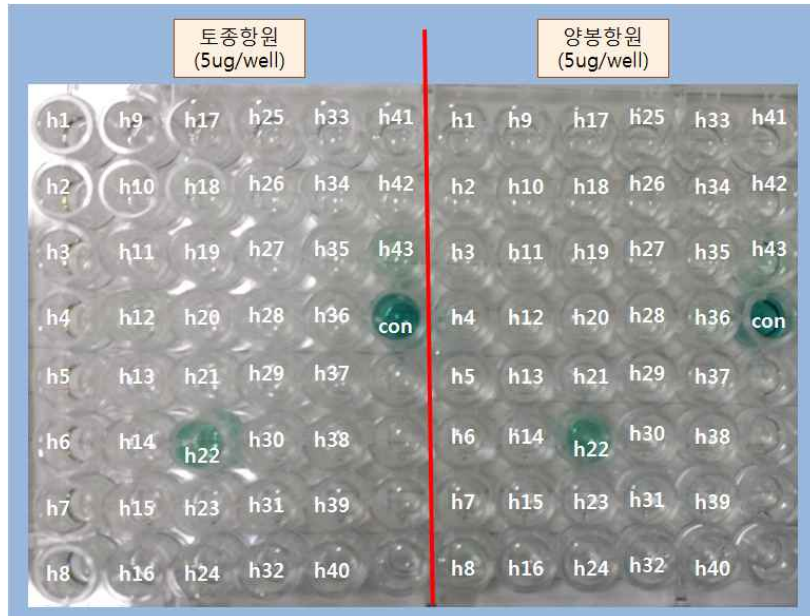


그림. 항체 생성 하이브리도마 선별을 위한 ELISA 예시

h1~h43: 생성된 하이브리도마 배양액, con: 꿀 단백질 감작 마우스 혈청 (예시; h2와 같이 반응하는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 선별함)

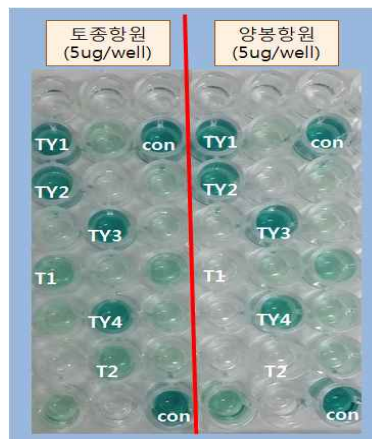


그림. 최종적으로 선별된 항체 생성 하이브리도마 ELISA 결과

TY1~TY4: 토종과 양봉 단백질을 공통적으로 인식하는 항체 생산 하이브리도마 (single colony 선별 완성), T1, T2: 토종꿀 단백질 특이적으로 인식하는 항체 생산 하이브리도마 (single colony 선별 진행 중에 있음), con: 꿀 단백질 감작 마우스 혈청



- 선발된 6개의 하이브리도마가 생산하는 항체가 인식하는 벌꿀 단백질을 western blotting 방법을 이용하여 검증하였다. 토종과 양봉 벌꿀의 단백질을 모두 인식하는 항체를 생산하는 TY1, TY2, TY3, TY4 하이브리도마 배양액은 ELISA 방법과 일치하는 결과로 토종과 양봉 벌꿀의 주요단백질을 인식하고 있음을 확인하였다. 또한 T1과 T2 하이브리도마 세포가 생산하는 항체는 토종 벌꿀의 주요단백질 만을 인식하고 있는 결과를 보여 이 또한 ELISA 결과와 일치하고 있음을 확인하였다.

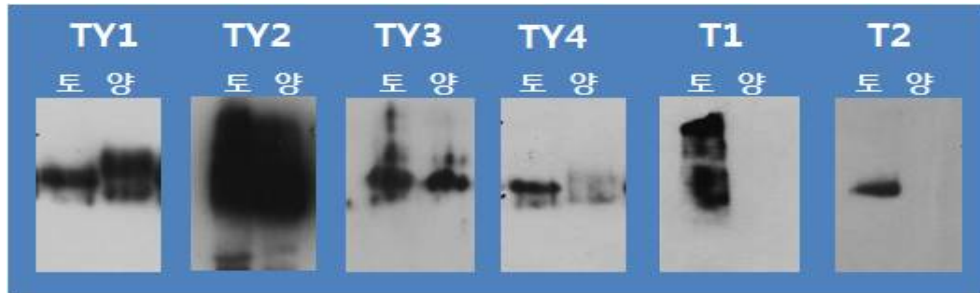


그림. 각 항체가 인식하는 벌꿀 단백질 패턴

TY1~TY4: 토종과 양봉 단백질을 공통적으로 인식하는 항체, T1, T2: 토종꿀 단백질 특이적으로 인식하는 항체, 토: 토종 벌꿀, 양: 양봉 벌꿀

- mono-clone화 된 토종과 양봉 벌꿀 단백질을 공통적으로 인식하는 4종류 항체의 isotype을 키트를 이용하여 동정하였다. TY1, TY3, TY4이 생산하는 항체는 IgG1을 주로 하고 IgM의 중쇄 일부분을 갖는 항체로, TY2는 IgG1 isotype의 중쇄를 갖는 항체로 동정되었다. 경쇄는 4가지 종류의 모든 항체가 kappa chain을 메인으로 하는 항체임을 확인할 수 있었다.

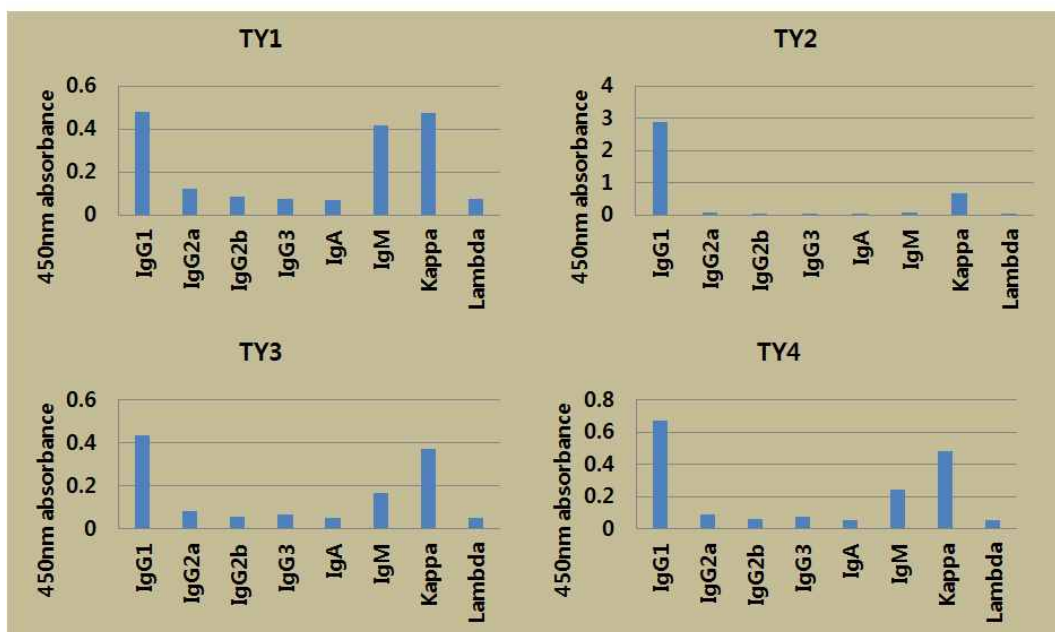


그림. 각 항체 중쇄와 경쇄의 isotype 결정

TY1, TY3, TY4: IgG1의 중쇄를 메인으로 하나 IgM의 일부분을 갖는 항체, TY2: IgG1의 중쇄를 갖는 항체, 이들 모두의 경쇄는 kappa chain을 갖고 있는 것으로 동정됨

- mono-clone화 된 토종과 양봉 벌꿀 단백질을 공통적으로 인식하는 4종류 항체의 항원 희석배수에 따른 항원인식 한계를 조사하였다. 현재까지의 배양 한계에서는 TY2 하이브리도마 세포로부터 만들어지는 항체가 가장 좋은 affinity를 갖는 것으로 판단된다.

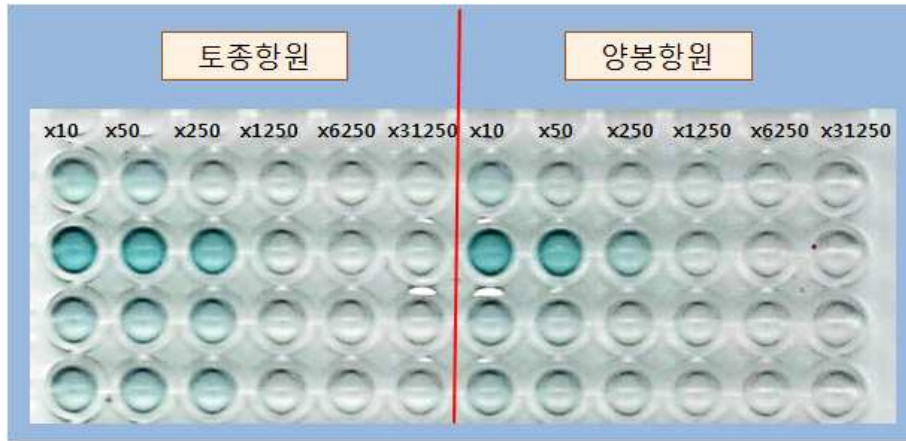


그림. 항원 희석배수에 따른 항체의 항원 인식 한계

#### 다. 벌꿀 가공품 분류 기준안 개발을 위한 사례 조사

- 일본의 벌꿀 가공품 품질표시 기준에 대한 정보 수집 및 그 사례를 조사하였다. 다음은 일본의 벌꿀류 품질표시 및 그 기준 실시에 대한 내용을 요약하였다.

- 내용 요약

##### 1. 표시대상 상품

벌꿀류

##### 2. 표시해야하는 항목

벌꿀류(용기에 넣었거나 또는 포장된 물건에 한한다.)의 품질에 관한 표시에 있어서는, 농림자원의 규격화 품질표시 적정화에 관한 법률(JAS법)에 준하는 가공식품품질표시기준 등의 법령이 정하는 것과 동경도 소비생활조례(이하 조례로 표시)에서 정하는 것에 의해 아래의 사항을 표시한다.

##### (1) 품명

##### (2) 원재료의 비율 및 중량

##### 3. 표시방법 등

표시해야할 항목의 표시방법 등은 아래와 같다.

##### (1) 적용범위

##### ① 조례의 적용범위

벌꿀류의 적용범위는, 벌꿀, 정제벌꿀, 당첨가벌꿀, 벌꿀집벌꿀 또는 벌꿀집 벌꿀 첨가 벌꿀로 한다.

- 벌꿀류의 정의

##### 가. 벌꿀

꿀벌이 식물의 꽃꿀을 채집해서 벌집에 저장숙성시킨 천연의 감미물질을 말한다. (벌꿀에 정제벌꿀

또는 로얄제리, 화분, 향료, 과즙이나 비타민을 첨가한 것을 포함한다.)

나. 정제벌꿀

벌꿀으로부터 향기나 색을 제거한 것을 말한다.

다. 당첨가벌꿀

벌꿀에 이성화액당 또는 기타 당류를 첨가한 것으로, 벌꿀 함유량이 중량백분율로 60% 이상의 것을 말한다.

라. 벌꿀집 벌꿀

유충이 없는 벌집에 꿀벌에 의해 저장된 벌꿀로 벌꿀집 전체 또는 일부를 밀봉한대로 판매되고 있는 것을 말한다.

마. 벌꿀집 벌꿀 첨가 벌꿀

벌꿀에 벌꿀집 벌꿀을 첨가한 것을 말한다.

## ② 품명의 적용범위

벌꿀류에 있어서, 정제벌꿀, 당첨가벌꿀, 벌꿀집벌꿀 또는 벌꿀집 벌꿀 첨가 벌꿀에 적용한다.

## ③ 원재료의 비율 또는 중량의 적용 범위

정제벌꿀을 사용한 벌꿀류, 당첨가벌꿀, 벌꿀집 벌꿀 또는 벌꿀집 벌꿀 첨가 벌꿀 그리고 제품에서 차지하는 중량비율로 0.05% 이상의 로얄제리, 0.1% 이상의 화분 또는 과즙을 사용 및 첨가한 벌꿀류에 적용한다.

## (2) 표시방법

### ① 품명

정제벌꿀에는 “정제벌꿀”이라고, 당첨가벌꿀에 있어서는 “가당벌꿀”, 벌꿀집 벌꿀에 있어서는 “벌꿀집 벌꿀”, 벌꿀에 벌꿀집 벌꿀을 첨가한 것에 있어서는 “벌꿀집 벌꿀 첨가 벌꿀” 이라고 표시한다.

### ② 원재료의 함량비율 또는 중량

정제벌꿀을 사용한 벌꿀류에 있어서는 정제벌꿀의, 당첨가벌꿀에 있어서는 사용한 당류의, 벌꿀집 벌꿀 첨가 벌꿀에 있어서는 벌꿀집 벌꿀 원재료에 해당하는 중량의 비율을 표시하고, 제품에서 차지하는 중량비율로 0.05% 이상의 로얄제리, 0.1% 이상의 화분 또는 과즙을 사용 및 첨가한 벌꿀류에 있어서는 로얄제리, 화분 또는 과즙의 원재료에 해당하는 중량 또는 중량의 비율을 표시한다. 사용하는 단위는 퍼센트(%) 또는 그램(g)으로 한다.

## << 표시예 >>

- 원재료의 비율: 설탕 0%

- 원재료의 중량: 로얄제리 0g

## (3) 표시장소

2개의 규정에 의해 필수표시 사항은 용기 또는 포장의 잘 보이는 곳에 인쇄 또는 인쇄한 라벨을 붙이는 방법으로 표시할 것.

또는 품명의 표시사항은 가공식품품질표시기준에 준해 명칭(품명)란에, 그 이외에 표시사항을 아래의 방법으로 표시할 것.

① JAS법에 준하는 가공식품품질표시기준에 규정되어져 있는 원재료명란에는 “정제벌꿀”이라는 글자를, 당류를 표시하는 글자 또는 “벌꿀집 벌꿀”이라는 글자, “로얄제리”라는 글자, “화분” 또는 “00과즙”이라는 글자를 괄호를 붙여서 표시



- ② JAS법에 준하는 가공식품품질표시기준에 규정되어져 있는 일괄표시란 내에 항목명을 표시
- ③ JAS법에 준하는 가공식품품질표시기준에 규정되어져 있는 표시항목에 근접된 장소에 항목명을 표시

(4) 글자의 크기 또는 배색

표시에 사용하는 글자는 일본공업규격 Z8305 (활자 기준방침)에서 규정하는 8포인트이상의 크기로 통일된 활자로 배경의 생과 대조적인 색으로 할 것.

- 일본에서는 “별꿀류 품질표시 기준실시요강”에서 벌꿀 가공품에 대한 품질표시를 규제하고 있으며 실질적인 제품의 표시사례를 살펴보았음.

\* 실례 1



(1) 품명

하치미츠 시럽

(2) 원재료명

식이섬유(환원난소화성 텍스트린), 벌꿀, 에리스리톨, 감미료(아스파탐, L-페닐알라닌 화합물), 보존료(안식향산나트륨)

(3) 내용량

180g

(4) 유통기한

별도표시

(5) 보존방법

직사광선을 피하고 서늘한 장소에 보관해 주세요.

(6) 판매자

아지노모토주식회사

\* 실례 2



(1) 품명

쿠로미즈

(2) 원재료명

이소말토올리고당 시럽, 쿠로미즈(쇼당액당, 적당(조당, 당밀)), 벌꿀, 흑당벌꿀(오키나와산 흑당), 과당

(3) 내용량

200g

(4) 유통기한

별도표시

(5) 보존방법

직사광선을 피하고 상온에 보관

(6) 제조자

(주)가련미봉원본원

## 2) 제 2세부 과제

### 가. 사양꿀 및 인조꿀의 특이성분 분석

#### ● 재료 및 방법

##### - 시료

분석을 위한 꿀은 시중의 상점이나 양봉 농가를 방문하여 구입하거나 양봉 및 토종봉을 제한된 시설에서 사육하여 제조하였다.

##### - 시료의 DNPH 유도체 합성

꿀, 설탕 등 시료 2g을 증류수 4ml에 용해한다. 물에 녹인 시료 2ml에 0.1% 2,4-dinitrophenylhydrazine(in 2N HCl) 2ml를 가하고 실온에서 1시간 방치하여 반응시켰다.

##### - DNPH 유도체의 추출

반응이 끝난 시료 800 $\mu$ l를 eppendorf tube에 옮겨 담고, dichloromethane, ethylacetate 등 각종 유기용매를 400 $\mu$ l을 각각 가하고 10초간 vortexing 한 후 2분간 원심분리하여 층을 분리하였다. 원심분리하여 분리된 상층액 350 $\mu$ l를 eppendorf tube에 옮겨 담은 후 50 $^{\circ}$ C dry oven에서 용매를 다 날리고 dichloromethane 20 $\mu$ l를 가하여 녹인 시료액을 DNPH 유도체 분석 시료로 하였다.

##### - 시료의 TLC 분석

Dichloromethane에 녹인 DNPH 유도체 분석 시료 4 $\mu$ l를 5 cm 길이의 Silica Gel G250(thick 0.5 mm, Merck)에 loading 한 후 benzene : ethylacetate (1 : 4)를 전개용매로 하여 전개하였다. 전개가 끝난 TLC plate는 잘 말린 다음 5% NaOH(in 80% EtOH)를 분무한 후 가열하여 발색하였다.

##### - Dansyl유도체의 조제

증류수로 2배 희석한 꿀 시료 100 $\mu$ l, 10mg/ml의 dansyl chloride 200 $\mu$ l, 포화 Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 200 $\mu$ l를 넣고 vortexing 후 70 $^{\circ}$ C 암실에서 1시간 반응한다. 반응이 끝난 후 냉각하고 100 $\mu$ g/ml의 proline 200 $\mu$ l를 가하고 70 $^{\circ}$ C 암실에서 30min 반응한다. 여기에 toluene 300 $\mu$ l를 가하고 vortexing한 후 12000g 3min 원심분리하여 상층액 3 $\mu$ l를 TLC plate에 loading한 후 전개한다. 크로마토그램은 UV에서 카메라로 촬영하였다.

##### - 시료의 HPLC 분석

Dichloromethane에 녹인 DNPH 유도체 분석 시료 4 $\mu$ l를 C18 column(Agilent TC C-18, 5 $\mu$ m, 4.6 X 250mm)에 주입하여 분석하였다. 시료의 분석은 유속 ml/min, 전개 용매는 benzene : ethylacetate (1 : 4)를 사용하였으며 250 nm에서 검출하였다.

#### ● 결과

##### - 사양꿀 특이 성분의 검출

수집한 꽃꿀과 사양꿀의 DNPH 유도체를 TLC로 분석한 결과 사양꿀에서 나타나나 꽃꿀에서는 발견되지 않는 성분이 있음을 확인하였다.

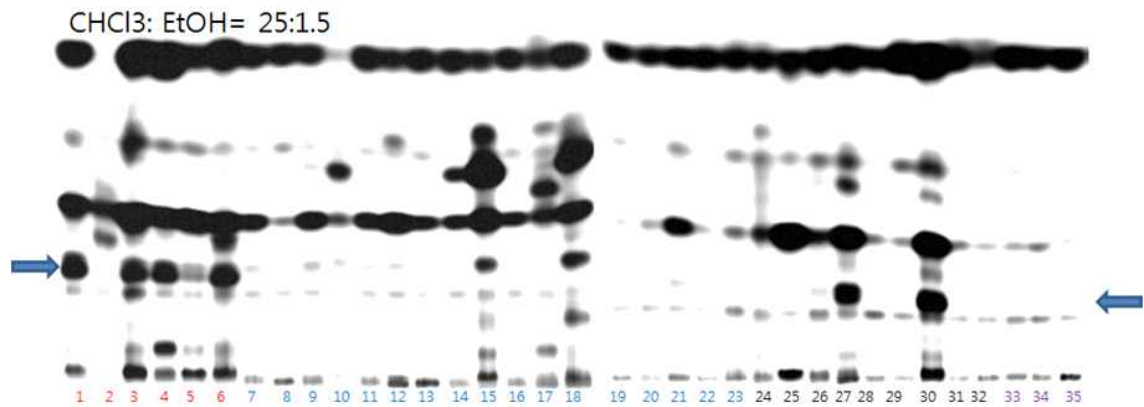


그림 1. 꿀 DNP-유도체의 thin layer chromatogram

꿀의 DNP-유도체 이외에 dansylchloride 유도체를 조제하여 TLC로 사양꿀 특이성분을 확인하였다. Dansyl chloride 유도체의 경우 다양한 spot이 검출되었으나 사양꿀 특이적인 spot의 존재를 확인할 수 없었다.

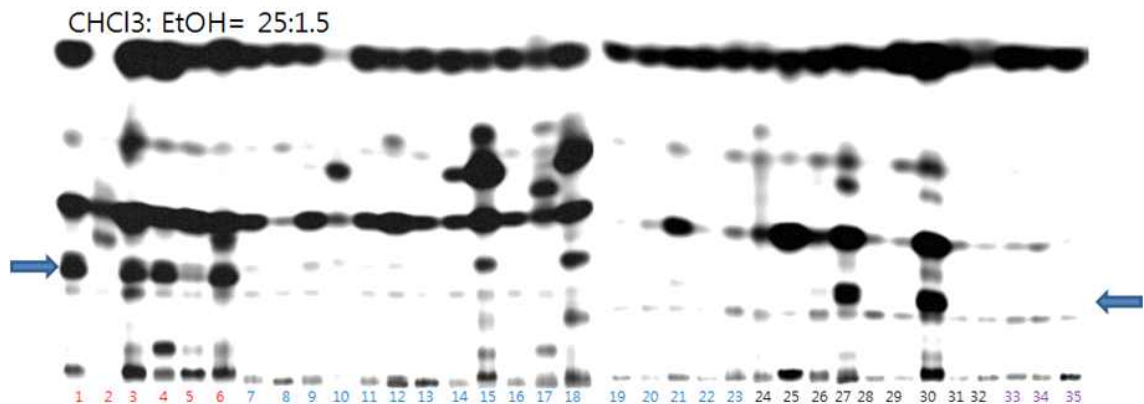


그림 2. 꿀의 dansyl 유도체

#### - 설탕 특이 성분의 확인

설탕 특이성분의 기원을 확인하기 위하여 설탕과 사양꿀의 DNP-유도체를 TLC로 확인하였다. 설탕에는 불순물로부터 기원하는 것으로 판단되는 수종의 DNP-유도체가 TLC 상에서 확인이 되었으며 그림 3의 붉은 화살표로 표시된 부분은 사양꿀 특이적으로 발견되는 성분으로 설탕으로부터 유래하는 것을 알 수 있다.

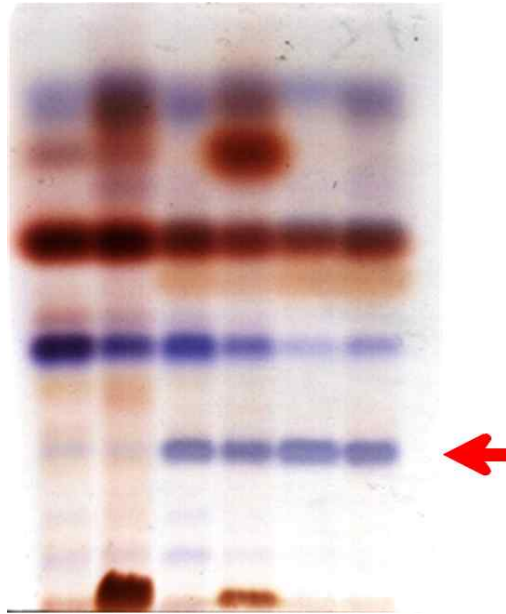
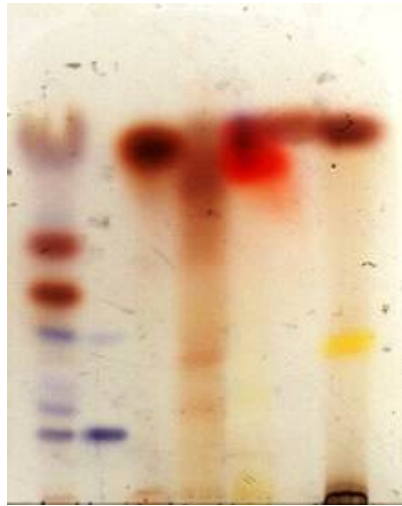


그림 3. 설탕 기원의 특이 성분의 확인

1: 밤 꿀, 2: 잡화 꿀, 3: 아카시아 꿀, 4: 아카시아 꿀, 5: 사탕수수 설탕, 6: 사탕무 설탕

그림에서 나타나듯이 설탕에서 발견되는 사양꿀 특이적인 성분은 설탕의 기원이 사탕수수 이거나 사탕무 이거나 공통적으로 존재하고 있음을 알 수 있다. 백설탕에는 HMF 이외에도 유기산이나 아미노산 등이 불순물로 존재하고 있음이 보고되고 있다. 따라서 수종의 알데히드 및 유기산의 DNPH 유도체를 TLC로 비교 확인하였다. 설탕 특이성분은 설탕의 DNPH유도체를 TLC로 분리하여 추출한 것을 사용하였다. 알데히드 화합물로는 formaldehyde, glutaldehyde, methylglyoxal, benzaldehyde, 2-furaldehyde, 유기산으로는 lactic acid, formic acid, malic acid, maleic acid, ascorbic acid, acetic acid, citric acid, oxalic acid, succinic acid 그리고 glycerol의 DNPH 유도체를 비교하였다. 그림 4~6에서 보듯이 설탕 기원의 특이성분은 짙은 푸른색을 나타내나 비교 물질로 사용한 알데히드나 유기산에서는 푸른색을 나타내는 화합물은 없었다. Lactic acid와 formic acid는 특이 물질과 같은 Rf 값을 나타내고 있으나 발색된 결과가 달랐다. 사양꿀 특이 성분의 생성 기원을 파악하기 위해서는 이 성분의 정제가 필요함을 알 수 있다.



1 2 3 4 5 6 7

**그림 4. 알데히드의 DNPH 유도체**

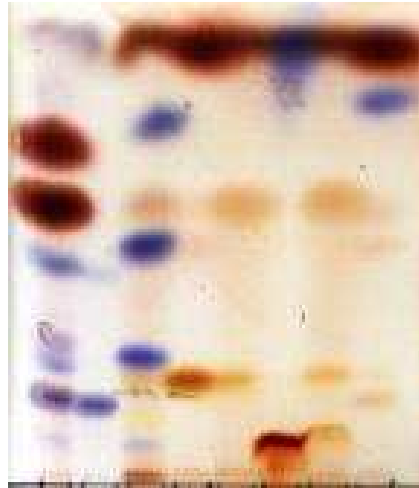
1: 설탕, 2: 설탕 특이성분의 TLC 추출물, 3: formaldehyde, 4: glutaldehyde, 5: methylglyoxal, 6: benzaldehyde, 7: 2-furaldehyde



1 2 3 4 5 6

**그림 5. 유기산의 DNPH 유도체**

1: 설탕, 2: 설탕 특이성분의 TLC 추출물, 3: lactic acid, 4: formic acid, 5: malic acid, 6: maleic acid



1 2 3 4 5 6 7 8

**그림 6. 유기산의 DNPH 유도체**

1: 설탕, 2: 설탕 특이성분의 TLC 추출물, 3: ascorbic acid, 4: acetic acid, 5: citric acid, 6: oxalic acid, 7: succinic acid, 8: glycerol

**- DNPH 유도체의 효율적인 분리를 위한 TLC 전개용매 탐색**

꿀로부터 유래한 DNPH 유도체는 다수가 존재하며 일부는 서로 겹치거나 인접하여 있으므로 정확한 판단에 어려움을 가져온다. 특히 사양꿀 특이 성분은 일부의 꿀에서 갈색의 성분과 겹치거나 인접하여 나타나고 있다. 따라서 TLC 전개용매의 조성을 바꾸어 이들 성분이 분리가 잘 되는 조건을 검토할 필요가 있다. 문헌에 보고되어있는 DNPH 유도체의 silica gel TLC의 전개 용매로 사용된 것을 참고하여 선정된 12종의 전개 용매에 따른 특이 성분의 분리력을 검정하였다. 그 결과 그림00에서 보듯이 Toluene : Ethyl acetate(1 : 1), Acetone : Benzene (1 : 4), Benzene : Ethyl acetate(1 : 2)가 비교적 잘 분리되었다. 그러나 Toluene : Ethyl acetate(1 : 1), Acetone : Benzene (1 : 4)의 경우 특이 성분의 위치가 아래에 치우쳐 있어 갈색의 band와 잘 분리 되지 않는 단점이 있다. Benzene : Ethyl acetate(1 : 2)의 경우 특이 성분이 TLC plate의 1/3되는 곳에 위치하고 spot의 위 아래로 붉은 색과 갈색이 잘 분리되어 특이 성분의 DNPH 유도체 분리에는 최적의 전개 용매로 판단이 되었다.



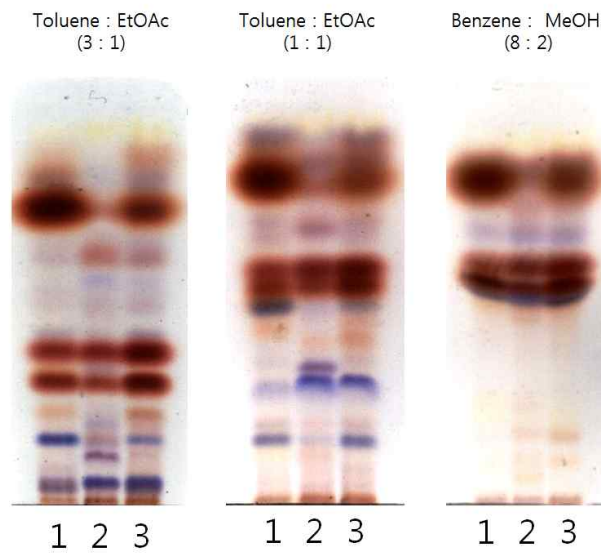


그림 7. 전개 용매에 따른 DNPH 유도체의 분리-1

1: 설탕, 2: 꿀, 3: 사탕

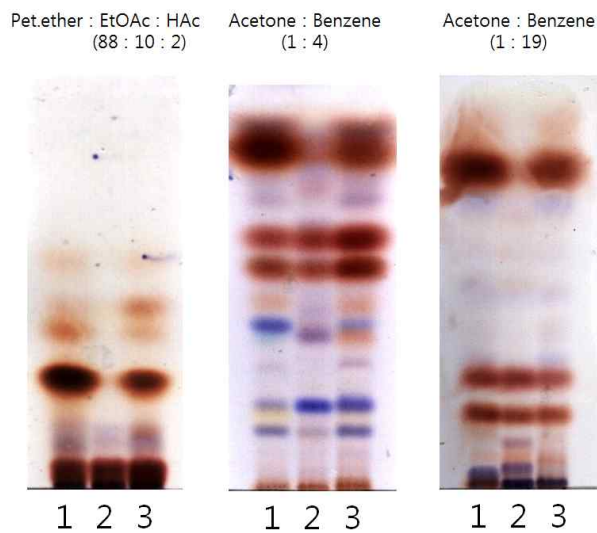


그림 8. 전개 용매에 따른 DNPH 유도체의 분리-2

1: 설탕, 2: 꿀, 3: 사탕



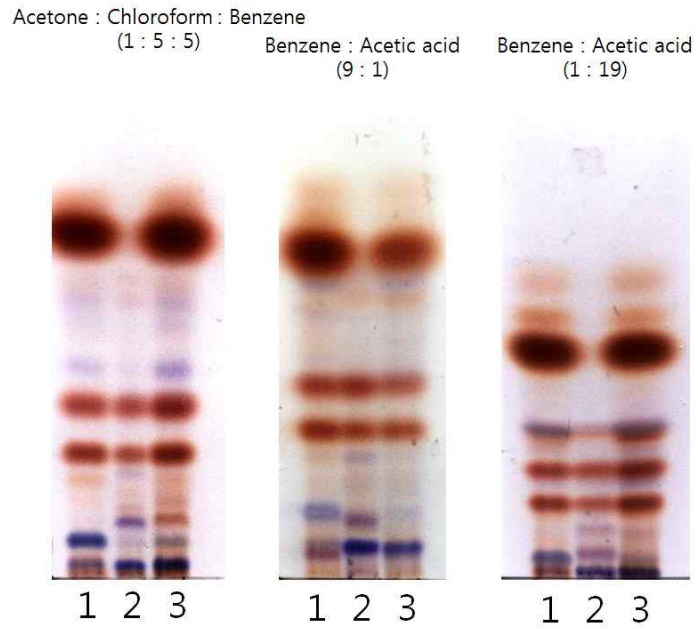


그림 9. 전개 용매에 따른 DNPH 유도체의 분리-3

1: 설탕, 2: 꽃꿀, 3: 사양꿀

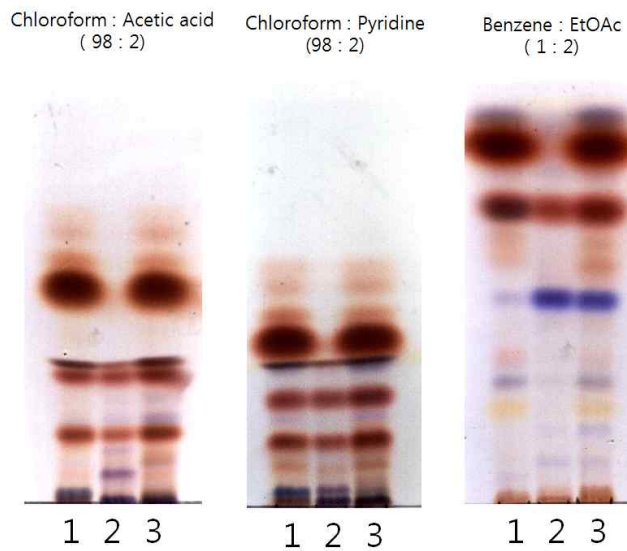


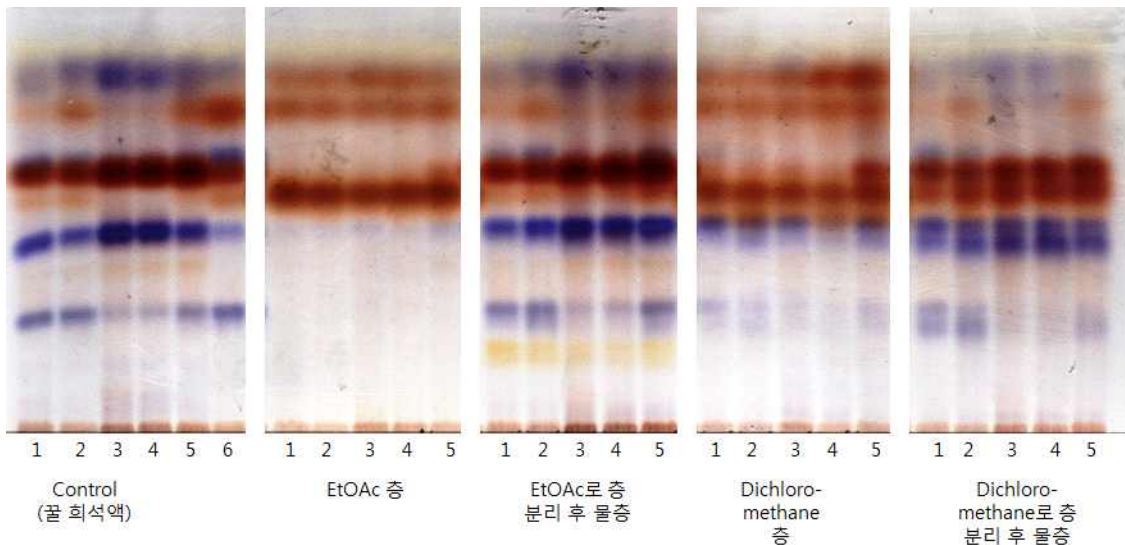
그림 10. 전개 용매에 따른 DNPH 유도체의 분리-4

1: 설탕, 2: 꽃꿀, 3: 사양꿀

**- 설탕 지표 물질의 선택적 추출**

꿀 시료의 DNPH 유도체는 앞서 제시한 그림에서 보듯이 매우 다양하여 실제적인 판별에 어려움이 따른다. 따라서 꿀의 희석액을 유기용매로 추출하여 DNPH 유도체의 패턴의 변화와 지표 물질의 선택적 추출 가능성을 검토하였다.

꿀, 설탕 등 시료 1g에 물 2ml 을 가하여 녹인 후 그 중 2ml를 취하고 유기용매 (EtOAc, Dichloromethane) 2ml을 첨가하여 vortexing 후 원심분리하였다. 원심분리 후 유기용매 층과 수 층으로 분리 후 유기용매를 다 날린 후 EtOH 2ml 첨가하여 유기용매에 있던 물질을 녹여냈다. 각각의 수 층과 유기용매 층에 0.1% DNPH (in 2N HCl) 2ml을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. 반응물을 800µl씩 eppendorf tube에 옮겨 담고, benzene 500µl을 첨가 하여 추출하고 이를 TLC로 분석하였다. 그림 11에서 나타나듯이 설탕 지표 물질의 선택적 추출이 이루어지지 않는 않았다.



**그림 11. 설탕 지표 물질의 선택적 추출**

1: 아카시아 꿀, 2: 아카시아 꿀, 3: 잡화 꿀, 4: 잡화 꿀, 5: 사탕 꿀, 6: 설탕

**- DNPH 유도체 추출의 최적 용매**

앞서 제시한 다양한 그림에서 볼 수 있듯이 꿀의 DNPH 유도체는 매우 다양하게 나타나고 있다. 특히 특이 성분의 주변에는 분리가 잘 되지 않는 다양한 spot이 시료에 따라 존재하기도 한다. DNPH유도체는 유도체를 합성한 후 유기 용매로 추출하는 과정에서 추출 양상이 바뀌게 되므로 특이 물질을 선택적으로 추출할 수 있는 용매를 검토하였다.

반응이 끝난 시료 800µl를 eppendorf tube에 옮겨 담고 dichloromethane, ethylacetate, benzene 등 유기용매를 400µl을 각각 가하고 10초간 vortexing 한 후 2분간 원심분리하여 층을 분리하였다. 원심 분리하여 분리된 상층액 400µl를 eppendorf tube에 옮겨 담은 후 50°C dry oven에서 용매를 다 날리고 각각의 추출용매를 20µl를 가하여 녹인 시료액을 DNPH 유도체의 선택적 추출 분석 시료로 하였다.

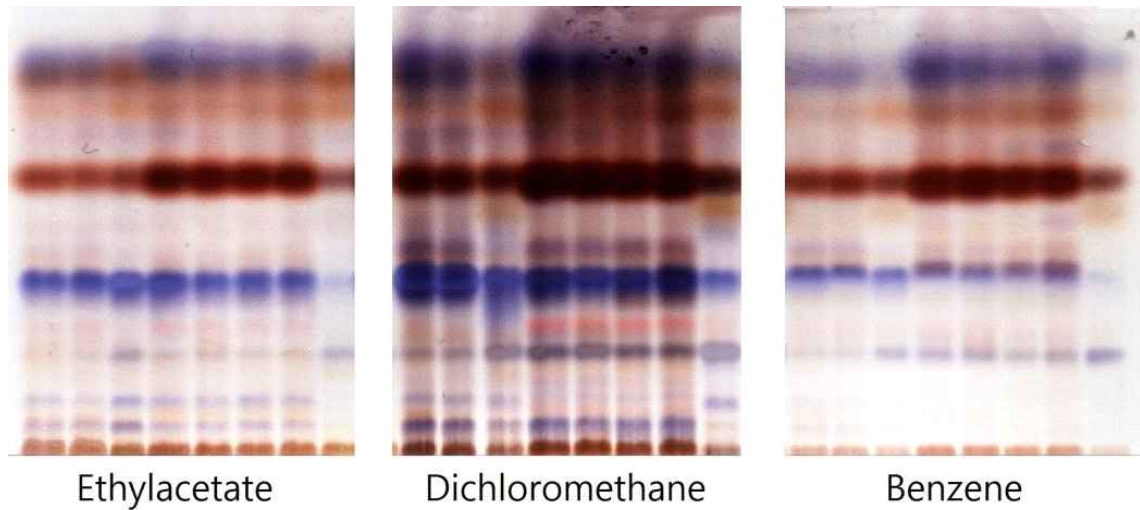


그림 12. DNPH 유도체의 선택적 추출

물과 분리가 잘되는 dichloromethane, ethylacetate, benzene 등의 유기용매를 이용하여 반응 후 유도체의 추출에 미치는 영향을 살펴 보았다. 그림 12에서 보듯이 추출용매에 따라 TLC chromatogram의 복잡성이 현저하게 다르게 나타났다. benzene의 경우 특이성분(지표물질)의 추출은 다소 감소하였으나 다른 spot 의 현저한 감소로 인하여 지표물질의 존재 유무를 간단하게 판단할 수 있는 용매임을 알 수 있다.

**- 설탕 지표물질의 분포**

앞에서 확정된 방법으로 시중에서 구입한 꿀의 설탕 지표물질 분포를 조사하였다.

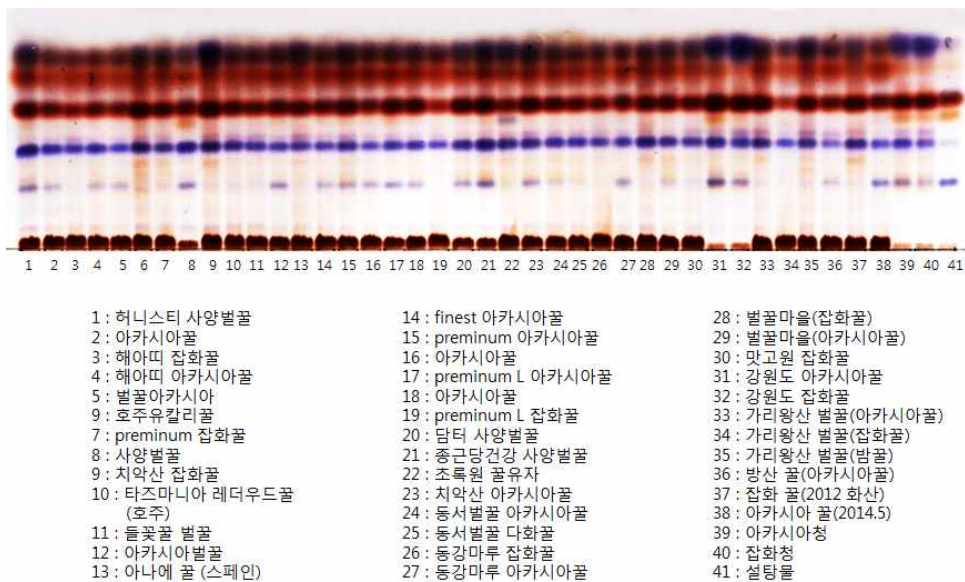
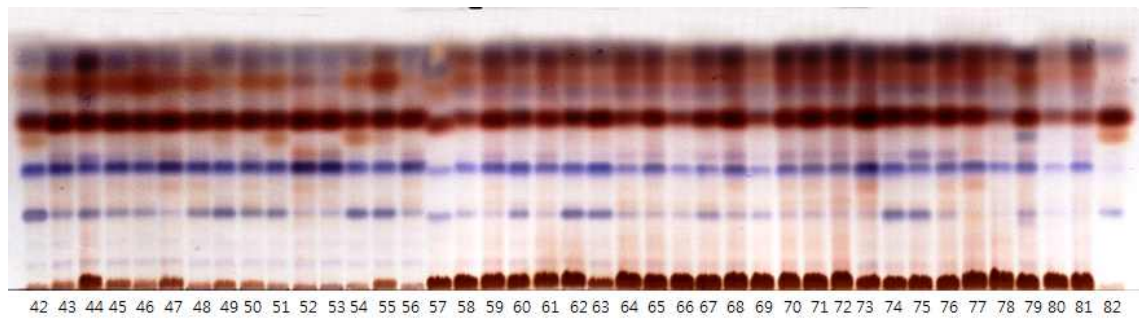


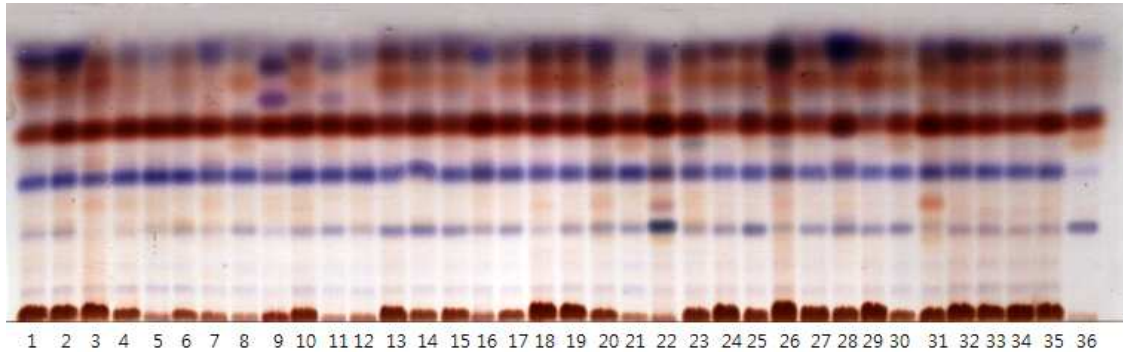
그림 13. 양봉꿀에서 설탕 지표물질의 분포-1





- |                        |                       |                                  |
|------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| 42 : 자연이 준 선물-벌꿀(아카시아) | 55 : 맛고원 아카시아꿀        | 68 : 산속의 꿀(잡화꿀)                  |
| 43 : 청밀 잡화꿀            | 56 : 맛고원 잡화꿀          | 69 : 청밀 아카시아꿀                    |
| 44 : 청밀 아카시아           | 57 : 양봉 벌집꿀(이현우)      | 70 : 청밀 잡화꿀                      |
| 45 : 한국양봉생꿀(잡화꿀_도자기)   | 58 : 충북 기수 아카시아꿀(이현우) | 71 : 하성 야생화꿀                     |
| 46 : 광고양봉원             | 59 : 충북 기수 밤꿀(이현우)    | 72 : 윤상복 벌꿀가족(밤꿀)                |
| 47 : 금주산 벌꿀(잡화꿀)       | 60 : 충북 기수 사양꿀(이현우)   | 73 : 윤상복 벌꿀가족(잡화)                |
| 48 : 금주산 벌꿀(아카시아꿀)     | 61 : 김태우 실장           | 74 : 윤상복 벌꿀가족(아카시아)              |
| 49 : 고려국산벌꿀(사양벌꿀)      | 62 : 양구 벌꿀 아카시아꿀      | 75 : 교육학과 임교수 (아카시아)             |
| 50 : 오감산양봉농원           | 63 : 양구 벌꿀 잡화꿀        | 76 : 교육학과 임교수 (잡화)               |
| 51 : 아카시아꿀(김광용)        | 64 : Honey Love 잡화꿀   | 77 : 100% Natural pure honey(미국) |
| 52 : 밤꿀(김광용)           | 65 : 칠백리 잡화꿀          | 78 : Pure RAW HONEY(미국)          |
| 53 : 농협안심 야생꽃꿀         | 66 : 칠백리 아카시아꿀        | 79 : Really Raw Honey(미국)        |
| 54 : 농협안심 아카시아꿀        | 67 : 산속의 꿀(아카시아꿀)     | 80 : 꿀속의 향연(아카시아 꿀)              |
|                        |                       | 81 : 꿀속의 향연(잡화 꿀)                |
|                        |                       | 82 : 설탕물                         |

그림 14. 양봉꿀에서 설탕 지표물질의 분포-2



- |                                    |                             |
|------------------------------------|-----------------------------|
| 1 : 중국꿀-1                          | 19 : THE FINEST HONEY (연꽃꿀) |
| 2 : 중국꿀-2                          | 20 : THE FINEST HONEY (잡화꿀) |
| 3 : nectaflo(야생꽃꿀)                 | 21 : THE FINEST HONEY (토치)  |
| 4 : nectaflo(송꿀)                   | 22 : THE FINEST HONEY (메밀꿀) |
| 5 : nectaflo(벚꽃꿀)                  | 23 : PETIT HONEY(후쿠라시)      |
| 6 : Airborne(클로버꿀)                 | 24 : PETIT HONEY(굴꿀)        |
| 7 : Airborne(라타꿀)                  | 25 : PETIT HONEY(아카시아꿀)     |
| 8 : miel de citronnier(레몬나무꿀)      | 26 : 미즈바시(메밀꿀)              |
| 9 : miel de lavande maritime(라벤더꿀) | 27 : 미즈바시(토치)               |
| 10 : lune de miel (오렌지나무꿀)         | 28 : 미즈바시(연꽃꿀)              |
| 11 : lune de miel (아카시아꿀)          | 29 : 미즈바시(잡화꿀)              |
| 12 : lune de miel (꿀)              | 30 : PURE HONEY(아카시아꿀)      |
| 13 : THE FINEST HONEY (아카시아꿀)      | 31 : HIGUCHIEN HONEY(잡화꿀)   |
| 14 : THE FINEST HONEY (클로버꿀)       | 32 : 유칼립투스꿀                 |
| 15 : THE FINEST HONEY (오렌지꿀)       | 33 : 가미카와꿀                  |
| 16 : THE FINEST HONEY (해바라기꿀)      | 34 : 모리꿀                    |
| 17 : THE FINEST HONEY (로즈마리꿀)      | 35 : 울방울꿀                   |
| 18 : THE FINEST HONEY(잡화꿀)         | 36 : 설탕물                    |

그림 15. 외국산 꿀에서 설탕 지표물질의 분포

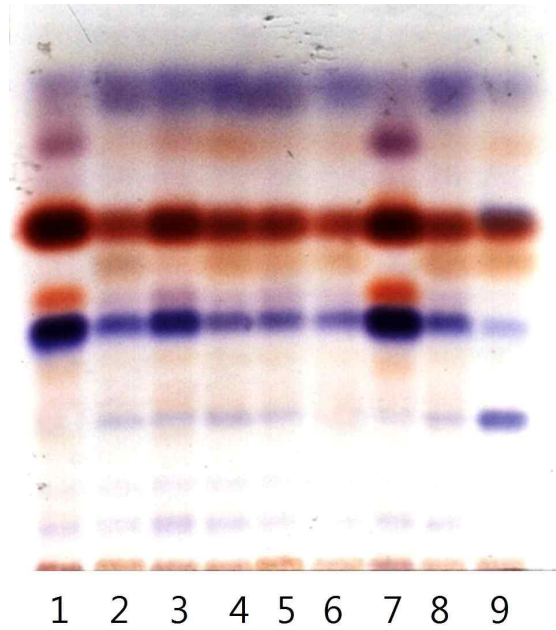


그림 16. 토종꿀에서 설탕 지표물질의 분포

1: 지리산 마천, 2: 영월북면, 3: 정선 가리왕산, 4: 체천, 5: 가리왕산, 6: 덕두원, 7: 강원도 정선, 8: 인제읍 하추리, 9: 설탕

수집하여 분석한 꿀은 모두 124종으로 국내 수집 꿀이 89종, 국외 수집 꿀이 35종이었다. 국내 토종꿀은 가을에 수집할 예정이므로 현재까지의 분석 결과에는 나타나 있지 않다.

국내에서 수집한 양봉꿀은 크게 아카시아꿀과 잡화꿀로 나눌수 있으며 사양꿀 지표물질은시료 33과 81을 제외한 대부분의 아카시아 꿀에서 나타나고 있다. 이는 월동을 하며 급여한 설탕이 남아서 생긴 결과로 설명을 하고 있다. 한편 잡화 꿀의 경우에는 지표물질이 검출 되지 않는 빈도가 높게 나타나고 있다. 잡화 꿀의 경우 설탕을 급여하지 않더라도 다른 곳 어디에서인가 공급되는 설탕에 기인 한 것으로 판단이 된다.

본 연구에서 제시하는 지표 물질은 정제 후 구조 결정을 통하여 생성 경로가 밝혀 지게 될 것이다. 앞으로 지표물질의 검출 허용 농도에 관한 검토가 이루어 져야 할 것이다.

#### - 설탕 지표 물질의 HPLC에 의한 분석

꿀의 DNPH유도체는 TLC로 간단하게 분리 동정 할 수 있으나 정량성에 한계가 있다. 꿀 중에 존재하는 설탕 지표 물질의 허용 범위를 설정하기 위하여 설탕 지표물질의 정량이 필요하므로 HPLC분석조건을 검토하였다.

분석에 사용한 HPLC는 YL-9100 (영린기기)이며 Column은 TC-C18 column (250 mm X 4.6 mm i.d., particle size 5 µm, Agilent, USA), 이동상으로는 Water : Methanol(30 : 70), 유속 0.8 ml/min, Column Temperature 25 °C로 하였으며 검출은 352 nm에서 하였다.

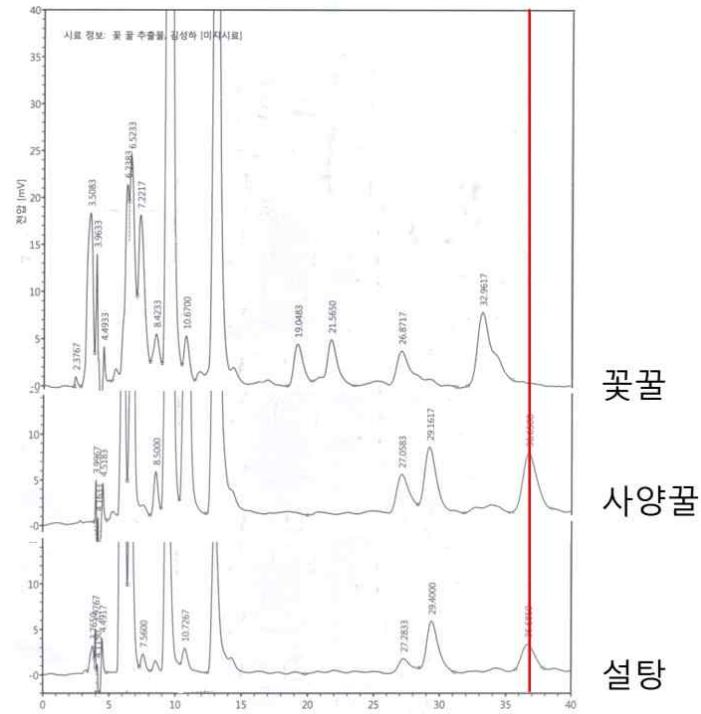
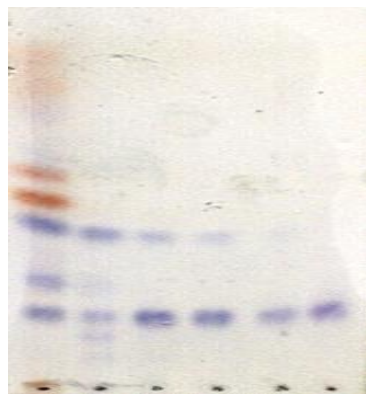


그림 17. 꿀의 DNPH유도체의 HPLC chromatogram

그림 17에서 보듯이 꿀의 HPLC 분석 결과 설탕물과 사양 꿀에서는 36min 대에 peak가 있는 반면 꽃 꿀에서는 나타나지 않음을 확인하였습니다. 36분대의 peak를 모아 TLC로 분석한 결과 설탕 지표 물질과 일치하여 HPLC 로 정량 분석이 가능함을 입증하였다.



S 33 34 35 36 37

그림 18. HPLC fraction의 TLC에 의한 확인

S: Sucrose, 33~37: 용출 시간(분)

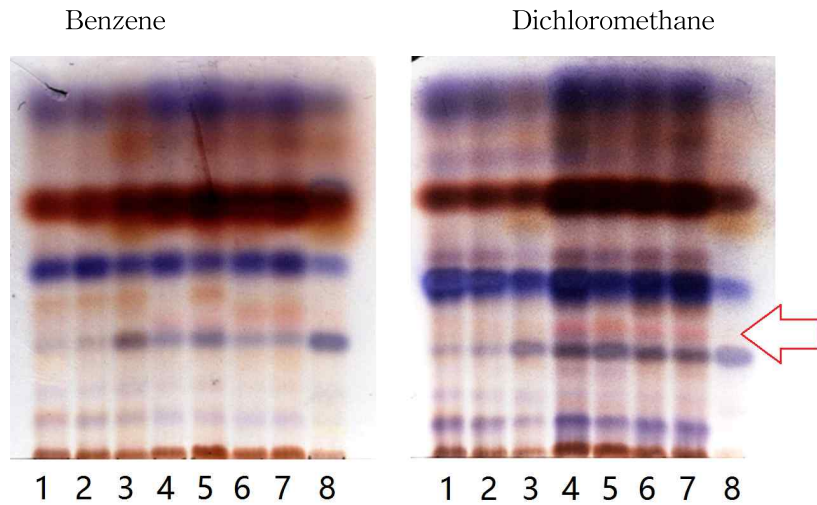
그림 18은 HPLC Column을 통해 elution된 33분 ~ 37분 사이의 fraction을 농축하여 TLC로 확인한 결과이다. 설탕의 지표 물질과 일치하는 것을 알 수 있다.

**- 인조 꿀 특이 성분의 검출**

인조 꿀은 꽃꿀이나 사탕 꿀과는 달리 꿀벌 기원의 invertase에 의한 설탕의 가수 분해로 이루어지는 전화당이다. 따라서 인조 꿀에서는 벌꿀 기원의 단백질을 검출 할 수 없으며 총 단백질 양도 매우 적은 편이다. 인조꿀의 제조에 사용되는 invertase는 효모기원의 효소가 사용되는 것으로 알려져 있으나 기원을 명확하게 알 수는 없다.

인조 꿀의 생성 과정은 통상적인 벌꿀과 다르므로 그 조성도 다를 것으로 판단이 된다. 따라서 특이한 DNPH 유도체의 존재 유무를 검토하였다.

실험 방법에서 제시된 대로 DNPH 유도체를 조제하여 TLC로 확인하였다. 시료의 DNPH 유도체 조제 후 benzene과 dichloromethane으로 각각 partition하여 추출한 유도체는 인조꿀에서만 나타나는 붉은 spot를 확인 할 수 있었으며 dichloromethane으로 추출 한 경우 그림 19에서 나타낸 화살표 부분의 특이 성분이 benzene의 경우보다 효율적으로 검출됨을 알 수 있다. 추후 더 많은 시료를 대상으로 확인 할 필요가 있다.



**그림 19. 인조꿀 특이 성분의 확인**

1: 잡화꿀-1, 2: 잡화꿀-2, 3: 아카시아꿀, 4: 인조꿀-1, 5: 인조꿀-2, 6: 인조 꿀-3, 7: 인조꿀-4, 8: 설탕

**- 설탕 급여 꿀의 조제**

양평군 농업기술센터에서 사탕수수 기원 설탕 및 사탕무 기원 설탕을 토봉 및 양봉에 각각 급여하며 설탕급여 꿀, 설탕급여 꽃꿀 혼합꿀, 꽃꿀 등으로 각각 제조하였다.



**그림 20. 사탕무 기원 설탕**





그림 21. 채밀 중인 벌통

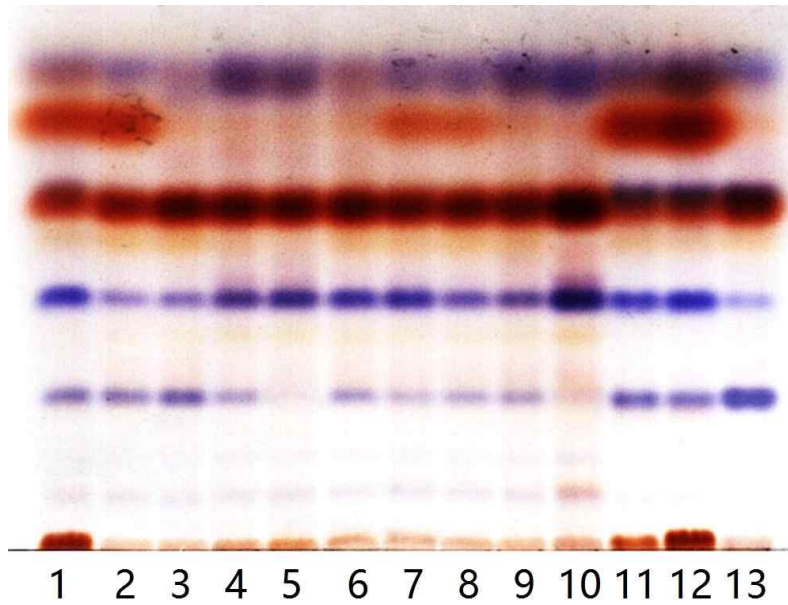


그림 22. 2015년 양봉·토봉 조제물의 설탕 지표 물질 분석

1: 양봉 사탕수수 설탕, 2: 양봉 사탕무 설탕, 3: 양봉 아카시아 꽃꿀, 4: 양봉 잡화 1차, 5: 양봉 잡화 2차, 6: 양봉 사탕수수 설탕 혼합, 7: 양봉 사탕무 설탕 혼합, 8: 토봉 사탕수수 설탕 혼합, 9: 토봉 사탕무 설탕 혼합, 10: 토봉 꽃꿀, 11: 토봉 사탕수수 설탕, 12: 토봉 사탕무 설탕, 13: 사탕무 설탕(표1의 시료 번호와 동일)



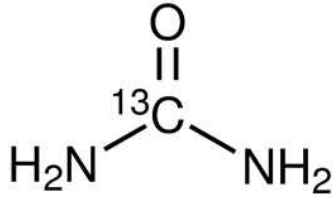


그림 23.  $\delta^{13}\text{C}$  측정용 표준물질

표 1. 2015년 양봉·토봉 조제꿀의 탄소비

급여 구분	번호	밀원	$\delta^{13}\text{C}(‰)$		수분	당도
			1차	2차		
양봉 순수 설탕 급여	1	양봉 사탕수수	-12.81	-12.82	36.0	62.5
	2	양봉 사탕무	-25.35	-25.42	34.7	63.8
양봉 꽃꿀 균	3	양봉 아카시아	-24.69	-24.71	17.5	81.1
	4	양봉 1차 잡화	-24.41	-24.44	16.9	81.6
	5	양봉 2차 잡화	-24.02	-24.26	16.1	82.5
양봉 혼합 급여 균	6	양봉 사탕수수 혼합	-22.98	-22.87	18.2	80.3
	7	양봉 사탕무 혼합	-24.58	-24.81	18.3	80.2
토봉 혼합 급여 균	8	토봉 사탕수수 혼합	-19.40	-19.36	23.3	75.4
	9	토봉 사탕무 혼합	-25.27	-25.31	21.1	77.4
토봉 꽃꿀 균	10	토봉 꽃꿀	-24.17	-24.26	14.8	83.7
토봉 순수 설탕 급여 균	11	토봉 사탕수수	-19.52	-19.50	31.1	67.3
	12	토봉 사탕무	-25.67	-25.89	27.8	70.4

그림 22는 계획적으로 조제한 토봉 및 양봉의 사양꿀 및 꽃꿀의 설탕 지표물질을 분석한 결과를 보여주고 있다. 그림에서 보듯이 lane 5의 양봉 잡화 2차, lane 10의 토봉 꽃꿀 이외의 시료에서는 모두 설탕 지표 물질이 검출되고 있다. 특히 lane 3과 4의 양봉 아카시아 및 양봉 잡화 1차의 경우 사료로 제공된 설탕이 남아 있어 설탕 지표 물질이 검출되고 있다. lane 5의 양봉 잡화 2차의 경우 기존의 사료에 기인한 꿀을 모두 제거 한 뒤 채밀하였으므로 설탕 지표물질이 검출되지 않고 있다.

Lane 10의 토봉 꽃꿀과 lane 11, 12의 설탕 사양군의 경우를 보면 본 연구에서 제시하고 있는 설탕 지표물질의 검출 여부를 확연히 판정할 수 있다. 즉 lane 5의 양봉 꽃꿀, lane 10의 토봉 꽃꿀의 경우 설탕지표물질이 검출 되지 않으나 나머지 설탕 급여 꿀의 경우 설탕 지표물질이 검출되므로 설탕 급여 여부를 판단할 수 있는 지표물질로서의 타당성을 갖는 것으로 판단 할 수 있다. 추후 설탕 지표 물질의 구조 결정을 통하여 생성 기원을 추구하므로서 지표물질 사용의 타당성이 부여 될 수 있을 것으로 판단한다.

표 1은 계획적으로 조제한 토봉 및 양봉의 사양꿀 및 꽃꿀의 탄소 동위원소비를 분석한 결과를 보여주고 있다. 탄소 동위원소비 측정을 위한 표준물질로는 Euro Vector사의 분자량 61.05g/mol,  $\delta^{13}\text{C}(-42.07\text{‰})$ 의 Urea- $^{13}\text{C}$ 를 사용하여 2회 반복 측정하였다. 사탕 수수 기원의 설탕을 급여한 1번과 11번의 경우  $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ 가 각각 -12.81과 -19.52, 사탕무 기원의 설탕을 급여한 2와 12의 경우  $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ 가 각각 -25.35와 -25.67로 나타나고 있다. 사탕무 기원의 설탕과 꽃꿀을 혼합 급여한 7과 9 시료의 경우 탄소 동위 원소비에는 전혀 이상을 감지 할 수 없으나 그림 22의 lane 7, 9에서는 설탕 지표물질이 검출되고 있다. 따라서 사탕무 기원의 설탕을 급여한 경우 탄소 동위원소비로 설탕의 혼입여부를 판단하는 것은 불가하다는 것을 나타내 주고 있다.

### 3) 제 1협동 과제

#### 가. 벌꿀 감별을 위한 신속 검사 카드리지 설계 및 시약 개발

- 고점도 시료 처리 및 면역반응 유도를 위한 채취도구 확정
  - 고점도 시료 처리를 위해 아래 그림1과 같은 채취도구를 이용하여 벌꿀 판별 키트를 개발할 예정입니다.

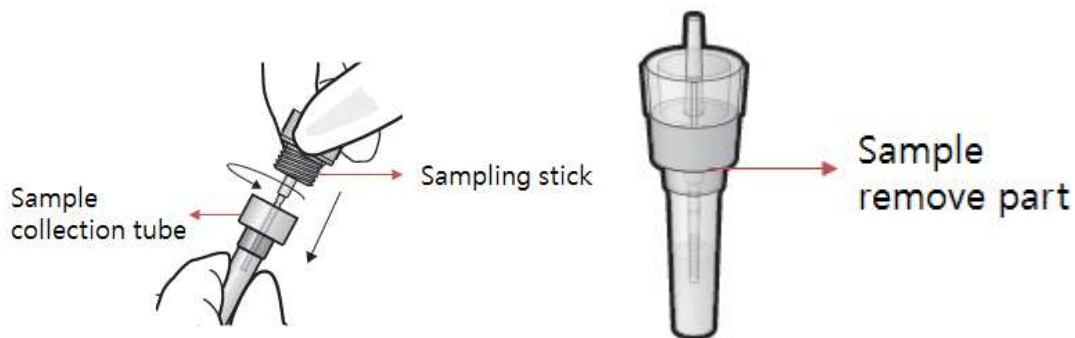


그림1. 고점도 시료 채취도구

- 시료 채취도구는 sampling stick을 통해 시료인 고점도 벌꿀을 찍어 묻히고 이를 sample collection tube에 넣어 detection Ab와 1차적으로 항원항체 반응을 유도시킨다.
- 그림1의 오른쪽 그림에서 sample remove part가 있는데 있는 일정량의 고점도 시료가 collection tube에 들어가도록 하여 시료량에 영향을 받지 않고 정확한 결과를 획득 할 수 있다.

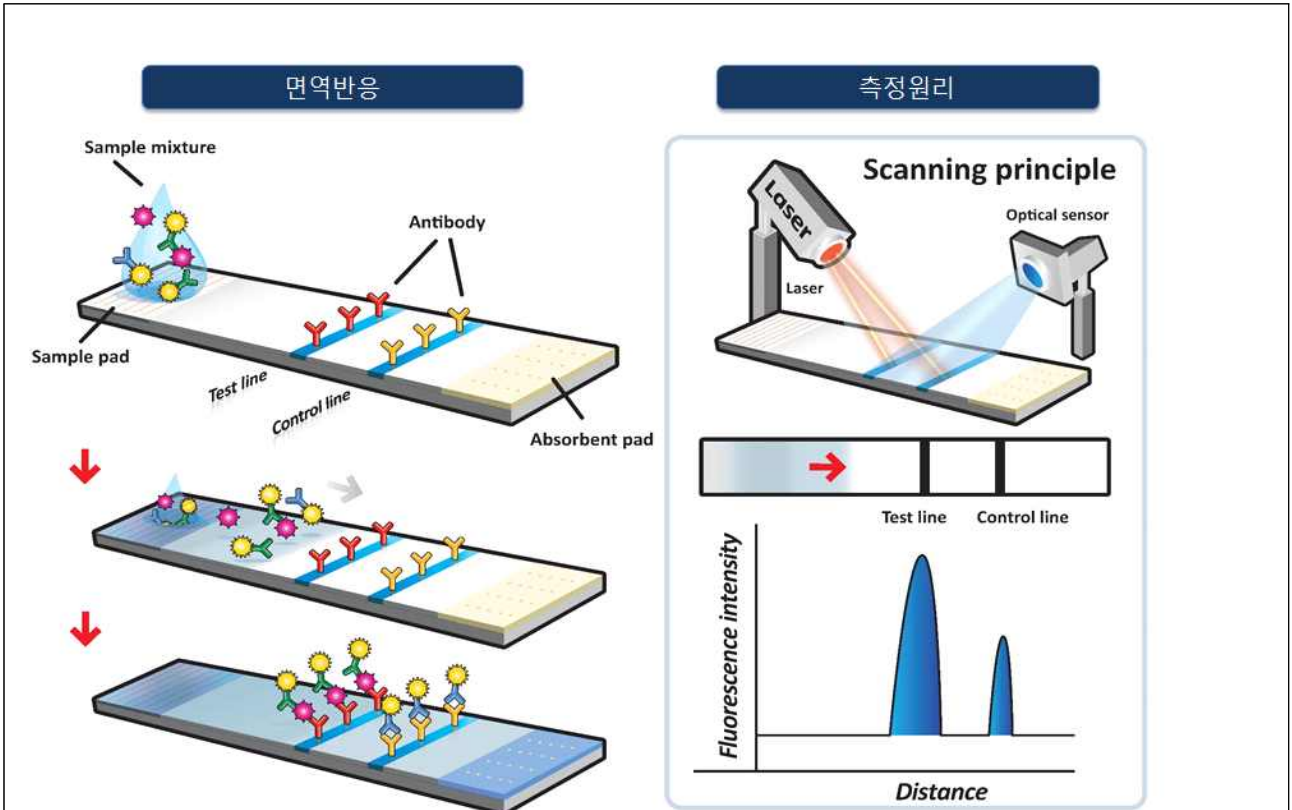


그림2. 제 1협동기관 카트리지에 적용될 면역반응 및 측정원리

- 제1협동기관에서는 제1세부기관에서 개발한 항체 및 항체pair를 통해 그림2의 면역반응에서와 같이 capture 및 detection Ab로 사용하여 면역반응이 최적화된 카트리지를 개발할 예정이다.
- 그림 2의 측정원리는 벌꿀 타입에 따른 항원이 카트리지에 있는 capture 항체와 형광이 conjugation 되어 있는 detection 항체와의 면역반응 통해 벌꿀 타입의 항원 양에 따라 형광 세기를 측정하여 정량화되는 시스템이다.



그림3. 면역반응을 통한 정량화

- 개발된 카트리지를 측정기기를 통해 측정결과를 정량화 하여 벌꿀 타입을 결정할 예정이다.

● 표준시료의 구축 및 검증

- 토종꿀과 양봉꿀 2가지 시료 타입을 통해 제 1세부기관에서 제공받은 cell을 통해 시료 희석별 ELISA 결과값을 확인하였다. 2가지 시료를 원액부터 희석하여 평가를 진행하였고, 희석별로 감도가 감소하는 것을 확인하였으나, 선별된 항체가 아닌 cell 배양액을 통해 측정된 결과로 감도가 다소 낮게 측정이 되었으며, 희석구간별 차이가 크게 나지 않는 것으로 확인하였다. 추후 선별된 항체를 통해 표준시료 농도를 재확인하여 구축할 예정이다.

Ag	토종꿀	양봉꿀
원액	0.83	1.32
1/2	0.70	1.14
1/5	0.58	1.01
1/10	0.43	0.73
1/20	0.29	0.52
1/50	0.22	0.35
1/100	0.27	0.33
Ag-negative	0.10	0.12
Detector-negative	0.08	0.05
2ndHRP-negative	0.04	0.04

● sample pad별 시료처리 능력 검토 및 선정

- 제 1협동기관에서 보유중인 주요 sample pad 별로 고점도 시료 처리 능력을 확인하였다. 희석 buffer 150ul에 고점도 시료를 1/2부터 1/100이 되도록 희석하여 flow 여부를 확인하였으며, 기존 희석 buffer는 육안으로 확인이 어려워 색소를 추가하여 카트리리지상에서의 flow를 확인하였다.
- 3개의 sample pad를 확인한 결과, sample pad 별로 flow 양상이 다소 차이는 있으나, 1/10 또는 1/20 이상으로 희석하였을 경우 고점도 시료라도 lateral flow가 되는 것을 확인하였다.

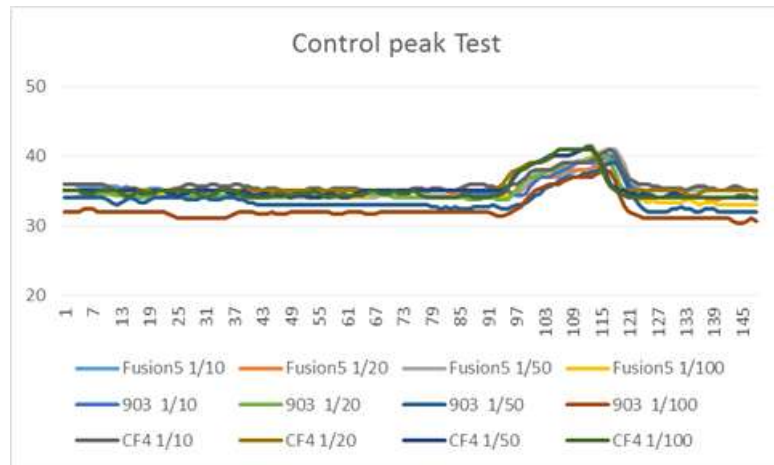


● 고점도 시료의 처리방법, 시약 최적화

- 희석버퍼를 이용한 고점도 시료 처리방법으로 확정하였으며, sample pad별로 control line의 면

적값을 회석비율별로 확인하였다. sample pad 별로 control line의 면적값의 차이는 있으나 1/20 또는 1/50 정도에서 반응이 완료되는 것으로 확인되었다. 그러나 회석이 많이 할수록 flow 속도는 빨라지나, 항원의 양이 상대적으로 적어져 test 면적값이 적어질 것으로 예상되어 1/20의 회석배율에서 높은 control 면적값을 보인 903과 CF4 sample pad를 적용하여 추후 별 꿀 타입별로 면역반응을 확인할 예정이다.

- 아직 항체쌍이 선별이 되지 않았기에 시약 조성 최적화는 추후에 진행할 예정이다.



Sample pad	Fusion 5				903				CF4			
꿀회석비율	1/10	1/20	1/50	1/100	1/10	1/20	1/50	1/100	1/10	1/20	1/50	1/100
C area	66	61.67	86.50	89.67	73.83	92.50	92	98.33	64.67	92.50	89.83	114

● 시료별 검사조건 확립

- 제 1세부기관으로 제공받은 토종 및 양봉꿀을 회석하여 flow 및 control 면적값을 확인한 결과 두 시료에서 큰 차이는 나타나지 않았다. 추가적으로 벌꿀 시료를 받아 추가 진행을 할 예정이나 위에서 진행된 고점도 시료 처리 방법 및 회석배율로 추가 평가를 진행할 예정이다.

4) 제 2협동 과제

가. Betaine의 분포 분석 및 벌꿀의 판별을 위한 PCR 법 개발

● HPLC를 이용한 betaine 분석 방법의 선정

- 사탕무 설탕에 미량 함유된 betaine을 측정하기 위하여 이온교환수지를 사용하는 SPE 방법으로 betaine을 추출하였다. 추출물의 betaine을 분석하는 방법으로서 3 종류의 방법을 시도하였다. 첫 번째 방법으로서 Luna 5u NH2 column과 RI detector를 사용하는 HPLC 분석 방법을 시도하였으나 검출 민감도가 낮고 HPLC에 의해 betaine peak가 분리되지 않았다. 두 번째 방법으로서 추출물을 4-bromophenyl triflate로 유도반응하고 Luna 5u SCN column과 UV detector로 HPLC 분석하는 방법을 시도하였으나 유도반응이 일어나지 않았다. 세 번째 방법으로서 추출물을 4-bromobenzyl bromide로 유도반응하고 Luna 5u SCN column과 UV detector로 HPLC 분석하는 방법을 시도하여 betaine을 아래와 같이 분석할 수 있었다 (표 1).

표 1. 벌꿀과 사탕무 설탕의 betaine 분석

시료 종류	조사시료 수	검출 시료 수	Betaine 함량 (mg/kg)
사탕무 설탕	2	2	32.3, 42.2
아카시아꿀	6	6	3.9, 5.3, 4.5, 2.6, 7.6, 4.3
밤꿀	3	1	11.1
잡화꿀	3	1	6.8
헛개꿀	2	0	
옷꿀	2	0	
사탕수수설탕 사양꿀	1	0	
합계	19	9	

- 아카시아꿀, 밤꿀, 잡화꿀, 사탕무 설탕, 사탕무 전화당, 사탕무 설탕 첨가 인조꿀의 betaine 분석.

- 표 1에서 사탕무 설탕 두 시료 모두 betaine이 검출되고 각각 32.3mg/kg과 42.2mg/kg이었으며 아카시아꿀은 6 시료 모두 검출되었으며 함량이 2.6-7.6mg/kg이었다. 밤꿀과 잡화꿀은 각각 3시료 중 1시료가 검출되었으며 함량은 각각 11.1mg/kg과 6.8mg/kg 이었다.

- SPE와 TLC를 이용한 betaine 간이검사 방법의 개발

- 이온교환수지를 이용한 SPE 방법으로 추출한 밤꿀추출물과 betaine 첨가 밤꿀추출물을 TLC를 이용하여 분석하였다 (그림 1). betaine 첨가 밤꿀에서 표준 betaine과 동일한 위치에서 검출되었다.



A B C

그림 1. 밤꿀과 betaine 첨가 밤꿀의 TLC 분석

A: betaine, B: 밤꿀, C: 0.25% betaine 첨가 밤꿀

- 벌꿀의 PCR 반응을 위한 DNA 추출 방법의 비교 선발

- PCR 반응에서 사용한 동양벌 특이 primer와 서양벌 특이 primer의 토종꿀과 잡화꿀의 판별 능력을 검사하였다 (그림 2). 그림 2에서 동양벌 특이 primer를 사용한 PCR 에서 168bp의 DNA가 토종꿀(그림 2, A, E)에서만 합성되었으며 서양벌 특이 primer를 사용한 PCR에서는 205bp의 DNA가 잡화꿀(그림 2, D, F)에서만 합성되었다. 본 연구에서 디자인 primer가 각각 토종꿀과 잡화꿀을 분별하여 DNA를 합성할 수 있음을 알 수 있었다.

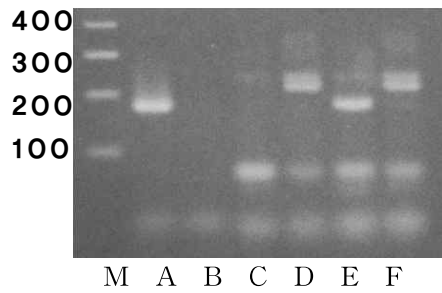


그림 2. PCR를 이용한 토종꿀과 잡화꿀의 판별

A, C, E: 토종꿀 DNA, B, D, F: 잡화꿀 DNA, A, B: 동양벌 특이 primer 첨가 PCR 반응, C, D: 서양벌 특이 primer 첨가 PCR 반응, E, F: 동양벌 특이 primer + 서양벌 특이 primer 첨가한 multiplex PCR 반응, M: 100bp DNA marker

- 벌꿀로부터 DNA를 추출하는 방법으로서 Wizard 방법(Promega), Accuprep 방법(Bioneer), Chelex 방법 (Bio-Rad)의 민감도를 비교하였다 (그림 3). Chelex 방법, Accuprep 방법, Wizard 방법의 순으로 PCR에서 DNA가 많이 합성되었다.

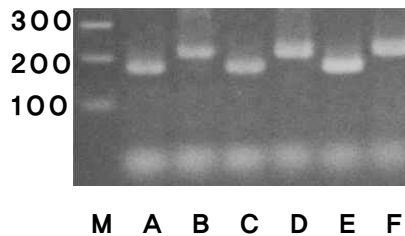


그림 3. DNA 추출 방법이 PCR에 의한 토종꿀과 잡화꿀의 판별에 미치는 효과

A, B: Wizard 방법 (Promega), C, D: Accuprep 방법 (Bioneer), E, F: Chelex 방법 (Bio-Rad), A, C, E: 토종꿀 DNA, B, D, F: 잡화꿀 DNA.

- PCR에 사용하기 위한 반응액으로서 Bioneer에서 판매하는 PCR premix제품들의 민감도를 비교하였다 (그림 4). Gold multiplex PCR premix, Multiplex PCR premix, PCR premix, Hot-Start PCR premix의 순으로 PCR에서 DNA가 많이 합성되었다.

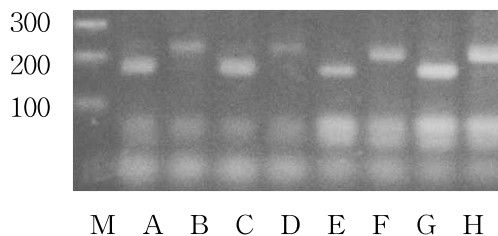


그림 4. PCR premix (Bioneer)가 PCR에 의한 토종꿀과 잡화꿀의 판별에 미치는 효과

A, B: PCR premix, C, D: Hot-start PCR premix, E, F: Multiplex PCR premix, G, H: Gold multiplex PCR premix, A, C, E, G: 토종꿀 추출 DNA, B, D, F, H: 잡화꿀 추출 DNA



(2) 2차년도(2015년)

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차년도	<p><b>제1세부과제</b> : 단클론 항체를 이용한 ELISA 분석법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 토종 및 양봉 꿀 주요 단백질에 대한 단클론 항체 제작</li> <li>● 단클론 항체 정제 및 특성 분석</li> <li>● 단클론 항체를 이용한 ELISA 분석법 개발</li> <li>● 제조된 사양꿀 및 수집된 인조, 양봉, 토종꿀의 성분분석</li> <li>● 벌꿀 가공품의 국내시장 조사 및 분석</li> </ul>
	<p><b>제2세부과제</b> : 사양 꿀 및 인조 꿀(가짜 꿀) 특이 성분의 분리 정제 및 구조 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 사양 꿀 특이 성분의 분리 및 정제</li> <li>● 사양 꿀 특이 성분의 구조 결정</li> <li>● 인조 꿀(가짜 꿀) 특이성분 분석법 개발</li> <li>● 기관별 탄소동위원소비 측정</li> <li>● 탄소동위원소비 측정 결과의 보정법 개발</li> </ul>
	<p><b>제1협동과제</b> : 벌꿀 감별을 위한 단클론항체 적용 및 기초평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 벌꿀형태별 단클론항체 고정화 및 형광 conjugation 최적화</li> <li>● 벌꿀형태별 측정 조건 및 반응 최적화</li> <li>● 동시검사를 위한 3-line 적용 및 시료별 interference 평가</li> </ul>
	<p><b>제2협동과제</b> : 벌꿀 당의 정밀분석 방법 및 벌꿀 판별을 위한 PCR 법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● SPE와 GC를 이용한 raffinose와 theandrose의 분석</li> <li>● 아카시아꿀, 밤꿀, 잡화꿀, 사탕수수설탕, 사탕무설탕, 전화당 내 raffinose와 theandrose의 분석</li> <li>● 벌꿀의 PCR 반응 조건의 결정 (primer 염기 서열 및 농도, 반응 온도 등)</li> </ul>



## 1) 제 1세부 과제

### 가. 항체 생산 하이브리도마 제작과정

- 토종꿀과 양봉꿀을 각각 투석막을 이용해 투석하고 원심분리(10000rpm, 10분)를 해 화분을 제거하고 상등액 만을 다음 과정에 사용하였다. 투석하고 원심분리를 해 얻은 상등액은 동결건조를 해 농축하여 얻은 시료를 항체 제작을 위한 항원으로 사용하였다.
- 단일클론 항체를 만들기 위해 각각의 mouse에 만든 시료 100ug과 complement freud's adjuvant를 1대 1로 잘 섞어 주입하였다. 2주 후에는 시료 100ug과 incomplement freud's adjuvant를 1대 1로 잘 섞어 주입하였다. 2주 간격으로 incomplement freud's adjuvant와 섞은 시료를 1회나 2회 더 주입한 다음 마지막 주입을 하고 일주일 후에 sacrifice하여 hybridoma 제작을 했다. Mouse의 spleen과 mouse기원의 myeloma(SP2/0)를 융합하여 꿀을 항원으로 하는 항체부순 후 거즈를 이용하여 15ml tube에 걸러 담아 원심분리(1500rpm, 5분, 25도)한다. 이때 myeloma도 같이 원심분리했다. 원심분리를 한 뒤 상등액을 제거하고 tapping을 해 RPMI medium 10ml을 넣은 다음 cell counting을 해 50ml tube에 myeloma와 splenocyte의 비율이 1 : 5~10이 되도록 섞어 총 합이 20ml이 되도록 했다. 다시 원심분리(1500rpm, 5분, 25도)를 했다. 상등액을 제거한 후 37°C에서 1분 동안 PEG 1ml을 넣어 주고 1분 동안 RPMI 2ml을, 2분 동안 RPMI 7ml을 넣어 주었다. 원심분리를 한 뒤 hybridoma를 넣고,

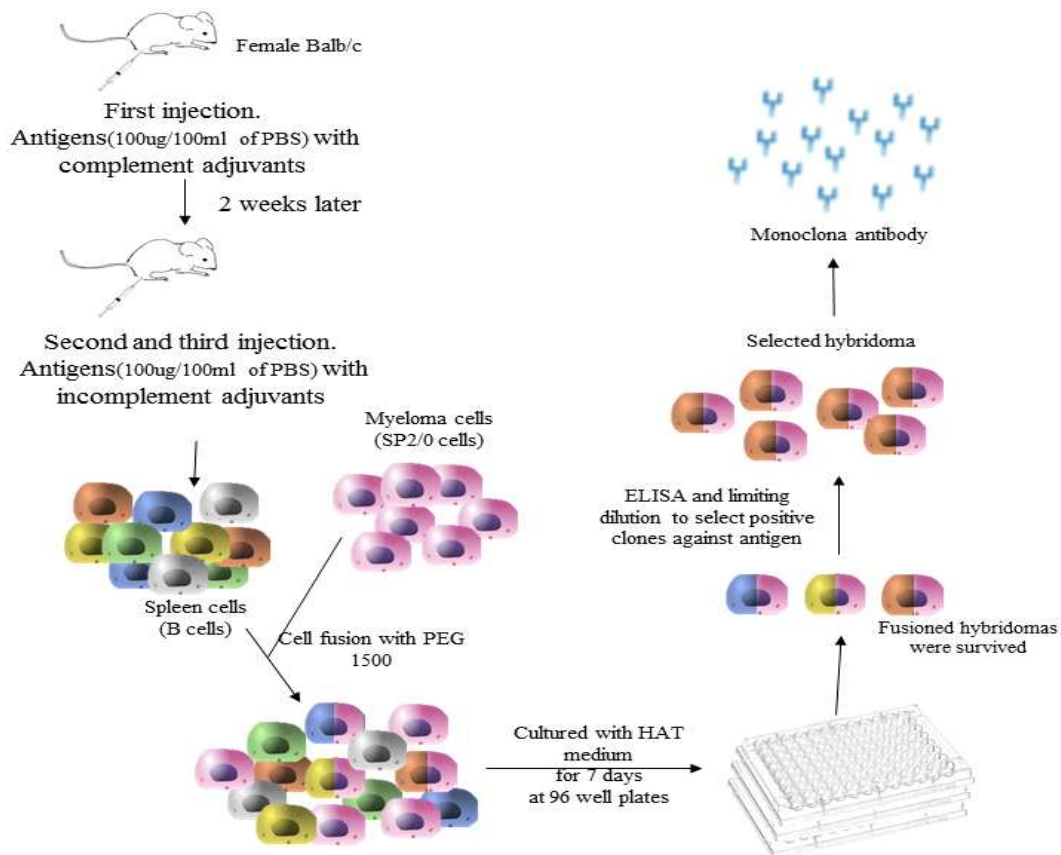


그림. 단일클론항체 제작 과정

hybridoma medium을 넣고 culture용 96well plate에 100ul/well씩 분주하고 24시간 후 HAT medium (x2)을 100ul/well씩 분주했다. 1주일에서 10일 정도 후 colony가 생기는지 확인하고 colony가 1~2개 정도만 뜬 well만을 선택해 피펫팅을 해서 mixing을 했다. 한 시간에서 두 시간 후 세포가 가라앉으면 상등액을 제거하고 HT medium(x100)을 100ul/well씩 분주한 후 다시 피펫팅을 해 새 96 well plate에 옮겼다.

- 선택된 하이브리도마들은 단일클론으로 만들기 위해 각 plate에 하나의 세포만 들어가도록 희석하여 배양했다. single colony가 생성된 것을 확인한 후 ELISA를 통해 항체 생산능력을 검증했다.

**나. 토종꿀과 양봉꿀 공통인식 항체를 생산 하이브리도마 개발 과정**

- 만들어진 hybridoma의 96well plate에서의 screening 중 토종 단백질과 양봉 단백질 모두를 인식하는 항체를 생성하는 hybridoma가 7개가 선택되었다. 선택된 hybridoma는 세포의 양을 늘이면서 96well에서 24well로, 24well 에서 60mm dish로, 60mm dish에서 100mm dish로 옮기는데 옮길 때 마다 ELISA를 이용해 항체 생성 여부를 검증하였다. 항체 생성이 검증된 hybridoma 중에 H13과 같이 토종과 양봉 모두를 인식하는 항체를 생산하는 hybridoma를 선택하였으며, 선택된 7개의 hybridoma 중에 3개는 96 well plate에서 24 well plate로 옮기면서 다시 하는 ELISA에서는 발색을 하지 않았다. 이것으로 보아 96well plate에서 screening을 할 때에 근처의 토종과 양봉 모두를 인식하는 항체가 된 것으로 생각된다.

토종 항원(3ug/well)						양봉 항원(3ug/well)					
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H1	H2	H3	H4	H5	H6
H7	H8	H9	H10	H11	H12	H7	H8	H9	H10	H11	H12
<b>H13</b>	H14	H15	H16	H17	H18	<b>H13</b>	H14	H15	H16	H17	H18
H19	H20	H21	H22	H23	H24	H19	H20	H21	H22	H23	H24
H25	H26	H27	H28	H29	H30	H25	H26	H27	H28	H29	H30
H31	H32	<b>H33</b>	H34	H35	H36	H31	H32	<b>H33</b>	H34	H35	H36
H37	H38	H39	H40	H41	H42	H37	H38	H39	H40	H41	H42
H43	H44	H45	H46	H47	con	H43	H44	H45	H46	H47	con

**그림. 토종꿀과 양봉꿀 공통인식 항체 생산 하이브리도마 선발 1**

H1~H47은 생성된 hybridoma의 배양액을 1차 항체로 사용하고 con은 꿀 단백질을 주입한 mouse의 혈청을 1차 항체로 사용하였다. H13과 같이 토종 항원과 양봉 항원을 모두 인식하는 항체를 생성하는 hybridoma를 선별했다.

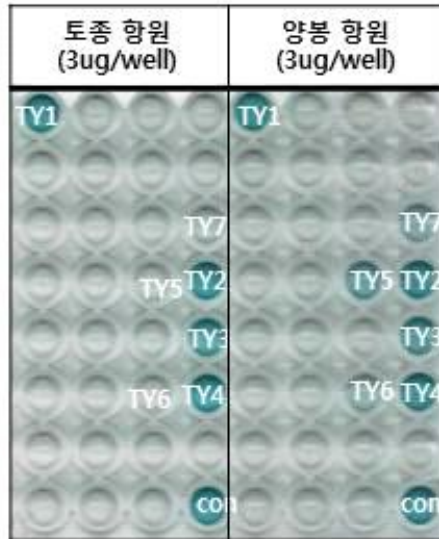


그림. 토종꿀과 양봉꿀 공통인식 항체 생산 하이브리도마 선발 2

투석한 토종과 양봉 단백질을 항원으로 사용하였고 1차 항체로는 hybridoma 배지를 사용했으며 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG HRP를 사용했다. 총 7개의 TY 가 나왔지만 3개(TY5, TY6, TY7)는 옆이나 근처 well에서 튀어 발색된 것으로 판단됨.

- 단클론으로 만들기 위해 96well plate의 각 well에 하나의 세포만 들어가도록 희석한 후 96well plate에 분주하였다. 계속 살펴보며 cell이 하나만 들어간 곳을 확인한 후 single colony가 되는 것을 확인하였다. Single colony가 만들어진 것을 확인 후 ELISA를 통해 항체 생산 능력을 검증하였다. 토종과 양봉을 모두 인식하는 항체가 확인된 single colony라면 세포의 양을 늘리고 stock하였다.
- 선발된 4개의 토종과 양봉을 모두 인식하는 항체를 생산하는 hybridoma들의 항체가 벌꿀단백질을 어떤 패턴으로 인식하는지 알아보기 위해 western blotting 방법을 이용하였다. 토종과 양봉을 모두 인식하는 항체를 생산하는 TY1, TY2, TY3, TY4은 ELISA와 일치하는 결과로 토종과 양봉 항원을 모두 인식해 두 항원에서 모두 밴드를 나타내었다.

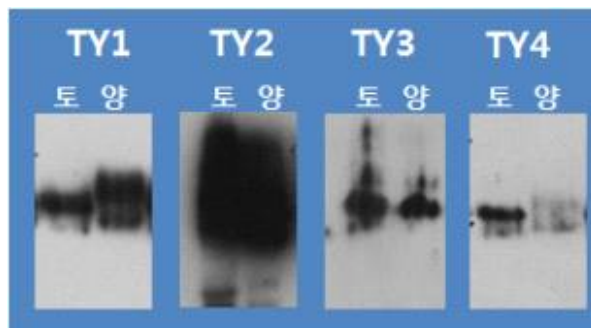


그림. 각 항체를 이용한 immuno-blotting 결과 : TY

- Single colonization을 통해 mono-clone이 된 hybridoma는 그들이 생산하는 항체의 Isotype을 확인하였다. 키트를 이용해 Isotype을 확인하였는데 TY1은 IgG1과 IgM을 중쇄로 가지고 있고 나머지 세 종류의 TY는 IgG1을 중쇄로 가지고 있다. 네 가지 모두 경쇄로는 kappa chain을 가지고 있음이 확인되었다.

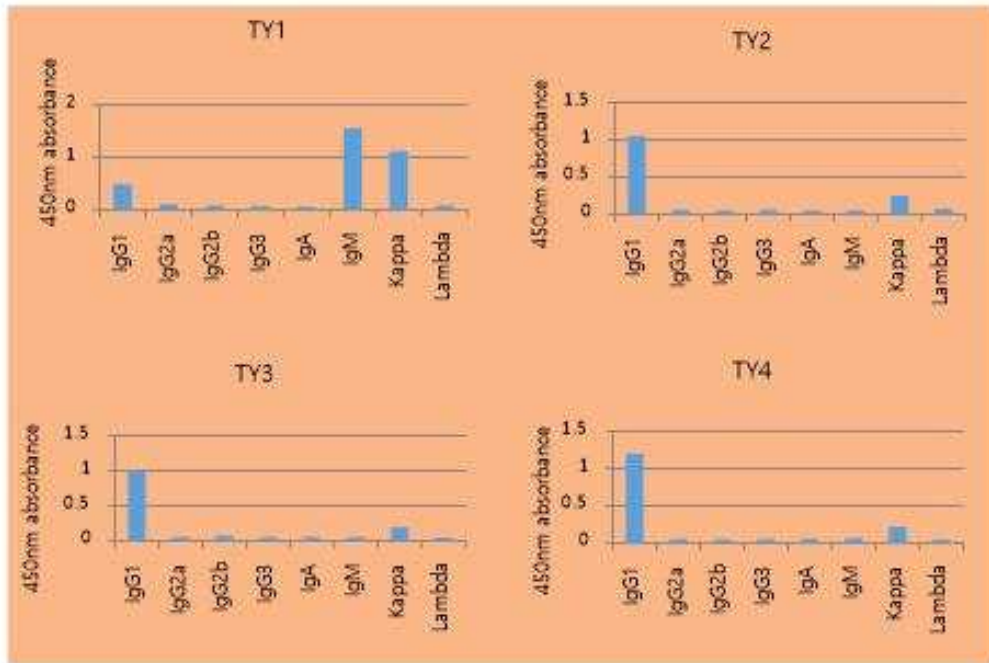


그림. 4종류 항체의 isotyping

TY1은 IgG1과 IgM을 중쇄로 가지고 있고 나머지는 IgG1을 중쇄로 가지고 있으며 네 종류의 TY는 모두 kappa chain을 경쇄로 가지고 있다.

- ELISA 결과와 western blot의 결과를 보았을 때 TY2의 항원에 대한 affinity가 가장 좋은 TY2를 Honey TY라 명명하였다.

#### 다. 토종꿀 특이적 인식 항체를 생산 하이브리도마 개발 과정

- 선택된 hybridoma는 세포의 양을 늘이면서 96well에서 24well로, 24well 에서 60mm dish로, 60mm dish에서 100mm dish로 옮기는데 옮길 때 마다 ELISA를 이용해 항체 생성 여부를 검증한다. 항체 생성이 검증된 hybridoma 중에 토종 항원만을 특이적으로 인식하는 항체를 생성하는 hybridoma가 5개가 발견되었고 이들은 양봉 항원을 인식하지 않는다. 5종류의 토종만을 인식하는 항체를 생산하는 hybridoma, T는 mono-clone으로 만들기 위해 single colonization을 했다. 각각의 hybridoma들의 세포가 96well plate의 well안에 하나의 세포만이 들어가도록 희석한 후 pate에 분주했다. 이 후 single colony가 만들어진 well의 상등액만을 ELISA 방법을 이용해 항체를 검증하고 H9나 H21 같이 토종만을 인식하는 항체를 생성하는 single colony를 선택해 세포의 양을 늘리고 stock 하였다.

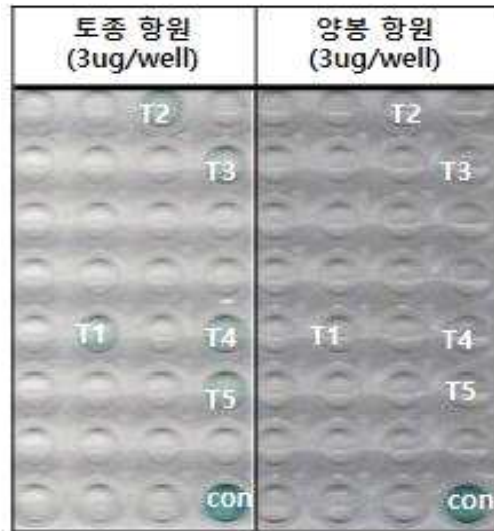


그림. 토종꿀을 특이적으로 인식하는 항체 생산 하이브리도마 선발

투석한 토종과 양봉 단백질을 항원으로 사용하였고 1차 항체로는 hybridoma 배지를 사용했으며 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG HRP를 사용했다. control로는 토종항원을 주입한 쥐와 양봉항원을 주입한 쥐의 혈청을 같은 양으로 섞은 것을 사용했다. T1 ~ T5는 토종꿀 단백질만을 항원으로 인식하고 양봉꿀 단백질은 항원으로 인식하지 않는 항체를 생산하는 것으로 확인되었다.

- 선택한 다섯 종류의 T가 생산하는 항체가 인식하는 단백질 패턴을 알아보기 위해 western blot 을 이용하였다. 다섯 개의 T 모두 ELISA의 결과와 마찬가지로 토종 항원만을 인식하여 토종 항원에서만 밴드가 나왔으며 양봉 항원에서는 아무것도 나오지 않았다.

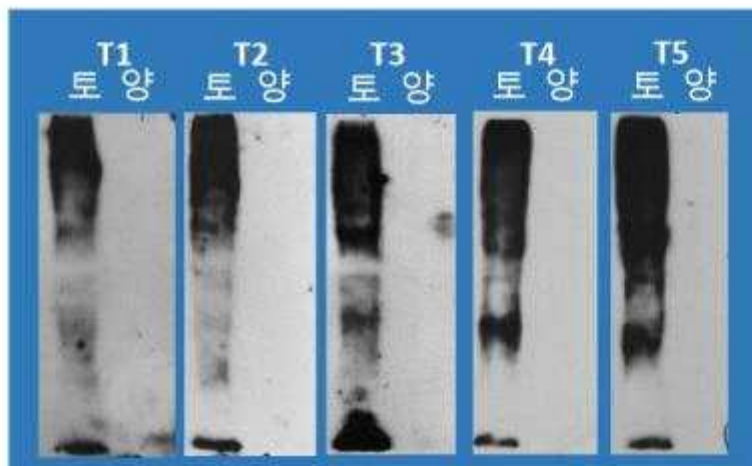


그림. 각 항체를 이용한 immuno-blotting 결과 : T

다섯 종류의 항체는 모두 토종 항원만을 인식하는 것을 확인하였다.



- Single colonization을 통해 mono-clone이 된 hybridoma는 그들이 생산하는 항체의 Isotype을 확인해야 한다. 키트를 이용해 Isotype을 확인하였는데 다섯 종류의 T 모두 IgG1을 중쇄로 가지고 있고 경쇄로는 kappa chain을 가지고 있음을 확인하였다.

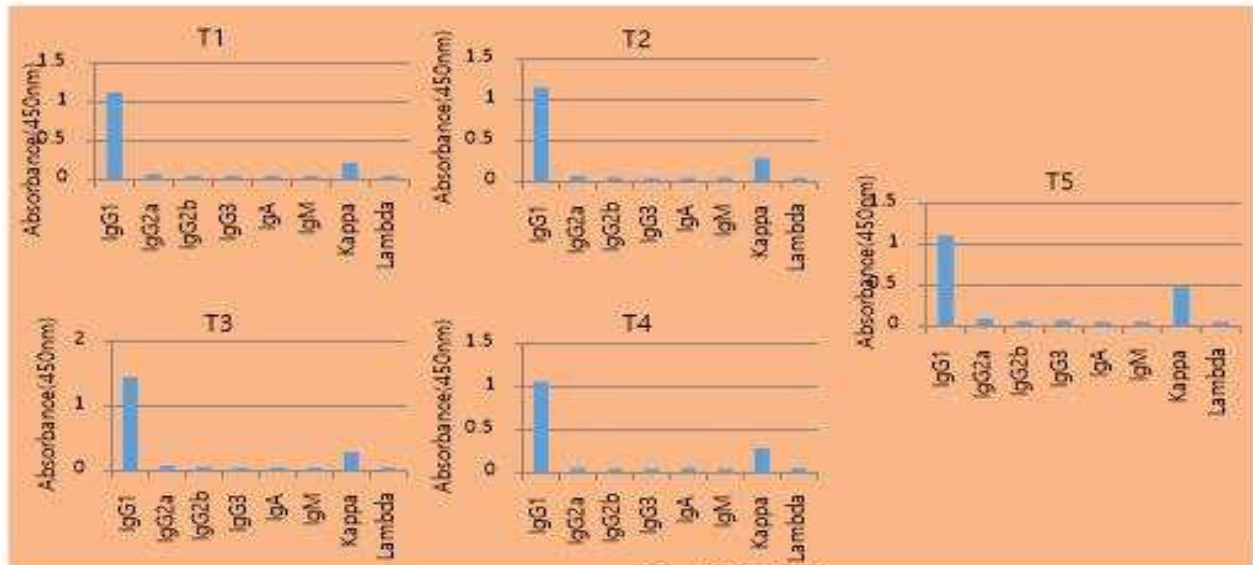


그림. 각 항체 중쇄와 경쇄의 isotype 결정: T

다섯 가지 모두 IgG1을 중쇄로 가지고 있고 kappa chain을 경쇄로 가지고 있다.

- ELISA 결과와 western blot의 결과를 보았을 때 T2의 항원에 대한 affinity가 가장 좋은 것 같아 T2를 Honey T라 하였다.

#### 라. 양봉꿀 특이적 인식 항체를 생산 하이브리도마 개발 과정

- 선택된 hybridoma는 세포의 양을 늘리면서 96well에서 24well로, 24well 에서 60mm dish로, 60mm dish에서 100mm dish로 옮기는데 옮길 때 마다 ELISA를 이용해 항체 생성 여부를 검증한다. 항체 생성이 검증된 hybridoma 중에 양봉 항원만을 특이적으로 인식하는 항체를 생성하는 hybridoma가 6개가 발견되었고 이들은 토종 항원을 인식하지 않는다. 6개 중 affinity가 낮은 Y3, Y6은 제외하고 나머지 4개를 mono-clone화 했다. 96well plate의 각 well에 세포가 하나씩 들어가도록 해 single colonization을 하고 제대로 single colony가 만들어진 것들을 ELISA를 이용하여 항체 생성 능력에 대한 검증을 진행하였다. H17이나 H23같이 토종 항원은 인식하지 않고 양봉 항원만을 특이적으로 인식하면서 single colony였던 hybridoma는 세포 양을 늘려서 stock 하였다.

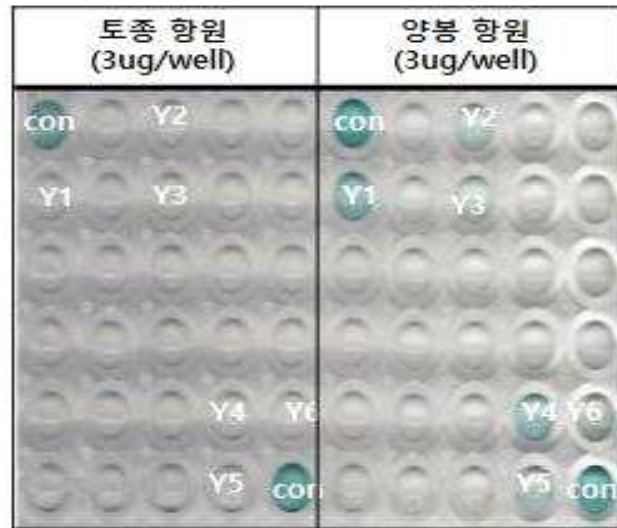


그림. 양봉꿀을 특이적으로 인식하는 항체 생산 하이브리도마 선발

투석한 토종과 양봉 단백질을 항원으로 사용하였고 1차 항체로는 hybridoma 배지를 사용했으며 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG HRP를 사용했다. control로는 토종항원을 주입한 쥐와 양봉항원을 주입한 쥐의 혈청을 같은 양으로 섞은 것을 사용했다. Y1 ~ Y6은 양봉 꿀 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 생산하는 hybridoma이다.

- 선발된 4개의 양봉만을 특이적으로 인식하는 항체를 생산하는 hybridoma들의 항체가 벌꿀단백질을 어떤 패턴으로 인식하는지 알아보기 위해 western blotting 방법을 이용하였다. 양봉만을 특이적으로 인식하는 항체를 생산하는 Y1, Y2, Y4, Y5은 ELISA와 일치하는 결과로 양봉 항원만을 인식해 양봉 항원에서만 밴드를 나타내었다.

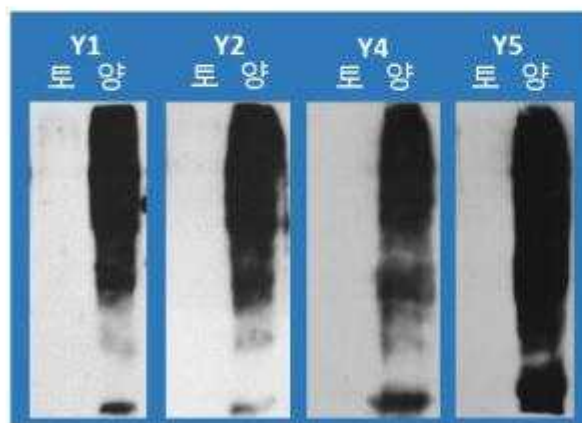


그림. 각 항체를 이용한 immuno-blotting 결과 : Y

네 종류의 Y항체는 모두 양봉꿀 항원만을 인식하여 밴드가 양봉 항원 쪽에만 나타났다.

- Single colonization을 통해 mono-clone이 된 hybridoma는 그들이 생산하는 항체의 Isotype을 확인해야 한다. 키트를 이용해 Isotype을 확인하였는데 네 종류의 Y 모두 IgG1을 중쇄로 가지고 있고 경쇄로는 kappa chain을 가지고 있다.

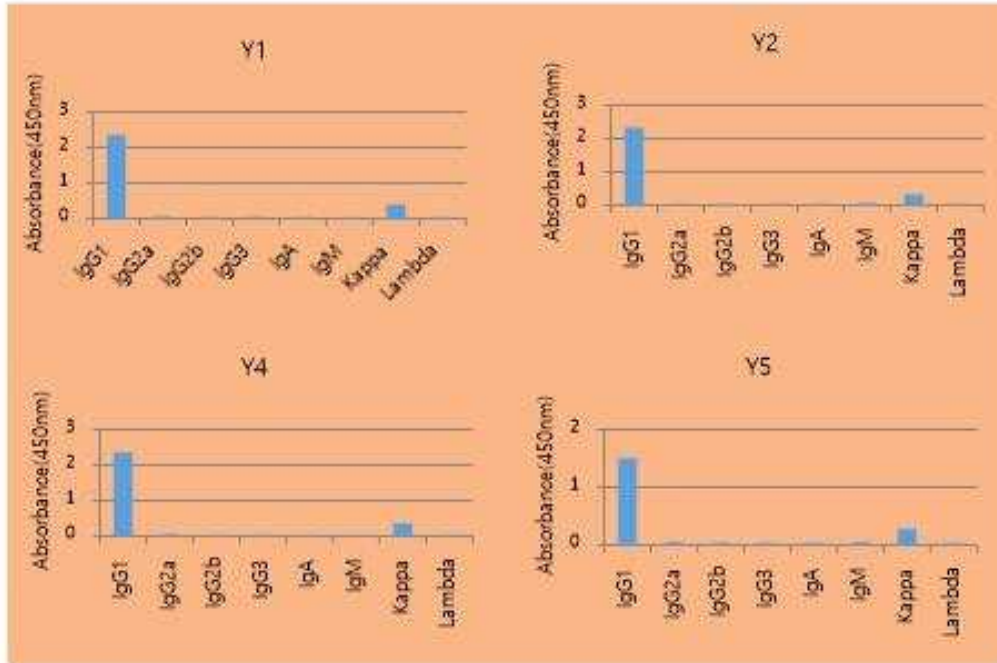


그림. 각 항체 중쇄와 경쇄의 isotype 결정: Y

네 종류의 Y 모두 IgG1을 중쇄로 가지고 있고 kappa chain을 경쇄로 가지고 있다.

- ELISA 결과와 western blot의 결과를 보았을 때 Y4의 항원에 대한 affinity가 가장 좋은 것 판단되어 Y4를 Honey Y라 명명하였다.

#### 마. 선발된 항체의 항원 검출한계 검증

- 선택된 hybridoma는 ELISA를 이용하여 항원 인식 한계를 보았다. 토종과 양봉 꿀의 단백질을 모두 인식하는 항체를 생산하는 hybridoma 중 항원에 대한 affinity가 가장 높았던 Honey TY, T, Y 항체를 PBS-T에 10배부터 5배씩 희석해 1차 항체로 사용하고 투석한 토종꿀, 양봉 꿀 단백질을 일정하게 3ug씩 항원으로 코팅했을 때 항체의 희석배수에 따라 색이 연해지는 것을 볼 수 있었다. 항체 TY의 경우, 10배부터 6250배까지는 별 다른 차이를 보이지 않다가 그 이후부터 색이 점차 연해지는 것을 볼 수 있었다. Honey TY는 토종과 양봉 모두를 인식하는 항체답게 토종과 양봉 항원 모두에서 항체 희석 배수에 따라 색이 연해졌다. 150625배까지는 발색된 것이 육안으로 관찰 가능하지만 그 이후의 희석 배수에서는 육안으로 관찰이 불가능하다.
- 토종꿀 단백질을 특이적으로 인식하는 Honey T를 10배부터 25배, 50배, 2배씩 희석해서 25600배 까지 1차 항체로 사용하고 투석한 토종꿀, 양봉 꿀 단백질을 일정하게 3ug씩 항원으로 코팅했을 때 항체의 희석배수에 따라 토종 항원만이 색이 연해지는 것을 볼 수 있었다. Honey



T는 토종만을 특이적으로 인식하는 항체답게 토종 항원에서만 항체 희석 배수에 따라 색이 연해졌다. 800배까지는 발색된 것이 육안으로 관찰 가능하지만 그 이후의 희석 배수에서는 육안으로 관찰이 불가능하였다.

- 양봉 꿀 단백질만을 특이적으로 인식하는 Honey Y를 10배부터 25배, 50배, 2배씩 희석해서 25600배까지 1차 항체로 사용하고 투석한 토종꿀, 양봉 꿀 단백질을 일정하게 3ug씩 항원으로 코팅했을 때 항체의 희석배수에 따라 양봉 꿀 항원만이 색이 연해지는 것을 볼 수 있었다. 10배부터 400배까지는 별 다른 차이를 보이지 않다가 그 이후부터 색이 점차 연해지는 것을 볼 수 있었다. Honey Y는 양봉 꿀만을 특이적으로 인식하는 항체답게 양봉 항원에서만 항체 희석 배수에 따라 색이 연해졌다. 3200배까지는 발색된 것이 육안으로 관찰 가능하지만 그 이후의 희석 배수에서는 육안으로 관찰이 불가능하였다.

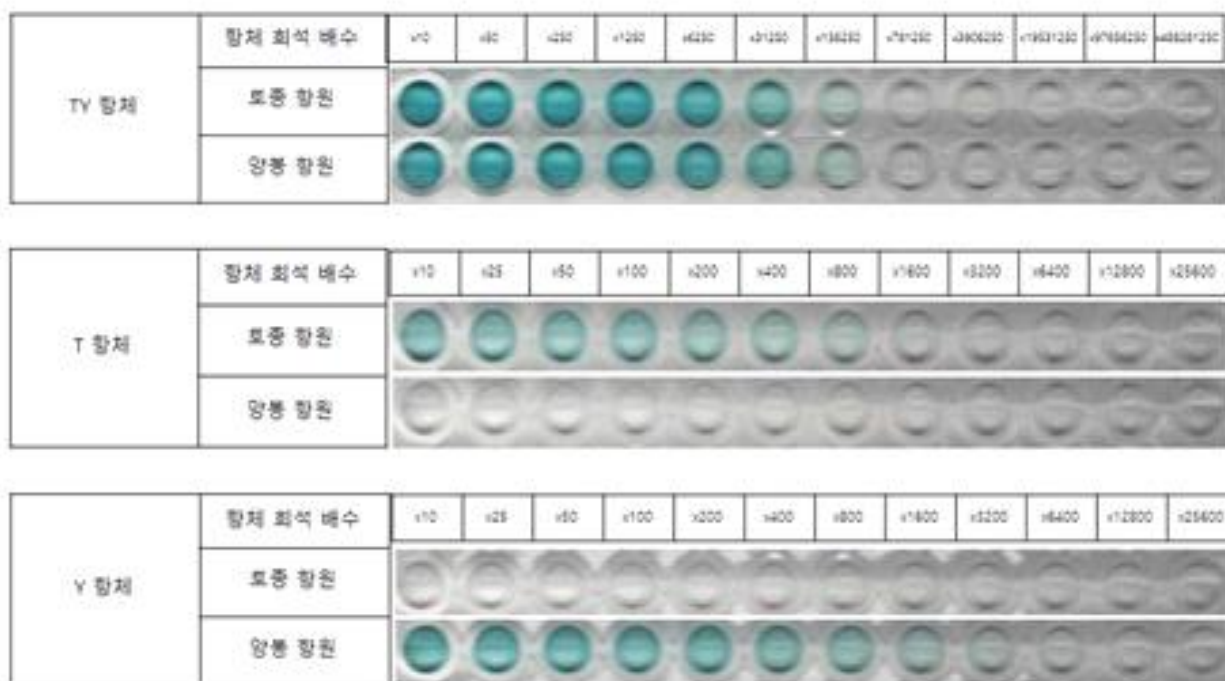


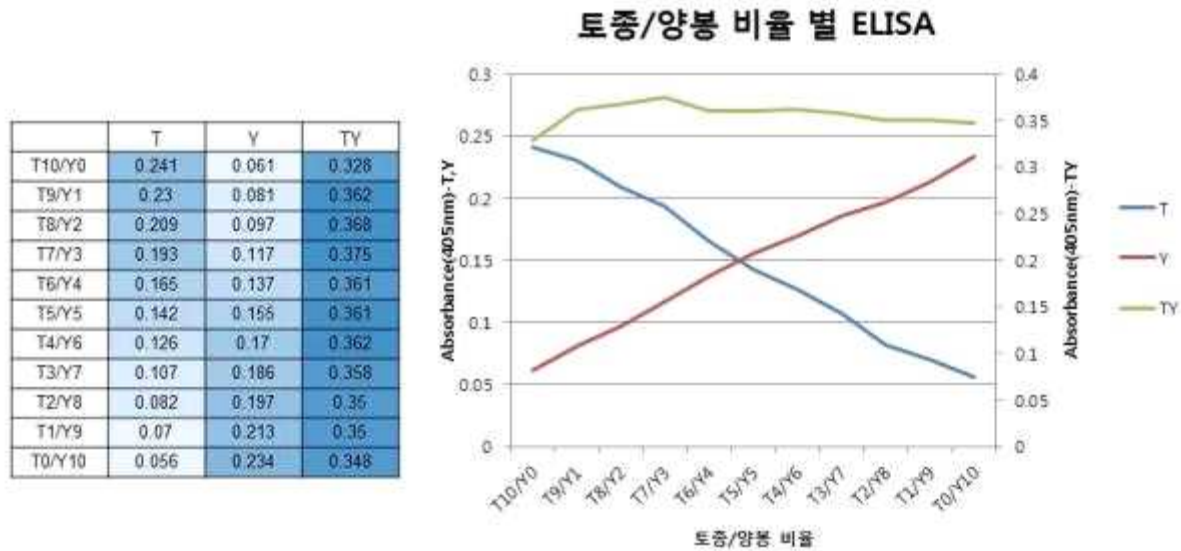
그림. 선발된 항체를 이용한 항원 인식 한계 검증: ELISA

투석한 토종꿀, 양봉 꿀 단백질 3ug을 항원으로 일정하게 코팅했을 때 토종 항원에서만 Honey T 항체의 희석배수에 따라 일정하게 색이 연해지는 것을 볼 수 있다

**바. 선발된 항체를 이용한 토종꿀과 양봉꿀을 혼합한 시료에 대한 반응 검증**

- 토종꿀과 양봉 꿀의 혼합 비율에 따라 Honey TY, Honey T, Honey Y의 항체들이 어떻게 인식을 하는 지에 대해 알아보기 위해서 ELISA와 western blot을 이용했다. ELISA의 경우 토종꿀과 양봉 꿀을 일정한 비율대로 섞어 carbonate coating buffer에 희석한 후 코팅 하고 1차 항체로는 Honey TY, Honey T, Honey Y의 항체를 사용하고 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG HRP를 사용했다. 1차 항체로 Honey TY를 사용했을 때, 토종꿀의 비율이나 양봉 꿀의 비율에 상관없이 거의 일정한 흡광도를 보여주었다. 토종꿀만을 특이적으로 인식하는 Honey T의 항체

는 토종꿀의 비율에 따라 흡광도가 변하는 것을 볼 수 있었다. 양봉 꿀의 비율과는 상관없이 토종꿀의 비율이 줄어들면 흡광도도 비례하여 낮아지는 것이 선형적으로 보였다. 양봉 꿀만을 특이적으로 인식하는 Honey Y의 항체도 양봉 꿀의 비율에 비례한 흡광도를 볼 수 있었고 토종꿀의 비율과는 상관없이 양봉 꿀의 비율이 증가함에 따른 흡광도의 선형적인 증가 그래프를 볼 수 있었다.



**그림. 토종꿀과 양봉꿀 혼합 정도에 따른 항체의 항원 인식 검증: ELISA**

토종꿀과 양봉 꿀을 혼합하여 항원으로 코팅하고 세 항체를 이용해 분석해 보았다.

Honey TY 항체의 경우, 토종꿀과 양봉의 비율과 상관없이 거의 일정한 정도의 흡광도를 보여주고 Honey T 항체의 경우에는 토종꿀의 비율이 줄어드는 것에 따라 흡광도가 선형적으로 줄어드는 것이 보인다. Honey Y 항체는 양봉 꿀의 비율이 증가하는 것에 따라 흡광도도 비례하여 증가하는 것이 보인다.

- Western blot의 경우도 ELISA와 마찬가지로 토종꿀과 양봉 꿀을 비율대로 섞어 항원으로 사용하고 1차 항체로 Honey TY, Honey T, Honey Y의 항체를 사용하고 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG HRP를 사용했다. 1차 항체로 Honey TY를 사용했을 때, ELISA의 결과와 마찬가지로 토종꿀의 비율이나 양봉 꿀의 비율에 상관없이 거의 일정한 밴드를 보여주었으며, 1차 항체로 Honey T의 항체를 사용했을 때는 양봉 꿀의 비율에 관계없이 토종꿀의 비율이 줄어들에 따라 밴드의 크기가 작아지고 연해지는 것을 볼 수 있었다. 1차 항체로 Honey Y의 항체를 사용했을 때도 ELISA와 같은 결과가 나왔는데 토종꿀의 비율에 상관없이 양봉 꿀의 비율이 증가하면 밴드의 크기가 커지고 색이 진해지는 것을 볼 수 있었다.

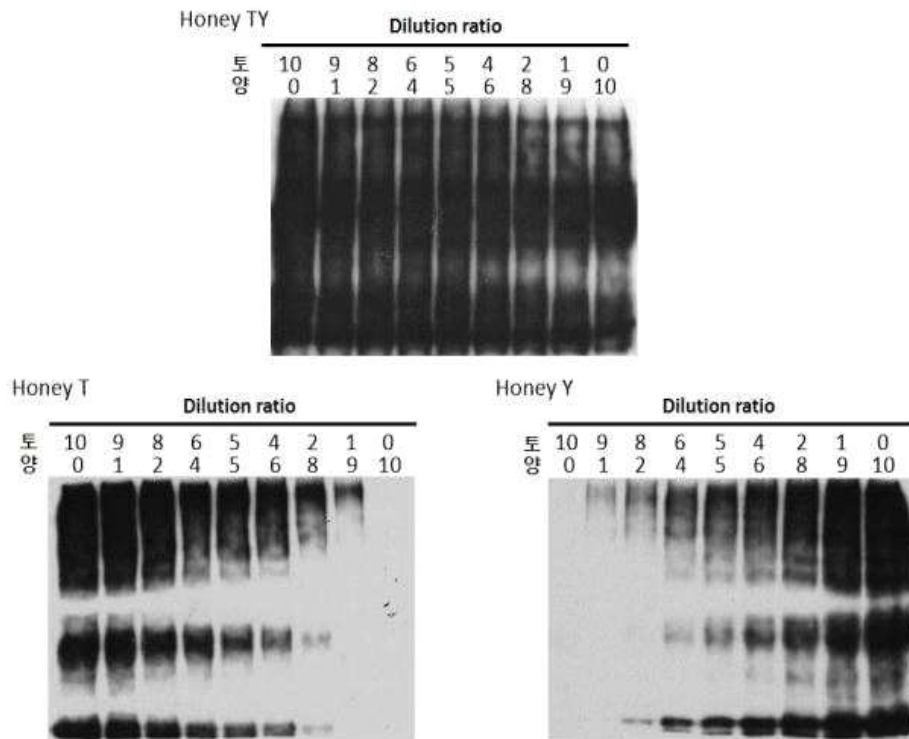


그림. 선발된 항체를 이용한 항원 인식 한계 검증: Immuno-blotting

토종꿀과 양봉을 혼합한 꿀을 western blot을 이용해 분석했다. Honey TY 항체의 경우 토종꿀과 양봉의 비율에 의존하지 않고 거의 비슷한 수준의 밴드를 보이고 Honey T 항체는 토종꿀의 비율이 적어질수록 밴드의 크기가 작아지고 색이 연해지며 Honey Y 항체는 양봉의 비율이 많아질수록 밴드가 진해지고 크기가 커지는 것을 보여주고 있다.

#### 사. ELISA 키트 개발

- ELISA kit는 plate 바닥에 capturing Ab를 세운 후 항원을 붙이고 항원을 인식하는 또 다른 항체를 detection Ab로 사용하였다. 그 후 detection Ab를 인식하는 HRP-linked Ab를 붙이고 HRP의 기질을 넣어 발색시켜 흡광도를 측정하였다.
- Capturing Ab를 세우는 여러 가지 방법이 있지만 황산과 과산화수소를 2:1의 비율로 섞어 37°C에서 10분 반응하여 plate표면에 -OH기(hydroxyl group)을 만든 후 APTES를 이용해 -NH<sub>2</sub>(amino group)이 표면에 나오도록 하고 capturing Ab 중쇄의 -COOH(carboxyl group)가 -NH<sub>2</sub>(amino group)와 crosslinking 하도록 coupling agent EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)를 사용하여 항체가 플레이트 표면에 설 수 있게 했다. capturing Ab와 EDC의 반응 부피비는 100:1이며 37°C에서 15분 동안 미리 반응시킨 뒤 1% APTES와 동량 섞어서 plate에 넣고 37°C에서 30분 동안 반응시켰다.
- 꿀을 항원으로 사용하기 때문에 토종과 양봉 꿀을 모두 인식할 수 있는 Honey TY의 항체를 capturing Ab로 사용하고 detecting Ab로는 Honey T와 Honey Y를 사용하였다. 토종 항원과 양봉 항원의 희석배수와 Honey TY의 항체인 capturing Ab의 농도를 고정하고 detecting Ab인 Honey T와 Honey Y 항체의 희석배수를 다르게 했다. 두 항체를 사용한 ELISA에서 모두 항체

의 희석배수에 따라 Honey T의 경우 토종 항원에서, Honey Y의 경우 양봉 항원에서 희석배수에 반비례하는 흡광도를 보였다. 이를 바탕으로 Honey T와 Honey Y의 희석배수를 1000배로 고정한 뒤 항원을 희석배수별로 다르게 하여 실험하였을 때 동일하게 Honey T는 토종항원만을 인식하고 Honey Y는 양봉항원만을 인식하며 흡광도는 항원의양에 비례하였다.

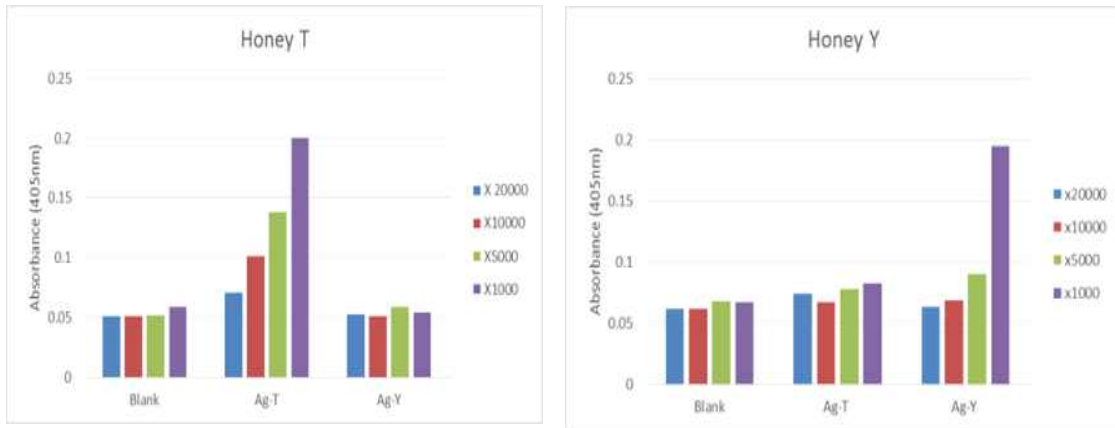


그림. 검출항체인 Honey T와 Honey Y 항체 희석배수에 따른 흡광도

Capturing Ab로는 토종과 양봉을 모두 인식하는 Honey TY 항체를 사용하고 항원으로는 토종과 양봉꿀을 사용하였다. Detection Ab로 토종항원만을 인식하는 Honey T와 양봉항원만을 인식하는 Honey Y 항체를 1000배,5000배,10000배,20000배 희석하여 사용했다. Honey T 항체를 사용했을 때 양봉항원은 인식하지 않고 토종항원만을 인식하며 희석배수가 증가함에 따라 일정하게 값이 감소하는 것을 볼 수 있다. Honey Y 항체의 경우도 희석배수에 따라 흡광도가 감소하는 것을 볼 수 있다. Ag-T는 토종 항원이고 Ag-Y는 양봉 항원이다.

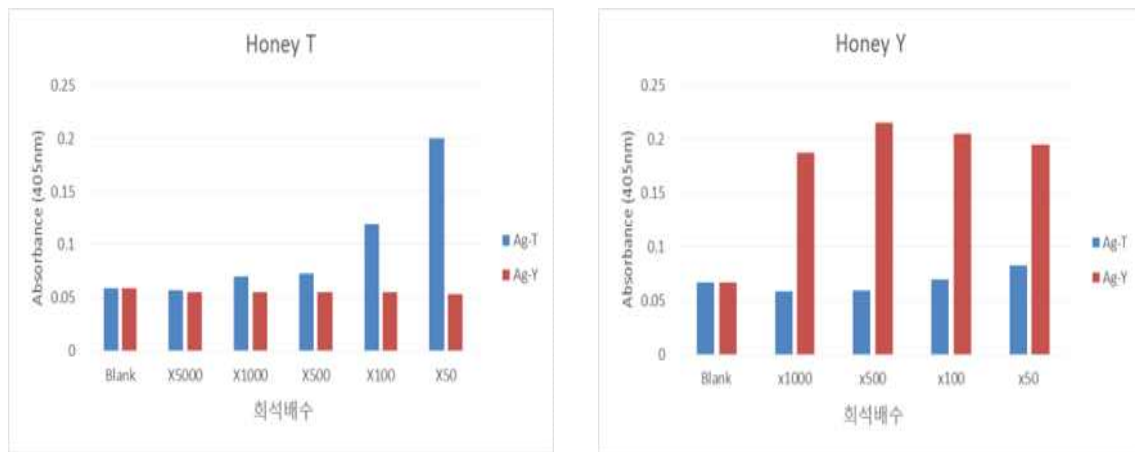


그림. 항원 희석배수에 따른 흡광도

Capturing Ab로는 토종과 양봉을 모두 항원으로 인식하는 Honey TY항체를 이용하고 항원으로 토종꿀 (Ag-T)과 양봉꿀(Ag-Y)를 다양하게 희석하여 사용하였다. Detection Ab로는 토종항원만 인식하는 Honey T와 양봉항원만을 인식하는 Honey Y를 각각 1000배 희석하여 사용하였다. Honey T 항체를 사용하였을 때 토종꿀만을 항원으로 인식하며 항원의 양이 증가할수록 흡광도 또한

증가하였다. Honey Y 항체를 사용하였을 때 양봉꿀 만을 항원으로 인식하며 Honey T 항체에 비해 전체적으로 높은 흡광도를 보여 더 낮은 희석 배수로의 조건 검토가 요구된다.

- kit를 제작한다는 것은 그 plate를 바로 바로 사용한다는 것이 아니기 때문에 보존이 가능해야 한다. 따라서 ELISA kit의 보존 기간에 따른 항체의 affinity도 실험해 보았다. Honey TY의 항체를 capturing Ab로 사용하고 detecting Ab로는 Honey T와 Honey Y를 1000배 희석하여 사용하였다. Capturing Ab를 plate에 반응시키고 1% BSA로 blocking 시킨 뒤 PBS로 워시 한 후 당일, 5일 후, 10일 후, 15일 후에 각각 ELISA를 해 보았다. Honey T를 detecting Ab로 사용한 경우, 당일과 5일 후, 10일 후까지는 토종 항원만을 인식하고 양봉 항원을 인식하지 않는데 15일 후의 경우 토종과 양봉 모두를 인식하지 못하는 것 같다. Honey Y를 detecting Ab로 사용하는 경우, 당일, 5일 후, 10일 후에 한 ELISA에서보다는 흡광도가 낮지만 15일 후에 한 ELISA에서도 양봉 항원만을 인식하였다.

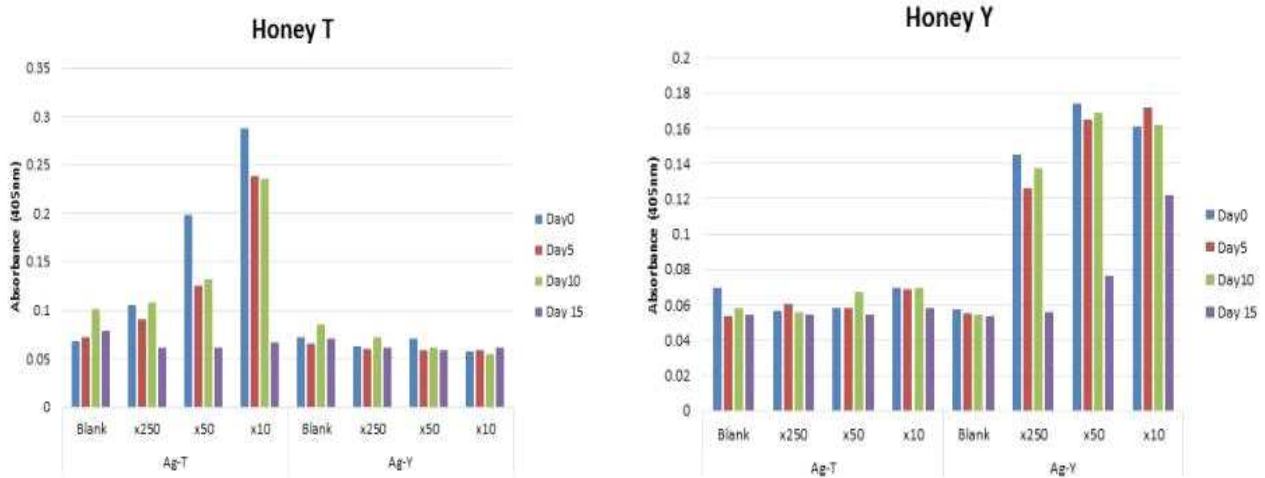


그림. ELISA 키트 보관기간에 따른 항체의 안정성 검토

Capturing Ab로는 Honey TY의 항체를 사용하고 detecting Ab로는 Honey T, Honey Y의 항체를 사용했다. 토종 항원(Ag-T)과 양봉 항원(Ag-Y)을 사용했다. Honey T의 항체를 사용했을 때 10일까지는 affinity가 유지되지만 15일 이후로는 유지가 되지 않는다. Honey Y의 항체를 이용했을 때는 10일까지는 affinity가 줄어들지 않지만 15일 후에는 affinity가 줄어들지만 사라지는 않는 것을 확인하였다.

#### 아. 수집 벌꿀 목록 및 성분분석 결과

- 수집된 벌꿀 목록

샘플 번호	샘플 정보	기타
X-001	허니스티 사양벌꿀 (허니스티)	원산지: 국산
X-002	아카시아꿀 (꽃샘식품) A	원산지: 국산
X-003	해아띠 잡화꿀 (가보팜스)	원산지: 국산
X-004	해아띠 아카시아꿀 (가보팜스)	원산지: 국산

X-005	벌꿀아카시아 (오뚜기)	원산지: 국산
X-006	호주유칼리꿀 (CAPILANO)	원산지: 국산
X-007	Premium 잡화꿀 (꽃샘식품)	원산지: 국산
X-008	사양벌꿀 (동아양봉원)	원산지: 국산
X-009	치약산 잡화꿀 (신림농협)	원산지: 국산
X-010	타즈마니아 레더우드꿀 (허니스티)	원산지: 호주
X-011	들꽃꿀 벌꿀 (동아양봉원)	원산지: 국산
X-012	아카시아벌꿀 (동아양봉원)	원산지: 국산
X-013	아나에 꿀 (Sdad. Coop. Apicola de Espane)	원산지: 스페인
X-014	Finest 아카시아꿀 (꽃샘식품)	원산지: 국산
X-015	Premium 아카시아꿀 (꽃샘식품) A	원산지: 국산
X-016	Premium 아카시아꿀 (꽃샘식품) B	원산지: 국산
X-017	Premium L 아카시아꿀 (꽃샘식품)	원산지: 국산
X-018	아카시아꿀 (꽃샘식품) B	원산지: 국산
X-019	Premium L 잡화꿀 (꽃샘식품)	원산지: 국산
X-020	담터 사양벌꿀 (담터)	원산지: 국산
X-021	종근당건강 사양벌꿀 (종근당)	원산지: 국산
X-022	초록원 꿀유자 (초록원)	원산지: 국산
X-023	치약산 아카시아꿀 (신림농협)	원산지: 국산
X-024	동서벌꿀 아카시아꿀 (동서식품)	원산지: 국산
X-025	동서벌꿀 다화꿀 (동서식품)	원산지: 국산
X-026	동강마루 잡화꿀 (영월농협)	원산지: 국산
X-027	동강마루 아카시아꿀 (영월농협)	원산지: 국산
X-028	벌꿀마을 잡화꿀 (서남농협)	원산지: 국산
X-029	벌꿀마을 아카시아꿀 (서남농협)	원산지: 국산
X-030	맛고원 잡화꿀 (신림농협)	원산지: 국산
X-031	강원도 아카시아꿀 (순우리초)	원산지: 국산
X-032	강원도 잡화꿀 (순우리초)	원산지: 국산
X-033	가리왕산 아카시아꿀 (황해수, 최복녀)	원산지: 국산
X-034	가리왕산 잡화꿀	원산지: 국산
X-035	가리왕산 벌꿀	원산지: 국산
X-036	방산 아카시아꿀 (양구농협) A	원산지: 국산
X-037	방산 아카시아꿀 (양구농협) B	원산지: 국산
X-038	정선 아카시아꿀	원산지: 국산
X-039	정선 잡화꿀	원산지: 국산
X-040	아카시아청 (청림)	원산지: 국산
X-041	잡화청 (청림)	원산지: 국산
X-042	아카시아 벌꿀 (자연이 준 선물)	원산지: 국산
X-043	청밀잡화꿀(한국양봉농협)	원산지: 국산
X-044	청밀 아카시아꿀 (한국양봉농협) A	원산지: 국산
X-045	한국양봉생꿀 잡화꿀 (한국양봉농협)	원산지: 국산

X-046	광고양봉원 꿀 (광고양봉원)	원산지: 국산
X-047	금주산 잡화꿀 (영중농협)	원산지: 국산
X-048	금주산 아카시아꿀 (영중농협)	원산지: 국산
X-049	고려국산벌꿀 사양벌꿀 (고려인삼주식회사)	원산지: 국산
X-050	오갑산양봉농원 꿀 (오갑산양봉농원)	원산지: 국산
X-051	아카시아꿀	원산지: 국산
X-052	밤꿀	원산지: 국산
X-053	농협안심 야생꽃꿀 (북부농협)	원산지: 국산
X-054	농협안심 아카시아꿀 (북부농협)	원산지: 국산
X-055	맛고원 아카시아꿀 (신림농협)	원산지: 국산
X-056	맛고원 잡화꿀 (신림농협)	원산지: 국산
X-057	양봉 벌집꿀(청원기수양봉원)	원산지: 국산
X-058	아카시아꿀 (청원기수양봉원)	원산지: 국산
X-059	밤꿀 (청원기수양봉원)	원산지: 국산
X-060	사양꿀 (청원기수양봉원)	원산지: 국산
X-061	정선 벌꿀	원산지: 국산
X-062	아카시아꿀 (양구)	원산지: 국산
X-063	잡화꿀 (양구)	원산지: 국산
X-064	Honey Love 잡화꿀 (한국양봉농협)	원산지: 국산
X-065	칠백리 잡화꿀 (상주원예농협)	원산지: 국산
X-066	칠백리 아카시아꿀 (상주원예농협)	원산지: 국산
X-067	산속의 꿀 아카시아꿀 (보은농협)	원산지: 국산
X-068	산속의 꿀 잡화꿀 (보은농협)	원산지: 국산
X-069	청밀 아카시아꿀 (한국양봉농협) B	원산지: 국산
X-070	청밀 잡화꿀 (한국양봉농협) B	원산지: 국산
X-071	하성 야생화꿀 (거창북부농협)	원산지: 국산
X-072	윤상복 벌꿀가족 밤꿀 (에덴양봉원)	원산지: 국산
X-073	윤상복 벌꿀가족 잡화꿀 (에덴양봉원)	원산지: 국산
X-074	윤상복 벌꿀가족 아카시아꿀 (에덴양봉원)	원산지: 국산
X-075	아카시아꿀 (지푸락양봉원)	원산지: 국산
X-076	잡화꿀 (지푸락양봉원)	원산지: 국산
X-077	100% Natural pure honey (1st International Health Foods, HAVERST RAW. NY)	원산지: 미국
X-078	Pure RAW HONEY (Bee flower % Sun Honey co.)	원산지: 미국
X-079	Really Raw Honey (Really Raw honey baltimore, mary land 21224)	원산지: 미국
X-080	꿈속의 향연 아카시아꿀	원산지: 국산
X-081	꿈속의 향연 잡화꿀	원산지: 국산
X-082	양봉대회 꿀(tube)	원산지: 국산
X-083	양봉대회 꿀 high land	원산지: 국산
X-084	양봉대회 꿀 low land	원산지: 국산
X-085	아카시아꿀	원산지: 국산



X-086	잡꿀	원산지: 국산
X-087	아카시아꿀 (백담메아리 특산물 판매장)	원산지: 국산
X-088	피나무꿀 (백담메아리 특산물 판매장)	원산지: 국산
X-089	안데스산 목청 (인제 용대리)	원산지: 안데스산
X-090	층주팜	원산지: 국산
X-091	벌꿀 양양 아카시아꿀	원산지: 국산
X-092	벌꿀 양양 피나무 꿀	원산지: 국산
X-093	벌꿀 양양 잡화 꿀	원산지: 국산
X-094	벌꿀 Pure Honeny 아카시아 꿀	원산지: 국산
X-095	벌꿀 Pure Honeny 잡화 꿀	원산지: 국산
X-096	벌꿀 Pure Honeny 밤 꿀	원산지: 국산
X-097	벌꿀 Pure Honeny 아카시아 꿀	원산지: 국산
X-098	비무장지대 꿀 Bee&Bee my sweet friend (벚꽃꿀)	원산지: 국산
X-099	비무장지대 꿀 Bee&Bee my sweet friend (피나무꿀)	원산지: 국산
X-100	비무장지대 꿀 Bee&Bee my sweet friend (밤꿀)	원산지: 국산
X-101	비무장지대 꿀 Bee&Bee my sweet friend (야생화꿀)	원산지: 국산
X-102	비무장지대 꿀 Bee&Bee my sweet friend (아카시아꿀)	원산지: 국산
X-103	파주민통선 아카시아 꿀	원산지: 국산
X-104	파주민통선 잡화꿀	원산지: 국산
X-105	파주민통선 밤나무 꿀	원산지: 국산
X-106	양양벌꿀 잡화꿀	원산지: 국산
X-107	양양벌꿀 아카시아꿀	원산지: 국산
X-108	양양벌꿀 밤꿀 (구룡양봉영농조합법인)	원산지: 국산
X-109	양양혼합 (구룡양봉영농조합법인)	원산지: 국산
X-110	지리산 프리미엄 아카시아 꿀 (지리산 한봉 조합)	원산지: 국산
X-111	지리산 프리미엄 밤꿀 (지리산 한봉 조합)	원산지: 국산
X-112	비무장지대꿀 잡화꿀	원산지: 국산
X-113	비무장지대꿀 아카시아꿀	원산지: 국산
X-114	신동1 아카시아+밤(벌집)	원산지: 국산
X-115	신동2 아카시아+밤(벌집)	원산지: 국산
X-116	명품 벌꿀(칠곡 제일양봉산업)	원산지: 국산
X-117	신토불이 벌꿀(경산, 평사 휴게소)	원산지: 국산
X-118	군위벌꿀(양봉 영구회)	원산지: 국산
X-119	벌꿀 pure honey(제천)	원산지: 국산
X-120	토함산 꿀벌세상 잡화꿀	원산지: 국산
X-121	토함산 꿀벌세상 아카시아꿀	원산지: 국산
X-122	토함산 꿀벌세상 대추꿀	원산지: 국산
X-123	털보양봉원 아카시아꿀 (경북 경주)	원산지: 국산
X-124	털보양봉원 밤꿀 (경북 경주)	원산지: 국산
X-125	털보양봉원 대추꿀 (경북 경주)	원산지: 국산
X-126	털보양봉원 잡화꿀 (경북 경주)	원산지: 국산



X-127	신동3 무설탕 밤꿀	원산지: 국산
X-128	신동4 설탕(반봉개)	원산지: 국산
X-129	신동5 설탕(미봉개)	원산지: 국산
X-130	신동6 설탕(맨 밑부분)	원산지: 국산
X-131	Bulgaria sweet honey(BG QUALITY HONEY)	원산지: 불가리아
X-132	2016.05.28 아카시아+잡화(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-133	2016.06.17 밤+잡화(새소비)(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-134	2016.06.23 밤(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-135	2016.07.15 자연벌집꿀(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-136	2016.07.21 잡화(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-137	2016.08.10 잡화(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-138	2016. 유채꿀(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-139	오뚜기 벌꿀 아카시아 (강원도 영월)	원산지: 국산
X-140	오뚜기 벌꿀 잡화 (강원도 영월)	원산지: 국산
X-141	윤상복 벌꿀가족 대추나무꿀 (에덴양봉원)	원산지: 국산
X-142	방산 잡화꿀 (양구농협)	원산지: 국산
Y-001	지리산 마천 토종꿀 (마천농협)	원산지: 국산
Y-002	영월 북면 꿀 A	원산지: 국산
Y-003	영월 북면 꿀 B	원산지: 국산
Y-004	영월 북면 꿀 C	원산지: 국산
Y-005	정선 가리왕산 꿀	원산지: 국산
Y-006	제천 꿀	원산지: 국산
Y-007	가리왕산 토종꿀	원산지: 국산
Y-008	덕두원 토종꿀 (덕두원) A	원산지: 국산
Y-009	덕두원 토종꿀 (덕두원) B	원산지: 국산
Y-010	지리산 벌집꿀 (청원기수양봉원)	원산지: 국산
Y-011	정선 꿀	원산지: 국산
Y-012	인제읍 하추리 꿀 A	원산지: 국산
Y-013	인제읍 하추리 꿀 B	원산지: 국산
Y-014	백담사	원산지: 국산
Y-015	하늘내린 2015년	원산지: 국산
Y-016	하늘내린 2014년	원산지: 국산
Y-017	하늘내린 A	원산지: 국산
Y-018	하늘내린 B	원산지: 국산
Y-019	제천 토종꿀협회 A	원산지: 국산
Y-020	제천 토종꿀협회 B	원산지: 국산
Y-021	제천 토종꿀협회 C	원산지: 국산
Y-022	제천 토종꿀협회 D	원산지: 국산
Y-023	제천 토종꿀협회 E	원산지: 국산
Y-024	충주팍	원산지: 국산
Y-025	양양군 토종꿀 2015. 10	원산지: 국산

Y-026	양양군토종꿀	원산지: 국산
Y-027	파주민통선 천연벌꿀	원산지: 국산
Y-028	2014. 10월 산 토종꿀	원산지: 국산
Y-029	2015. 10월 산 토종꿀	원산지: 국산
Y-030	강시봉 토종꿀	원산지: 국산
Y-031	지리산 IC 쌍용 휴게소 토종꿀(벌집 꿀) (남원)	원산지: 국산
Y-032	지리산 벌통 벌꿀 (남원)	원산지: 국산
Y-033	전통玉種(토종)꿀(남원)	원산지: 국산
Y-034	무명 꿀 (토종)(남원)	원산지: 국산
Y-035	지리산 토종꿀(지리산한봉영농조합)	원산지: 국산
Y-036	전통토종꿀 (남원)	원산지: 국산
Y-037	제천 토종꿀	원산지: 국산
Y-038	2016. 토봉(야생화)(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
Y-039	2015. 토봉(농가분)(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
W-001	중국꿀 A	원산지: 중국
W-002	중국꿀 B	원산지: 중국
W-003	Nectaflor 야생꽃꿀	원산지: 스위스
W-004	Nectaflor 숲꿀	원산지: 스위스
W-005	Nectaflor 벚꽃꿀	원산지: 스위스
W-006	Airborne 클로버꿀	원산지: 뉴질랜드
W-007	Airborne 라타꿀	원산지: 뉴질랜드
W-008	Miel de citronnier 레몬나무꿀	원산지: 프랑스
W-009	Miel de lavande maritime 라벤더꿀	원산지: 프랑스
W-010	Lune de miel 오렌지나무꿀	원산지: 프랑스
W-011	Lune de miel 아카시아꿀	원산지: 프랑스
W-012	Lune de miel 꿀	원산지: 프랑스
W-013	THE FINEST HONEY 아카시아꿀	원산지: 루마니아
W-014	THE FINEST HONEY 클로버꿀	원산지: 캐나다
W-015	THE FINEST HONEY 오렌지꿀	원산지: 멕시코
W-016	THE FINEST HONEY 해바라기꿀	원산지: 루마니아
W-017	THE FINEST HONEY 로즈마리꿀	원산지: 스페인
W-018	THE FINEST HONEY 잡화꿀	원산지: 쿠바
W-019	THE FINEST HONEY 연꽃꿀	원산지: 일본
W-020	THE FINEST HONEY 잡화꿀	원산지: 일본
W-021	THE FINEST HONEY 토치	원산지: 일본
W-022	THE FINEST HONEY 메밀꿀	원산지: 일본
W-023	PETIT HONEY 후쿠라시	원산지: 일본
W-024	PETIT HONEY 굴꿀	원산지: 일본
W-025	PETIT HONEY 아카시아꿀	원산지: 일본
W-026	미츠바시 메밀꿀	원산지: 일본
W-027	미츠바시 토치꿀	원산지: 일본

W-028	미츠바시 연꽃꿀	원산지: 일본
W-029	미츠바시 잡화꿀	원산지: 일본
W-030	PURE HONEY 아카시아꿀	원산지: 일본
W-031	HIGUCHIEN HONEY 잡화꿀	원산지: 일본
W-032	일본토종유칼립투스꿀	원산지: 일본
W-033	일본 토종 가미카와꿀	원산지: 일본
W-034	일본 토종 모리꿀	원산지: 일본
W-035	일본 토종 물방울꿀	원산지: 일본
W-036	Miele di acacia	원산지: 이탈리아
W-037	Miele di agurmi	원산지: 이탈리아
W-038	Miele di millefiori	원산지: 이탈리아
W-039	Miele thun tarassa co dandelion honey	원산지: 이탈리아
W-040	Wilkin & sons LTD PURE HONEY	원산지: 영국
W-041	Miele thun tarassa co linden honey	원산지: 미국
W-042	Miele di castagno	원산지: 미국
W-043	Alnaqaa honey(Spring flowers)	원산지: 리비아
W-044	Alnaqaa honey(Greek strawberry tree)	원산지: 리비아
W-045	희03 유채	원산지: 일본
W-046	희01 때죽	원산지: 일본
W-047	nectaflor(야생꽃꿀)	원산지: 스위스
W-048	nectaflor(오렌지&아카시아꿀)	원산지: 스위스
W-049	nectaflor(산벚꽃꿀)	원산지: 스위스
W-050	캐나다 퓨어 허니	원산지: 캐나다
W-051	하치미쯔	원산지: 일본
W-052	순수틀 벌꿀	원산지: 일본
W-053	ROYAL FIR HONEY	원산지: 독일
W-054	miel de citronnier	원산지: 프랑스
W-055	아카시아꿀	원산지: 독일
W-056	Mielizia Arancio de Sud d'Italia	원산지: 이탈리아
W-057	Mielizia Eucalipto della Costa Ionica	원산지: 이탈리아
W-058	Creamy honey	원산지: 일본
W-059	벌꿀(백화꿀)	원산지: 일본
W-060	Orange blossom honey	원산지: 미국
W-061	Real raw honey	원산지: 미국
W-062	Pure HONEY(wild honey)	원산지: 미국
C-001	토봉밀(년 수회)	원산지: 중국
C-002	토봉밀(년 일회)	원산지: 중국
C-003	이탈리안 아카시아	원산지: 중국
C-004	이탈리안 계피	원산지: 중국
C-005	이탈리안 벌집	원산지: 중국
C-006	중국 농가 1	원산지: 중국

C-007	중국 농가 2	원산지: 중국
C-008	느티나무 꽃향이 사방에 풍긴다	원산지: 중국
C-009	봉밀(계수나무80+피나무20)	원산지: 중국
C-010	영양밀윤	원산지: 중국
C-011	유미방 야생국화꽃	원산지: 중국
C-012	유미방 아카시아꽃	원산지: 중국
C-013	관생원 자운영꽃	원산지: 중국
C-014	관생원아카시아꽃	원산지: 중국
C-015	면산 봉밀(잡화꽃)	원산지: 중국
C-016	면산 토봉밀	원산지: 중국
C-017	야생계수나무꽃꿀	원산지: 중국
A-01	인조꿀 1	제조
A-02	인조꿀 2	제조
A-03	인조꿀 3	제조
A-04	인조꿀 4	제조

- 수집 벌꿀 성분 분석을 식품공전에 기재된 분석법에 의해 진행하였으며, 아래와 같은 분석결과를 얻을 수 있었다. (분석된 자료는 추후 개발된 항체에 의한 분별법의 기본자료로 사용될 것임)

표. 수집 벌꿀 성분 분석

샘플 번호	수분 (%)	과당 (%)	포도당 (%)	전화당 (%)	자당 (%)	HMF (mg/kg)	인공감미료	비고
X-080	17.9	46.05	27.74	73.79	0.00	17.04	불검출	
X-081	17.9	36.26	19.46	55.73	0.00	2.17	불검출	
X-085	17.3	39.05	30.66	69.71	0.50	3.71	불검출	
X-086	19.8	37.66	32.41	70.07	0.35	5.43	불검출	
X-087	18.2	45.62	28.77	74.39	0.02	5.61	불검출	
X-088	19.9	38.54	28.74	67.28	0.00	1.91	불검출	
X-089	18.2	44.46	29.66	74.12	0.00	98.82	불검출	
X-090	16.9	44.82	26.93	71.75	0.06	4.26	불검출	
X-091	16.9	45.02	28.24	73.25	0.02	0.89	불검출	
X-092	20.2	38.89	31.10	69.98	0.00	4.23	불검출	
X-093	18.4	37.35	30.30	67.64	0.00	2.86	불검출	
X-094	17.3	36.36	27.98	64.34	0.00	2.29	불검출	
X-095	17.9	38.18	30.97	69.15	0.00	2.65	불검출	
X-096	17.0	41.83	26.89	68.71	0.00	0.66	불검출	
X-097	17.0	45.07	27.34	72.41	0.06	3.18	불검출	

X-098	17.0	39.45	31.11	70.57	0.00	3.91	불검출	
X-099	17.8	38.34	29.67	68.01	0.00	3.62	불검출	
X-100	16.2	35.81	25.87	61.68	0.00	1.10	불검출	
X-101	17.0	33.09	28.10	61.20	0.04	5.75	불검출	
X-102	17.7	43.42	27.42	70.83	0.68	4.24	불검출	
X-103	18.4	43.50	26.88	70.38	0.00	4.28	불검출	
X-104	17.6	40.30	28.56	68.86	0.00	11.08	불검출	
X-105	17.3	42.86	22.06	64.92	0.00	0.49	불검출	
X-106	17.3	37.63	27.46	65.09	0.10	6.52	불검출	
X-107	18.0	36.46	24.89	61.34	10.59	9.45	불검출	
X-108	17.0	43.05	22.42	65.47	0.00	0.76	불검출	
X-110	18.8	42.97	28.03	71.00	0.25	7.02	불검출	
X-111	18.8	39.16	22.97	62.13	0.00	9.14	불검출	
X-112	17.4	31.66	26.20	57.86	0.05	1.42	불검출	
X-113	17.9	45.34	26.48	71.82	1.15	3.64	불검출	
X-114	14.6	51.58	34.53	86.11	2.53	0.83	불검출	
X-115	20.7	45.77	33.33	79.10	0.45	0.15	불검출	
X-116	17.9	50.88	32.10	82.98	4.79	0.17	불검출	
X-117	17.8	33.00	26.58	59.58	8.08	4.66	불검출	
X-118	17.0	50.04	31.81	81.85	0.90	5.76	불검출	
X-119	17.9	51.75	33.52	85.26	4.82	5.13	불검출	
X-120	17.9	42.05	25.40	67.45	0.00	5.68	불검출	
X-121	17.3	50.95	32.09	83.04	0.96	7.53	불검출	
X-122	16.5	42.19	27.30	69.49	0.57	0.00	불검출	
X-123	17.9	51.33	33.05	84.38	1.25	5.80	불검출	
X-124	17.7	46.15	23.35	69.50	0.00	6.22	불검출	
X-125	16.4	41.48	28.94	70.43	0.69	0.13	불검출	
X-126	18.5	43.11	27.81	70.91	0.00	13.31	불검출	
X-127	19.5	38.78	27.81	66.58	0.00	0.54	불검출	
X-128	23.1	26.06	21.29	47.35	14.79	0.00	불검출	
X-129	21.1	26.88	21.42	48.29	20.44	0.00	불검출	
X-130	23.7	24.19	20.33	44.53	18.32	0.00	불검출	
X-131	18.8	41.27	29.68	70.95	1.06	51.52	불검출	
X-132	15.7	43.55	27.88	71.43	0.85	1.51	불검출	
X-133	15.9	37.84	26.15	63.98	0.44	0.78	불검출	
X-134	19.9	40.45	24.41	64.86	0.00	1.24	불검출	
X-135	17.7	26.64	25.78	52.42	1.49	0.65	불검출	

X-136	17.7	27.55	25.42	52.97	1.20	0.64	불검출	
X-137	14.9	25.42	21.86	47.28	2.14	0.10	불검출	
X-138	21.4	36.00	31.77	67.77	0.00	0.70	불검출	
Y-015	17.8	37.37	26.96	64.33	0.07	6.27	불검출	
Y-016	17.6	36.59	25.57	62.16	0.00	26.09	불검출	
Y-017	18.8	37.24	25.70	62.94	0.00	3.73	불검출	
Y-018	19.2	38.11	26.35	64.46	0.07	2.87	불검출	
Y-019	22.9	35.56	28.20	63.76	0.01	1.61	불검출	
Y-020	25.0	32.88	30.40	63.28	0.05	2.15	불검출	
Y-021	19.3	35.12	29.79	64.91	0.00	10.13	불검출	
Y-022	18.9	36.63	26.71	63.33	0.00	5.31	불검출	
Y-023	20.3	36.88	27.66	64.54	0.01	1.46	불검출	
Y-024	17.4	34.33	25.08	59.41	0.08	1.94	불검출	
Y-025	17.2	36.37	30.67	67.04	0.11	316.37	불검출	
Y-026	21.5	35.40	27.66	63.05	0.00	1.56	불검출	
Y-027	17.6	37.15	26.41	63.56	0.00	2.04	불검출	
Y-028	19.0	43.15	22.60	65.75	0.34	169.35	불검출	
Y-029	18.9	37.22	27.77	64.99	0.00	2.49	불검출	
Y-030	18.2	37.67	26.70	64.37	0.24	3.97	불검출	
Y-033	18.2	32.96	26.55	59.52	7.46	8.52	불검출	
Y-034	17.8	37.10	25.61	62.70	0.54	233.98	불검출	
Y-035	17.8	39.64	27.01	66.65	0.00	2.46	불검출	
Y-036	17.8	37.63	27.99	65.61	0.09	1.13	불검출	
Y-037	16.5	45.57	26.24	71.81	0.59	2.35	불검출	
Y-038	18.6	37.49	31.59	69.08	0.65	1.05	불검출	
Y-039	21.3	42.29	32.99	75.28	0.00	3.45	불검출	
W-036	16.7	41.32	26.49	67.81	0.74	8.13	불검출	
W-037	18.1	36.96	30.15	67.11	0.00	54.54	불검출	
W-038	17.8	46.70	26.76	73.46	0.00	42.18	불검출	
W-039	14.8	36.37	36.82	73.19	0.00	12.31	불검출	
W-040	18.0	41.74	28.86	70.60	0.00	30.42	불검출	
W-041	17.2	38.01	32.94	70.95	0.00	10.70	불검출	
W-042	17.0	39.41	21.65	61.06	0.00	3.45	불검출	
W-043	17.0	36.75	31.36	68.11	0.50	6.83	불검출	
W-044	20.9	37.10	24.56	61.66	0.48	26.21	불검출	
W-045	17.8	38.03	30.68	68.71	0.48	5.61	불검출	
W-046	17.1	34.69	33.48	68.17	0.00	18.83	불검출	

W-047	19.9	43.70	23.88	67.58	0.00	61.50	불검출	
W-048	16.6	39.88	31.30	71.18	1.20	30.14	불검출	
W-049	17.6	37.12	29.43	66.54	0.00	24.70	불검출	
W-050	18.5	39.93	35.60	75.52	0.60	20.87	불검출	
W-051	18.7	36.79	30.55	67.34	0.58	15.16	불검출	
W-052	15.8	35.10	31.50	66.60	1.16	4.69	불검출	
W-053	17.3	29.59	22.81	52.40	0.00	7.59	불검출	
W-054	17.2	35.47	27.38	62.85	0.94	18.10	불검출	
W-055	17.0	41.35	28.16	69.51	0.87	8.28	불검출	
W-056	16.7	38.64	29.48	68.13	0.50	7.42	불검출	
W-057	16.6	36.70	27.47	64.17	0.00	5.06	불검출	
W-058	20.7	39.77	26.23	66.00	0.00	9.89	불검출	
W-059	19.4	38.05	27.19	65.24	0.17	12.18	불검출	
W-060	17.2	44.23	24.96	69.19	0.00	109.82	불검출	
W-061	22.2	39.78	25.31	65.09	0.00	27.68	불검출	
W-062	17.1	36.22	30.81	67.04	0.63	325.01	불검출	
C-001	17.2	40.31	23.98	64.29	0.00	124.86	불검출	
C-002	19.6	35.32	32.02	67.35	0.93	186.45	불검출	
C-003	18.3	42.45	26.79	69.25	0.85	3.42	불검출	
C-004	20.9	38.04	28.30	66.35	0.00	9.05	불검출	
C-005	16.9	38.82	34.31	73.13	1.38	9.70	불검출	
C-006	24.8	32.46	29.39	61.85	0.00	0.30	불검출	
C-007	24.8	33.05	27.10	60.16	0.00	7.00	불검출	
C-008	18.7	15.88	17.73	33.61	0.00	32.51	불검출	
C-009	19.5	38.93	32.05	70.98	0.53	29.75	불검출	
C-010	20.3	22.91	29.21	52.12	0.00	68.55	불검출	
C-011	19.2	39.12	32.02	71.14	0.91	57.88	불검출	
C-012	19.3	40.26	33.07	73.34	0.90	64.39	불검출	
C-013	19.2	34.95	31.58	66.53	0.00	23.91	불검출	
C-014	19.1	39.46	30.82	70.27	0.00	10.13	불검출	
C-015	20.4	40.96	34.78	75.74	0.00	38.38	불검출	
C-016	20.7	40.26	34.35	74.62	0.66	48.55	불검출	
C-017	19.0	44.18	31.12	75.29	0.00	2.58	불검출	
A-001	24.8	45.28	22.52	67.80	1.38	260.85	불검출	
A-002	22.7	42.52	26.52	69.04	0.63	247.22	불검출	
A-003	24.8	42.21	21.50	63.71	1.32	248.76	불검출	

A-004	24.1	45.94	23.69	69.62	0.69	249.69	불검출	
-------	------	-------	-------	-------	------	--------	-----	--

- 수분 (규격기준: 20.0% 이하)

구분	시료수	평균(%)	표준편차	최소	최대	비고
X-시료	55	18.1	1.71	14.6	23.7	
Y-시료	23	19.0	1.99	16.5	25.0초과	
W-시료	27	17.8	1.62	14.8	22.2	
C-시료	17	19.9	2.14	16.9	24.8	
A-시료	4	24.1	0.97	22.7	24.8	
합계	126	18.6	2.15	14.6	25.0초과	

- 전화당 (규격기준: 60% 이상)

구분	시료수	평균(%)	표준편차	최소	최대	비고
X-시료	55	67.67	9.37	44.53	86.11	
Y-시료	23	64.89	3.50	59.41	75.28	
W-시료	27	67.20	4.50	52.40	75.52	
C-시료	17	66.20	10.42	33.61	75.74	
A-시료	4	67.50	2.67	63.71	69.62	
합계	126	66.87	7.71	33.61	86.11	

- 자당 (규격기준: 7.0% 이하)

구분	시료수	평균(%)	표준편차	최소	최대	비고
X-시료	55	1.81	4.39	0.00	20.44	
Y-시료	23	0.45	1.54	0.00	7.46	
W-시료	27	0.3	0.40	0.00	1.20	
C-시료	17	0.4	0.47	0.00	1.38	
A-시료	4	1.0	0.40	0.63	1.38	
합계	126	1.02	3.05	0.00	20.44	

- 하이드록시메틸푸르푸랄 (규격기준: 80mg/kg 이하)

구분	시료수	평균(%)	표준편차	최소	최대	비고
X-시료	55	6.20	14.70	0.00	98.82	
Y-시료	23	35.23	84.20	1.05	316.37	
W-시료	27	33.6	62.60	3.45	325.01	
C-시료	17	42.2	49.35	0.30	186.45	
A-시료	4	251.6	6.23	247.22	260.85	
합계	126	30.02	65.71	0.00	325.01	

- 인공감미료 (규격기준: 불검출) : 126건 모두 불검출



자. 벌꿀 가공품 분류 기준안 개발을 위한 사례 조사

- 국내산 벌꿀 가공품 시장조사 및 품질표시 등의 사례를 조사하였다.

\* 실례 1



- (1) 품명 : 오뚜기 꿀대추차
- (2) 원재료명 : 대추농축액(대추(국산), 고품분), 대추과육, 벌꿀, 액상과당, 정제수, 백설탕, 이소말토올리고당, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 카라기난, 합성착향료(대추향), 잔탄검, 젯산칼슘, 구연산
- (3) 내용량 : 1kg
- (4) 유통기한 : 2018.01.14
- (5) 보존방법 : 직사광선을 피하여 건조하고 서늘한 곳에 보관하십시오.
- (6) 제조자 : 오뚜기삼화식품(주) 충남 논산시 은진면 관촉로 58번길 138

\* 실례 2



- (1) 품명 : 담터 꿀유자차
- (2) 원재료명 : 유자당절임(유자(국산), 정백당), 벌꿀(잡화꿀, 국산), 정백당, 정제수, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 구연산(결정), 비타민C
- (3) 내용량 : 770g
- (4) 유통기한 : 2017.12.08
- (5) 보존방법 : 개봉 후에는 가급적 빨리 드시고, 뚜껑을 닫아 반드시 냉장보관 하십시오.
- (6) 제조자 : 두원농협유자가공사업소 / 전남 고흥군 두원면 고흥로 2418

\* 실례 3



- (1) 품명 : 담터 꿀대추차
- (2) 원재료명 : 대추절편(국산), 대추농축액, 벌꿀(잡화꿀, 국산) 액상과당, 백설탕, 카라기난, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 합성착향료(대추향)
- (3) 내용량 : 770g
- (4) 유통기한 : 2017.11.17
- (5) 보존방법 : 개봉 후에는 가급적 빨리 드시고, 뚜껑을 닫아 반드시 냉장보관 하십시오.
- (6) 제조자 : 두원농현유자가공사업소 / 전남 고흥군 두원면 고흥로 2418

\* 실례 4



- (1) 품명 : 초록원 참 꿀유자차
- (2) 원재료명 : 당침유자(유자(국산), 설탕), 벌꿀, 액상과당, 설탕, 비타민C, 구연산, 카라기난(해초)
- (3) 내용량 : 1kg
- (4) 유통기한 : 2018.01.21
- (5) 보존방법 : 개봉 후에는 반드시 냉장 보관하시고 가급적 빠른 시일 내에 드시기 바랍니다.
- (6) 제조자 : (주)초록원 경북 경산시 진량읍 평사1길 45-15

\* 실례 5



- (1) 품명 : 초록원 꿀모과차
- (2) 원재료명 : 당침모과(모과(국산), 설탕), 벌꿀, 액상과당, 설탕, 비타민C, 구연산, 카라기난(해초)
- (3) 내용량 : 1kg
- (4) 유통기한 : 2017.09.14
- (5) 보존방법 : 개봉 후에는 반드시 냉장 보관하시고 가급적 빠른 시일 내에 드시기 바랍니다.
- (6) 제조자 : (주)초록원 경북 경산시 진량읍 평사1길 45-15

\* 실례 6



- (1) 품명 : 태백의 미 홍삼꿀
- (2) 원재료명 : 홍삼농축액, 대추추출액, 벌꿀, 사과즙, 액상과당, 올리고당, 비타민C, 벌꿀향(합성착향료), 안식향산나트륨(합성보존료), 정제수
- (3) 내용량 : 100ml
- (4) 유통기한 : 별도표시
- (5) 보존방법 : 직사광선을 피하여 건조하고 서늘한 곳에 보관하십시오.
- (6) 제조자 : 태백농협

2) 제 2세부 과제

가. 사양꿀 및 인조꿀의 특이성분의 분리 및 정제 시판 꿀 시료의 분석

● 서론

- 사양꿀에만 존재하는 이들의 유도체를 합성하여 사양꿀 특이적인 성분을 분리 정제하여 동정하고자 함.
- 다양한 분석기계(TLC-MS interface, HPLC, IR, HRMS, NMR, X-Ray 등) 틀을 이용함으로써 보다 정확한 성분동정을 하고자 함.
- 따라서 사양꿀 미량분석 기술을 개발하고 표준화하고자 함.
- 또한 시판 중인 꿀을 수종 수집하여 토종 꿀과 사양 꿀 또는 인조 꿀의 진위여부를 Thin Layer Chromatography (TLC) 전개를 이용한 분석방법으로 확인함.
- 분석 결과를 참고하여 토종꿀과 양봉꿀의 분석 기술 개발에 필요한 기초자료로 이용 하고자 함.

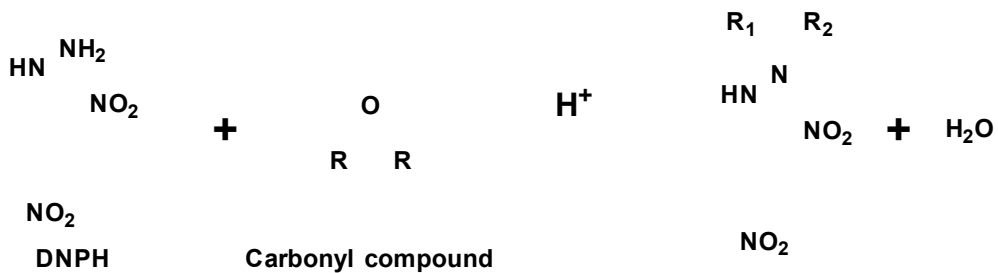
● 재료 및 방법

a) 시료

- 기존 실험결과에 이어서 사양꿀 및 인조꿀의 특이성분이 설탕에서 유래한 것임을 확인하고자, 설탕수용액을 이용하여 DNPH유도체를 확인하였다.
- 시판중인 꿀 시료들 중 토종 꿀 및 사양 꿀, 인조 꿀의 TLC 상에서의 band 차이를 대조하여 진위 여부를 판단함.

b) 설탕수용액의 DNPH 유도체 합성

- 기존 80% 설탕 수용액을 2배 희석하여 시료로 사용한다. 시료 2 ml에 동량의 0.1% 2,4-dinitrophenylhydrazine(in 2N HCl)을 가하여 실온에서 1시간 교반하여 반응하였다.



c) DNPH 유도체의 추출

- 반응이 끝난 시료에 2 ml의 ethylacetate 2 ml와 물 2 ml를 첨가하여 vortexing 한 후 상층액을 취하여 용매를 제거한 후 acetone 20 μl를 가하여 녹인 뒤 DNPH 유도체 분석 시료로 사용하였다.

d) 시료의 TLC 분석

- acetone에 녹인 DNPH 유도체 분석 시료 4μl를 4 cm 길이의 TLC Silica Gel 60 (F254, Merck)에 loading 한 후 ethanol : chloroform (1.5 : 25)를 전개용매로 하여 전개하였다. 전개가 끝난 TLC plate는 잘 말린 다음 5% NaOH(in 80% EtOH)에 침전시킨 후 가열하여 발색하였다.

e) 시료의 분리 및 정제

- 소량의 특이성분의 분리 및 정제를 위하여 flash column을 사용하여 분리하였다. 충전제는 Silicagel 60(230~400 mesh, Merk)을 사용하였으며 전개 용매로는 ethanol : dichloromethane (1 : 40)을 사용하였다.
- 대량의 특이성분의 분리 및 정제는 MPLC (Isolera™ Prime, Biotage)에 ZIP® Sphere Silica cartridges 120g(Merk)을 이용하여 ethanol : dichloromethane (1 : 40)을 이용하여 분리하였다.

f) 시료의 HPLC 분석

- Ethanol에 녹인 DNPH 유도체 분석 시료 4μl를 C18 column(Agilent TC C-18, 5μm, 4.6 X 250mm)에 주입하여 분석하였다. 시료의 분석은 유속 1.0 ml/min, 전개 용매는 methanol : water (70 : 30)를 사용하였으며 245 nm에서 검출하였다.

g) 시판꿀의 시료의 TLC 분석

- 수집한 꿀 시료는 증류수로 희석하고 원심분리(14,000rpm 5min)하여 화분을 제거한 후 DNPH(2,4-Dinitrophenylhydrazine)와 차광하여 반응했다. 반응 후 Benzene을 첨가하여 Vortexing(2min)과 원심분리(14,000rpm 5min)를 한 후 상등액만을 취하여 농축했다. 농축한 반응액을 High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)에 4μl를 Loading한 후 Benzene : Ethyl acetate (1 : 4)로 전개시켜주었다. 전개 후 5% NaOH (in 85% Ethanol)용액을 전개 면에 도포한 후 가열하여 발색반응 하였다. 비교 대상인 사탕수수, 사탕무 설탕의 경우 80%(w/w) 설탕 시럽을 제조하여 증류수로 희석하여 위와 같은 절차를 시행하였다. 전개된 각 TLC 마지막 두 lane은 각각 사탕수수, 사탕무 설탕을 이용한 것으로 지표로써 사용되었다. 결과에 표시된 붉은 선상에 특이 물질이 검출되는 꿀들을 판별 할 수 있다.

● 결과

a) 설탕수용액에서의 사탕꿀 특이 성분의 검출

- 설탕수용액을 사용한 DNPH 유도체를 꽃꿀 및 사탕꿀 DNPH 유도체와 함께 TLC로 분석한 결과, 설탕수용액과 사탕꿀에서는 특이성분이 나타나나 꽃꿀에서는 발견 되지 않는 것을 확인하였다.

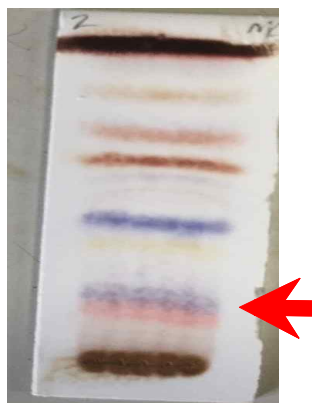


그림 1. 설탕 DNPH유도체의 thin layer chromatogram

b) 시료의 TLC 분석

- 설탕 특이성분의 기원을 확인하기 위하여 설탕과 사탕꿀의 DNPH 유도체를 TLC로 확인하였다. 설탕에 존재하는 불순물로부터 기원하는 것으로 판단되는 수종의 DNPH 유도체가 TLC 상에서 확인이 되었으며 그림 1의 붉은 화살표로 표시된 부분은 사탕꿀 및 설탕수용액에서 특이적으로 발견되는 성분으로 특이성분이 설탕으로부터 유래하는 것을 알 수 있다.
- 그림에서 나타나듯이 설탕에서 발견되는 사탕꿀 특이적인 성분은 설탕의 기원이 사탕수수 이거나 사탕무 이거나 공통적으로 존재하고 있음을 알 수 있다. 백설탕에는 HMF 이외에도 유기산이나 아미노산 등이 불순물로 존재하고 있음이 보고되고 있다. 따라서 수종의 알데히드 및 유기산의 DNPH 유도체를 TLC로 비교 확인하였다. 설탕 특이성분은 설탕의 DNPH유도체를 TLC로 분리하여 추출한 것을 사용하였다. 알데히드 화합물로는 formaldehyde, glutaldehyde, methylglyoxal, benzaldehyde, 2-furaldehyde, 유기산으로는 lactic acid, formic acid, malic acid, maleic acid, ascorbic acid, acetic acid, citric acid, oxalic acid, succinic acid 그리고 glycerol의 DNPH 유도체를 비교하였다. 그림 4~6에서 보듯이 설탕 기원의 특이성분은 짙은 푸른색을 나타내나 비교 물질로 사용한 알데히드나 유기산에서는 푸른색을 나타내는 화합물은 없었다. Lactic acid와 formic acid는 특이 물질과 같은 Rf 값을 나타내고 있으나 발색된 결과가 달랐다. 사탕꿀 특이 성분의 생성 기원을 파악하기 위해서는 이 성분의 정제가 필요함을 알 수 있다.

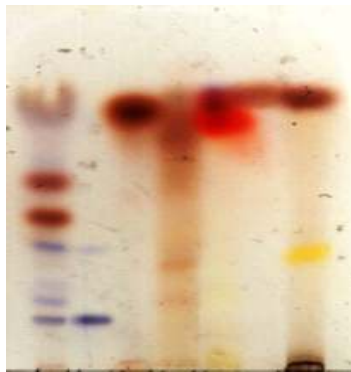


그림 2. 알데히드의 DNPH 유도체

1: 설탕, 2: 설탕 특이성분의 TLC 추출물, 3: formaldehyde, 4: glutaldehyde, 5: methylglyoxal, 6: benzaldehyde, 7: 2-furaldehyde



그림 3. 유기산의 DNPH 유도체

1: 설탕, 2: 설탕 특이성분의 TLC 추출물, 3: lactic acid, 4: formic acid, 5: malic acid, 6: maleic acid



그림 4. 유기산의 DNPH 유도체

1: 설탕, 2: 설탕 특이성분의 TLC 추출물, 3: ascorbic acid, 4: acetic acid, 5: citric acid, 6: oxalic acid, 7: succinic acid, 8: glycerol

c) 설탕 지표물질의 효율적인 분리를 위한 전개용매 탐색

- 꿀로부터 유래한 DNPH 유도체는 다수가 존재하며 일부는 서로 겹치거나 인접하여 있으므로 정확한 판단에 어려움을 가져온다. 특히 사양꿀 특이 성분은 일부의 꿀에서 갈색의 성분과 겹치거나 인접하여 나타나고 있다. 따라서 분리를 위해서는 전개용매의 종류와 조성을 바꾸어 이들 성분이 분리가 잘 되는 조건을 검토할 필요가 있다. 기존 과제의 TLC의 전개용매를 기반으로 하여 분리능력이 비슷한 다양한 용매를 시도하였다. 그 결과 ethanol : chloroform (1.5 : 25)의 전개용매가 특이성분을 다른 화합물과의 겹침 없이 잘 분리함을 확인하였다.

d) 설탕 지표물질의 선택적 추출

- 꿀 시료의 DNPH 유도체는 앞서 제시한 그림에서 보듯이 매우 다양하여 실제적인 판별에 어려움



이 따른다. 따라서 꿀의 회석액을 유기용매로 추출하여 DNPH 유도체의 패턴의 변화와 지표 물질의 선택적 추출 가능성을 검토하였다.

- 꿀, 설탕 등 시료 1g에 물 2ml 을 가하여 녹인 후 그 중 2ml를 취하고 다양한 유기용매(Hexane, Ethylacetate, Dichloromethane) 각 각 2 ml씩 순서대로 첨가하여 vortexing 후 유기용매 층을 분리하였다. 유기용매 층과 수층으로 분리 후 유기용매를 다 날린 후 ethanol 2ml 첨가하여 유기용매에 있던 물질을 녹여냈다. 수층과 각 유기용매 층에 0.1% DNPH (in 2N HCl) 2ml을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. 반응물에 ethylacetate 400 $\mu$ l을 첨가 하여 추출하고 이를 TLC로 분석하였다. 그림 5에서 나타나듯이 설탕 지표 물질의 선택적 추출이 이루어지지 않았으며, 수층에서 특이성분이 검출되었다.

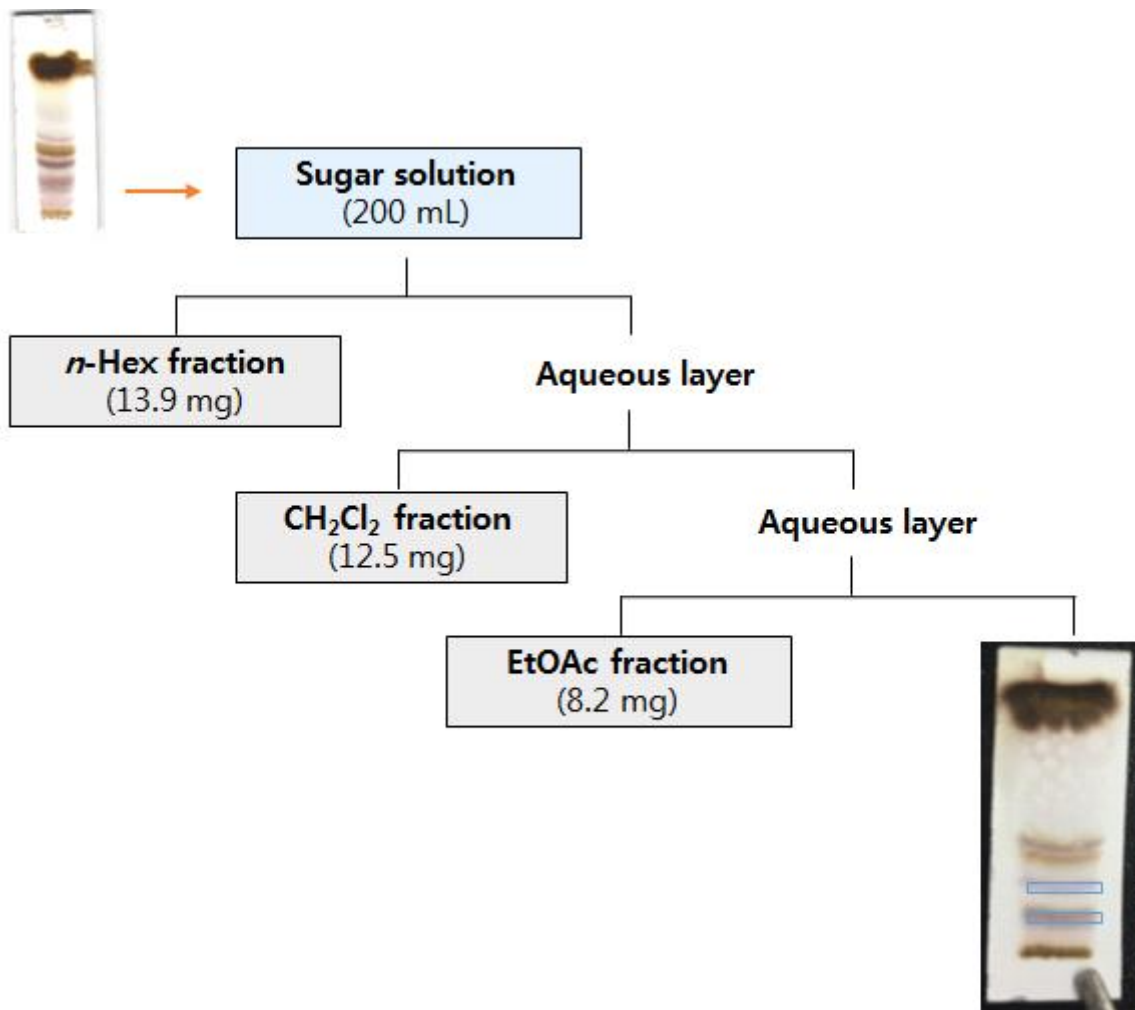


그림 5. 설탕 지표 물질의 선택적 추출



e) 설탕 지표물질의 분리 및 정제

- 적절한 추출용매의 탐색이 진행되지 않아 Prep-TLC 및 flash column을 이용하여 분리 및 정제를 한 특이성분을 NMR Spectrum을 통하여 그 구조를 확인하고자 하였다.
- 이에 Prep-TLC 및 flash column을 이용하여 ethanol : chloroform을 전개용매로 하여 단일성분을 분리하였으나, Prep-TLC를 통한 분리는 깨끗하였으나 양이 적었다. 또한 flash column의 경우 다른 화합물과 섞여 나와 정확한 NMR Spectrum을 확인 할 수 없었다.

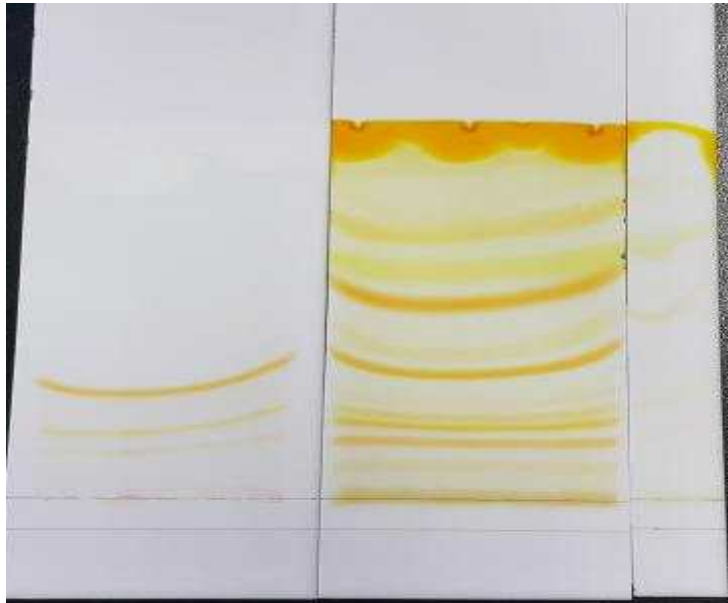


그림 6. Prep-TLC를 통한 분리

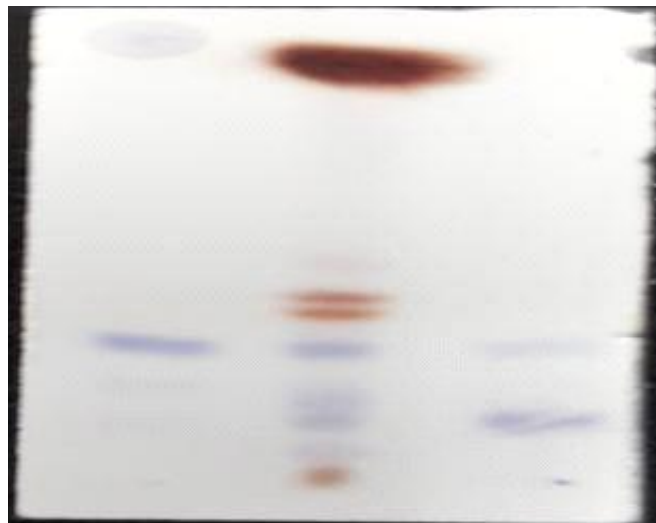


그림 7. Prep-TLC(좌) 및 flash column(우)를 통한 분리 결과

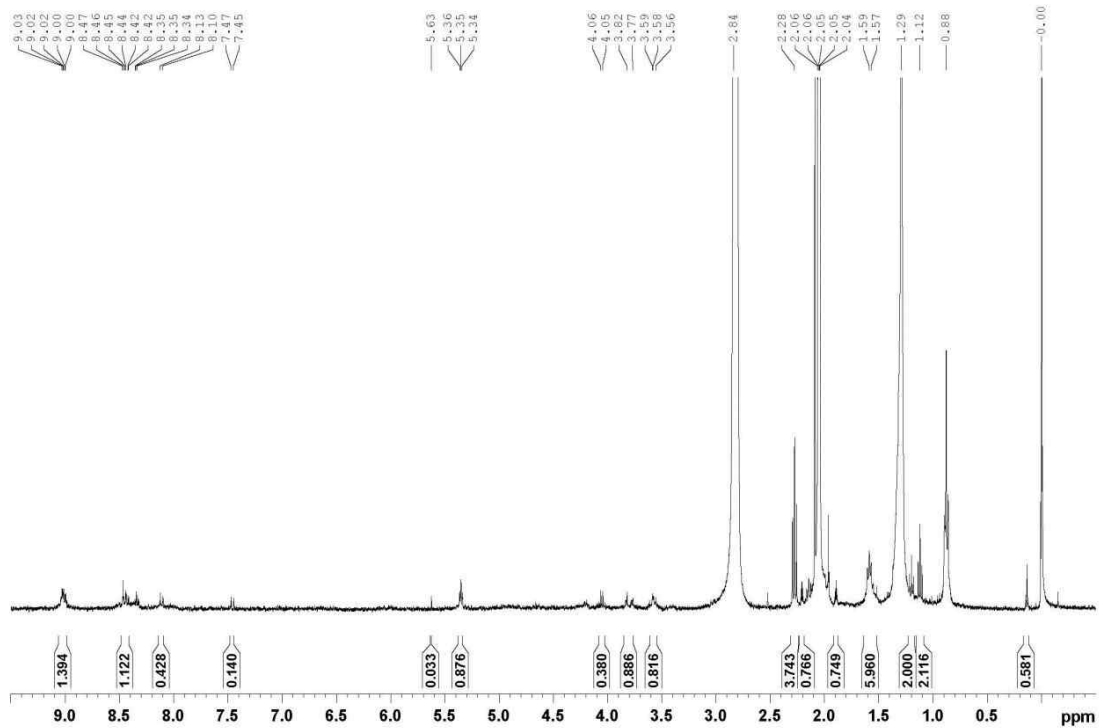


그림 8. flash column으로 분리한 설탕지표물질의  $^1\text{H-NMR}$

#### 나. 사양꿀 및 인조꿀의 특이성분의 구조 결정

##### ● 결과

##### a) 설탕 지표물질의 대량 분리 및 NMR spectrum 확인

- 설탕 지표물질의 정확한 구조확인을 위하여 깨끗하게 분리한 대량의 화합물이 필요하였다. 이에 설탕수용액의 DNPH반응을 수차례 반복하여 화합물을 1 g 취득하여 MPLC를 이용하여 분리하였다. MPLC를 통한 분리 중 충전재 및 용매의 유속등의 조건이 TLC나 flash column과 차이가 있어서 새로운 전개용매를 탐색하였으며 ethanol : dichloromethane (1 : 40)을 전개용매로 사용하였다.

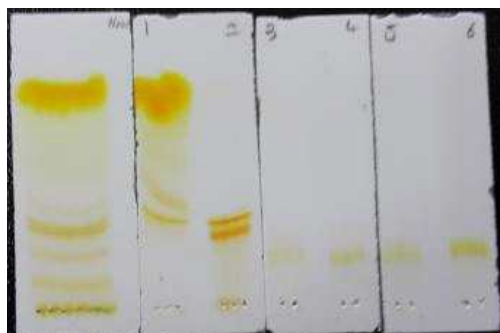


그림 9. MPLC로 분리한 특이성분의 TLC

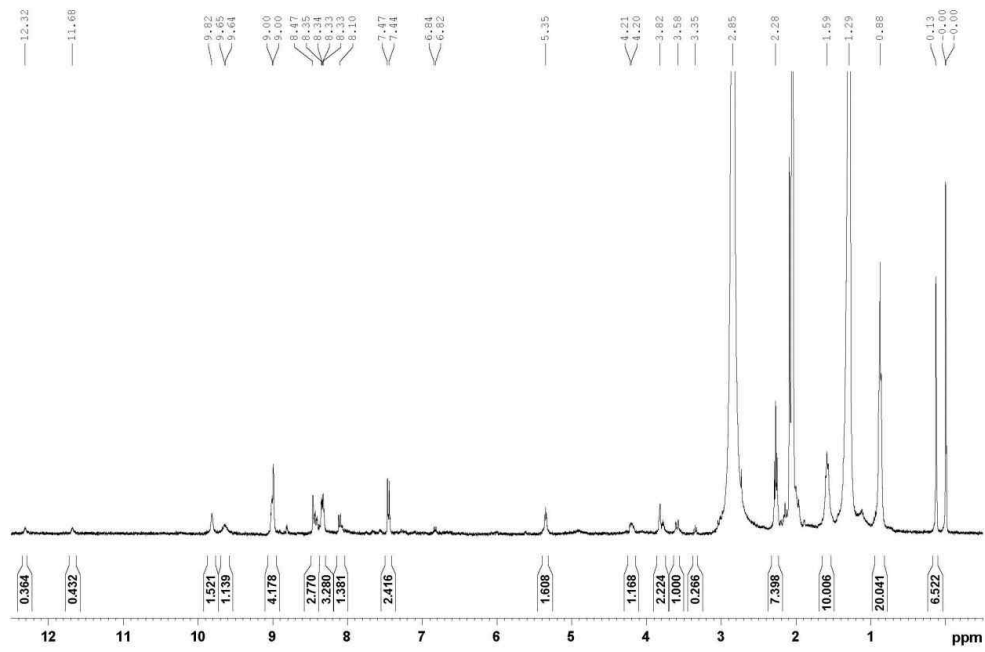


그림 10. MPLC로 분리한 설탕지표물질의  $^1\text{H-NMR}$

- MPLC를 통하여 분리한 설탕지표물질의  $^1\text{H-NMR}$ 을 얻었으나, 구조의 규명을 위하여 더욱 깨끗하고 명확한 Spectrum과  $^{13}\text{C}$  및 DEPT NMR등 추가적인 실험결과가 필요하였다. 동일하게 실험을 반복하여 2 g의 설탕수용액 DNPH반응물을 취합한 뒤 MPLC를 통하여 분리하고 얻어진 설탕지표성분을 각 NMR을 확인하였다.

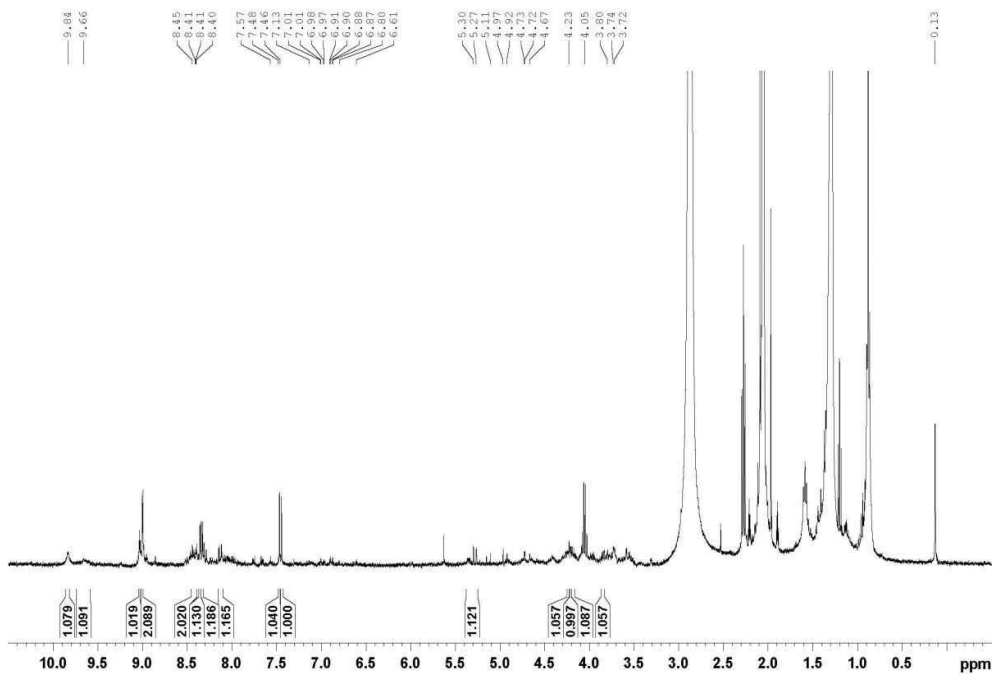


그림 11. 설탕지표물질의  $^1\text{H-NMR}$

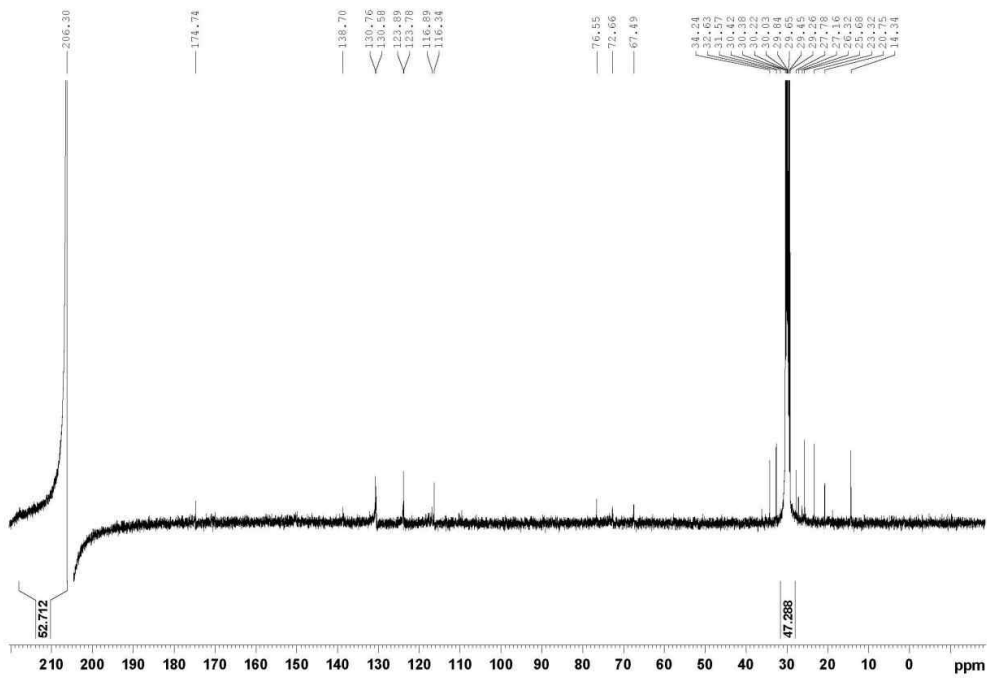


그림 12. 설탕지표물질의  $^{13}\text{C}$ -NMR

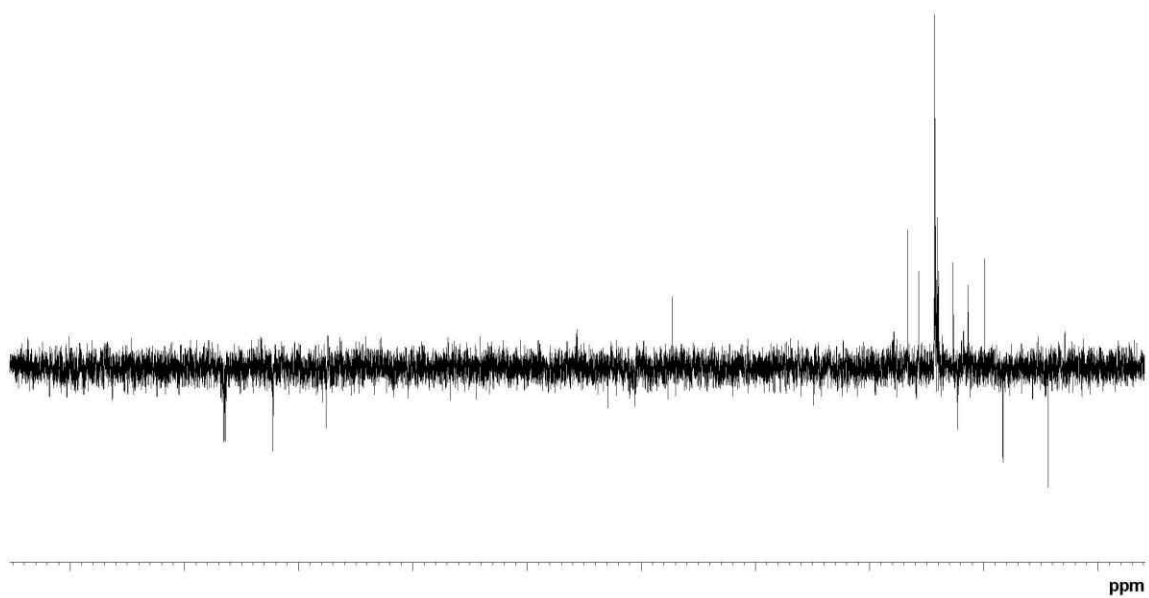


그림 13. 설탕지표물질의 DEPT-NMR

b) 설탕 지표물질의 NMR spectrum 해석

- 상기 실험을 통하여 얻어진  $^1\text{H-NMR}$  spectrum을 해석한 결과, 2,4-DNPH의 특이적인 Peak가 검출되는 것으로 보아 설탕 속 Ketone 작용기를 지닌 화합물이 2,4-DNPH와 반응하여 imine 작용기를 지닌 화합물을 생성한 것으로 판단된다. 또한  $^{13}\text{C}$ 와 DEPT NMR spectrum을 해석한 결과 가지 친 탄화수소사슬을 지닌 Aldehyde 화합물일 것으로 추정된다.

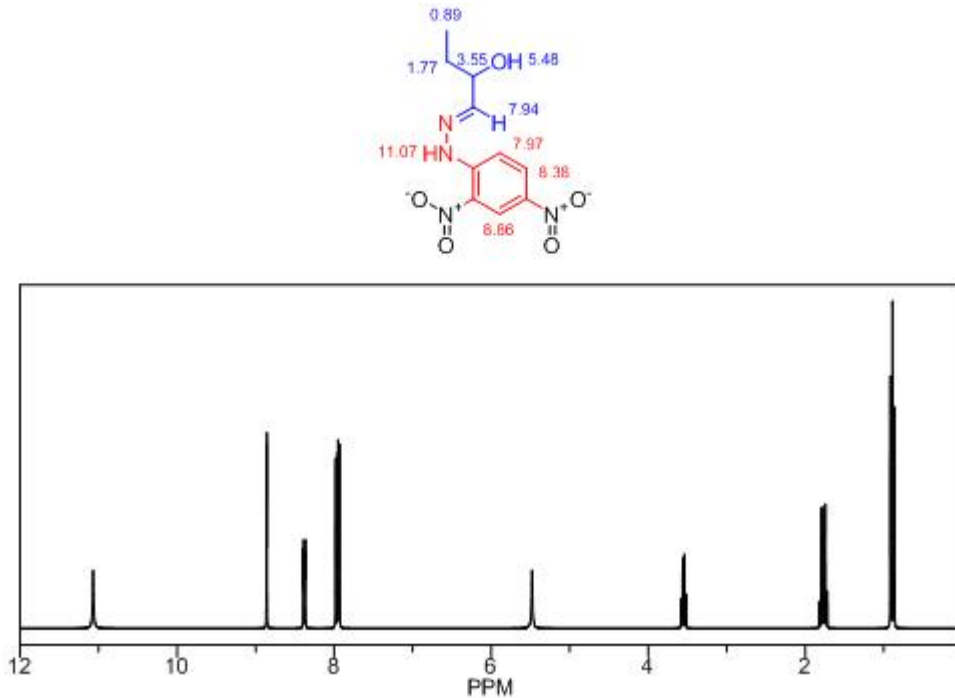


그림 14. 유사 추정구조의  $^1\text{H-NMR}$  예상 spectrum

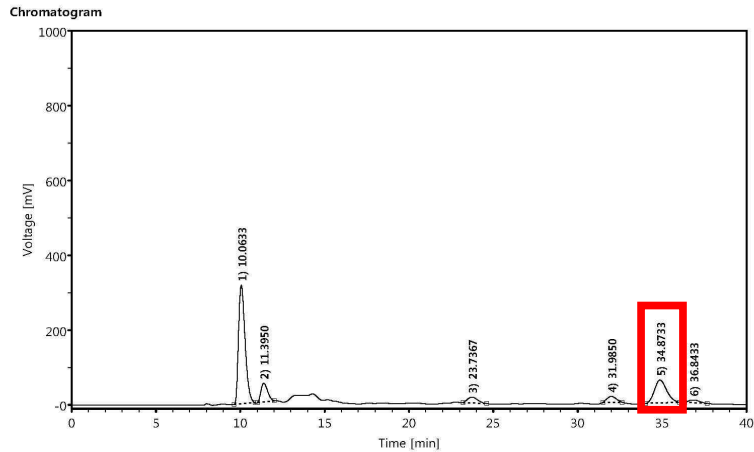
- 상기 구조를 명확히하기 위하여 해당 화합물의 분자량에 대한 정보가 필요하므로, LC/MS를 통하여 설탕지표성분의 분자량을 규명하고자하였다.

c) 설탕 지표물질의 분자량 확인

- LC/MS를 통한 분자량 확인에 앞서 설탕 지표물질의 LC분석조건을 확립하고자 HPLC를 통한 분리 분석실험을 진행하였다. 그 결과 그림 13에서 보듯이 머무름 시간 35분에 설탕지표물질(단일 분리하였으나 화합물 안전성이 떨어져 다른 Peak들이 검출 됨)이 분리되어 나타남을 확인하였다.
- 화합물의 용해도 및 안전성 문제로 인하여 정확한 분자량을 획득할 수 없었으며, 이에 추가로 설탕의 2,4-DNPH 미반응물을 이용한 근원물질의 추적을 계획하였다.

# Report

Sample ID: 황포상      Sample type: Unknown  
 Sample: HWS-01-099(sugar)      Vial:  
 Dilution factor: 1      Void time: 0.1 min      Column length: 0.15 m  
 MH K: 0.00016      MH α: 0.706      Q factor: 1



No.	Name	RT [min]	Area [mV*s]	Area%	Height [mV]	Amount
1		10.06	8569.2168	50.17	317.6791	
2		11.40	1356.5211	7.94	49.5742	
3		23.74	629.5648	3.69	15.5713	
4		31.99	576.2507	3.37	15.4292	
5		34.87	3084.1069	18.06	61.1942	
6		36.84	311.5078	1.82	7.4410	
7		41.62	964.7702	5.65	14.2048	
8		44.85	1014.7975	5.94	13.3573	
9		49.14	572.7275	3.35	7.7292	
Total			17079.4648		502.1802	0.00

그림 15. 설탕 지표물질의 HPLC 분석결과

d) 설탕 지표물질의 예상구조 탐색

- NMR Spectrum만을 이용하여 정확한 구조의 탐색이 어려우므로, 설탕 속 Ketone 작용기를 지닌 화합물들의 보고 내용을 조사한 결과 다음과 같은 구조들이 문헌적으로 보고되어 있었다.

e) 시판 꿀 시료 분석 결과

표 1. 한국 꿀 목록 (2016년 8월)

No.	Sample	No.	Sample
1	신동1 아카시아+밤 (벌집)	10	털보양봉원 (아카시아꿀) [경주시 안강읍]
2	신동2 아카시아+밤 (벌집)	11	털보양봉원 (밤꿀) [경주시 안강읍]
3	명품 벌꿀 [칠곡 제일양봉산업]	12	털보양봉원 (대추꿀) [경주시 안강읍]
4	신도불이 벌꿀 [경산 평사 휴게소]	13	털보양봉원 (잡화꿀) [경주시 안강읍]
5	군위벌꿀 [군위군 양봉연구회]	14	무설탕 밤꿀
6	벌꿀 pure honey [제철]	15	설탕 (반봉개)
7	토함산 꿀벌세상 (잡화꿀) [홍만의, 경주시 양남면]	16	설탕 (미봉개)
8	토함산 꿀벌세상 (아카시아꿀) [홍만의, 경주시 양남면]	17	설탕 (맨 밑부분)
9	토함산 꿀벌세상 (대추꿀) [홍만의, 경주시 양남면]	18	제천 토종꿀 [제천 심산 채취]

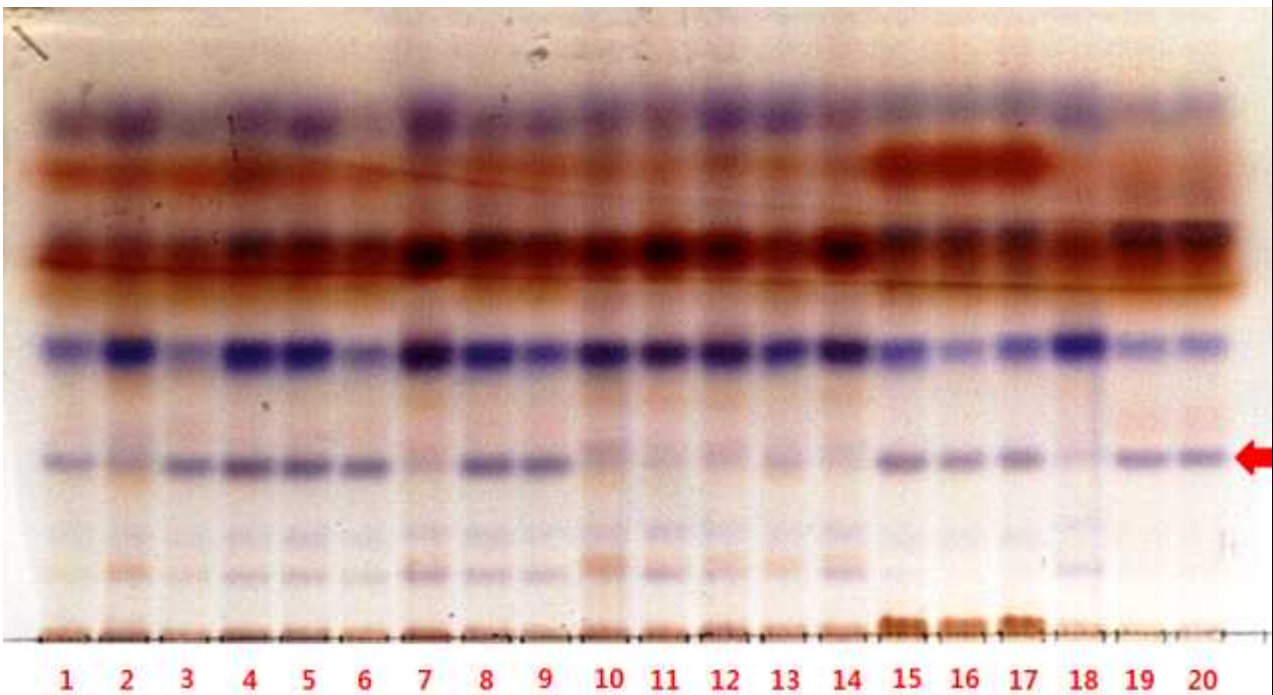


그림 17. 한국 꿀 시료의 분석 결과 (2016년 8월)



표 2. 중국 꿀 목록 (2016년 8월)

No.	Sample	No.	Sample
1	토봉밀 (년 수회) [금화시 농가]	10	영양밀운 [북건성 복주시 상점]
2	토봉밀 (년 일회) [금화시 농가]	11	야생국화꿀 [북선성 복주시 상점]
3	이탈리안 아카시아 [금화시 농가]	12	아카시아꿀 [북선성 복주시 상점]
4	이탈리안 계피 [금화시 농가]	13	자운영꿀 [상해시 상점]
5	이탈리안 벌집 [농가]	14	아카시아꿀 [상해시 상점]
6	중국 농가 1 [농가]	15	봉밀 (잡화꿀) [산시성 운성시 상점]
7	중국 농가 2 [농가]	16	토봉밀 [산시성 운성시 상점] [중국 토종]
8	느티나무 꽃향이 사방에 풍긴다 [북건성 복주시 상점]	17	야생계수나무꽃꿀 [광시성 계림시 상점]
9	봉밀 (계수나무80+피나무20) [북건성 복주시 상점]		

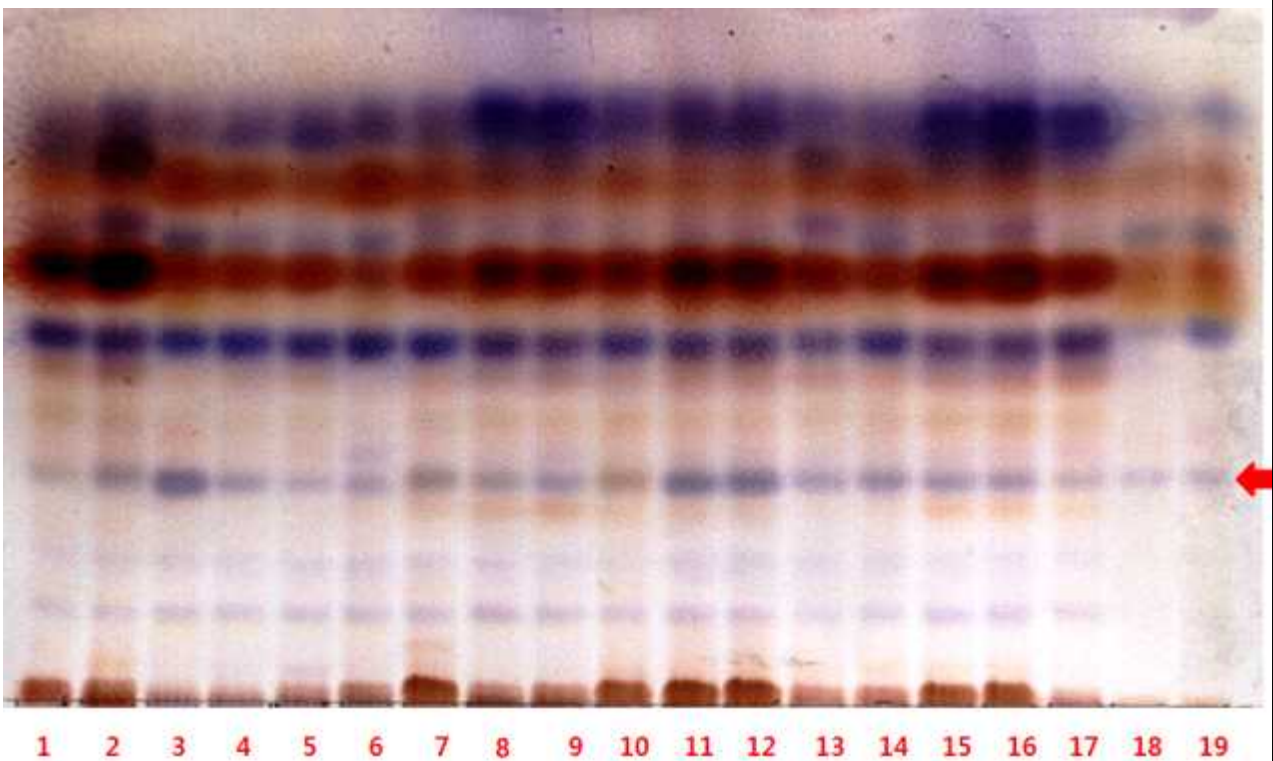


그림 18. 중국 꿀 시료의 분석 결과 (2016년 8월)



표 3. 해외 꿀 목록 (2016년 8월)

No.	Sample	No.	Sample
1	Alnaqaa honey (Spring flowers)	11	ROYAL FIR HONEY [독일산]
2	Alnaqaa honey (Greek strawberry tree)	12	miel de citronnier [프랑스산]
3	희03 유채	13	아카시아꿀 [독일산]
4	희01 때죽	14	Mielizia Arancio de Sud d'Italia [이탈리아산]
5	Nectaflor (야생꽃꿀)	15	Mielizia Eucalipto del la Costa Ionica [이탈리아산]
6	Nectaflor (오렌지&아카시아꿀)	16	Creamy honey [일본산]
7	Nectaflor (산벚꽃꿀)	17	벌꿀 (백화꿀) [일본산]
8	Canada pure honey	18	Orange blossom honey [미국산]
9	하치미쯔	19	Real raw honey [미국산]
10	순수들 벌꿀 [일본산]	20	Pure HONEY (wild honey) [미국산]

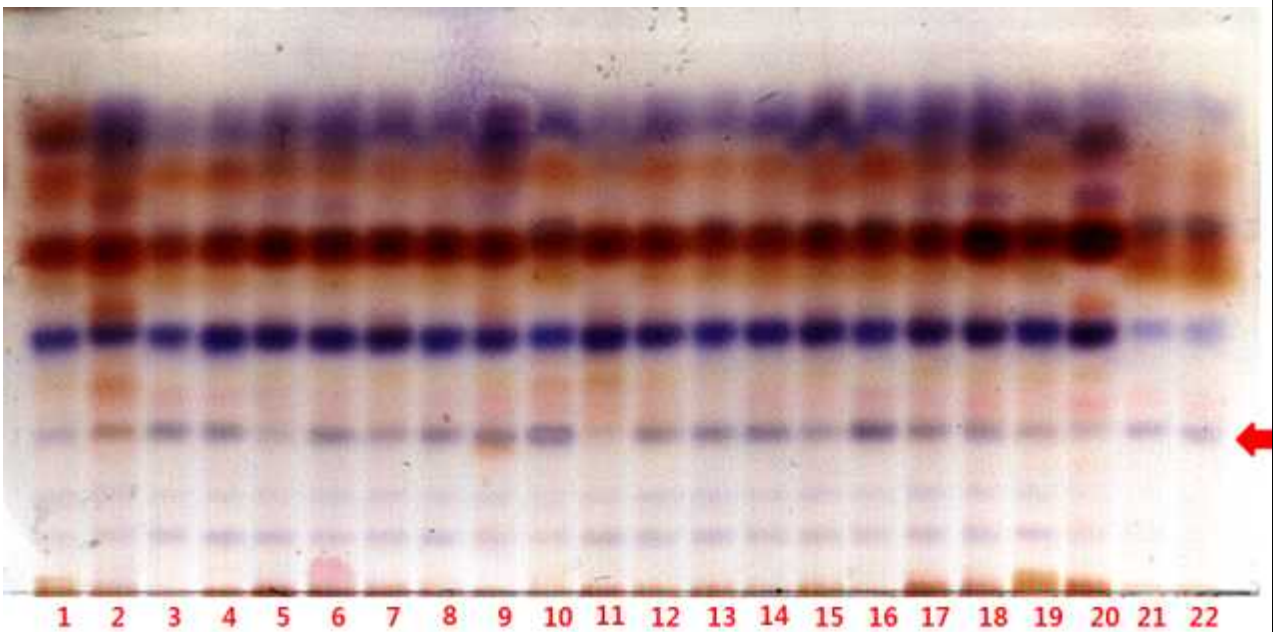


그림 19. 일본 꿀 시료 분석 결과 (2016년 8월)

표 4. 한국 꿀 목록 (2016년 9월)

No.	Sample	No.	Sample
1	방산 꿀(아카시아꿀) [양구농협]	11	자연벌집꿀 [양평농업기술센터]
2	청밀 잡화꿀 [한국양봉농협]	12	잡화꿀 [양평농업기술센터]
3	청밀 아카시아 [한국양봉농협]	13	잡화꿀 [양평농업기술센터]
4	운상복 벌꿀가족(밤꿀) [에덴양봉원]	14	유채꿀 [양평농업기술센터]
5	운상복 벌꿀가족(잡화) [에덴양봉원]	15	오뚜기 벌꿀 아카시아 [오뚜기 영월 농협가공사업소]
6	운상복 벌꿀가족(아카시아) [에덴양봉원]	16	오뚜기 벌꿀 잡화 [오뚜기 영월 농협가공사업소]
7	Bulgaria sweet honey [BG QUALITY HONEY]	17	운상복 벌꿀가족(대추나무) [에덴양봉원]
8	아카시아+잡화꿀 [양평농업기술센터]	18	방산 꿀(잡화꿀) [양구농협]
9	밤+잡화꿀(새소비) [양평농업기술센터]	19	토봉(야생화) [양평농업기술센터]
10	밤꿀 [양평농업기술센터]	20	토봉(농가분) [양평농업기술센터]

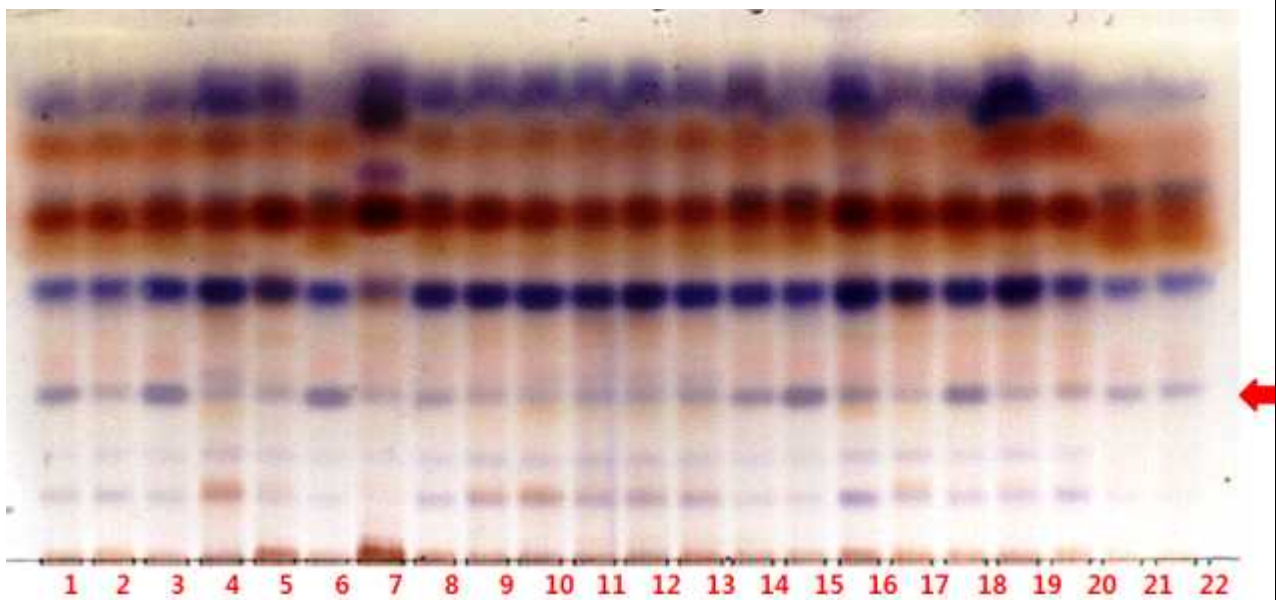


그림 20. 한국 꿀 시료 분석 결과 (2016년 9월)

- 전개된 각 TLC 마지막 2개의 lane은 사탕수수 사탕무 설탕을 TLC 상에서 spotting 하여 전개한 것으로 대조물질로 사용하여 다른 꿀 시료와 비교했다. 붉은 화살표가 지칭하고 있는 사탕수수

사탕물 설탕의 band가 꿀 시료에서도 확인이 된다면 이는 설탕을 이용하여 생산한 사탕 꿀이나 인조 꿀로 판명이 된다.

#### 다. 벌꿀의 탄소동위원소비 비교 분석

##### ● 서론

- 토봉과 양봉으로 생산된 벌꿀 시료의 탄소동위원소비를 각각 분석 비교하여 차이점을 규명하고 이를 토봉과 양봉 꿀 분류의 기초 자료로서 활용하는데 의의가 있다.

##### ● 시료의 채집과 분석 방법

###### a) 시험군 규모

- 서양종 꿀벌(양봉) : 4군
- 동양종 꿀벌(토봉) : 4군

###### b) 시험(채밀) 장소 : 양평군농업기술센터 총괄

- 서양종 꿀벌(양봉) : 양평군 강하면 왕창리 양경열 농가
- 동양종 꿀벌(토봉) : 양평군 단월면 덕수리 박명주 농가

###### c) 채밀 시기(회수) :

- 서양종 꿀벌(양봉) : 5. 28 ~ 8. 10 (6회)
- 동양종 꿀벌(토봉) : 6. 26. (1회)

###### d) 벌꿀 탄소동위원소비 분석 장비

- 안정동위원소질량분석기 (SIR-MS : Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer, UK)
- 원소분석기(EURO EA : Elemental Analyzer, Italy)

###### e) 벌꿀 샘플 채취 방법 (서양종꿀벌(양봉) 벌꿀 채취)

- 서양종꿀벌의 월동이후 자연(야생)의 벚꽃 등이 개화를 마치고 아카시아 개화초기에 정리채밀을 실시하고 2단 계상군으로 편성하였다. 이후에는 전혀 사양을 실시하지 않았다. 2단 계상으로 육성한 서양종꿀벌의 하단부에는 여왕벌의 산란공간을 마련해주고 1단과 2단 사이에 수평격왕판을 설치하여 여왕벌이 상단(계상)에 올라가 산란을 할 수 없도록 하고, 상단부(계상)에는 정리채밀한 빈소비와 새 소초광을 넣어주고 조소토록 하여 저밀공간을 마련토록 하였다.
- 2층 계상의 빈 소비에 벌꿀이 채워지고 1/3내외 붓개가 되면 채밀기를 활용하여 벌꿀을 채취하였다. 채밀시에는 여왕벌의 산란이 전혀 없는 2층 계상의 저밀소비만 채밀하여 유충이 벌꿀에 혼입되는 것을 방지하였다.
- 5월 28일~ 8월 10일까지 자연(야생)의 아카시아, 밤, 야생화 등의 밀원식물이 개화하여 꿀을 분비하는 시기에 6회 채밀하였다. 일반적으로 7~8월은 장마철 무밀기로 알려져 있으나 금년에는 특이하게 비가 적은 탓인지 3회에 걸쳐 채밀을 하였다.

###### f) 벌꿀 샘플 채취 방법 (동양종꿀벌(토봉) 벌꿀 채취)

- 자연(야생)의 아카시아, 밤, 야생화 등의 밀원식물이 개화하는 유밀기에 시험봉군(벌통)에 새 소초광을 넣어주고, 설탕물 등의 사양 없이 조소 및 저밀한 천연벌꿀을 채취하였다. 양봉과 달리 봉군세력이 약하고 여왕벌의 격리가 용이치 않아 전체 소비에 산란을 하는 경향이 있어 채밀에 제한적이었다.

● 분석결과

표 1. 벌꿀 샘플 채취 및 분석 결과

구 분	벌꿀 샘플 검사 결과				채밀일자	
	탄비 1차 (%)	탄비 2차 (%)	수분 (%)	당도 (Brix)		
양 봉 꿀	아카시아꽃꿀	-24.51	-24.44	15.2	83.0	5. 28
	잡화+밤꽃 꿀	-25.00	-24.97	16.7	81.1	6. 17
	밤꽃꿀	-25.48	-25.51	19.6	78.7	6. 23
	자연벌집꿀	-26.15	-26.15	17.8	80.2	7. 15
	야생화꿀	-25.48	-25.58	17.6	80.6	7. 21
	야생화꿀	-26.03	-26.02	15.5	83.6	8. 10
	평균	-25.44 ± 0.61	-25.45 ± 0.64	17.1 ± 1.64	81.2 ± 1.82	
토종꿀	-24.39	-24.34	18.7	79.9	6. 26	



그림 1. 벌꿀 샘플 주관기관 제출 사진자료

표2. 꿀 시료의 탄소 동위 원소비 분석 결과

(양평군농업기술센터)

순번	샘플번호	탄비 검사 결과 (%)					수분 (%)	당도 (Brix)	상품명 (별표 정보)
		1차	2차	3차	평균	표준 편차			
1	x-043-2	-24.61	-24.61	-24.60	-24.61	±0.00	18.4	80.2	청밀 잡화 양봉농협(안성)
2	x-044-1	-24.10	-24.13	-24.11	-24.11	±0.01	18.4	80.0	청밀 아카시아 양봉농협(안성)
3	x-073-1	-22.45	-22.46	-22.49	-22.47	±0.02	17.6	80.9	윤상복 벌꿀가족(잡화) 형성
4	x-074-1	-23.61	-23.61	-23.60	-23.61	±0.00	18.7	79.8	윤상복 벌꿀가족(아카시) 형성
5	x-101	-24.02	-23.99	-24.00	-24.00	±0.01	17.0	81.5	비무장지대꿀(야생화) 홍익벌꿀(과주)
6	x-119	-23.87	-23.94	-24.84	-24.22	±0.42	18.0	80.6	벌꿀 pure honey 제천
7	x-123	-23.57	-23.47	-23.57	-23.54	±0.04	18.1	80.5	털보양봉원(아카시아) 경주
8	x-124	-24.43	-24.41	-24.53	-24.46	±0.05	16.9	80.9	털보양봉원(밤꿀) 경주
9	x-139	-23.86	-23.86	-23.94	-23.89	±0.04	18.3	80.1	오뚜기벌꿀(아카시아) 영월
10	x-140	-25.82	-26.03	-25.93	-25.93	±0.07	18.5	79.9	오뚜기벌꿀(잡화) 영월
11	w-050	-25.92	-25.92	-26.01	-25.95	±0.04	18.8	79.6	캐나다 퓨어 허니
12	w-051	-25.17	-25.41	-25.13	-25.24	±0.12	18.5	79.8	하치미즈 (일본)
13	w-053	-23.96	-23.97	-23.84	-23.92	±0.06	17.4	81.0	ROYAL FIR HONEY(독일)
14	c-002	-24.58	-24.57	-24.57	-24.57	±0.00	18.4	80.4	토봉밀(년 1회) 중국금화시 농가
15	c-011	-25.84	-25.78	-25.96	-25.86	±0.07	19.0	79.4	야생국화꿀 중국북건설상점
16	y-024	-24.83	-24.75	-24.84	-24.81	±0.04	17.8	80.8	충주팜
17	y-031	-12.10	-12.10	-12.09	-12.10	±0.00	16.0	82.2	지리산IC쌍용휴게소 토종(벌집) 전북, 남원시
18	y-032	-12.75	-12.53	-12.70	-12.66	±0.09	14.5	84.2	지리산 벌통 벌꿀 남원시
19	y-038	-24.47	-24.51	-24.35	-24.44	±0.06	18.6	79.8	2016.토봉(야생화) 양평농업기술센터
20	y-039	-20.93	-20.86	-20.88	-20.89	±0.03	21.2	77.2	2015토봉(농가비매품) 양평농업기술센터

표 3. 꿀 시료의 탄소 동위 원소비 분석 기관별 분석 결과 비교

(단위: ‰)

순번	시료명	양평센터 탄비값 (a)	양봉농협 탄비값 (b)	양봉협회 탄비값 (c)	평균 (a~c)	표준 편차 (a~c)	상품명 (별꽃 정보)
1	x-043-2	-24.6	-25.4	-24.1	-24.7	±0.66	청밀 잡화 양봉농협(안성)
2	x-044-1	-24.1	-25.1	-24.3	-24.5	±0.53	청밀 아카시아 양봉농협(안성)
3	x-073-1	-22.5	-23.3	-23.1	-23.0	±0.43	윤상복 벌꿀가족(잡화) 횡성
4	x-074-1	-23.6	-24.4	-24.2	-24.1	±0.41	윤상복 벌꿀가족 (아카시) 횡성
5	x-101	-24.0	-24.9	-24.2	-24.4	±0.47	비무장지대꿀(야생화) 홍익벌꿀(파주)
6	x-119	-24.2	-24.9	-24.1	-24.4	±0.43	벌꿀 pure honey 제천
7	x-123	-23.5	-24.2	-24.1	-23.9	±0.36	털보양봉원(아카시아) 경주
8	x-124	-24.5	-25.2	-24.4	-24.7	±0.45	털보양봉원(밤꿀) 경주
9	x-139	-23.9	-24.6	-24.4	-24.3	±0.37	오뚜기벌꿀(아카시아) 영월
10	x-140	-25.9	-26.8	-25.0	-25.9	±0.90	오뚜기벌꿀(잡화) 영월
11	w-050	-26.0	-26.9	-25.0	-26.0	±0.95	캐나다 퓨어 허니
12	w-051	-25.2	-25.9	-24.7	-25.3	±0.60	하치미즈 (일본)
13	w-053	-23.9	-24.7	-24.4	-24.3	±0.39	ROYAL FIR HONEY(독일)
14	c-002	-24.6	-25.5	-24.1	-24.7	±0.71	토봉밀(년 1회) 중국금화시 농가
15	c-011	-25.9	-26.7	-24.9	-25.8	±0.90	야생국화꿀 중국북건설상점
16	y-024	-24.8	-25.7	-24.4	-25.0	±0.66	충주팜
17	y-031	-12.1	-12.1	-12.5	-12.2	±0.23	지리산IC쌍용휴게소 토종(벌집) 남원시
18	y-032	-12.7	-12.7	-13.0	-12.8	±0.19	지리산 벌통 벌꿀 남원시
19	y-038	-24.4	-25.1	-24.4	-24.6	±0.39	2016토봉(야생화,비매) 양평농업기술센터
20	y-039	-20.9	-21.3	-21.2	-21.1	±0.21	2015토봉(농가 비매품) 양평농업기술센터

2016 꿀 샘플 채취 및 탄소비 검사 결과

(양평군농업기술센터)

표 4. 양봉 꿀 시료의 탄소동위원소비 분석 결과 (2016년)

구 분		검 사 결 과				채밀일자
		13c 1차 (‰)	13c 2차 (‰)	수분 (%)	당도 (Brix)	
양 봉	아카시아꿀	-24.51	-24.44	15.2	83.0	5/28
	잡화+밤꽃꿀	-25.00	-24.97	16.7	81.1	6/17
	밤꽃꿀	-25.48	-25.51	19.6	78.7	6/23
	자연벌집꿀	-26.15	-26.15	17.8	80.2	7/15
	야생화꿀	-25.48	-25.58	17.6	80.6	7/21
	야생화꿀	-26.03	-26.02	15.5	83.6	8/10
	유채꽃꿀	-26.46	-26.45	20.2	78.2	부산

표 5. 토종 꿀 시료의 탄소동위원소비 분석 결과 (2016년)

구 분		검 사 결 과				비고
		13c 1차 (‰)	13c 2차 (‰)	수분 (%)	당도 (Brix)	
토 종	야생화	-24.39	-24.34	18.7	79.9	6월
	15년산 농가분	-20.69	-20.66	21.3	77.4	비매품



### 3) 제 1협동 과제

#### 가. 제1세부에서 제공받은 벌꿀종류별 단클론항체 정제

- 벌꿀 감별용 신속검사 카트리지를 제작을 위해 3개 type의 단클론항체를 정제하여 확보하였다.

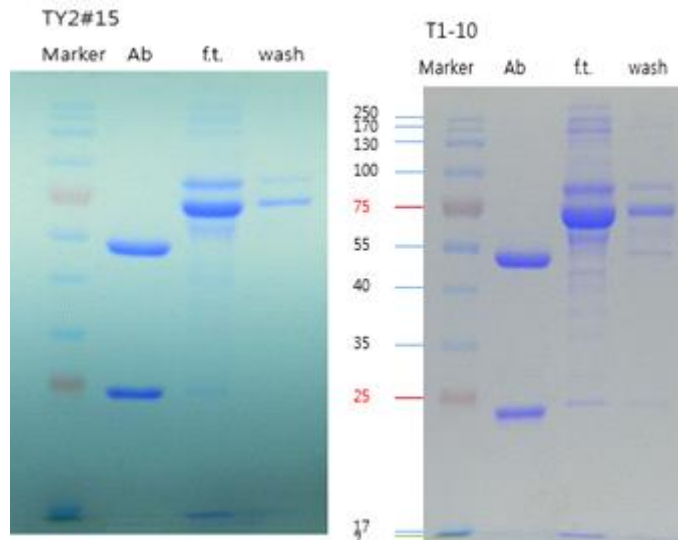


그림1. 항체 정제

Gel conc.	12%
Electrophoresis apparatus	Hoefer (SE250)
1 Lane	T&I prestained marker
2 Lane	Antibody (denature)
3 Lane	Flow through
4 Lane	Wash

- 토중, 양봉, 토중/양봉 3개 단클론항체를 각각 정제하여 사이즈를 확인하였으며, 확보된 토중과 양봉꿀을 통해 항체를 serial dilution 하여 반응성을 확인하였다. 각각의 토중, 양봉꿀을 1/40으로 희석하여 ELISA plate에 고정화 시킨후 각각의 정제된 항체를 dilution하여 반응성을 확인하였다.

- 아래의 측정결과는 꿀 원료에 따라 반응이 이루어지는 것을 확인하였다.

antibody dilution (ug/ml)	Y003 (토중)	X30 (양봉)	Y003 (토중)	X30 (양봉)	antibody dilution (ug/ml)	X30 (양봉)	Y003 (토중)
	TY2#15		T1-10				
5	1.1921	1.1648	1.0868	0.1928	1	3.87	2.18
2.5	1.1281	1.0936	1.0944	0.1152	0.5	3.96	1.59
1.25	1.1044	1.0833	1.0493	0.1074	0.25	3.89	1.30
0.625	1.1114	1.0982	1.0371	0.0679	0.125	4.00	1.12
0.3125	1.1229	1.0587	1.0004	0.0626	0.0625	3.99	1.00
0.15625	1.1023	1.0655	0.9748	0.051	0.0313	3.87	0.88
0.078125	1.0367	1.0067	0.8916	0.0469	0.0156	3.86	0.86



0.039063	1.0713	0.9785	0.8895	0.0446	0.0078	3.29	0.56
0.019531	0.8742	0.8847	0.6676	0.0591	0.0039	1.95	0.41
0.009766	0.7076	0.7681	0.5232	0.044	0.0020	1.49	0.38
0.004883	0.5493	0.5551	0.3561	0.0432	0.0010	0.60	0.20
0.002441	0.3813	0.3697	0.2497	0.0447	0.0005	0.47	0.23
0.001221	0.2423	0.2372	0.1676	0.0434	0.0002	0.45	0.14
0.00061	0.1518	0.1479	0.111	0.0458	0.0001	0.15	0.11
0.000305	0.1082	0.0986	0.0795	0.0547	0.0001	0.12	0.12
0	0.0488	0.0434	0.0625	0.0439	0	0.11	0.09

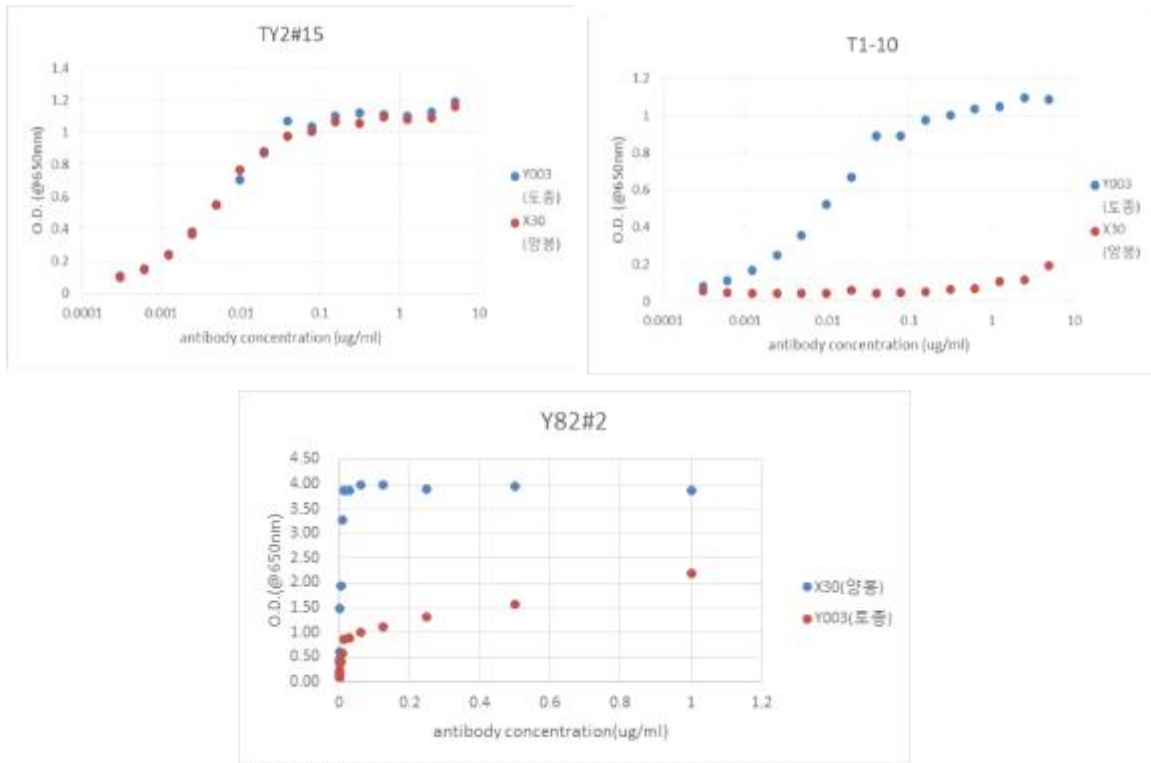


그림2. 각 정제항체별 반응성

#### 나. 벌꿀종류별 특정 조건 및 반응 최적화

- Detector dilution buffer(DDB) 종류에 따른 sample의 반응성을 확인하였다. 먼저 DDB에 계면활성제가 포함여부에 따른 반응성을 확인하였으며, 이때 sample을 순차적으로 희석하여 test 면적값을 비교하였고, 두 번째로는 정제된 항체에 형광 conjugator의 농도를 비교하였다. 반응성 평가시 sample과 buffer는 1:2로 혼합하였고, buffer에는 토종을 detection 할 수 있는 항체에 형광이 conjugation되어 각 sample에 대한 면적값을 확인하였다.

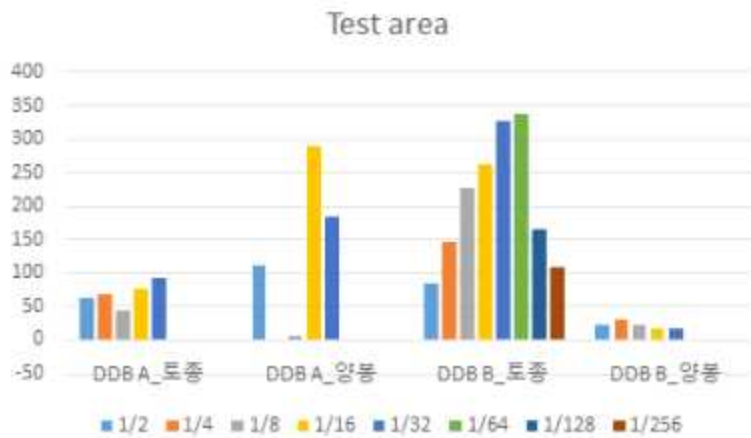


그림3. DDB 종류에 따른 반응성

- 위 그림에서 DDB A는 detergent가 없는 용액이며, DDB B는 detergent가 포함이 된 용액이다. 위 결과에서와 같이 DDB A에서는 sample 희석에 따라 반응성 차이가 없거나, 비특이 반응이 보이는 등의 결과가 나타났지만, detergent가 포함된 DDB B에서는 양봉 sample에서는 sample의 희석에 관계없이 지극히 적은 양이 나타나는 것이 확인되었고, 토중 sample을 희석함에 따라 면적값이 점차 증가되다가 1/64이후부터 감소되는 것으로 나타났다. 위 결과에 따라 sample을 1/32~1/64로 희석한 후 DB와 1:2로 혼합할 경우가 가장 반응성이 큰 것으로 나타났다.
- 그림 3에서 test 면적값이 250~350 정도 측정이 되었는데, 감도 향상을 위해 토중항체에 형광이 conjugation된 conjugator 농도를 확대하여 추가적으로 반응성을 확인하였다. 이때는 이전 실험에서 반응성이 좋게 나타난 1/16~1/64로 희석된 sample을 이용하여 측정하였다.

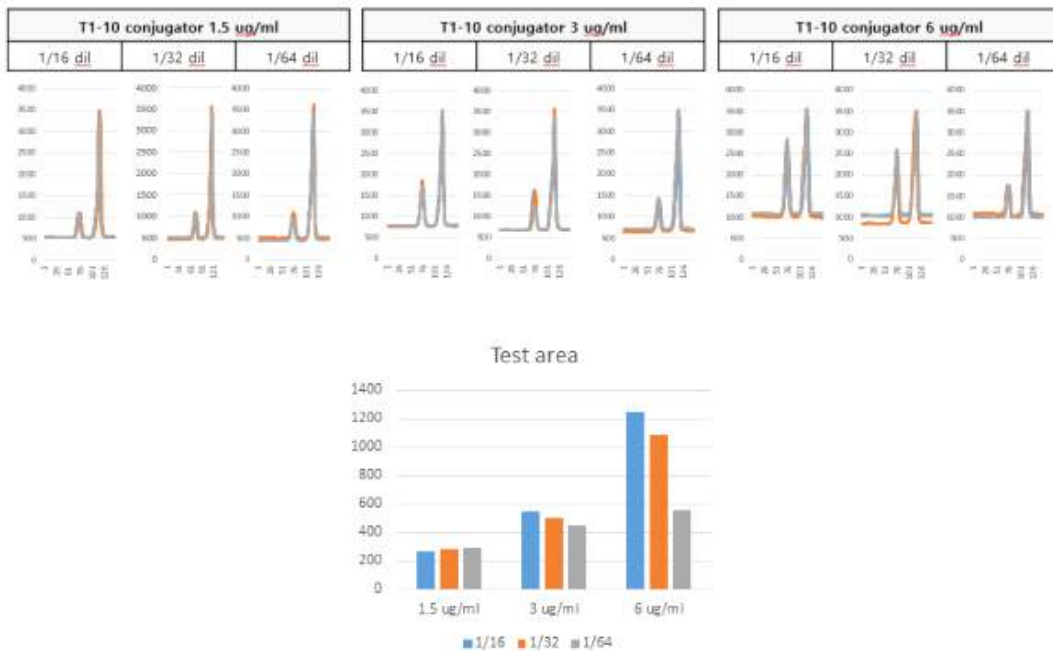
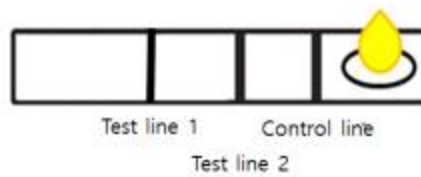


그림4. 형광 conjugator 농도에 따른 반응성

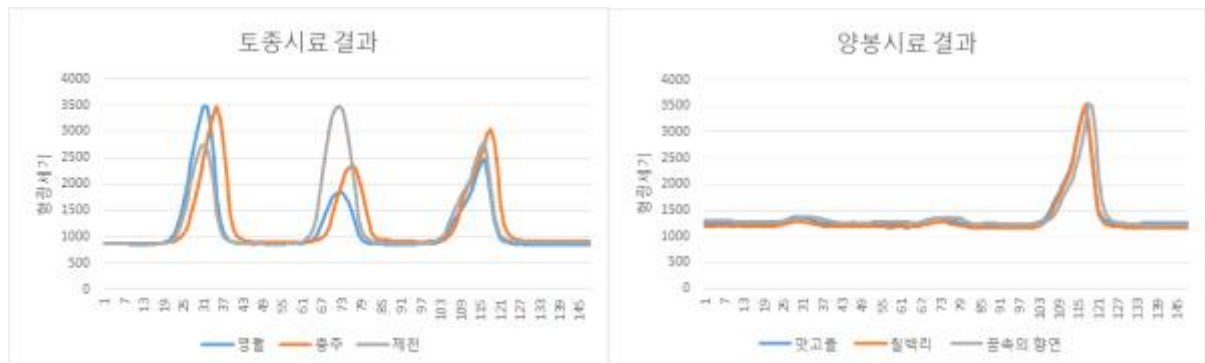
- 그림 4에서와 같이 detector conjugator의 양을 1.5ug부터 6ug까지 증가시켜 test 면적값을 확인한 결과, conjugator의 양이 증가할 수로 비례적으로 test 면적값도 같이 증가되는 것을 확인하였고, 특히 6ug을 사용한 경우 가장 큰 면적값이 나타내기에 DB에 혼합되는 conjugator의 양은 6ug으로 설정하였다.

**다. 동시검사를 위한 3-line 적용 및 시료별 interference 평가**

- 벌꿀 동시검사를 위해 3-line 적용을 위한 설계를 진행하였고 이에 대한 적용평가 및 비특이 반응성을 확인하고 있다.



- 현재 test line 1과 2에 토종/양봉 항체, 토종항체, 양봉항체를 서로 조합시켜 반응성 평가와 함께 비특이가 적은 조합쌍을 선별하고 있다.



- 위에서 선별 된 토종/양봉항체, 토종항체, 양봉항체를 통해 3-line 적용을 위한 interference 평가를 진행하였다. Test line 1은 양봉항체를 Test line 2에는 토종/양봉항체를 종이 membrane에 고정화 하였으며, detection 항체로 토종항체에 형광을 conjugation하여 꿀 type별로 반응성을 확인하였다. 시료를 1:16으로 희석한 후 희석된 시료를 detection buffer와 1:2 비율로 혼합한 후 카트리지에 10분간 반응하여 면적값을 확인하였다.
- 토종시료 결과에서 Test line 2는 토종/양봉을 모두 탐지할 수 있는 항체가 고정화 되어 있고, detector로 토종만 탐지할 수 있는 항체가 형광에 conjugation 되어있어 토종시료의 함유량에 따라 peak 크기가 다르게 나타나는 것을 확인하였다.
- 그러나, 양봉항체가 고정된 Test line 1에서도 토종시료를 사용했음에도 불구하고 peak이 발생되었는데, 이는 위의 정제항체별 ELISA 반응성 결과에서 보듯이, 양봉항체는 토종과 양봉시료 모두에서도 반응성이 나타났기에 이런 결과가 나타난 것으로 판단된다.
- 양봉시료 결과에서 양봉시료에는 토종항체와 반응성이 없기에 Test line 1(양봉항체)과 Test line 2(토종/양봉 항체)에서 peak이 나타나지 않고 control line만 나타나는 것을 확인하였다.
- 3-line 적용을 위해 양봉항체 고정화 농도 감소, 3-line 재설계 및 신규 양봉항체 적용 등을 평가하여 동시검사를 위한 3-line 최적화를 진행할 예정이다.

4) 제 2협동 과제

가. SPE와 GC를 이용한 raffinose와 theanderose의 분석 방법 개발

- Envi-Carb SPE cartridge (Supelclean)을 이용하여 벌꿀로 raffinose를 추출하는 방법을 개발하였음. 10% 벌꿀 용액을 Envi-carb SPE cartridge에 주입한 후 증류수로 세척하고 흡착된 당 성분을 methanol/ethanol(75:25)로 용출하였음. 용출된 시료는 농축 건조하였음. 건조된 시료는 1-(trimethylsilyl)imidazole과 pyridine을 일정량 가하여 80℃에서 1시간 가열하여 당유도체를 만들었음. 벌꿀의 당유도체 시료를 FID가 장착된 GC에 주입하여 분석하였음. 표준물질로서 삼당류인 raffinose, kestose, panose, erlose, melezitose의 당유도체를 또한 GC로 분석하였음. 이 결과 raffinose와 kestose가 유사한 retention time에 용출되어 분별할 수 없어 GC로 분석이 불가능하다고 결론을 내림.
- Envi-Carb SPE cartridge (Supelclean)을 이용하여 추출한 시료에 galactose oxidase assay를 이용하여 생성된 색을 425nm에서 흡광도를 측정하여 시료 내 raffinose의 함량을 결정하였음. 측정 온도와 시간을 30℃에서 1시간으로 하였음. 이 결과 raffinose 함량과 흡광도가 직선 상관관계를 나타내었음 (표 1). 그러나 실험 간에 재현성이 낮아, 실험 방법의 개선이 요구되었음. 따라서 벌꿀 시료들 중간에 raffinose 표준 용액을 넣어 측정하여 실험의 적절성 여부를 검증하였음.

표 1. Galactose oxidase assay에서 표준 raffinose와 흡광도의 상관관계

Raffinose (mg/100mL)	A425
0	0
1.34	0.052
2.68	0.101
4.02	0.170
8.04	0.546

나. 아카시아꿀, 밤꿀, 잡화꿀, 사탕수수설탕, 사탕무설탕, 전화당 내 raffinose와 theanderose의 분석

- 국산 아카시아꿀 17제품, 잡화꿀 12제품, 사탕꿀 5제품과 외국산 사탕무설탕 3제품, 본 연구에서 만든 사탕무설탕 사탕꿀 1개를 시료로하여 raffinose와 betaine 함량을 측정하였음.
- 1차년도에 확립한 방법에 따라 벌꿀을 Strata SCX SPE tube (Phenomenex)를 이용하여 betaine을 추출하였으며 4-bromophenylacyl triflate 유도체를 만들어 HPLC 방법으로 벌꿀 내 betaine 함량을 분석하였음.
- Envi-carb SPE tube (Supelclean)를 사용하여 raffinose를 추출하였으며 galactose oxidase 반응을 이용하여 A425를 측정하여 벌꿀 내 raffinose 함량을 분석하였음.
- 미국, 프랑스, 일본에서 생산된 사탕무설탕 3제품과 사탕무설탕 사탕꿀의 betaine과 raffinose의

함량을 조사하였다 (표 2). 사탕무설탕 3 제품 중에서 일본산 사탕무설탕이 betaine과 raffinose의 함량이 모두 가장 높았다. 사탕무설탕 사양꿀은 betaine 함량이 벌꿀 사양 원료로 사용한 프랑스산 사탕무설탕에 비해 45%이었으며 raffinose 함량은 83%에 도달하였다. 사탕무설탕 사양꿀의 수분 함량(20% 이상)과 사양 중 꽃꿀이 혼입되었을 것을 감안하면 raffinose 함량이 너무 높았다.

표 2. 사탕무설탕과 사탕무설탕사양꿀의 betaine과 raffinose의 함량

시료	Betaine (mg/kg)		Raffinose (mg/kg)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
사탕무설탕 (미국)	17	1	410	1
사탕무설탕 (프랑스)	27	4	470	16
사탕무설탕 (일본)	243	35	1,300	36
사탕무설탕 사양꿀	12	0	390	11

- 시중에서 구입한 아카시아꿀 17제품에 대한 betaine과 raffinose의 함량을 분석하였다 (표 3). 아카시아꿀의 betaine 함량은 0.4-5.2 mg/kg이고 raffinose 함량은 3-143 mg/kg이었다. Betaine 함량이 높은 시료 4와 시료 9는 또한 raffinose 함량이 높았으나 시료 14는 betaine 함량이 낮음에도 raffinose 함량이 높았다.

표 3. 국산 아카시아꿀의 betaine과 raffinose의 함량

시료 번호	Betaine (mg/kg)		Raffinose (mg/kg)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
1	1.1	0.5	24	1
2	0.5	0.0	21	11
3	0.5	0.2	24	5
4	0.6	0.3	5	4
5	5.2	2.4	143	6
6	0.9	0.1	49	1
7	0.4	0.0	19	1
8	0.7	0.0	12	17
9	3.6	0.1	116	3
10	1.5	0.0	22	27
11	2.8	0.3	34	34
12	2.2	0.2	37	25
13	0.5	0.0	81	64
14	1.4	0.0	126	3
15	1.4	0.5	67	81
16	1.1	0.1	43	7
17	1.7	0.4	3	4

- 시중에서 구입한 잡화꿀 12제품에 대한 betaine과 raffinose의 함량을 분석하였다 (표 4). 아카시아꿀의 betaine 함량은 0.0-2.5 mg/kg이고 raffinose 함량은 120-1,400 mg/kg이었다. Betaine의 함량은 표1의 사탕무설탕 사양꿀 보다 낮았으나 raffinose 함량이 더 높은 시료가 4개 되었다. 따라서 잡화꿀의 경우에는 꽃꿀로부터 raffinose가 유입되는 것으로 사료된다. 따라서 raffinose

함량으로부터 사탕무설탕의 혼입 여부를 알 수 없다.

표 4. 국산 잡화꿀의 betaine과 raffinose의 함량

시료 번호	Betaine (mg/kg)		Raffinose (mg/kg)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
1	0.6	0.2	120	93
2	1.7	0.2	220	14
3	0.1	0.2	120	33
4	0.1	1.2	350	160
5	1.0	0.2	1,400	270
6	2.5	0.4	420	230
7	1.2	0.0	330	160
8	1.7	0.4	330	45
9	1.7	1.0	150	36
10	1.0	0.5	550	230
11	2.0	0.2	530	130
12	0.0	0.0	130	35

- 시중에서 구입한 사양꿀 5제품에 대한 betaine과 raffinose의 함량을 분석하였다 (표 5). 사양꿀의 betaine 함량은 0.0-0.5 mg/kg이고 raffinose 함량은 0-20 mg/kg이었다.

표 5. 국산 사양꿀의 betaine과 raffinose의 함량

시료 번호	Betaine (mg/kg)		Raffinose (mg/kg)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
1	0.0	0.0	0	0
2	0.5	0.1	19	1
3	0.2	0.2	0	0
4	0.0	0.0	20	11
5	0.3	0.4	20	11

- 표 3, 4, 5에서 조사한 결과로부터 아카시아꿀, 잡화꿀과 사양꿀의 betaine 함량에 따른 분포를 조사하였다 (그림 1). 아카시아꿀이 다수의 시료가 0-1mg/kg의 betaine 함량을 나타냈으며 일부 시료가 높은 betaine 함량 (3-5mg/kg)을 보이고 있었다. 잡화꿀도 다수의 시료가 0-1mg/kg의 betaine 함량을 보이고 있으며 1시료가 2-3 mg/kg의 betaine 함량을 보였다. 사양꿀은 전체가 betaine의 함량이 0.5 mg/kg 이하 이었다. 이상의 결과에서 betaine이 벌꿀에 혼입된 사탕무설탕사양꿀의 검출을 결정하는 적당한 방법으로 결론을 지었다.

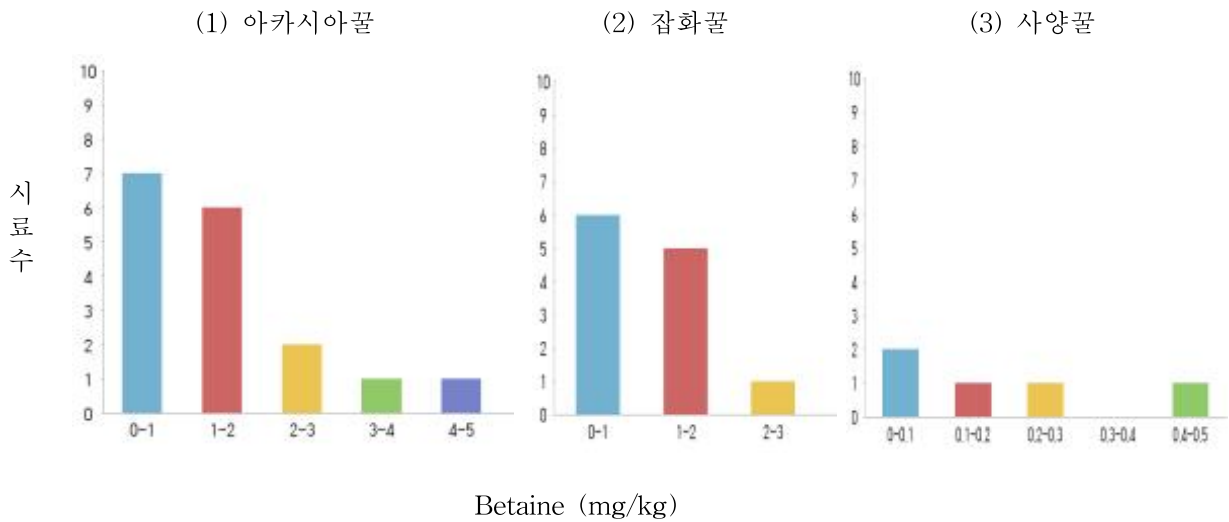


그림 1. Betaine 함량에 따른 국산 벌꿀 제품의 분포

#### 다. 벌꿀의 PCR 반응 조건의 결정 (primer 염기 서열 및 농도, 반응 온도 등)

- 양봉꿀과 토종꿀의 특이 primer의 염기서열 결정
  - 양봉꿀과 토종꿀의 특이 primer의 염기서열은 cytochrome C oxidase 유전자로부터 결정하였다. 토종벌(*Apis cerana*)와 양봉벌(*Apis mellifera*)의 mitochondria의 cytochrome oxidase subunit I 유전자의 염기서열은 Genebank의 DQ020245와 KJ396191을 참고로 조사하였다. 이 두 파일의 염기서열을 비교하여 토종꿀과 양봉꿀의 특이 primer의 염기서열을 결정하였다.

표 6. 토종꿀과 양봉꿀의 특이적 검출을 PCR에서 사용한 primer의 염기 서열

검출 벌꿀	Primer	염기서열	DNA 크기 (bp)
양봉꿀	M2-F	3081-CATCACTTGAATGATTAATTTTTTACCA-3109	206
	M2-R	3286-TTATTTTTAAATTAATATGAATTAAGTGGGG-3256	
양봉꿀	M5-F	3084-CACTTGAATGATTAATTTTTTACCACCT-3112	133
	M5-R	3216-CTTAAGTTCAATGCACTTATTCTGCC-3191	
토종꿀	C6-F	454-GGAGGGGGAGATCCAATTTA-474	178
	C5-R	621-ACCTAATATTGCGTAAATTATACCTAGATTT-591	

- 벌꿀 DNA의 추출
  - 10% 벌꿀 용액 50mL을 원심분리하여 얻은 침전물을 1mL의 TE 완충용액으로 2회 세척한 후 180μL TE 완충용액을 가한 후 20μL의 Chelex resin을 가한 후 100℃에서 가열 처리하여 원심 분리하고 상등액(DNA 용액)을 채취하여 PCR 시료로서 사용하였다.
- PCR 시료 조제
  - Gold multiplex PCR kit (Bioneer)의 tube에 DNA 용액 1μL, 각 primer (10mM) 1μL를 가한 후 증류수를 가하여 20μL의 PCR 반응액을 만들었다. DNAEngine gradient cycler (Bio-Rad)를 사

용하여 PCR 반응을 진행하였다.

● PCR 반응 조건

- 양봉꿀과 토종꿀 검출하는 primer를 동시에 반응시키는 duplex PCR을 수행하였으며 반응조건은 94℃에서 5분간 가열한 후 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초를 35회 반복하여 반응하였으며 마지막으로 72℃에서 30분 반응하였다.

● 전기영동

- PCR 반응액을 1× TAE 완충용액에 용해한 3% NuSieve 3:1 agarose gel을 사용하여 70V에서 전기영동하고 0.5mg/mL 용액에서 염색한 후 자외선을 비추어 사진을 촬영하였다.

● 토종꿀에 혼입된 양봉꿀의 검출

- 토종꿀에 양봉꿀이 0%, 1%, 5%, 10%, 50%, 90%, 100% 혼합된 10% 벌꿀 용액으로부터 DNA를 추출하여 duplex PCR을 사용하여 조사하였다.

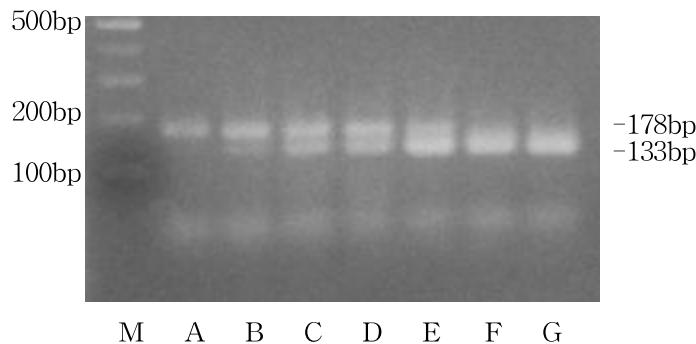


그림 2. 양봉꿀과 토종꿀이 혼합된 벌꿀에 대해 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M5F와 M5R의 양봉꿀 특이 primer를 사용한 PCR 반응. M: 100bp DNA ladder, A: 0%, B: 1%, C: 5%, D: 10%, E: 50%, F: 90%, G: 100%

- 그림 2에서 보는 바와 같이 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer는 토종꿀에서 178bp의 DNA가 합성되었으며 M5-F와 M5-R의 양봉꿀 특이 primer는 양봉꿀에서 133bp의 DNA가 합성되었다. 1% 양봉꿀을 함유하고 있는 토종꿀에서도 133bp DNA가 검출되었다.

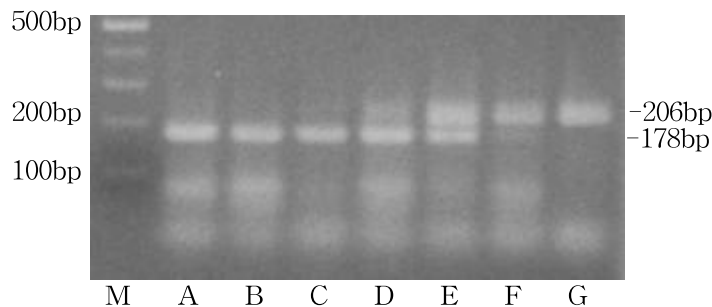


그림 3. 양봉꿀과 토종꿀이 혼합된 벌꿀에 대해 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M2F와 M2R의 양봉꿀 특이 primer를 사용한 PCR 반응. M: 100bp DNA ladder, A: 0%, B: 1%, C: 5%, D: 10%, E: 50%, F: 90%, G: 100%

- 그림 3에서 보는 바와 같이 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer는 토종꿀에서 178bp의 DNA가 합성되었으며 M2-F와 M2-R의 양봉꿀 특이 primer는 양봉꿀에서 206bp의 DNA가 합성되었다.



5% 양봉꿀을 함유하고 있는 토종꿀에서도 206bp DNA가 검출되었으나 1%에서는 검출되지 않았다.

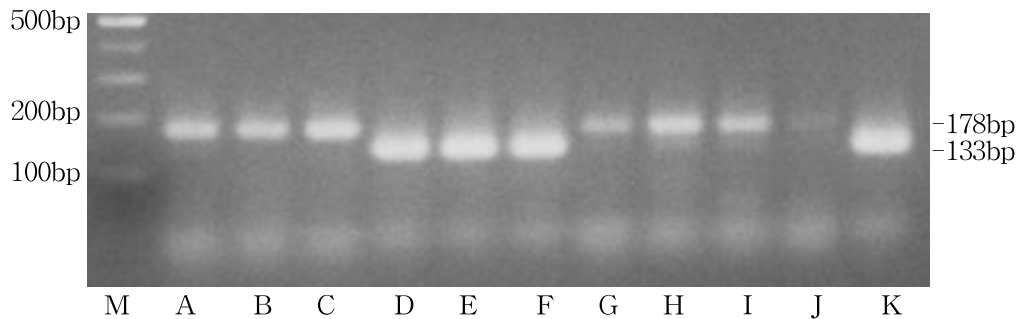


그림 4. 국내에서 수집한 토종꿀과 양봉꿀의 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M5F와 M5R의 양봉꿀 특이 primer를 사용한 PCR 반응. M: 100bp DNA ladder, A-J: 토종꿀 K: 양봉꿀

- 원주 지역에서 수집한 토종꿀(A-C), 인터넷을 통해 구입한 토종꿀(D-F), 강원도 기타 지역에서 수집한 토종꿀(G-J)와 양봉꿀(K)에서 DNA를 추출하여 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M5F와 M5R의 양봉꿀 특이 primer를 사용하여 PCR 반응을 하였다. 토종꿀 시료 중에서 인터넷으로 구입한 토종꿀이 양봉꿀 특이 DNA (133bp)가 검출되었으며 토종꿀 특이 DNA는 검출되지 않았다.

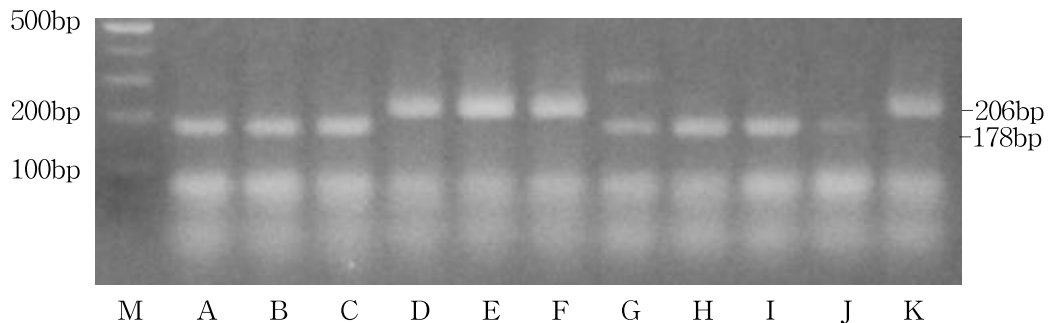


그림 5. 양봉꿀과 토종꿀이 혼합된 벌꿀에 대해 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M2F와 M2R의 양봉꿀 특이 primer를 사용한 PCR 반응. M: 100bp DNA ladder, A-J: 토종꿀, K: 양봉꿀

- 원주 지역에서 수집한 토종꿀(A-C), 인터넷을 통해 구입한 토종꿀(D-F), 강원도 기타 지역에서 수집한 토종꿀(G-J)와 양봉꿀(K)에서 DNA를 추출하여 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M2F와 M2R의 양봉꿀 특이 primer를 사용하여 PCR 반응을 하였다. 토종꿀 시료 중에서 인터넷으로 구입한 토종꿀이 양봉꿀 특이 DNA (206bp)가 검출되었으며 토종꿀 특이 DNA는 검출되지 않았다. 기타 다른 토종꿀은 토종꿀 특이 DNA (178bp)가 검출되었으며 양봉꿀은 양봉꿀 특이 DNA(206bp)가 검출되었다.

(3) 3차년도(2016년)

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도	<p><b>제1세부과제</b> : 인조꿀, 토종 꿀 및 양봉꿀 판별을 위한 ELISA 분석법의 표준화</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 인조, 토종, 양봉 꿀 ELISA 분석법의 적용에 의한 판별 여부 조사</li> <li>● 수집한 벌꿀의 ELISA 분석법에 의한 전수조사 및 분석 결과 비교 평가</li> <li>● 꿀 판별 ELISA 매뉴얼 개발</li> <li>● 벌꿀 성분 분석 자료의 통계적 비교</li> <li>● 벌꿀 가공품 규격화안 마련</li> </ul>
	<p><b>제2세부과제</b> : 사양 꿀 및 인조 꿀(가짜 꿀) 특이 성분의 분석 방법 표준화</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 사양 꿀 특이 성분의 미량 분석 기술 개발 및 표준화</li> <li>● 국내외 꿀의 methylglyoxal 함량 분포</li> <li>● 탄소 동위원소비 측정결과 보정화 및 표준화안 개발</li> </ul>
	<p><b>제1협동과제</b> : 벌꿀 진위 판별 dipstick 카트리지 시제품 제작 및 유효성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 벌꿀감별용 신속검사 카트리지 시제품 제작</li> <li>● 최저검출한계, 검출유효성, 재현성 평가</li> <li>● 벌꿀 가공품 및 벌꿀 시료를 이용한 유효성 평가</li> </ul>
	<p><b>제2협동과제</b> : Difuctose anhydride의 간이검사 방법 및 Dual PCR 방법에 의한 양봉꿀과 토종꿀 판별법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 전화당과 이성화당 내 difructose anhydride의 간이검사 방법 개발 (SPE와 TLC의 재료와 조건 결정)</li> <li>● Dual PCR 방법의 조건 결정에 의한 벌꿀 판별법 개발 (primer 염기 서열 및 벌꿀의 시료량 및 비율)</li> <li>● 벌꿀의 생산 지역 별, 생산시기별에 따라 PCR 법의 정확성 검토함</li> </ul>

1) 제 1세부 과제

가. T항체와 Y항체의 특성 및 그 이용

● T항체의 특성

- T 항체는 토종꿀만을 항원으로 인식하는 항체로, 그림 1에서 볼 수 있듯이 토종꿀, 양봉꿀, 혼합꿀, 인조꿀을 항원으로 사용한 ELISA에서 토종꿀과 혼합꿀만을 항원으로 인식하였다. Western blot에서도 마찬가지로 양봉꿀 항원에서는 밴드가 보이지 않고 토종꿀을 항원으로 사용한 line에서만 밴드가 보여 토종꿀만을 항원으로 인식하는 것을 알 수 있다. T 항체의 아이소타입은 IgG1이고 kappa 체인을 경쇄로 가지고 있다는 것을 isotype kit를 이용하여 확인했다.

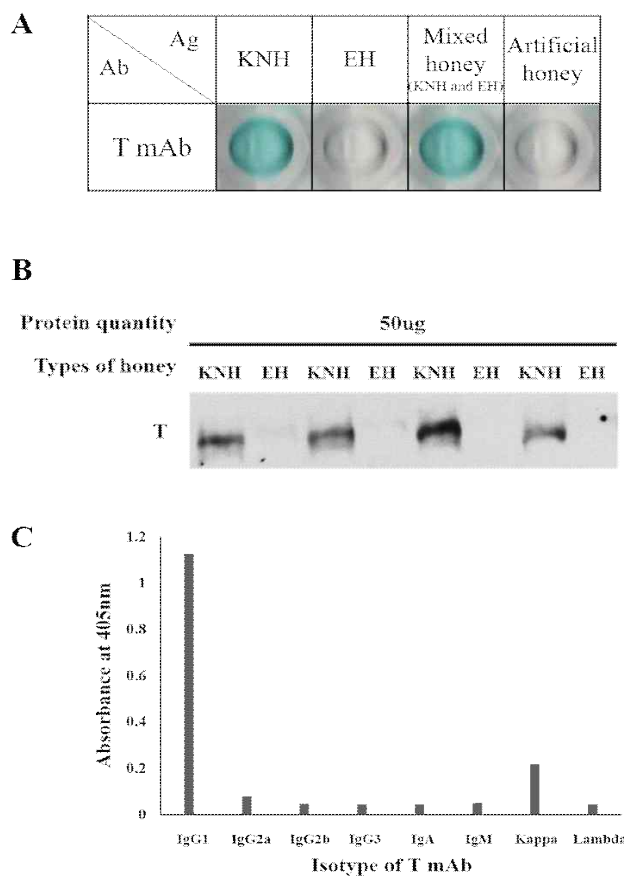


그림 131. T 항체의 특성

A. 토종꿀, 양봉꿀, 혼합꿀, 인조꿀을 항원으로 사용한 ELISA, B, Western blot, C. Isotype  
KNH : 토종꿀, EH : 양봉꿀

● Y항체의 특성

- Y 항체는 T 항체와는 반대로 양봉꿀만을 항원으로 인식하고 토종꿀은 항원으로 인식하지 않는 항체이다. 그림 2에서 보면 Y 항체는 토종꿀, 양봉꿀, 혼합꿀, 인조꿀을 항원으로 사용한 ELISA에서 양봉꿀과 양봉꿀이 섞여있는 혼합꿀만을 인식했으며, 토종꿀과 인조꿀은 인식하지

않았다. Western blot에서는 양봉꿀을 항원으로 한 line에서만 밴드를 보여 양봉꿀만을 항원으로 한다는 것을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

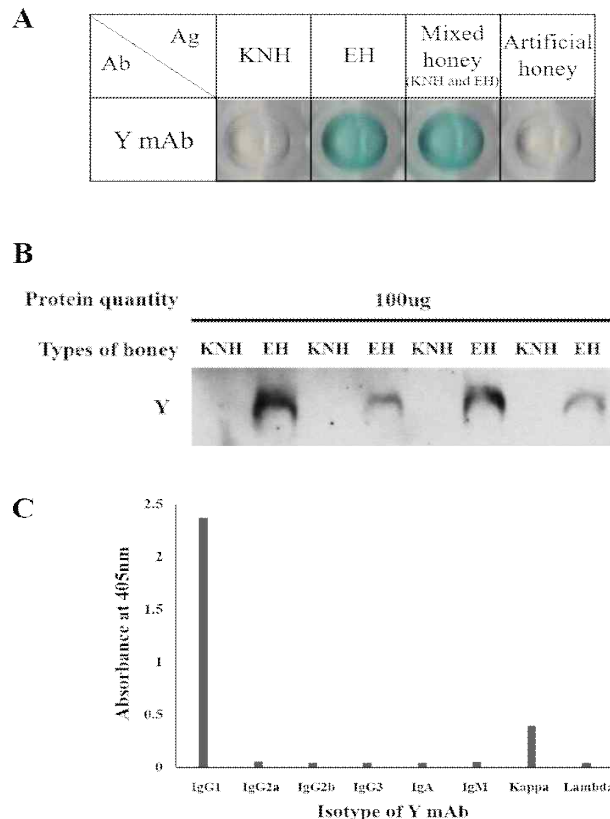


그림 132. Y 항체의 특성

A. 토종꿀, 양봉꿀, 혼합꿀, 인조꿀을 항원으로 사용한 ELISA, B, Western blot, C. Isotype  
KNH : 토종꿀, EH : 양봉꿀

- T항체와 Y항체를 이용한 판별법: 토종꿀과 양봉꿀의 진위 판별
  - T 항체와 Y 항체는 각각 토종꿀과 양봉꿀에 특이적으로 반응하는 항체로서, 토종꿀과 양봉꿀의 진위 판별에 이용되어질 수 있다. 또한 각각의 특이성은 서로 다른 항원을 인식하지 않기 때문에 각각의 꿀이 섞여있어도 독자적으로 판별할 수 있다. 따라서 토종꿀과 양봉꿀을 여러 가지 비율(0:10, 2:8, 5:5, 8:2, 10:0)로 혼합한 시료에 대해서 각각의 항체를 이용하여 ELISA를 실시하였다. 토종꿀만을 특이적으로 인식하는 T 항체와 양봉꿀만을 특이적으로 인식하는 Y 항체를 1차 항체로 사용하고 이들을 인식하는 goat anti mouse IgG HRP를 2차 항체로 사용하였다.
  - 결과는 그림 3과 같이 여러 가지 비율로 혼합되어 있는 꿀에서 T 항체는 토종꿀의 양에 비례하여 그래프가 증가하는 것을 볼 수 있었고 Y 항체도 마찬가지로 양봉꿀의 양에 비례하여 그래프가 감소하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 이를 이용한다면 토종꿀과 양봉꿀이 혼합되어 있을 경우, T 항체와 Y 항체를 이용한다면 토종꿀과 양봉꿀의 혼합 여부를 알 수 있을 뿐만 아니라 혼합 비율도 정성적으로 판별할 수 있다.

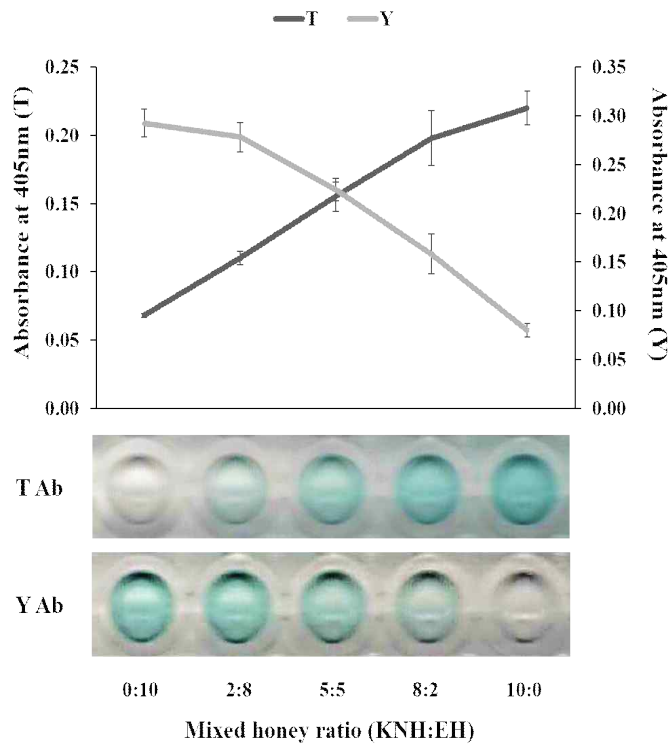


그림 133. ELISA : 토종꿀과 양봉꿀의 혼합꿀  
KNH : 토종꿀, EH : 양봉꿀

#### 나. TY항체의 특성 및 그 이용

- TY항체의 특성

- TY 항체는 토종꿀과 양봉꿀을 모두 인식하는 항체로 토종꿀과 양봉꿀 단백질의 공통적인 구조를 인식하여 꽃꿀을 인식하는 항체라고 할 수 있다. 따라서 TY 항체를 이용하면 토종꿀, 양봉꿀, 인조꿀을 항원으로 사용한 ELISA에서 인조꿀과 꽃꿀을 판별할 수 있다. 인조꿀은 대부분 효모의 효소를 이용하여 인위적으로 만든 것이기 때문에 꽃꿀에서 확인 되는 주요단백질이 존재하지 않는다. 그러므로 TY항체는 인조꿀을 인식하지 못한다. Western blot에서는 토종꿀과 양봉꿀 항원에서 모두 밴드가 나와 토종꿀과 양봉꿀을 모두 인식한다는 것을 다시 한 번 알 수 있었다. TY 항체는 T 항체나 Y 항체와 같이 IgG1을 중쇄로 가지고 kappa 체인을 경쇄로 가지고 있다는 것을 isotype kit를 이용하여 확인했다.

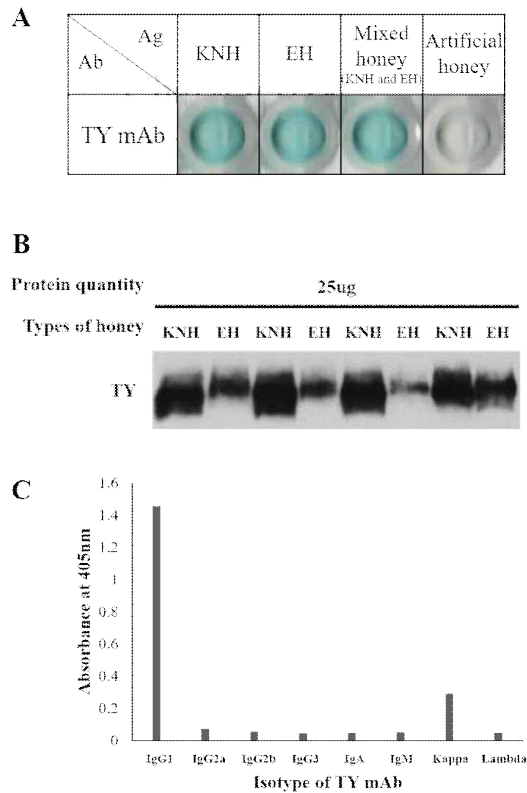


그림 134. TY 항체의 특성

A. 토종꿀, 양봉꿀, 혼합꿀, 인조꿀을 항원으로 사용한 ELISA, B, Western blot, C. Isotype  
KNH : 토종꿀, EH : 양봉꿀

● TY항체의 이용

- 시중에는 토종꿀과 양봉꿀의 증량을 위해서 이화학적 성분을 거의 유사하게 만든 인조꿀을 증량제로 사용하는 경우가 있다. 따라서 ELISA kit를 이용하여 인조꿀의 증량 여부를 확인할 수 있는지 확인해 보았다.
- 토종꿀과 양봉꿀에 각각 인조꿀을 여러 가지 비율로 혼합하여 항원으로 사용하였다. 항체는 토종꿀과 양봉꿀을 모두 인식하는 TY 항체를 사용했다. 토종꿀과 양봉꿀의 공통적인 부분을 인식하기 때문에 꽃꿀을 인식하는 것이라고 볼 수 있다.
- ELISA 결과에서 보듯이 인조꿀을 증량제로 사용한 토종-인조 혼합꿀과 양봉-인조 혼합꿀에서 TY 항체가 인조꿀을 인식하지 않고 각각 토종꿀과 양봉꿀의 양에만 비례하여 항원을 인식했다는 것을 알 수 있었다. 이는 인위적으로 만든 인조꿀에는 항체의 항원으로 인식되는 벌의 침에서 유래한 MRJP 단백질이 없기 때문으로 해석된다. 따라서 이를 이용한다면 TY항체를 이용한 ELISA kit에서는 인조꿀 증량 여부를 확인할 수 있다.

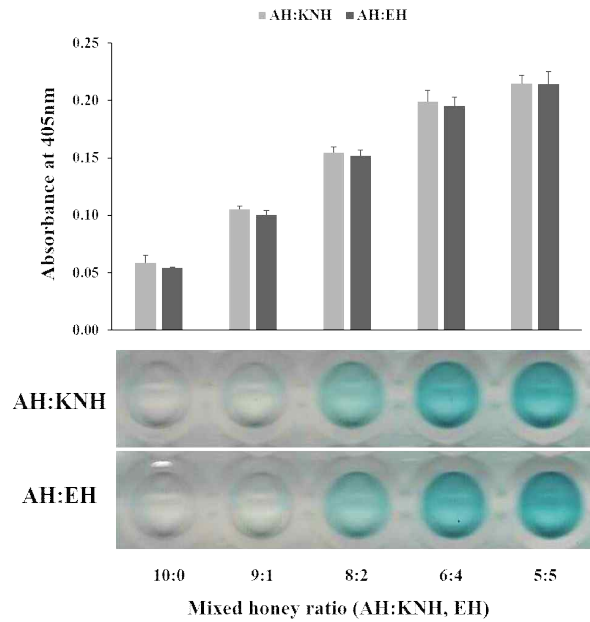


그림 135. 인조꿀 증량제 사용 ELISA  
 AH : 인조꿀, KNH : 토종꿀, EH : 양봉꿀

다. 수집된 꿀시료를 이용한 ELISA 키트 검증

● 수집한 벌꿀 목록

- 수집한 꿀은 총 338개로, 양봉꿀 150개(X-001~X-150), 토종꿀 44개(Y-001~Y-044), 외국에서 구입한 꿀 123개(W-001~W-123), 중국에서 구입한 꿀 17개(C-001~C-017), 그리고 인조꿀 4개(A-001~A-004)이다.

표1. 수집 벌꿀 목록

샘플 번호	샘플 정보	비고
X-001	허니스티 사양벌꿀 (허니스티)	원산지: 국산
X-002	아카시아꿀 (꽃샘식품) A	원산지: 국산
X-003	해아띠 잡화꿀 (가보팜스)	원산지: 국산
X-004	해아띠 아카시아꿀 (가보팜스)	원산지: 국산
X-005	벌꿀아카시아 (오뚜기)	원산지: 국산
X-006	호주유칼리꿀 (CAPILANO)	원산지: 국산
X-007	Premium 잡화꿀 (꽃샘식품)	원산지: 국산
X-008	사양벌꿀 (동아양봉원)	원산지: 국산
X-009	치약산 잡화꿀 (신림농협)	원산지: 국산
X-010	타즈마니아 레더우드꿀 (허니스티)	원산지: 호주
X-011	들꽃꿀 벌꿀 (동아양봉원)	원산지: 국산
X-012	아카시아벌꿀 (동아양봉원)	원산지: 국산
X-013	아나에 꿀 (Sdad. Coop. Apicola de Espane)	원산지: 스페인
X-014	Finest 아카시아꿀 (꽃샘식품)	원산지: 국산
X-015	Premium 아카시아꿀 (꽃샘식품) A	원산지: 국산

X-016	Premium 아카시아꽃 (꽃샘식품) B	원산지: 국산
X-017	Premium L 아카시아꽃 (꽃샘식품)	원산지: 국산
X-018	아카시아꽃 (꽃샘식품) B	원산지: 국산
X-019	Premium L 잡화꽃 (꽃샘식품)	원산지: 국산
X-020	담터 사양벌꿀 (담터)	원산지: 국산
X-021	중근당건강 사양벌꿀 (중근당)	원산지: 국산
X-022	초록원 꿀유자 (초록원)	원산지: 국산
X-023	치악산 아카시아꽃 (신림농협)	원산지: 국산
X-024	동서벌꿀 아카시아꽃 (동서식품)	원산지: 국산
X-025	동서벌꿀 다화꽃 (동서식품)	원산지: 국산
X-026	동강마루 잡화꽃 (영월농협)	원산지: 국산
X-027	동강마루 아카시아꽃 (영월농협)	원산지: 국산
X-028	벌꿀마을 잡화꽃 (서남농협)	원산지: 국산
X-029	벌꿀마을 아카시아꽃 (서남농협)	원산지: 국산
X-030	맛고원 잡화꽃 (신림농협)	원산지: 국산
X-031	강원도 아카시아꽃 (순우리초)	원산지: 국산
X-032	강원도 잡화꽃 (순우리초)	원산지: 국산
X-033	가리왕산 아카시아꽃	원산지: 국산
X-034	가리왕산 잡화꽃	원산지: 국산
X-035	가리왕산 벌꿀	원산지: 국산
X-036	방산 아카시아꽃 (양구농협) A	원산지: 국산
X-037	방산 아카시아꽃 (양구농협) B	원산지: 국산
X-038	정선 아카시아꽃	원산지: 국산
X-039	정선 잡화꽃	원산지: 국산
X-040	아카시아청 (청림)	원산지: 국산
X-041	잡화청 (청림)	원산지: 국산
X-042	아카시아 벌꿀 (자연이 준 선물)	원산지: 국산
X-043	청밀잡화꽃(한국양봉농협)	원산지: 국산
X-044	청밀 아카시아꽃 (한국양봉농협) A	원산지: 국산
X-045	한국양봉생꿀 잡화꽃 (한국양봉농협)	원산지: 국산
X-046	광고양봉원 꿀 (광고양봉원)	원산지: 국산
X-047	금주산 잡화꽃 (영중농협)	원산지: 국산
X-048	금주산 아카시아꽃 (영중농협)	원산지: 국산
X-049	고려국산벌꿀 사양벌꿀 (고려인삼주식회사)	원산지: 국산
X-050	오갑산양봉농원 꿀 (오갑산양봉농원)	원산지: 국산
X-051	아카시아꽃	원산지: 국산
X-052	밤꿀	원산지: 국산
X-053	농협안심 야생꽃꿀 (북부농협)	원산지: 국산
X-054	농협안심 아카시아꽃 (북부농협)	원산지: 국산
X-055	맛고원 아카시아꽃 (신림농협)	원산지: 국산
X-056	맛고원 잡화꽃 (신림농협)	원산지: 국산
X-057	양봉 벌집꿀(청원기수양봉원)	원산지: 국산
X-058	아카시아꽃 (청원기수양봉원)	원산지: 국산



X-059	밤꿀 (청원기수양봉원)	원산지: 국산
X-060	사양꿀 (청원기수양봉원)	원산지: 국산
X-061	정선 벌꿀	원산지: 국산
X-062	아카시아꿀 (양구)	원산지: 국산
X-063	잡화꿀 (양구)	원산지: 국산
X-064	Honey Love 잡화꿀 (한국양봉농협)	원산지: 국산
X-065	칠백리 잡화꿀 (상주원예농협)	원산지: 국산
X-066	칠백리 아카시아꿀 (상주원예농협)	원산지: 국산
X-067	산속의 꿀 아카시아꿀 (보은농협)	원산지: 국산
X-068	산속의 꿀 잡화꿀 (보은농협)	원산지: 국산
X-069	청밀 아카시아꿀 (한국양봉농협) B	원산지: 국산
X-070	청밀 잡화꿀 (한국양봉농협) B	원산지: 국산
X-071	하성 야생화꿀 (거창북부농협)	원산지: 국산
X-072	윤상복 벌꿀가족 밤꿀 (에덴양봉원)	원산지: 국산
X-073	윤상복 벌꿀가족 잡화꿀 (에덴양봉원)	원산지: 국산
X-074	윤상복 벌꿀가족 아카시아꿀 (에덴양봉원)	원산지: 국산
X-075	아카시아꿀 (지푸락양봉원)	원산지: 국산
X-076	잡화꿀 (지푸락양봉원)	원산지: 국산
X-077	100% Natural pure honey (1st International Health Foods, HAVERST RAW. NY)	원산지: 미국
X-078	Pure RAW HONEY (Bee flower % Sun Honey co.)	원산지: 미국
X-079	Really Raw Honey (Really Raw honey baltimore, mary land 21224)	원산지: 미국
X-080	꿈속의 향연 아카시아꿀	원산지: 국산
X-081	꿈속의 향연 잡화꿀	원산지: 국산
X-082	양봉대회 꿀(tube)	원산지: 국산
X-083	양봉대회 꿀 high land	원산지: 국산
X-084	양봉대회 꿀 low land	원산지: 국산
X-085	아카시아꿀 (신진수)	원산지: 국산
X-086	잡꿀 (신진수)	원산지: 국산
X-087	아카시아꿀 (백담메아리 특산물 판매장)	원산지: 국산
X-088	피나무꿀 (백담메아리 특산물 판매장)	원산지: 국산
X-089	안데스산 목청 (인제 용대리)	원산지: 안데스산
X-090	충주팍	원산지: 국산
X-091	벌꿀 양양 아카시아꿀	원산지: 국산
X-092	벌꿀 양양 피나무 꿀	원산지: 국산
X-093	벌꿀 양양 잡화 꿀	원산지: 국산
X-094	벌꿀 Pure Hoeny 아카시아 꿀	원산지: 국산
X-095	벌꿀 Pure Hoeny 잡화 꿀	원산지: 국산
X-096	벌꿀 Pure Hoeny 밤 꿀	원산지: 국산
X-097	벌꿀 Pure Hoeny 아카시아 꿀	원산지: 국산
X-098	비무장지대 꿀 Bee&Bee my sweet friend (벚꽃꿀)	원산지: 국산
X-099	비무장지대 꿀 Bee&Bee my sweet friend (피나무꿀)	원산지: 국산

X-100	비무장지대 꿀 Bee&Bee my sweet friend (밤꿀)	원산지: 국산
X-101	비무장지대 꿀 Bee&Bee my sweet friend (야생화꿀)	원산지: 국산
X-102	비무장지대 꿀 Bee&Bee my sweet friend (아카시아꿀)	원산지: 국산
X-103	과주민통선 아카시아 꿀	원산지: 국산
X-104	과주민통선 잡화꿀	원산지: 국산
X-105	과주민통선 밤나무 꿀	원산지: 국산
X-106	양양벌꿀 잡화꿀	원산지: 국산
X-107	양양벌꿀 아카시아꿀	원산지: 국산
X-108	양양벌꿀 밤꿀 (구룡양봉영농조합법인)	원산지: 국산
X-109	양양혼합 (구룡양봉영농조합법인)	원산지: 국산
X-110	지리산 프리미엄 아카시아 꿀 (지리산 한봉 조합)	원산지: 국산
X-111	지리산 프리미엄 밤꿀 (지리산 한봉 조합)	원산지: 국산
X-112	비무장지대꿀 잡화꿀	원산지: 국산
X-113	비무장지대꿀 아카시아꿀	원산지: 국산
X-114	신동1 아카시아+ 밤(벌집)	원산지: 국산
X-115	신동2 아카시아+ 밤(벌집)	원산지: 국산
X-116	명품 벌꿀(칠곡 제일양봉산업)	원산지: 국산
X-117	신토불이 벌꿀(경산, 평사 휴게소)	원산지: 국산
X-118	군위벌꿀(양봉 영구회)	원산지: 국산
X-119	벌꿀 pure honey(제천)	원산지: 국산
X-120	토함산 꿀벌세상 잡화꿀	원산지: 국산
X-121	토함산 꿀벌세상 아카시아꿀	원산지: 국산
X-122	토함산 꿀벌세상 대추꿀	원산지: 국산
X-123	털보양봉원 아카시아꿀 (경북 경주)	원산지: 국산
X-124	털보양봉원 밤꿀 (경북 경주)	원산지: 국산
X-125	털보양봉원 대추꿀 (경북 경주)	원산지: 국산
X-126	털보양봉원 잡화꿀 (경북 경주)	원산지: 국산
X-127	신동3 무설탕 밤꿀	원산지: 국산
X-128	신동4 설탕(반봉개)	원산지: 국산
X-129	신동5 설탕(미봉개)	원산지: 국산
X-130	신동6 설탕(맨 밑부분)	원산지: 국산
X-131	Bulgaria sweet honey(BG QUALITY HONEY)	원산지: 불가리아
X-132	2016.05.28 아카시아+ 잡화(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-133	2016.06.17 밤+ 잡화(새소비)(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-134	2016.06.23 밤(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-135	2016.07.15 자연벌집꿀(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-136	2016.07.21 잡화(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-137	2016.08.10 잡화(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-138	2016. 유채꿀(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-139	오뚜기 벌꿀 아카시아 (강원도 영월)	원산지: 국산
X-140	오뚜기 벌꿀 잡화 (강원도 영월)	원산지: 국산
X-141	윤상복 벌꿀가족 대추나무꿀 (에덴양봉원)	원산지: 국산
X-142	방산 잡화꿀 (양구농협)	원산지: 국산

X-143	강원도 허니원(밤꽃꿀)(강원허니영농조합법인)	원산지: 국산
X-144	강원도 허니원(아카시아꿀)(강원허니영농조합법인)	원산지: 국산
X-145	강원도 허니원(야생화꿀)(강원허니영농조합법인)	원산지: 국산
X-146	2017년 04월 25일 정리채밀(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-147	2017년 05월 12일 정리채밀(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-148	2017년 05월 23일 아카시아(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-149	2017년 06월 08일 잡화(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
X-150	양양 벌꿀 밤꿀(양양)	원산지: 국산
Y-001	지리산 마천 토종꿀 (마천농협)	원산지: 국산
Y-002	영월 북면 꿀 A	원산지: 국산
Y-003	영월 북면 꿀 B	원산지: 국산
Y-004	영월 북면 꿀 C	원산지: 국산
Y-005	정선 가리왕산 꿀	원산지: 국산
Y-006	제천 꿀	원산지: 국산
Y-007	가리왕산 토종꿀	원산지: 국산
Y-008	덕두원 토종꿀 (덕두원) A	원산지: 국산
Y-009	덕두원 토종꿀 (덕두원) B	원산지: 국산
Y-010	지리산 벌집꿀 (이현우, 청원기수양봉원)	원산지: 국산
Y-011	정선 꿀	원산지: 국산
Y-012	인제읍 하추리 꿀 A	원산지: 국산
Y-013	인제읍 하추리 꿀 B	원산지: 국산
Y-014	백담사	원산지: 국산
Y-015	하늘내린 2015년	원산지: 국산
Y-016	하늘내린 2014년	원산지: 국산
Y-017	하늘내린 A	원산지: 국산
Y-018	하늘내린 B	원산지: 국산
Y-019	제천 토종꿀협회 A	원산지: 국산
Y-020	제천 토종꿀협회 B	원산지: 국산
Y-021	제천 토종꿀협회 C	원산지: 국산
Y-022	제천 토종꿀협회 D	원산지: 국산
Y-023	제천 토종꿀협회 E	원산지: 국산
Y-024	충주팜	원산지: 국산
Y-025	양양군 토종꿀 박원균 2015. 10	원산지: 국산
Y-026	양양군토종꿀	원산지: 국산
Y-027	과주민통선 천연벌꿀	원산지: 국산
Y-028	2014. 10월 산 토종꿀	원산지: 국산
Y-029	2015. 10월 산 토종꿀	원산지: 국산
Y-030	강시봉 토종꿀	원산지: 국산
Y-031	지리산 IC 쌍용 휴게소 토종꿀(벌집 꿀) (남원)	원산지: 국산
Y-032	지리산 벌통 벌꿀 (남원)	원산지: 국산
Y-033	전통玉種(토종)꿀(남원)	원산지: 국산
Y-034	무명 꿀 (토종)(남원)	원산지: 국산
Y-035	지리산 토종꿀(지리산한봉영농조합)	원산지: 국산

Y-036	전통토종꿀 (남원)	원산지: 국산
Y-037	제천 토종꿀	원산지: 국산
Y-038	2016. 토봉(야생화)(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
Y-039	2015. 토봉(농가분)(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
Y-040	강원도 석청(인제)	원산지: 국산
Y-041	2016 토종 각두골 각두골(양양)	원산지: 국산
Y-042	2016 토종 각두골 대청봉(양양)	원산지: 국산
Y-043	2016.9. 토종 각두골 점봉산(양양)	원산지: 국산
Y-044	2017년 09월 12일 토봉(양평 농업 기술 센터)	원산지: 국산
W-001	중국꿀 A	원산지: 중국
W-002	중국꿀 B	원산지: 중국
W-003	Nectaflo 야생꽃꿀	원산지: 스위스
W-004	Nectaflo 숲꿀	원산지: 스위스
W-005	Nectaflo 벚꽃꿀	원산지: 스위스
W-006	Airborne 클로버꿀	원산지: 뉴질랜드
W-007	Airborne 라타꿀	원산지: 뉴질랜드
W-008	Miel de citronnier 레몬나무꿀	원산지: 프랑스
W-009	Miel de lavande maritime 라벤더꿀	원산지: 프랑스
W-010	Lune de miel 오렌지나무꿀	원산지: 프랑스
W-011	Lune de miel 아카시아꿀	원산지: 프랑스
W-012	Lune de miel 꿀	원산지: 프랑스
W-013	THE FINEST HONEY 아카시아꿀	원산지: 루마니아
W-014	THE FINEST HONEY 클로버꿀	원산지: 캐나다
W-015	THE FINEST HONEY 오렌지꿀	원산지: 멕시코
W-016	THE FINEST HONEY 해바라기꿀	원산지: 루마니아
W-017	THE FINEST HONEY 로즈마리꿀	원산지: 스페인
W-018	THE FINEST HONEY 잡화꿀	원산지: 쿠바
W-019	THE FINEST HONEY 연꽃꿀	원산지: 일본
W-020	THE FINEST HONEY 잡화꿀	원산지: 일본
W-021	THE FINEST HONEY 토치	원산지: 일본
W-022	THE FINEST HONEY 메밀꿀	원산지: 일본
W-023	PETIT HONEY 후쿠라시	원산지: 일본
W-024	PETIT HONEY 꿀꿀	원산지: 일본
W-025	PETIT HONEY 아카시아꿀	원산지: 일본
W-026	미즈바시 메밀꿀	원산지: 일본
W-027	미즈바시 토치꿀	원산지: 일본
W-028	미즈바시 연꽃꿀	원산지: 일본
W-029	미즈바시 잡화꿀	원산지: 일본
W-030	PURE HONEY 아카시아꿀	원산지: 일본
W-031	HIGUCHIEN HONEY 잡화꿀	원산지: 일본
W-032	일본 토종 유칼립투스꿀	원산지: 일본
W-033	일본 토종 가미카와꿀	원산지: 일본
W-034	일본 토종 모리꿀	원산지: 일본

W-035	일본 토종 물방울꿀	원산지: 일본
W-036	Miele di acacia	원산지: 이탈리아
W-037	Miele di agurmi	원산지: 이탈리아
W-038	Miele di millefiori	원산지: 이탈리아
W-039	Miele thun tarassa co dandelion honey	원산지: 이탈리아
W-040	Wilkin & sons LTD PURE HONEY	원산지: 영국
W-041	Miele thun tarassa co linden honey	원산지: 미국
W-042	Miele di castagno	원산지: 미국
W-043	Alnaqaa honey(Spring flowers)	원산지: 리비아
W-044	Alnaqaa honey(Greek strawberry tree)	원산지: 리비아
W-045	희03 유채	원산지: 일본
W-046	희01 매죽	원산지: 일본
W-047	nectaflor(야생꽃꿀)	원산지: 스위스
W-048	nectaflor(오렌지&아카시아꿀)	원산지: 스위스
W-049	nectaflor(산벚꽃꿀)	원산지: 스위스
W-050	캐나다 퓨어 허니	원산지: 캐나다
W-051	하치미쯔	원산지: 일본
W-052	순수틀 벌꿀	원산지: 일본
W-053	ROYAL FIR HONEY	원산지: 독일
W-054	miel de citronnier	원산지: 프랑스
W-055	아카시아꿀	원산지: 독일
W-056	Mielizia Arancio de Sud d'Italia	원산지: 이탈리아
W-057	Mielizia Eucalipto della Costa Ionica	원산지: 이탈리아
W-058	Creamy honey	원산지: 일본
W-059	벌꿀(백화꿀)	원산지: 일본
W-060	Orange blossom honey	원산지: 미국
W-061	Real raw honey	원산지: 미국
W-062	Pure HONEY(wild honey)	원산지: 미국
W-063	순수 벌꿀	원산지: 일본
W-064	하치미쯔(중국)	원산지: 중국
W-065	하치미쯔(캐나다산)	원산지: 캐나다
W-066	아카시아 벌꿀	원산지: 중국
W-067	아카시아 허니(프랑스)	원산지: 프랑스
W-068	아카시아 허니(헝가리)	원산지: 헝가리
W-069	하치미쯔(캐나다, 아르헨티나)	원산지: 캐나다, 아르헨티나
W-070	로얄 젤리 첨가 하치미쯔(아르헨티나)	원산지: 아르헨티나
W-071	하치미쯔(아카시아)	원산지: 일본
W-072	하치미쯔(꿀)	원산지: 일본
W-073	하치미쯔(벚꽃)	원산지: 일본
W-074	하치미쯔(사과)	원산지: 일본
W-075	아카시아 하치미쯔(우크라이나, 미국, 프랑스)	원산지: 우크라이나, 미국, 프랑스
W-076	하치미쯔(중국, 이탈리아, 프랑스)	원산지: 중국, 이탈리아, 프랑스
W-077	하치미쯔(일본)	원산지: 일본

W-078	하치미쯔(백화, 일본)	원산지: 일본
W-079	하치미쯔(중국)	원산지: 중국
W-080	하치미쯔(클로버)	원산지: 일본
W-081	하치미쯔(민들레)	원산지: 일본
W-082	하치미쯔(참피나무)	원산지: 일본
W-083	하치미쯔(백화)	원산지: 일본
W-084	Raw Honey(white clover, blossom)	원산지: 미국
W-085	순수 하치미쯔(캐나다)	원산지: 캐나다
W-086	아르헨티나산 순수 하치미쯔	원산지: 아르헨티나
W-087	일본 꿀벌 하치미쯔(나가사키현)	원산지: 일본
W-088	일본 꿀벌 하치미쯔(효고현)	원산지: 일본
W-089	국산북해도하치미쯔	원산지: 일본
W-090	아카시아밀봉	원산지: 일본
W-091	하치미쯔(북해도)	원산지: 일본
W-092	하치미쯔(사쿠라, 벚꽃)	원산지: 일본
W-093	하치미쯔(링고, 사과)	원산지: 일본
W-094	하치미쯔(아카시아)	원산지: 일본
W-095	하치미쯔(백화꿀)	원산지: 일본
W-096	Queen Bee Fruit honey(블루베리)	원산지: 뉴질랜드
W-097	Queen Bee Fruit honey(레몬)	원산지: 뉴질랜드
W-098	Queen Bee Fruit honey(딸기)	원산지: 뉴질랜드
W-099	Queen Bee Fruit honey(키위)	원산지: 뉴질랜드
W-100	Queen Bee Fruit honey(피조아)	원산지: 뉴질랜드
W-101	Queen Bee Manuka Honey MGO 50+	원산지: 뉴질랜드
W-102	Queen Bee Manuka Honey MGO 80	원산지: 뉴질랜드
W-103	Queen Bee Manuka Honey MGO 100+	원산지: 뉴질랜드
W-104	Queen Bee Manuka Honey MGO 250+	원산지: 뉴질랜드
W-105	Queen Bee Manuka Honey MGO 400+	원산지: 뉴질랜드
W-106	Queen Bee Manuka Honey MGO 550+	원산지: 뉴질랜드
W-107	Queen Bee Manuka Honey MGO 100+(큰통)	원산지: 뉴질랜드
W-108	Queen Bee Manuka Honey MGO 550+(큰통)	원산지: 뉴질랜드
W-109	Manuka Honey pure honey	원산지: 뉴질랜드
W-110	Manuka Honey MGO100	원산지: 뉴질랜드
W-111	Manuka Honey MGO200	원산지: 뉴질랜드
W-112	Manuka Honey MGO400	원산지: 뉴질랜드
W-113	Manuka Honey MGO1000	원산지: 뉴질랜드
W-114	ROCKY ICE HONEY(CANADA)	원산지: 캐나다
W-115	Manuka Honey MGO50	원산지: 뉴질랜드
W-116	콤비타 유엠에프 18+마누카꿀	원산지: 뉴질랜드
W-117	Pure Australian Eucalyptus Honey	원산지: 호주
W-118	Pure Tasmanian Honey Manuka	원산지: 호주
W-119	Pure Tasmanian Honey Prickly Box	원산지: 호주
W-120	Pure Tasmanian Honey Leather Wood	원산지: 호주

W-121	Pure Tasmanian Honey Summer Blossom	원산지: 호주
W-122	Pure Tasmanian Honey Fennel	원산지: 호주
W-123	Pure Tasmanian Honey Forest	원산지: 호주
C-001	토봉밀(년 수회)	원산지: 중국
C-002	토봉밀(년 일회)	원산지: 중국
C-003	이탈리안 아카시아	원산지: 중국
C-004	이탈리안 계피	원산지: 중국
C-005	이탈리안 벌집	원산지: 중국
C-006	중국 농가 1	원산지: 중국
C-007	중국 농가 2	원산지: 중국
C-008	느티나무 꽃향이 사방에 풍긴다	원산지: 중국
C-009	봉밀(계수나무80+ 피나무20)	원산지: 중국
C-010	영양밀윤	원산지: 중국
C-011	유미방 야생국화꽃	원산지: 중국
C-012	유미방 아카시아꽃	원산지: 중국
C-013	관생원 자운영꽃	원산지: 중국
C-014	관생원아카시아꽃	원산지: 중국
C-015	면산 봉밀(잡화꽃)	원산지: 중국
C-016	면산 토봉밀	원산지: 중국
C-017	야생계수나무꽃	원산지: 중국
A-001	인조꿀 1	제조
A-002	인조꿀 2	제조
A-003	인조꿀 3	제조
A-004	인조꿀 4	제조

● 수집한 벌꿀 분석 결과

- 수수집한 꿀 총 338개를 샘플로 하여 진행했다. 수집한 꿀 338개는 국내에서 수집한 양봉꿀 150개(X-001~X-150), 국내에서 수집한 토종꿀 44개(Y-001~Y-044), 외국에서 구입한 꿀 123개(W-001~W-123), 중국에서 수집한 17개(C-001~C-017), 그리고 제조한 인조꿀 4개(A-001~A-004)로 이루어져 있다. 총 338개의 꿀을 항원으로 하여 ELISA plate에 코팅하고 T, Y, TY 항체를 1차 항체로 이용하고, goat anti-mouse IgG HRP를 2차 항체로 사용했다.
- 분석 결과, 양봉꿀 150개 중 X-022를 제외하고는 모두 양봉꿀인 것을 확인했다. X-022는 초록원 꿀유자로 TY 항체의 흡광도 값이 낮은 것으로 보아 제조 시 꿀이 거의 들어가지 않은 것으로 보인다. X-022를 제외한 양봉꿀 149개의 T 항체를 사용했을 때의 평균 흡광도가 0.064, 표준편차는 0.002, 최대 흡광도가 0.068, 최소 흡광도는 0.059를 나타냈고, Y 항체를 사용했을 때는 평균 0.107의 흡광도를, 표준편차는 0.009, 최대 흡광도는 0.143, 최소 흡광도는 0.076을 보였고 TY 항체를 이용했을 때는 평균 0.108, 표준편차는 0.009, 최대 흡광도는 0.130, 최소 흡광도는 0.073를 나타냈다.
- 토종꿀 44개(Y-001 ~ Y-044) 중 11개는 양봉꿀(Y-010, Y-025, Y-031 ~ Y-036, Y-041 ~ Y-043), 3개는 혼합꿀 (토종꿀과 양봉꿀의 혼합꿀, Y-027 ~ Y-029), 그리고 나머지 30개는 토

종꿀인 것으로 확인되었다. 양봉꿀이라고 밝혀진 11개의 샘플은 T 항체를 사용했을 때의 평균 0.064, 표준편차는 0.002, 최대 흡광도는 0.068, 최소 흡광도는 0.061를 나타냈고, Y 항체를 사용했을 때는 평균 0.090, 표준편차는 0.012, 최대 0.118의 흡광도를 나타내었고, 최소 흡광도는 0.074를 보이며 T 항체는 인식하지 않고 양봉꿀 단백질만을 항원으로 인식하는 Y 항체만 인식했다. TY 항체를 이용했을 때는 평균 0.102, 표준편차는 0.009, 최대 흡광도는 0.110, 최소 흡광도는 0.085를 나타냈다. 토종꿀 중에 양봉꿀과의 혼합꿀이라고 밝혀진 3개의 꿀은 T 항체를 사용했을 때의 평균 0.083, 표준편차는 0.006, 최대 흡광도는 0.087, 최소 흡광도는 0.076을 나타내었으며, Y 항체를 사용했을 때는 평균 흡광도가 0.083, 표준편차는 0.005, 최대 0.089의 흡광도를 보이고, 최소 흡광도는 0.080을 나타내며 T 항체와 Y 항체가 이들을 모두 인식하는 것으로 토종꿀과 양봉꿀이 혼합되어 있음을 확인했다. TY 항체를 이용했을 때는 평균 0.109, 표준편차는 0.009, 최대 흡광도는 0.118, 최소 흡광도는 0.101을 나타냈다. 토종꿀인 30개의 꿀들은 T 항체를 사용했을 때의 평균 0.104, 표준편차는 0.012, 최대 흡광도는 0.129, 최소 흡광도는 0.084를 보였고, Y 항체를 사용했을 때는 평균 0.063, 표준편차는 0.002, 최대 0.066, 최소 0.058의 흡광도를 보이며 T 항체는 인식하고 Y 항체는 인식하지 않는 것을 보여주었다. TY 항체를 이용했을 때는 평균 0.116, 표준편차는 0.004, 최대 흡광도는 0.124, 최소 흡광도는 0.103을 볼 수 있었다.

- 외국꿀 123개(W-001~W-123) 중에는 토종벌(동양벌)이 만든 꿀이 4개(W-032~W-035)였고 이들은 T 항체를 사용했을 때의 평균 0.108, 표준편차는 0.014, 최대 흡광도는 0.129, 최소 흡광도는 0.097인 것을 볼 수 있었고, Y 항체를 사용했을 때는 평균 0.061, 표준편차는 0.002, 최대 0.064, 최소 0.060의 흡광도를 보였고 TY 항체를 이용했을 때는 평균 0.136, 표준편차는 0.014, 최대 흡광도는 0.157, 최소 흡광도는 0.126이었다. 나머지 119개는 모두 양봉꿀이었고 이들을 항원으로 하여 ELISA를 했을 때, T 항체를 사용했을 때의 평균 0.064, 표준편차는 0.003, 최대 흡광도는 0.069, 최소 흡광도는 0.059를 나타냈고, Y 항체를 사용했을 때는 평균 0.104, 표준편차는 0.008, 최대 0.133의 흡광도를, 최소는 0.080을 보였다. 또 TY 항체를 이용했을 때는 평균 0.123, 표준편차는 0.017, 최대 흡광도는 0.166, 최소 흡광도는 0.095였다.
- 중국꿀에서 수집한 17개(C-001~C-017)의 꿀은 3개가 토종꿀(C-007, C-011, C-012)이었고, 14개가 양봉꿀이었다. 14개의 양봉꿀은 T항체를 사용했을 때, 평균 0.065의 흡광도를 보였고, 0.001의 표준편차와 최대 0.067, 최소 0.063의 흡광도를 보였으며, Y 항체를 사용했을 때는 평균 0.091, 0.005의 표준편차, 최대 0.103, 최소 0.083의 흡광도를 보이며 T 항체는 이들을 인식하지 않고 Y 항체만 이들을 인식했다. 또 TY 항체를 사용했을 때, 평균 0.105, 0.009의 표준편차, 최대 0.130, 최소 0.093의 흡광도를 보였다. 중국꿀 중 3개의 토종꿀을 항원으로 사용한 경우, T 항체를 사용했을 때, 평균 0.087, 0.007의 표준편차, 최대 0.095, 최소 0.083의 흡광도 값을 보였고 Y 항체를 사용했을 때는 평균 0.065, 0.001의 표준편차, 최대 0.065, 최소 0.064의 흡광도 값을 보이며 T 항체만 이들을 인식하고 Y 항체는 이들을 인식하지 않았다. 또 TY 항체를 사용했을 때는 평균 0.108, 0.005의 표준편차, 최대 0.112, 최소 0.102의 흡광도를 보였다.
- 인조꿀 4개(A-001~A-004)을 항원으로 사용한 경우, T 항체를 사용했을 때, 평균값은 0.060, 0.004의 표준편차, 최대 0.064, 최소 0.056의 흡광도 값을 가졌고 Y 항체를 사용했을 때는 평균 0.060, 0.005의 표준편차, 최대 0.064, 최소 0.053의 흡광도 값을 가졌으며, TY 항체를 사용했을 때는 평균 0.056, 0.004의 표준편차, 최대 0.060, 최소 0.053의 흡광도를 보였다. T, Y, TY 항체



모두 인조꿀을 인식하지 않은 것을 확인할 수 있었다.

- ELISA를 이용하여 전수조사를 한 결과 꿀의 종류와 혼합여부는 알 수 있었지만 꿀 속 단백질이 함유량에 따라 인조꿀 증량여부에 대한 기준을 제시할 수는 없었다. 기준을 제시할 정도의 정량적인 수치는 앞으로 더 구체적인 연구가 필요해 보인다.

표 56 수집 벌꿀 분석 결과

샘플번호	흡광도(405nm)			토종, 양봉 판별 여부	샘플번호	흡광도(405nm)			토종, 양봉 판별 여부
	T	Y	TY			T	Y	TY	
X-001	0.067	0.127	0.098	양봉	Y-020	0.123	0.064	0.119	토종
X-002	0.066	0.109	0.096	양봉	Y-021	0.115	0.063	0.122	토종
X-003	0.066	0.101	0.096	양봉	Y-022	0.102	0.061	0.116	토종
X-004	0.063	0.115	0.100	양봉	Y-023	0.120	0.066	0.116	토종
X-005	0.060	0.102	0.098	양봉	Y-024	0.108	0.061	0.119	토종
X-006	0.066	0.120	0.111	양봉	Y-025	0.063	0.081	0.110	양봉
X-007	0.068	0.102	0.111	양봉	Y-026	0.116	0.064	0.124	토종
X-008	0.061	0.100	0.098	양봉	Y-027	0.085	0.081	0.109	혼합꿀
X-009	0.068	0.113	0.123	양봉	Y-028	0.076	0.080	0.101	혼합꿀
X-010	0.063	0.100	0.116	양봉	Y-029	0.087	0.089	0.118	혼합꿀
X-011	0.064	0.101	0.121	양봉	Y-030	0.088	0.061	0.117	토종
X-012	0.064	0.110	0.109	양봉	Y-031	0.063	0.095	0.085	양봉
X-013	0.064	0.102	0.096	양봉	Y-032	0.066	0.093	0.087	양봉
X-014	0.061	0.109	0.098	양봉	Y-033	0.061	0.089	0.092	양봉
X-015	0.061	0.106	0.105	양봉	Y-034	0.061	0.090	0.103	양봉
X-016	0.060	0.115	0.102	양봉	Y-035	0.063	0.102	0.105	양봉
X-017	0.061	0.098	0.109	양봉	Y-036	0.066	0.118	0.107	양봉
X-018	0.064	0.102	0.111	양봉	Y-037	0.108	0.066	0.116	토종
X-019	0.062	0.103	0.111	양봉	Y-038	0.098	0.065	0.113	토종
X-020	0.065	0.102	0.096	양봉	Y-039	0.088	0.066	0.103	토종
X-021	0.061	0.099	0.109	양봉	Y-040	0.088	0.061	0.116	토종
X-022	0.060	0.060	0.054	x	Y-041	0.063	0.088	0.106	양봉
X-023	0.061	0.098	0.096	양봉	Y-042	0.066	0.087	0.107	양봉
X-024	0.061	0.112	0.099	양봉	Y-043	0.061	0.078	0.110	양봉
X-025	0.063	0.116	0.117	양봉	Y-044	0.084	0.061	0.113	토종
X-026	0.065	0.113	0.114	양봉	W-001	0.066	0.096	0.110	양봉
X-027	0.063	0.100	0.109	양봉	W-002	0.064	0.098	0.128	양봉
X-028	0.063	0.103	0.115	양봉	W-003	0.065	0.110	0.106	양봉
X-029	0.065	0.108	0.105	양봉	W-004	0.066	0.118	0.108	양봉
X-030	0.065	0.119	0.106	양봉	W-005	0.060	0.104	0.107	양봉
X-031	0.060	0.105	0.114	양봉	W-006	0.061	0.110	0.098	양봉
X-032	0.060	0.103	0.106	양봉	W-007	0.065	0.100	0.112	양봉
X-033	0.066	0.133	0.122	양봉	W-008	0.060	0.103	0.140	양봉
X-034	0.063	0.107	0.109	양봉	W-009	0.064	0.102	0.131	양봉

X-035	0.060	0.143	0.129	양봉	W-010	0.066	0.098	0.106	양봉
X-036	0.065	0.099	0.102	양봉	W-011	0.064	0.098	0.128	양봉
X-037	0.063	0.096	0.100	양봉	W-012	0.065	0.099	0.132	양봉
X-038	0.062	0.103	0.100	양봉	W-013	0.060	0.100	0.106	양봉
X-039	0.064	0.109	0.113	양봉	W-014	0.061	0.106	0.108	양봉
X-040	0.063	0.077	0.077	양봉	W-015	0.060	0.098	0.103	양봉
X-041	0.063	0.076	0.073	양봉	W-016	0.064	0.102	0.102	양봉
X-042	0.064	0.103	0.103	양봉	W-017	0.066	0.107	0.095	양봉
X-043	0.065	0.110	0.117	양봉	W-018	0.064	0.117	0.112	양봉
X-044	0.068	0.104	0.104	양봉	W-019	0.060	0.099	0.112	양봉
X-045	0.063	0.103	0.102	양봉	W-020	0.061	0.102	0.109	양봉
X-046	0.068	0.105	0.100	양봉	W-021	0.060	0.100	0.128	양봉
X-047	0.065	0.109	0.114	양봉	W-022	0.060	0.113	0.149	양봉
X-048	0.063	0.105	0.100	양봉	W-023	0.064	0.103	0.098	양봉
X-049	0.062	0.110	0.093	양봉	W-024	0.069	0.096	0.106	양봉
X-050	0.066	0.101	0.100	양봉	W-025	0.064	0.101	0.108	양봉
X-051	0.060	0.102	0.099	양봉	W-026	0.067	0.133	0.166	양봉
X-052	0.063	0.107	0.114	양봉	W-027	0.069	0.104	0.099	양봉
X-053	0.066	0.106	0.109	양봉	W-028	0.064	0.101	0.106	양봉
X-054	0.063	0.105	0.099	양봉	W-029	0.067	0.105	0.105	양봉
X-055	0.064	0.098	0.100	양봉	W-030	0.060	0.102	0.105	양봉
X-056	0.059	0.101	0.103	양봉	W-031	0.064	0.101	0.100	양봉
X-057	0.065	0.105	0.096	양봉	W-032	0.100	0.060	0.128	토종
X-058	0.063	0.103	0.097	양봉	W-033	0.097	0.060	0.126	토종
X-059	0.063	0.105	0.107	양봉	W-034	0.129	0.064	0.157	토종
X-060	0.063	0.104	0.099	양봉	W-035	0.106	0.060	0.134	토종
X-061	0.064	0.111	0.113	양봉	W-036	0.063	0.099	0.105	양봉
X-062	0.064	0.105	0.109	양봉	W-037	0.064	0.102	0.099	양봉
X-063	0.059	0.102	0.099	양봉	W-038	0.068	0.106	0.098	양봉
X-064	0.066	0.101	0.108	양봉	W-039	0.068	0.099	0.106	양봉
X-065	0.063	0.114	0.116	양봉	W-040	0.060	0.103	0.098	양봉
X-066	0.068	0.105	0.103	양봉	W-041	0.064	0.102	0.101	양봉
X-067	0.065	0.102	0.100	양봉	W-042	0.068	0.106	0.105	양봉
X-068	0.067	0.106	0.109	양봉	W-043	0.060	0.127	0.134	양봉
X-069	0.062	0.100	0.098	양봉	W-044	0.063	0.098	0.133	양봉
X-070	0.065	0.105	0.108	양봉	W-045	0.060	0.109	0.102	양봉
X-071	0.065	0.103	0.103	양봉	W-046	0.068	0.107	0.098	양봉
X-072	0.065	0.108	0.115	양봉	W-047	0.060	0.102	0.100	양봉
X-073	0.063	0.106	0.107	양봉	W-048	0.063	0.105	0.134	양봉
X-074	0.067	0.112	0.099	양봉	W-049	0.067	0.107	0.131	양봉
X-075	0.065	0.108	0.091	양봉	W-050	0.068	0.103	0.105	양봉
X-076	0.067	0.105	0.113	양봉	W-051	0.063	0.102	0.100	양봉
X-077	0.065	0.107	0.114	양봉	W-052	0.062	0.099	0.112	양봉
X-078	0.064	0.111	0.119	양봉	W-053	0.068	0.111	0.109	양봉
X-079	0.065	0.108	0.119	양봉	W-054	0.061	0.099	0.110	양봉

X-080	0.067	0.108	0.108	양봉	W-055	0.060	0.102	0.105	양봉
X-081	0.066	0.132	0.130	양봉	W-056	0.063	0.098	0.110	양봉
X-082	0.065	0.103	0.102	양봉	W-057	0.067	0.108	0.110	양봉
X-083	0.061	0.124	0.116	양봉	W-058	0.068	0.102	0.098	양봉
X-084	0.060	0.100	0.096	양봉	W-059	0.060	0.105	0.101	양봉
X-085	0.061	0.106	0.095	양봉	W-060	0.063	0.109	0.102	양봉
X-086	0.066	0.109	0.108	양봉	W-061	0.063	0.102	0.105	양봉
X-087	0.061	0.105	0.105	양봉	W-062	0.064	0.104	0.101	양봉
X-088	0.060	0.109	0.106	양봉	W-063	0.068	0.106	0.136	양봉
X-089	0.061	0.106	0.105	양봉	W-064	0.067	0.097	0.127	양봉
X-090	0.065	0.109	0.110	양봉	W-065	0.068	0.100	0.129	양봉
X-091	0.061	0.105	0.113	양봉	W-066	0.068	0.099	0.125	양봉
X-092	0.065	0.099	0.109	양봉	W-067	0.064	0.092	0.122	양봉
X-093	0.061	0.104	0.109	양봉	W-068	0.061	0.095	0.125	양봉
X-094	0.062	0.112	0.110	양봉	W-069	0.067	0.099	0.129	양봉
X-095	0.065	0.111	0.099	양봉	W-070	0.067	0.099	0.129	양봉
X-096	0.065	0.108	0.110	양봉	W-071	0.063	0.094	0.124	양봉
X-097	0.061	0.101	0.099	양봉	W-072	0.065	0.094	0.124	양봉
X-098	0.063	0.121	0.116	양봉	W-073	0.060	0.112	0.142	양봉
X-099	0.065	0.114	0.123	양봉	W-074	0.063	0.103	0.133	양봉
X-100	0.065	0.106	0.117	양봉	W-075	0.067	0.099	0.129	양봉
X-101	0.068	0.103	0.107	양봉	W-076	0.061	0.093	0.123	양봉
X-102	0.062	0.103	0.094	양봉	W-077	0.060	0.102	0.132	양봉
X-103	0.065	0.105	0.102	양봉	W-078	0.067	0.097	0.127	양봉
X-104	0.064	0.101	0.106	양봉	W-079	0.060	0.096	0.126	양봉
X-105	0.060	0.106	0.106	양봉	W-080	0.061	0.095	0.125	양봉
X-106	0.065	0.109	0.111	양봉	W-081	0.060	0.105	0.135	양봉
X-107	0.066	0.106	0.100	양봉	W-082	0.063	0.098	0.128	양봉
X-108	0.064	0.106	0.117	양봉	W-083	0.065	0.102	0.132	양봉
X-109	0.065	0.107	0.110	양봉	W-084	0.066	0.104	0.134	양봉
X-110	0.062	0.095	0.092	양봉	W-085	0.062	0.098	0.128	양봉
X-111	0.065	0.104	0.105	양봉	W-086	0.063	0.102	0.132	양봉
X-112	0.068	0.111	0.106	양봉	W-087	0.063	0.095	0.125	양봉
X-113	0.060	0.098	0.106	양봉	W-088	0.067	0.093	0.123	양봉
X-114	0.060	0.109	0.113	양봉	W-089	0.065	0.098	0.128	양봉
X-115	0.066	0.127	0.114	양봉	W-090	0.063	0.097	0.127	양봉
X-116	0.066	0.100	0.113	양봉	W-091	0.067	0.103	0.133	양봉
X-117	0.066	0.108	0.098	양봉	W-092	0.063	0.112	0.142	양봉
X-118	0.063	0.109	0.092	양봉	W-093	0.066	0.102	0.132	양봉
X-119	0.065	0.098	0.101	양봉	W-094	0.065	0.098	0.128	양봉
X-120	0.062	0.099	0.103	양봉	W-095	0.062	0.101	0.131	양봉
X-121	0.065	0.110	0.115	양봉	W-096	0.059	0.080	0.110	양봉
X-122	0.063	0.099	0.104	양봉	W-097	0.062	0.110	0.140	양봉
X-123	0.064	0.115	0.119	양봉	W-098	0.067	0.115	0.145	양봉
X-124	0.062	0.099	0.110	양봉	W-099	0.059	0.117	0.147	양봉

X-125	0.066	0.114	0.120	양봉	W-100	0.067	0.111	0.141	양봉
X-126	0.066	0.108	0.116	양봉	W-101	0.062	0.104	0.134	양봉
X-127	0.063	0.109	0.115	양봉	W-102	0.060	0.106	0.136	양봉
X-128	0.063	0.097	0.100	양봉	W-103	0.069	0.108	0.138	양봉
X-129	0.063	0.096	0.102	양봉	W-104	0.066	0.115	0.145	양봉
X-130	0.060	0.096	0.103	양봉	W-105	0.060	0.113	0.143	양봉
X-131	0.066	0.104	0.105	양봉	W-106	0.063	0.124	0.154	양봉
X-132	0.066	0.104	0.113	양봉	W-107	0.068	0.117	0.147	양봉
X-133	0.066	0.109	0.120	양봉	W-108	0.068	0.116	0.146	양봉
X-134	0.063	0.119	0.124	양봉	W-109	0.060	0.114	0.144	양봉
X-135	0.065	0.127	0.113	양봉	W-110	0.068	0.107	0.137	양봉
X-136	0.065	0.121	0.121	양봉	W-111	0.060	0.104	0.134	양봉
X-137	0.063	0.114	0.119	양봉	W-112	0.062	0.118	0.148	양봉
X-138	0.065	0.106	0.111	양봉	W-113	0.068	0.118	0.148	양봉
X-139	0.066	0.104	0.112	양봉	W-114	0.068	0.099	0.129	양봉
X-140	0.061	0.106	0.092	양봉	W-115	0.063	0.116	0.146	양봉
X-141	0.068	0.110	0.119	양봉	W-116	0.060	0.106	0.136	양봉
X-142	0.065	0.115	0.101	양봉	W-117	0.064	0.098	0.128	양봉
X-143	0.067	0.115	0.114	양봉	W-118	0.068	0.101	0.131	양봉
X-144	0.065	0.106	0.112	양봉	W-119	0.068	0.114	0.144	양봉
X-145	0.065	0.125	0.125	양봉	W-120	0.063	0.107	0.137	양봉
X-146	0.062	0.104	0.120	양봉	W-121	0.062	0.111	0.141	양봉
X-147	0.059	0.127	0.124	양봉	W-122	0.068	0.104	0.134	양봉
X-148	0.066	0.121	0.127	양봉	W-123	0.062	0.116	0.146	양봉
X-149	0.066	0.114	0.124	양봉	C-001	0.064	0.103	0.109	양봉
X-150	0.065	0.115	0.113	양봉	C-002	0.065	0.083	0.094	양봉
Y-001	0.087	0.065	0.111	토종	C-003	0.066	0.086	0.093	양봉
Y-002	0.105	0.063	0.113	토종	C-004	0.064	0.094	0.105	양봉
Y-003	0.105	0.064	0.116	토종	C-005	0.066	0.097	0.099	양봉
Y-004	0.109	0.061	0.117	토종	C-006	0.067	0.089	0.107	양봉
Y-005	0.097	0.060	0.112	토종	C-007	0.095	0.064	0.109	토종
Y-006	0.110	0.061	0.116	토종	C-008	0.065	0.091	0.109	양봉
Y-007	0.118	0.065	0.114	토종	C-009	0.064	0.088	0.104	양봉
Y-008	0.105	0.060	0.123	토종	C-010	0.065	0.094	0.103	양봉
Y-009	0.106	0.061	0.119	토종	C-011	0.083	0.065	0.102	토종
Y-010	0.068	0.074	0.106	양봉	C-012	0.084	0.065	0.112	토종
Y-011	0.096	0.060	0.111	토종	C-013	0.065	0.090	0.103	양봉
Y-012	0.114	0.064	0.117	토종	C-014	0.065	0.098	0.130	양봉
Y-013	0.109	0.065	0.117	토종	C-015	0.065	0.086	0.104	양봉
Y-014	0.088	0.064	0.116	토종	C-016	0.063	0.089	0.102	양봉
Y-015	0.093	0.066	0.111	토종	C-017	0.066	0.093	0.109	양봉
Y-016	0.102	0.061	0.120	토종	A-001	0.064	0.053	0.060	인조
Y-017	0.101	0.060	0.118	토종	A-002	0.062	0.058	0.059	인조
Y-018	0.129	0.058	0.120	토종	A-003	0.058	0.063	0.053	인조
Y-019	0.117	0.060	0.119	토종	A-004	0.056	0.064	0.053	인조

표 57 전수조사 분석 결과 : 평균값, 표준편차, 최대값, 최소값

샘플	항체	평균값(mean)	표준편차(SD)	최대값	최소값
양봉꿀 (n=149, X-022제외)	T	0.064	0.002	0.068	0.059
	Y	0.107	0.009	0.143	0.076
	TY	0.108	0.009	0.130	0.073
토종 (양봉, n=11)	T	0.064	0.002	0.068	0.061
	Y	0.090	0.012	0.118	0.074
	TY	0.102	0.009	0.110	0.085
토종 (토종, n=30)	T	0.104	0.012	0.129	0.084
	Y	0.063	0.002	0.066	0.058
	TY	0.116	0.004	0.124	0.103
토종 (혼합, n=3)	T	0.083	0.006	0.087	0.076
	Y	0.083	0.005	0.089	0.080
	TY	0.109	0.009	0.118	0.101
외국꿀 (양봉, n=119)	T	0.064	0.003	0.069	0.059
	Y	0.104	0.008	0.133	0.080
	TY	0.123	0.017	0.166	0.095
외국꿀 (토종, n=4)	T	0.108	0.014	0.129	0.097
	Y	0.061	0.002	0.064	0.060
	TY	0.136	0.014	0.157	0.126
중국꿀 (양봉, n=14)	T	0.065	0.001	0.067	0.063
	Y	0.091	0.005	0.103	0.083
	TY	0.105	0.009	0.130	0.093
중국꿀 (토종, n=3)	T	0.087	0.007	0.095	0.083
	Y	0.065	0.001	0.065	0.064
	TY	0.108	0.005	0.112	0.102
인조꿀(n=4)	T	0.060	0.004	0.064	0.056
	Y	0.060	0.005	0.064	0.053
	TY	0.056	0.004	0.060	0.053

● 표준단백질을 이용한 표준곡선

- 토종꿀과 양봉꿀 중 확실하게 토종꿀과 양봉꿀이라고 확인된 Y-004와 X-035를 투석막을 이용해 72시간 투석하고 원심분리하여 화분을 제거하고 동결건조해서 표준물질로 사용했다. 표준물질은 각각 최대 0.05mg/ml, 최소 0.01mg/ml를 사용했다.

토종/양봉 표준물질(mg/ml)	T	Y
0.05/0	0.132	0.067
0.04/0.01	0.115	0.078
0.025/0.025	0.097	0.092
0.01/0.04	0.082	0.114
0/0.05	0.068	0.125

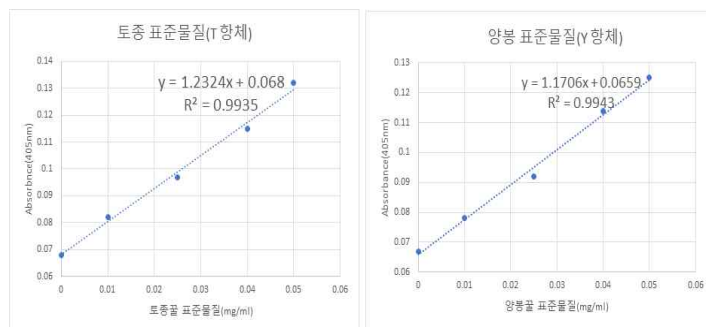


그림 136 토종꿀과 양봉꿀 표준물질을 이용한 표준곡선 그래프

## 라. ELISA 키트 개발 및 매뉴얼

### ● ELISA 키트 매뉴얼

#### 1) 키트 구성품

- 표준물질 : 토종꿀과 양봉꿀, 혼합꿀(토종꿀과 양봉꿀)
- 코팅 버퍼 : Carbonate coating buffer(pH 9.6, 15ml tube)
- 1차 항체 : T, Y, TY 항체 (각각 항체 희석배수 100배, 10배, 1000배 1.5ml tube)
- 2차 항체 : Goat anti-mouse IgG HRP(1.5ml tube)
- PBS-T : 20배 농축한 PBS(0.5% tween 20, 15ml tube)
- Blocking buffer : 1% BSA(in PBS, 15ml tube)
- HRP 기질 : ABTS in PCB(15ml tube)
- 기질 촉매 : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(1.5ml tube)
- ELISA plate : 1장
- Reservoir : 1장
- 15ml tube : 4개

#### 2) 키트 구성품의 준비장치

- Spectrophotometer
- 증류수
- 1.5mL Tube

#### 3) 벌꿀시료 준비

- 시료(꿀)와 standard를 1.5ml tube에 500mg씩 담고 증류수 1ml을 넣어 잘 섞어준다.

#### 4) 시험절차

- ① 준비한 시료를 carbonate coating buffer에 10배 희석하여 ELISA plate의 well에 100ul 씩 넣고 4℃에서 overnight 코팅한다.
- ② PBS-T를 이용하여 plate를 wash 한다.(200ul x3)
- ③ Blocking buffer를 100ul씩 넣고 blocking 한다. (25℃, 1시간)
- ④ PBS-T를 이용하여 plate를 wash 한다.(200ul x3)
- ⑤ 1차 항체(T, Y, TY 항체)를 PBS-T에 10배씩 희석하여 100ul씩 well에 반응시킨다. (25℃, 1시간)
- ⑥ PBS-T를 이용하여 plate를 wash 한다.(200ul x3)
- ⑦ 2차 항체를 PBS-T에 2500배 희석하여 100ul씩 well에 반응시킨다. (25℃, 1시간)
- ⑧ PBS-T를 이용하여 plate를 wash 한다.(200ul x3)
- ⑨ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1000배 희석하여 ABTS에 넣고 100ul씩 well에 반응시킨다.(37℃, 10분)
- ⑩ 405nm에서 흡광도를 측정한다.

● ELISA 키트를 이용한 실제 샘플 분석예

- 샘플은 양평군농업기술센터에서 2017년 채취된 시료로 양봉꿀 297개와 토종꿀 3개로 총 300개의 꿀을 이용하였다.
- 시료들을 500mg/ml의 농도로 증류수에 희석하고 carbonate coating buffer에 10배 씩 희석하여 ELISA plate에 코팅했다. 각각 100배, 10배, 1000배씩 희석되어 있는 T, Y, TY 항체들을 PBS-T에 10배씩 더 희석하여 1차 항체로 사용했다.

표 59 실제 시료를 이용한 ELISA kit 분석

Sample			T	Y	TY
양봉1	6-1	잡화꿀	0.057	0.295	0.306
양봉2	6-5	밤꿀	0.055	0.303	0.371
양봉3	7-1	아카시아꿀	0.057	0.288	0.362
양봉4	7-2	아카시아꿀	0.06	0.289	0.373
양봉5	7-3	아카시아꿀	0.061	0.248	0.326
양봉6	8-1	잡화꿀	0.06	0.239	0.357
양봉7	8-2	잡화꿀	0.062	0.204	0.392
양봉8	8-3	잡화꿀	0.055	0.306	0.115
양봉9	8-5	밤꿀	0.053	0.275	0.372
양봉10	8-6	밤꿀	0.062	0.232	0.41
양봉11	9-1	아카시아꿀	0.053	0.165	0.342
양봉12	9-2	아카시아꿀	0.059	0.232	0.363
양봉13	10-1	잡화꿀	0.055	0.25	0.328
양봉14	10-3	잡화꿀	0.056	0.26	0.393
양봉15	11-1	잡화꿀	0.055	0.341	0.382
양봉16	11-2	아카시아꿀	0.056	0.249	0.342
양봉17	11-3	아카시아꿀	0.056	0.327	0.327
양봉18	11-4	잡화꿀	0.056	0.297	0.34
양봉19	11-5	밤꿀	0.055	0.306	0.382
양봉20	12-1	아카시아꿀	0.053	0.222	0.377
양봉21	12-2	아카시아꿀	0.056	0.37	0.344
양봉22	12-4	잡화꿀	0.057	0.269	0.369
양봉23	12-5	잡화꿀	0.054	0.326	0.365
양봉24	13-1	잡화꿀	0.057	0.29	0.264
양봉25	14-1	잡화꿀	0.057	0.212	0.322
양봉26	14-2	잡화꿀	0.056	0.226	0.314
양봉27	16-1	아카시아꿀	0.055	0.323	0.397
양봉28	17-1	아카시아꿀	0.054	0.259	0.33
양봉29	17-2	아카시아꿀	0.055	0.224	0.378
양봉30	18-1	잡화꿀	0.056	0.297	0.332
양봉31	18-2	잡화꿀	0.06	0.269	0.326
양봉32	19-1	아카시아꿀	0.061	0.284	0.235
양봉33	19-2	아카시아꿀	0.059	0.282	0.318
양봉34	19-3	아카시아꿀	0.06	0.28	0.316
양봉35	20-1	잡화꿀	0.06	0.257	0.266
양봉36	20-2	잡화꿀	0.061	0.304	0.165

양봉37	21-1	아카시아꿀	0.069	0.272	0.337
양봉38	21-2	아카시아꿀	0.057	0.28	0.387
양봉39	21-3	아카시아꿀	0.056	0.254	0.394
양봉40	22-1	아카시아꿀	0.058	0.254	0.35
양봉41	23-1	아카시아꿀	0.057	0.247	0.382
양봉42	23-2	아카시아꿀	0.056	0.253	0.366
양봉43	23-3	아카시아꿀	0.059	0.31	0.348
양봉44	24-1	아카시아꿀	0.065	0.324	0.278
양봉45	25-1	아카시아꿀	0.06	0.191	0.308
양봉46	25-2	아카시아꿀	0.056	0.266	0.297
양봉47	25-3	아카시아꿀	0.055	0.254	0.347
양봉48	26-1	아카시아꿀	0.057	0.117	0.242
양봉49	26-2	아카시아꿀	0.057	0.301	0.258
양봉50	26-12	아카시아꿀	0.055	0.243	0.277
양봉51	27-1	아카시아꿀	0.058	0.148	0.288
양봉52	28-3	아카시아꿀	0.064	0.204	0.316
양봉53	29-1	아카시아꿀	0.06	0.268	0.364
양봉54	29-4	아카시아꿀	0.057	0.245	0.375
양봉55	29-8	아카시아꿀	0.056	0.233	0.313
양봉56	29-9	아카시아꿀	0.059	0.24	0.353
양봉57	29-15	아카시아꿀	0.057	0.232	0.358
양봉58	29-16	아카시아꿀	0.057	0.258	0.382
양봉59	29-19	아카시아꿀	0.059	0.281	0.374
양봉60	29-24	아카시아꿀	0.061	0.28	0.317
양봉61	29-27	아카시아꿀	0.066	0.219	0.328
양봉62	30-1	아카시아꿀	0.059	0.203	0.294
양봉63	31-2	아카시아꿀	0.059	0.238	0.364
양봉64	31-5	아카시아꿀	0.062	0.262	0.366
양봉65	31-7	아카시아꿀	0.061	0.287	0.365
양봉66	31-8	잡화꿀	0.064	0.319	0.361
양봉67	31-10	잡화꿀	0.069	0.288	0.225
양봉68	31-11	잡화꿀	0.058	0.349	0.35
양봉69	31-14	잡화꿀	0.057	0.31	0.245
양봉70	31-17	잡화꿀	0.058	0.304	0.29
양봉71	31-18	밤꿀	0.058	0.332	0.322
양봉72	31-20	밤꿀	0.056	0.356	0.335
양봉73	31-23	밤꿀	0.06	0.371	0.353
양봉74	31-24	아카시아꿀	0.065	0.339	0.376
양봉75	31-25	잡화꿀	0.061	0.223	0.336
양봉76	32-1	아카시아꿀	0.056	0.234	0.318
양봉77	33-1	아카시아꿀	0.057	0.255	0.308
양봉78	33-5	아카시아꿀	0.057	0.373	0.265
양봉79	34-1	아카시아꿀	0.056	0.312	0.363
양봉80	35-1	아카시아꿀	0.056	0.235	0.389
양봉81	36-1	아카시아꿀	0.061	0.344	0.362
양봉82	37-1	아카시아꿀	0.063	0.343	0.362



양봉83	37-3	아카시아꿀	0.061	0.267	0.355
양봉84	37-7	아카시아꿀	0.057	0.274	0.335
양봉85	37-10	아카시아꿀	0.058	0.178	0.293
양봉86	37-11	아카시아꿀	0.057	0.391	0.271
양봉87	37-15	아카시아꿀	0.057	0.395	0.276
양봉88	37-16	아카시아꿀	0.058	0.383	0.335
양봉89	37-17	아카시아꿀	0.059	0.211	0.346
양봉90	37-18	아카시아꿀	0.078	0.301	0.219
양봉91	37-20	잡화꿀	0.061	0.246	0.322
양봉92	37-21	잡화꿀	0.06	0.252	0.314
양봉93	38-1	잡화꿀	0.058	0.23	0.293
양봉94	39-1	잡화꿀	0.059	0.207	0.28
양봉95	39-2	잡화꿀	0.062	0.306	0.308
양봉96	39-3	잡화꿀	0.062	0.306	0.308
양봉97	39-4	잡화꿀	0.072	0.309	0.364
양봉98	39-7	잡화꿀	0.058	0.348	0.34
양봉99	40-1	아카시아꿀	0.057	0.282	0.344
양봉100	41-1	아카시아꿀	0.057	0.316	0.308
양봉101	42-1	아카시아꿀	0.059	0.355	0.334
양봉102	43-1	아카시아꿀	0.058	0.279	0.335
양봉103	44-1	잡화꿀	0.06	0.307	0.378
양봉104	45-1	잡화꿀	0.064	0.324	0.321
양봉105	46-1	아카시아꿀	0.061	0.37	0.383
양봉106	46-4	잡화꿀	0.057	0.327	0.325
양봉107	47-1	아카시아꿀	0.055	0.246	0.347
양봉108	47-2	아카시아꿀	0.057	0.234	0.333
양봉109	47-4	아카시아꿀	0.055	0.301	0.304
양봉110	47-5	잡화꿀	0.057	0.341	0.333
양봉111	48-1	아카시아꿀	0.06	0.332	0.326
양봉112	48-3	아카시아꿀	0.067	0.244	0.332
양봉113	48-6	아카시아꿀	0.062	0.282	0.36
양봉114	49-1	아카시아꿀	0.054	0.293	0.337
양봉115	50-1	아카시아꿀	0.059	0.289	0.35
양봉116	50-3	아카시아꿀	0.069	0.373	0.335
양봉117	50-5	아카시아꿀	0.063	0.277	0.342
양봉118	50-7	아카시아꿀	0.059	0.375	0.374
양봉119	50-8	아카시아꿀	0.069	0.299	0.381
양봉120	50-9	아카시아꿀	0.056	0.273	0.316
양봉121	50-11	아카시아꿀	0.059	0.293	0.329
양봉122	50-15	아카시아꿀	0.059	0.317	0.339
양봉123	51-1	아카시아꿀	0.064	0.309	0.38
양봉124	51-2	아카시아꿀	0.061	0.29	0.343
양봉125	52-1	아카시아꿀	0.06	0.326	0.375
양봉126	52-4	아카시아꿀	0.062	0.24	0.374
양봉127	52-7	아카시아꿀	0.067	0.32	0.343
양봉128	52-8	아카시아꿀	0.053	0.287	0.343

양봉129	52-12	아카시아꿀	0.056	0.286	0.318
양봉130	53-1	아카시아꿀	0.058	0.33	0.334
양봉131	53-2	아카시아꿀	0.054	0.366	0.345
양봉132	53-3	아카시아꿀	0.056	0.32	0.323
양봉133	53-4	아카시아꿀	0.058	0.324	0.347
양봉134	53-5	아카시아꿀	0.065	0.321	0.319
양봉135	53-8	아카시아꿀	0.057	0.216	0.352
양봉136	53-9	아카시아꿀	0.054	0.355	0.371
양봉137	53-11	아카시아꿀	0.057	0.217	0.307
양봉138	53-12	아카시아꿀	0.06	0.253	0.321
양봉139	53-15	아카시아꿀	0.056	0.25	0.305
양봉140	53-16	잡화꿀	0.055	0.269	0.311
양봉141	54-1	잡화꿀	0.056	0.209	0.283
양봉142	54-2	잡화꿀	0.064	0.296	0.265
양봉143	56-1	아카시아꿀	0.057	0.296	0.342
양봉144	56-2	아카시아꿀	0.057	0.214	0.296
양봉145	57-1	아카시아꿀	0.058	0.291	0.329
양봉146	57-2	잡화꿀	0.061	0.359	0.324
양봉147	57-3	잡화꿀	0.06	0.282	0.355
양봉148	57-5	잡화꿀	0.057	0.27	0.34
양봉149	58-1	아카시아꿀	0.06	0.296	0.327
양봉150	58-2	아카시아꿀	0.063	0.31	0.36
양봉151	58-5	아카시아꿀	0.057	0.288	0.308
양봉152	58-8	아카시아꿀	0.056	0.282	0.301
양봉153	58-10	잡화꿀	0.059	0.323	0.277
양봉154	59-1	아카시아꿀	0.058	0.284	0.313
양봉155	60-1	잡화꿀	0.053	0.321	0.312
양봉156	60-4	잡화꿀	0.057	0.333	0.306
양봉157	61-2	잡화꿀	0.053	0.267	0.316
양봉158	61-3	잡화꿀	0.05	0.267	0.322
양봉159	61-4	잡화꿀	0.054	0.26	0.323
양봉160	61-5	잡화꿀	0.055	0.268	0.328
양봉161	62-1	아카시아꿀	0.05	0.249	0.315
양봉162	62-2	아카시아꿀	0.05	0.257	0.314
양봉163	62-3	아카시아꿀	0.054	0.257	0.316
양봉164	62-4	아카시아꿀	0.06	0.237	0.309
양봉165	62-7	잡화꿀	0.05	0.286	0.294
양봉166	62-8	잡화꿀	0.051	0.282	0.299
양봉167	63-1	아카시아꿀	0.051	0.261	0.297
양봉168	63-2	아카시아꿀	0.052	0.27	0.297
양봉169	63-4	아카시아꿀	0.05	0.282	0.296
양봉170	63-6	아카시아꿀	0.05	0.284	0.294
양봉171	63-9	아카시아꿀	0.055	0.278	0.291
양봉172	63-10	아카시아꿀	0.054	0.266	0.287
양봉173	64-1	아카시아꿀	0.048	0.266	0.291
양봉174	64-2	아카시아꿀	0.054	0.213	0.327

양봉175	64-3	아카시아꿀	0.052	0.214	0.33
양봉176	64-4	아카시아꿀	0.048	0.23	0.338
양봉177	64-5	아카시아꿀	0.049	0.224	0.335
양봉178	64-6	아카시아꿀	0.05	0.22	0.335
양봉179	66-1	아카시아꿀	0.057	0.266	0.32
양봉180	66-2	아카시아꿀	0.056	0.254	0.305
양봉181	66-4	아카시아꿀	0.062	0.261	0.29
양봉182	67-1	아카시아꿀	0.06	0.258	0.27
양봉183	67-2	아카시아꿀	0.059	0.251	0.27
양봉184	67-3	아카시아꿀	0.061	0.246	0.268
양봉185	68-1	아카시아꿀	0.059	0.259	0.28
양봉186	68-2	아카시아꿀	0.059	0.264	0.29
양봉187	69-1	잡화꿀	0.06	0.273	0.311
양봉188	70-1	아카시아꿀	0.058	0.239	0.29
양봉189	70-4	아카시아꿀	0.057	0.235	0.287
양봉190	70-7	아카시아꿀	0.059	0.228	0.284
양봉191	70-8	아카시아꿀	0.057	0.221	0.283
양봉192	70-11	아카시아꿀	0.052	0.247	0.282
양봉193	70-14	아카시아꿀	0.058	0.253	0.293
양봉194	70-15	아카시아꿀	0.058	0.259	0.308
양봉195	70-16	아카시아꿀	0.057	0.25	0.311
양봉196	70-19	아카시아꿀	0.052	0.242	0.305
양봉197	71-1	아카시아꿀	0.054	0.232	0.294
양봉198	72-1	잡화꿀	0.055	0.228	0.296
양봉199	73-1	아카시아꿀	0.052	0.257	0.286
양봉200	74-1	잡화꿀	0.053	0.266	0.244
양봉201	74-6	잡화꿀	0.058	0.278	0.251
양봉202	74-11	잡화꿀	0.06	0.285	0.249
양봉203	74-14	잡화꿀	0.056	0.28	0.25
양봉204	75-1	아카시아꿀	0.051	0.259	0.31
양봉205	75-4	잡화꿀	0.056	0.252	0.308
양봉206	76-1	잡화꿀	0.055	0.252	0.29
양봉207	77-1	아카시아꿀	0.051	0.267	0.298
양봉208	78-1	잡화꿀	0.054	0.245	0.304
양봉209	79-1	아카시아꿀	0.059	0.145	0.312
양봉210	79-3	아카시아꿀	0.057	0.266	0.307
양봉211	80-1	잡화꿀	0.063	0.278	0.261
양봉212	81-1	밤꿀	0.06	0.228	0.267
양봉213	81-5	밤꿀	0.062	0.223	0.258
양봉214	81-8	밤꿀	0.061	0.249	0.257
양봉215	82-1	잡화꿀	0.063	0.256	0.252
양봉216	83-1	잡화꿀	0.063	0.281	0.276
양봉217	83-4	잡화꿀	0.064	0.312	0.305
양봉218	84-1	밤꿀	0.058	0.243	0.222
양봉219	85-1	잡화꿀	0.055	0.24	0.274
양봉220	85-3	아카시아꿀	0.057	0.223	0.263

양봉221	86-1	밤꿀	0.053	0.241	0.251
양봉222	86-3	밤꿀	0.052	0.239	0.255
양봉223	86-4	밤꿀	0.056	0.251	0.269
양봉224	86-9	밤꿀	0.062	0.275	0.289
양봉225	87-1	밤꿀	0.059	0.261	0.303
양봉226	88-1	밤꿀	0.055	0.265	0.293
양봉227	88-4	밤꿀	0.057	0.249	0.283
양봉228	88-7	밤꿀	0.058	0.24	0.281
양봉229	89-1	잡화꿀	0.052	0.239	0.266
양봉230	90-1	잡화꿀	0.054	0.251	0.267
양봉231	91-1	잡화꿀	0.057	0.256	0.246
양봉232	91-3	잡화꿀	0.06	0.274	0.25
양봉233	91-5	잡화꿀	0.055	0.269	0.262
양봉234	91-6	잡화꿀	0.054	0.249	0.254
양봉235	91-9	잡화꿀	0.056	0.235	0.253
양봉236	91-14	잡화꿀	0.057	0.229	0.25
양봉237	92-1	밤꿀	0.052	0.249	0.289
양봉238	93-1	아카시아꿀	0.056	0.236	0.308
양봉239	94-1	아카시아꿀	0.059	0.261	0.296
양봉240	95-1	잡화꿀	0.06	0.25	0.299
양봉241	95-2	잡화꿀	0.061	0.264	0.269
양봉242	95-4	밤꿀	0.062	0.26	0.264
양봉243	97-1	잡화꿀	0.062	0.218	0.229
양봉244	97-2	잡화꿀	0.064	0.243	0.221
양봉245	97-4	잡화꿀	0.06	0.225	0.218
양봉246	98-1	잡화꿀	0.062	0.242	0.26
양봉247	99-1	잡화꿀	0.066	0.329	0.338
양봉248	99-3	밤꿀	0.056	0.28	0.292
양봉249	100-1	밤꿀	0.058	0.255	0.285
양봉250	101-1	잡화꿀	0.06	0.24	0.27
양봉251	101-4	잡화꿀	0.064	0.248	0.223
양봉252	101-5	잡화꿀	0.055	0.229	0.23
양봉253	101-7	잡화꿀	0.06	0.23	0.24
양봉254	101-8	잡화꿀	0.064	0.273	0.259
양봉255	101-9	아카시아꿀	0.064	0.176	0.332
양봉256	101-10	밤꿀	0.056	0.226	0.305
양봉257	101-11	잡화꿀	0.057	0.217	0.3
양봉258	101-12	밤꿀	0.057	0.223	0.293
양봉259	102-1	밤꿀	0.055	0.252	0.278
양봉260	103-1	밤꿀	0.053	0.256	0.28
양봉261	104-1	잡화꿀	0.067	0.261	0.265
양봉262	104-3	잡화꿀	0.06	0.302	0.268
양봉263	104-7	밤꿀	0.06	0.284	0.279
양봉264	105-1	잡화꿀	0.057	0.255	0.311
양봉265	105-2	잡화꿀	0.057	0.24	0.299
양봉266	105-4	잡화꿀	0.058	0.256	0.303

양봉267	105-5	잡화꿀	0.057	0.247	0.307
양봉268	105-6	잡화꿀	0.059	0.251	0.315
양봉269	105-8	잡화꿀	0.058	0.261	0.319
양봉270	105-9	잡화꿀	0.06	0.296	0.312
양봉271	106-1	밤꿀	0.062	0.302	0.299
양봉272	106-2	밤꿀	0.063	0.284	0.293
양봉273	107-1	아카시아꿀	0.065	0.264	0.286
양봉274	107-2	잡화꿀	0.064	0.275	0.282
양봉275	108-1	잡화꿀	0.061	0.311	0.22
양봉276	108-2	잡화꿀	0.068	0.313	0.216
양봉277	108-5	밤꿀	0.063	0.302	0.294
양봉278	108-6	밤꿀	0.05	0.305	0.295
양봉279	108-8	밤꿀	0.057	0.284	0.29
양봉280	108-10	밤꿀	0.071	0.282	0.293
양봉281	109-1	아카시아꿀	0.059	0.272	0.294
양봉282	109-3	아카시아꿀	0.054	0.289	0.29
양봉283	109-4	아카시아꿀	0.055	0.308	0.301
양봉284	110-1	잡화꿀	0.051	0.298	0.283
양봉285	110-3	잡화꿀	0.057	0.293	0.294
양봉286	110-7	잡화꿀	0.05	0.287	0.293
양봉287	111-1	아카시아꿀	0.061	0.268	0.302
양봉288	111-2	밤꿀	0.06	0.264	0.299
양봉289	112-1	잡화꿀	0.056	0.277	0.292
양봉290	112-2	밤꿀	0.058	0.306	0.281
양봉291	113-1	아카시아꿀	0.056	0.294	0.302
양봉292	113-4	아카시아꿀	0.059	0.277	0.302
양봉293	114-1	밤꿀	0.069	0.29	0.325
양봉294	114-2	밤꿀	0.057	0.281	0.314
양봉295	115-1	밤꿀	0.058	0.259	0.314
양봉296	115-2	밤꿀	0.057	0.266	0.314
양봉297	115-4	밤꿀	0.059	0.26	0.312
토봉1	Y-38	토종꿀	0.169	0.062	0.296
토봉2	Y-39	토종꿀	0.205	0.055	0.312
토봉3	Y-44	토종꿀	0.189	0.064	0.309

- 키트를 이용한 300개의 시료 분석 결과

1) 297개의 양봉 시료를 항원으로 이용했을 때,

- T 항체의 평균 흡광도 0.058, 최대 흡광도 0.078, 최소 흡광도 0.048
- Y 항체의 평균 흡광도 0.271, 최대 흡광도 0.395, 최소 흡광도 0.117
- 297개의 양봉꿀 모두 Y 항체에서만 반응하는 것으로 나타남.
- TY 항체의 평균 흡광도 0.310, 최대 흡광도 0.41, 최소 흡광도 0.115

2) 토종꿀 시료를 항원으로 사용했을 때,

- T 항체의 평균 흡광도 0.188, 최대 흡광도 0.205, 최소 흡광도 0.169
- Y 항체의 평균 흡광도 0.060, 최대 흡광도 0.064, 최소 흡광도 0.055

- 3개의 토종꿀이 모두 T 항체에서만 반응을 일으켰음을 확인
- TY 항체의 평균 흡광도 0.306, 최대 흡광도 0.312, 최소 흡광도 0.296

표 60 양봉꿀(n=297) 흡광도의 평균값, 표준편차, 최대값, 최소값

사용한 항체	평균값(mean)	표준편차(SD)	최대값	최소값
T	0.058	0.004	0.078	0.048
Y	0.271	0.042	0.395	0.117
TY	0.310	0.042	0.41	0.115

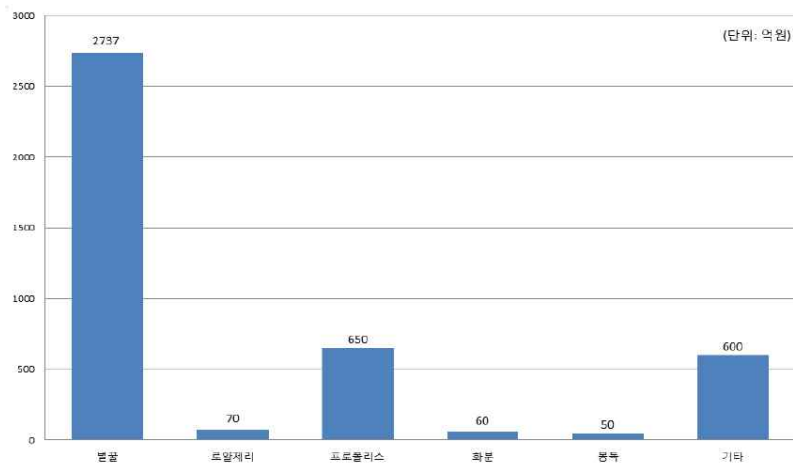
표 61 토종꿀(n=3) 흡광도의 평균값, 표준편차, 최대값, 최소값

사용한 항체	평균값(mean)	표준편차(SD)	최대값	최소값
T	0.188	0.018	0.205	0.169
Y	0.060	0.005	0.064	0.055
TY	0.306	0.009	0.312	0.296

#### 마. 벌꿀 가공품 분류기준안 개발

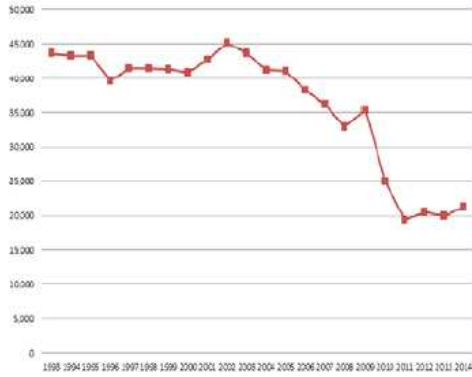
##### 1. 꿀 산업 현황

- 우리나라 산업 규모는 현재 생산량 약 25,145톤, 생산금액 약 4,167억원으로 추정되고 있음(충남연구원, 2016). 벌꿀 생산량 약 24.6천톤(97.8%), 생산금액 약 2,737억원(65.7%)로 가장 많고, 그 다음으로 프로폴리스 생산량 약 360톤(14.3%), 생산금액 약 650억원(15.6%)의 규모를 갖고 있으며, 그 외 화분, 로얄제리, 봉독 등이 생산되고 있으나 생산규모는 적음.

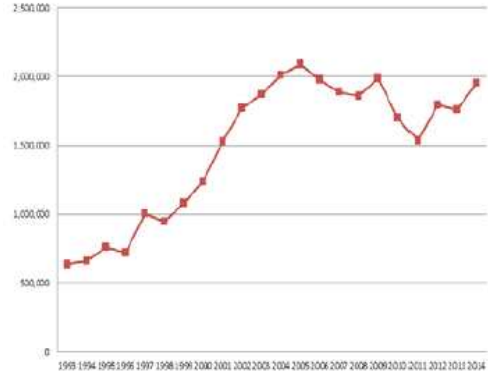


<국내 꿀산업 시장규모>

- 국내 사육농가 수 및 사육군수는 2002년 약 4만 5천호에서 2012년 약 2만호로 약 50% 감소하였고, 사육군수도 2005년 약 209만군에서 2012년 180만군으로 약 24% 감소하였음.

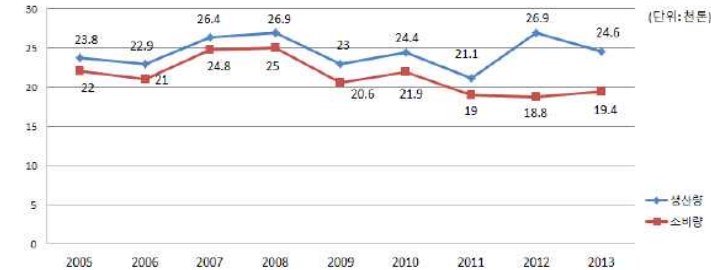


<사육농가 수>



<사육군수>

- 우리나라 전체 봉산물과 대비하여 꿀 생산량은 97.8%, 생산금액은 65.7%를 차지하고 있으며, 생산량은 2011년까지 감소하는 추세이나, 2012년 큰 폭으로 상승하였음. 소비량은 감소하는 추세임. 우리나라의 꿀 자급률은 97.2%로 2005년 이후 95% 이상의 수준을 유지하고 있으며(한국양봉협회, 2014), 1인당 소비량은 등락을 거듭하나 최근 15년 동안 0.95g~2.14g을 보이고 있음(한국농촌경제연구원, 2014).



<꿀의 생산량 및 소비량 추이>

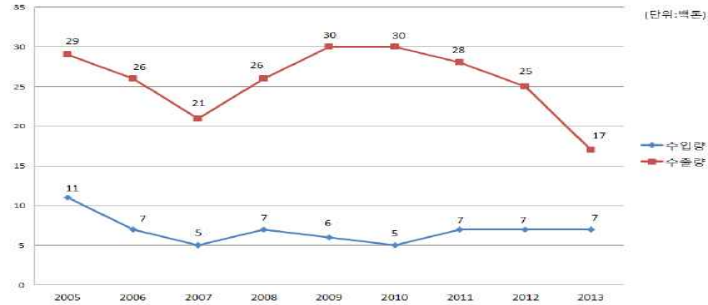
- 우리나라는 양봉 주요국 가운데 사육군수는 많은 편이나, 군당 꿀 생산량에서 현저하게 나타남. 생산량이 가장 많은 중국과 비교해서는 그 1/4 수준밖에 되지 않고, Kg당 꿀 가격은 가장 저렴한 호주보다 4배이상 비싸 생산 효율성과 가격 경쟁력 측면에서 열세임.

<국내·외 꿀의 생산량 및 소비량 추이>

구분	한국	미국	중국	베트남	호주	캐나다
총 사육군수(천군)	1,795	2,624	8,977	250	230	630
총 생산량(천톤)	24.6	66	451	12	10	29
군당 생산량(kg/군)	13.7	25.4	50.3	49.5	45.7	46.7
벌꿀가격(원/kg)	8,500	4,193	2,230	5,918	2,050	2,600

\*한국양봉협회, 2014

- 우리나라 꿀의 수출량은 감소하고, 수입량은 정체기에 있음. 수출량은 밀원부족과 꿀벌의 서식여건 악화에 따라 수출물량이 감소한 것으로 보이며, 수입량은 여러 통상협정에서 국내 양봉산업 보호를 위하여 수입산 꿀에 대한 관세철폐가 이루어지지 않았기 때문임(한국양봉협회, 2014).



<꿀 생산량과 수출량>

## 2. 국내·외 꿀 관련 제품 현황

- 국내 판매되고 있는 꿀 또는 관련 제품은 다양한 형태로 존재하고 있으며, 수입제품들도 존재함.

### 2-1. 미국

- 코스트코, 크리넥스, 듀라셀, 퍼실 등의 대형 브랜드와 나란히 자체 개발한 커클랜드 브랜드를 판매하고 있음. 커클랜드는 베이커리, 신선육, 식품, 미용, 유기농, 애완용품, 건강기능식품 등 다양한 제품들을 판매하고 있으며, 최고 인기 제품은 휴지임.

<커클랜드 꿀 관련 제품 현황>

제품사진	제품명	식품유형	원재료 및 함량	가격
	클로버 허니	벌꿀 (잡화꿀)	벌꿀 100% (원산지:아르헨티나)	38,610원 (2.26kg)
	오가닉 허니	벌꿀 (잡화꿀)	벌꿀 100% (원산지:브라질)	13,900원 (680g)
	메이플 시럽	당시럽류	단풍나무수액 100% (원산지:캐나다)	22,480원 (1L)





## 2-2. 뉴질랜드

- 콤비타는 뉴질랜드의 회사로써 뉴질랜드의 자연환경에서 기원한 제품들을 판매하고 있으며, 특히 꿀을 이용한 약용제품들이 판매되고 있음. 꿀 관련 제품 외에 오메가 3, 키위, 유제품 등을 판매하고 있음

<콤비타코리아 꿀 관련 제품 현황>

제품사진	제품명	식품유형	원재료 및 함량	가격
	마누카 꿀	벌꿀 (주밀원:마누카 꿀)	마누카꿀 100% (원산지:뉴질랜드)	171,000원 (250g)
	마누카꿀 로젠지 8개입	캔디류 (주밀원:마누카 꿀)	마누카꿀 100% (원산지:뉴질랜드)	17,000원
	야생화 꿀	벌꿀	잡화꿀 100% (원산지:뉴질랜드)	38,900원 (500g)
	클로버 꿀	벌꿀	클로버꿀100% (원산지:뉴질랜드)	29,000원 (250g)
	프로폴리스 스프레이	건강기능식품	프로폴리스추출물 UMF10+마누카꿀 20%, 글리세린, 정제수, 페퍼민트오일, 스타아니스오일, 물약오일, 멘톨	18,000원 (20mL)
	프로폴리스 틴처	건강기능식품	프로폴리스추출물(총 플라보노이드 97mg/g) 20%, 주정	45,000원 (25mL)



제품사진	제품명	식품유형	원재료 및 함량	가격
	프로폴리스 소프트겔(PFL30)	건강기능식품	프로폴리스추출물22.2%, 올리브오일, 경정셀룰로오스, 대두레시틴, 이산화규소, 밀납, D-알파-토코페롤, 대두오일	59,000원 (100캡슐)
	프로폴리스 타블렛(PFL30)	건강기능식품	프로폴리스추출물(총 플라보노이드 90mg/g) 16.67%, 결정셀룰로오스, 이소말트, 글리세린지방산에스테르, 이산화규소	59,900원 (100정)
	마누카꿀 로젠지-올리브	캔디류	설탕, 콘슈가, UMF10+마누카꿀 4.73%, 올리브잎추출액 2.02%, 멘톨	18,000원 (180g)
	마누카꿀 로젠지-프로폴리스&레몬	캔디류	설탕, 콘슈가, UMF10+마누카꿀 4.7%, 프로폴리스추출물 0.49%, 합성레몬향 0.37%, 멘톨, 페퍼민트오일	38,900원 (500g)
	프로폴리스 치약	의약외품	침강탄산칼슘 40.6g 외	11,000원 (100g)
	마누카꿀 블랙커런트 엘릭서	음료베이스	UMF10+마누카꿀 10%, 야생화꿀 블랙커런트 주스 농축 10%, 사과식초, 정제수, 엘더꽃파우더, 말토덱스트린, 글루콘산아연, 페퍼민트오일, 산탄검, 유칼립투스오일(천연향), 티트리오일(천연향), 펜넬오일	33,900원 (200mL)
	칠드런스 마누카꿀 레몬 엘릭서	음료베이스	UMF10+마누카꿀 10%, 야생화꿀, 사과식초, 프로폴리스추출물, 합성레몬향(0.1%), 구연산, 산탄검, 아이리쉬모스, 페퍼민트오일, 펜넬오일, 클로브잎오일,	31,900원 (200mL)



			유칼립투스오일(천연향)	
	화분과립	가공화분	화분 100% (원산지:호주)	65,900원 (250g)

### 2-3. 일본

- 일본의 벌꿀류 품질표시 및 그 기준

#### 1) 표시대상 상품

벌꿀류

#### 2) 표시해야하는 항목

벌꿀류(용기에 넣었거나 또는 포장된 물건에 한한다.)의 품질에 관한 표시에 있어서는, 농림자원의 규격화 품질표시 적정화에 관한 법률(JAS법)에 준하는 가공식품품질표시기준 등의 법령이 정하는 것과 동경도 소비생활조례(이하 조례로 표시)에서 정하는 것에 의해 아래의 사항을 표시한다.

(1) 품명

(2) 원재료의 비율 및 중량

#### 3) 표시방법 등

표시해야할 항목의 표시방법 등은 아래와 같다.

(1) 적용범위

① 조례의 적용범위

벌꿀류의 적용범위는, 벌꿀, 정제벌꿀, 당첨가벌꿀, 벌꿀집벌꿀 또는 벌꿀집 벌꿀 첨가 벌꿀로 한다. 벌꿀류라 하면 다음과 같다.

가. 벌꿀 : 꿀벌이 식물의 꽃꿀을 채집해서 벌집에 저장숙성시킨 천연의 감미물질을 말한다. (벌꿀에 정제벌꿀 또는 로얄제리, 화분, 향료, 과즙이나 비타민을 첨가한 것을 포함한다.)

나. 정제벌꿀 : 벌꿀으로부터 향기나 색을 제거한 것을 말한다.

다. 당첨가벌꿀 : 벌꿀에 이성화액당 또는 기타 당류를 첨가한 것으로, 벌꿀 함유량이 중량백분율로 60% 이상의 것을 말한다.

라. 벌꿀집 벌꿀 : 유충이 없는 벌집에 꿀벌에 의해 저장된 벌꿀로 벌꿀집 전체 또는 일부를 밀봉한대로 판매되고 있는 것을 말한다.

마. 벌꿀집 벌꿀 첨가 벌꿀

벌꿀에 벌꿀집 벌꿀을 첨가한 것을 말한다.

② 품명의 적용범위

벌꿀류에 있어서, 정제벌꿀, 당첨가벌꿀, 벌꿀집벌꿀 또는 벌꿀집 벌꿀 첨가 벌꿀에 적용한다.

③ 원재료의 비율 또는 중량의 적용 범위

정제벌꿀을 사용한 벌꿀류, 당첨가벌꿀, 벌꿀집 벌꿀 또는 벌꿀집 벌꿀 첨가 벌꿀 그리고 제품에서 차지하는 중량비율로 0.05% 이상의 로얄제리, 0.1% 이상의 화분 또는 과즙을 사용 및 첨가한 벌꿀류에 적용한다.

(2) 표시방법

① 품명

정제벌꿀에는 “정제벌꿀”이라고, 당첨가벌꿀에 있어서는 “가당벌꿀”, 벌꿀집 벌꿀에 있어서는 “벌꿀집벌꿀”, 벌꿀에 벌꿀집 벌꿀을 첨가한 것에 있어서는 “벌꿀집 벌꿀 첨가 벌꿀” 이라고 표시한다

다.

② 원재료의 함량비율 또는 중량

정제별꿀을 사용한 벌꿀류에 있어서는 정제별꿀의, 당첨가별꿀에 있어서는 사용한 당류의, 벌꿀집 벌꿀 첨가 벌꿀에 있어서는 벌꿀집 벌꿀 원재료에 해당하는 중량의 비율을 표시하고, 제품에서 차지하는 중량비율로 0.05% 이상의 로얄제리, 0.1% 이상의 화분 또는 과즙을 사용 및 첨가한 벌꿀류에 있어서는 로얄제리, 화분 또는 과즙의 원재료에 해당하는 중량 또는 중량의 비율을 표시한다. 사용하는 단위는 퍼센트(%) 또는 그램(g)으로 한다.

<< 표시예 >>

- 원재료의 비율: 설탕 0%
- 원재료의 중량: 로얄제리 0g

(3) 표시장소

2개의 규정에 의해 필수표시 사항은 용기 또는 포장의 잘 보이는 곳에 인쇄 또는 인쇄한 라벨을 붙이는 방법으로 표시할 것.

또는 품명의 표시사항은 가공식품품질표시기준에 준해 명칭(품명)란에, 그 이외에 표시사항을 아래의 방법으로 표시할 것.

① JAS법에 준하는 가공식품품질표시기준에 규정되어져 있는 원재료명란에는 “정제별꿀”이라는 글자를, 당류를 표시하는 글자 또는 “벌꿀집 벌꿀”이라는 글자, “로얄제리”라는 글자, “화분” 또는 “00과즙”이라는 글자를 괄호를 붙여서 표시

② JAS법에 준하는 가공식품품질표시기준에 규정되어져 있는 일괄표시란 내에 항목명을 표시

③ JAS법에 준하는 가공식품품질표시기준에 규정되어져 있는 표시항목에 근접된 장소에 항목명을 표시

(4) 글자의 크기 또는 배색

표시에 사용하는 글자는 일본공업규격 Z8305 (활자 기준방침)에서 규정하는 8포인트이상의 크기로 통일된 활자로 배경의 생과 대조적인 색으로 할 것.

- 일본에서는 “벌꿀류 품질표시 기준실시요강”에서 벌꿀 가공품에 대한 품질표시를 규제하고 있으며 실질적인 제품의 표시사례를 살펴보았음.

\* 실례 1



(1) 품명 : 하치미즈 시럽

(2) 원재료명 : 식이섬유(환원난소화성 텍스트린), 벌꿀, 에리스리톨, 감미료(아스파탐, L-페닐알라닌 화합물), 보존료(안식향산나트륨)

- (3) 내용량 : 180g
- (4) 유통기한 : 별도표시
- (5) 보존방법 : 직사광선을 피하고 서늘한 장소에 보관해 주세요.
- (6) 판매자 : 아지노모토주식회사

**\* 실례 2**



- (1) 품명 : 쿠로미즈
- (2) 원재료명 : 이소말토올리고당 시럽, 쿠로미즈(쇼당액당, 적당(조당, 당밀)), 벌꿀, 흑당벌꿀(오키나와산 흑당), 과당
- (3) 내용량 : 200g
- (4) 유통기한 : 별도표시
- (5) 보존방법 : 직사광선을 피하고 상온에 보관
- (6) 제조자 : (주)가련미봉원본원





**2-4. 한국**

- 영월농협의 브랜드인 동강마루는 고추장, 된장, 곡분류, 벌꿀 등을 판매하는 업체이며, 특히 벌꿀을 이용한 여러 제품의 유형들이 있음.


<동강마루 꿀 관련 제품 현황>

제품사진	제품명	식품유형	원재료 및 함량	가격
	아카시아벌꿀	벌꿀 (밀원:벌꿀100%)	아카시아벌꿀 100% (원산지:국산)	27,000원 (1kg)
	피나무꿀	벌꿀 (밀원:잡화(피나무))	벌꿀 100% (원산지:국산)	16,500원 (550g)

	잡화꿀	벌꿀 (밀원:벌꿀100%)	잡화꿀 100% (원산지:국산)	13,000원 (500g)
	야생화꿀	벌꿀 (밀원:벌꿀100%)	야생화꿀 100% (원산지:국산)	24,000원 (1kg)
	밤꽃꿀	벌꿀 (밀원:벌꿀100%)	밤꽃꿀 100% (원산지:국산)	27,000원 (1kg)
	꿀매실차	액상차	매실엑기스93%[매실50%(국내산),설탕50%], 잡화꿀7%(국내산)	18,500원 (630g)
	꿀오미자	액상차	오미자엑기스93%[오미자50%(국내산),설탕50%], 아카시아꿀7%(국내산)	22,000원 (630g)

제품사진	제품명	식품유형	원재료 및 함량	가격
	꿀생강차	액상차	당침생강16%[생강50%(국산),정백당50%],생강농축액(국산,고형분6%),액상과당45%,정백당21%,벌꿀10%(국산),푸드겔BF-100,올레오레진진저,구연산,정제수	8,500원 (1kg)
	꿀유자차	액상차	당침유자50%[유자50%(국산),정백당50%],액상과당25%,정백당12%,벌꿀7%(국산),구연산,푸드겔BF-100,비타민C,정제수	8,500원 (1kg)
	꿀벌화분	가공화분	화분100% (원산지:국산)	22,000원 (220g)
	벌꿀고추장	혼합장(살균제품)	쌀발효물40.65%[쌀83.3%(국산),정제소금16.7%(국산)]	10,000원



		)	,물엿17.34%,잡화꿀14.78%(국산),고춧가루12.82%(국산),설탕,정제소금(국산),주정,알파미,마늘(국산),원다시조미분K,다미분100	(500g)
---	--	---	---	--------

- 동서식품은 다양한 계열의 커피제품들과 커피크리머, 녹차, 곡물차, 시리얼, 벌꿀, 치즈, 비스킷 등의 제품들을 판매하고 있음. 동서식품의 메이저 브랜드는 맥심임.

<동서식품 꿀 관련 제품 현황>

제품사진	제품명	식품유형	원재료 및 함량	가격
	동서벌꿀 아카시아꿀	벌꿀(아카시아꿀)	아카시아벌꿀 100% (원산지:국산)	17,600원 (600g)
	동서벌꿀 다화꿀	벌꿀(잡화꿀)	벌꿀 100% (원산지:국산)	17,760원 (600g)

- 초록마을은 전국 470여개 매장과 온라인 쇼핑몰을 통해 1,500여가지 이상의 상품을 판매하고 있는 대한민국 친환경 유기농 브랜드임. 꿀 제품의 제조원은 전남 나주시 가보팜스 업체임.

<초록마을 꿀 관련 제품 현황>

제품사진	제품명	식품유형	원재료 및 함량	가격
	프리미엄밤꿀	벌꿀(밤꿀)	밤꿀 100% (원산지:국산)	21,500원 (600g)
	프리미엄잡화꿀	벌꿀(잡화꿀)	잡화꿀 100% (원산지:국산)	18,000원 (600g)
	프리미엄 아카시아꿀	벌꿀(아카시아꿀)	아카시아꿀 100% (원산지:국산)	18,500원 (600g)

				
	아카시아꿀	벌꿀(아카시아 꿀)	아카시아꿀 100% (원산지:국산)	9,100원 (500g)
	잡화꿀	벌꿀(잡화꿀)	잡화꿀 100% (원산지:국산)	11,000원 (500g)

- 중근당건강은 건강기능식품, 일반식품 등 건강, 미용 및 삶의 질을 개선하는 제품 등 다양한 Healthcare 제품을 판매하고 있는 업체임.


<중근당건강 꿀 관련 제품 현황>

제품사진	제품명	식품유형	원재료 및 함량	가격
	사양벌꿀	벌꿀(사양벌꿀)	사양벌꿀(국내산)90%, 잡화꿀(국내산)10%	14,480원 (2kg)
	비폴렌	화분제품	화분100% (원산지:스페인)	21,900원 (180g)
	들꽃꿀	벌꿀(잡화꿀)	벌꿀100% (원산지:국산)	7,450원 (300g)
	프로폴리스 플러스	건강기능식품	프로폴리스추출물[프로폴리스 추출물(호주산), 토덱스트린],건조효모(셀렌),산 화아연,결정셀룰로오스, 유당혼합분말[유당(미국산), 덱스트린],마늘발효추출물분말 (덱스트린),발효흑마늘추출물분 말),스테아린산마그네슘,이산화 규소	27,800원 (500mg x 60캡슐)



- 올즙은 건강즙을 제조, 판매하는 업체로 양배추, 사과, 배, 아로니아, 흑마늘, 갈라만시 등 여러 원물을 이용하여 단순가공 즙형태로 판매하고 있음.

<올즙 꿀 관련 제품 현황>

제품사진	제품명	식품유형	원재료 및 함량	가격
	올바른 허니스틱	액상차	꿀(국산)99.48%,더덕농축액(고형분50%이상,국산)0.3%,생강농축액(고형분60%이상,국산)0.2%,프로폴리스	25,900원 (15mL x 30포)

- 정우당은 건강가루(선식), 환, 액상차(즙), 유산균, 식초, 천연 오일, 조미료 등 다양한 형태의 제품을 수입 판매하는 업체임.

<정우당 꿀 관련 제품 현황>

제품사진	제품명	식품유형	원재료 및 함량	가격
	노니모과꿀차	추출가공식품	노니40%(베트남),모과40%(국산),꿀10%,정제수10%	31,000원 (110mL x 30포)
	초피꿀차	액상차	건강30%(국산),초피20%(국산),인삼20%(국산),꿀20%,정제수10%	70,000원 (110mL x 30포)
	보은대추꿀차	액상차	대추슬라이스(보은군)10%,대추농축액(고형분51.1%,보은군)8.8%,꿀(국산)19.9%,홍삼액기스(고형분8.7%,국산),고과당,저감미당,올리고당,카라기난,정백당	15,000원 (530g)
	아카시아벌꿀	벌꿀	아카시아꽃꿀20%,사양벌꿀80%	15,500원 (1kg)
	벌화분	가공화분	화분100% (원산지:스페인)	15,000원 (500g)

- 오뚜기는 조미식품류, 소스류, 유지류 등을 제조, 판매하는 종합식품회사로 '3분요리'란 브랜드로 레토르트 제품(건조식품류)이 주를 이루고 있음.

<오뚜기 꿀 관련 제품 현황>

제품사진	제품명	식품유형	원재료 및 함량	가격
	꿀모과차	액상차	모과당절임30%[모과50%(국산), 백설탕], 벌꿀2%(국산), 백설탕, 정제수, 이소말토올리고당5%, 비타민C, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 카라기난, 정제염, 구연산	5,900원 (1kg)
	꿀대추차	액상차	대추농축액20%[대추(국산), 고형분10%], 대추과육5%(국산), 벌꿀5%(국산), 액상과당, 정제수, 백설탕, 이소말토올리고당(7%), 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 카라기난, 합성착향료(대추향), 산탄검, 젖산칼슘, 구연산	7,900원 (1kg)
	꿀생강차	액상차	생강농축액6%[생강(국산), 고형분10%], 생강당절임19.5%[생강50%(국산), 백설탕], 벌꿀2%(국산), 액상과당, 정제수, 백설탕, 물엿, 이소말토올리고당5%, 카라기난, 카라겐, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 카라멜색소(천연색소), 올레오레진진저, 구연산	7,900원 (1kg)
	꿀유자차	액상차	유자당절임57%[유자50%(국산), 백설탕], 벌꿀3%(국산), 백설탕, 정제수, 이소말토올리고당5%, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 카라기난, 비타민C, 구연산	9,100원 (1kg)
	벌꿀야생화	벌꿀(야생화꿀)	벌꿀 100% (원산지:국산)	21,250원 (1kg)
	벌꿀아카시아	벌꿀(아카시아꿀)	벌꿀 100% (원산지:국산)	26,550원 (1kg)

▪ 그 외 업체(국내·외)

<국내·외 꿀 관련 제품 현황>

회사명/국가	제품사진	제품명	식품유형	원재료 및 함량	가격
고헬시/ 뉴질랜드		고 마누카 꿀 UMF 12+ 250g	벌꿀	마누카꿀 100% (원산지:뉴질랜드)	38,040원
푸르젠/ 대한민국		설탕없는 아카시아 꿀	아카시아벌 꿀	아카시아꿀 100% 또는 잡화꿀 100% (원산지:국산)	16,900원
토종원/ 대한민국		산딸기벌 꿀	벌꿀	꽃꿀 100% (원산지:국산)	39,300원 (1.2kg)
엘브레잘/ 스페인		비폴렌 벌화분	화분제품	화분100% (원산지:스페인)	25,000원 (235g)
안국건강/ 대한민국		안국레알 비폴렌	가공화분	가공화분100% (원산지:스페인)	22,000원 (180g)
대웅/ 대한민국		사양벌꿀	벌꿀 (사양벌꿀)	사양벌꿀(국산)90%, 잡화꿀(국산)10%	4,900원 (500g)
GNC/호주		아쿠아프 로폴리스 스프레이 플러스	건강기능식 품	프로폴리스추출물,마 누카꿀,도라지추출물 ,모과추출물,정제수, 글리세린,페퍼민트오 일	39,000원 (30mL)

**3. 벌꿀 기준 및 규격 현황**

**3-1. 국내**

- 식품의약품안전처에서 제공하는 ‘식품공전’의 내용은 [벌꿀 및 화분가공품류라 함은 꿀벌들이 채집하여 벌집에 저장한 자연물 또는 이를 가공한 것으로 벌꿀류, 로열젤리류, 화분가공식품을 말함].

**3-1-1. 벌꿀류**

- 벌꿀류라 함은 꿀벌들이 꽃술, 수액 등 자연물을 채집하여 벌집에 저장한 것 또는 이를 채밀한 것을 말함.
- 제조·가공기준은 화분, 로열젤리, 당류, 감미료 등 다른 식품이나 첨가물을 첨가하여서는 안됨.

<벌꿀류 식품 유형>

유형	벌집꿀	벌꿀	사양벌집꿀	사양벌꿀
수분(%)	23.0이하	20.0이하	23.0이하	20.0이하
물불용물(%)	-	0.5이하	-	0.5이하
산도(meq/kg)	-	40.0이하	-	40.0이하
전화당(%)	50.0이상	60.0이상	50.0이상	60.0이상
자당(%)	15.0이하	7.0이하	15.0이하	7.0이하
히드록시메틸푸르푸랄(mg/kg)	80.0이하			
타르색소	-	검출되어서는 아니 된다.	-	검출되어서는 아니 된다.
사카린나트륨	-	검출되어서는 아니 된다.	-	검출되어서는 아니 된다.
이성화당	-	검출되어서는 아니 된다.	-	검출되어서는 아니 된다.
탄소동위원소비율(%)	-22.5%이하	-22.5%이하	-22.5%초과	-22.5%초과

- 벌집꿀; 꿀벌들이 꽃꿀, 수액 등 자연물을 채집하여 벌집 속에 저장한 후 벌집의 전체 또는 일부를 봉한 것 또는 이에 벌꿀을 가한 것으로 벌집 고유의 형태를 유지하고 있는 것을 말함.
- 벌꿀; 꿀벌들이 꽃꿀, 수액 등 자연물을 채집하여 벌집에 저장한 것을 채밀, 숙성 시킨 것을 말함.
- 사양벌집꿀; 꿀벌을 설탕으로 사양한 후 채취한 벌집꿀 또는 이에 벌꿀이나 사양벌꿀을 가한 것으로 고유의 형태를 유지하고 있는 것을 말함.
- 사양벌꿀; 꿀벌을 설탕으로 사양한 후 채밀, 숙성시킨 것을 말함.

### 3-1-2. 로열젤리류

- 로열젤리류라 함은 일벌의 인두선에서 분비되는 분비물을 그대로 또는 이를 가공한 것으로 로열젤리제품 제조 시 생로열젤리의 경우 35.0% 이상, 동결건조로열젤리의 경우 14.0% 이상 사용하여야 함.

<로열젤리류 식품 유형>

유형	로열젤리	로열젤리제품
10-히드록시-2-데센산(%)	1.6이상 (건조제품은 4.0이상)	0.56이상
수분(%)	65.5~68.5 (건조제품은 5.0이하)	-
조단백질(%)	11.0~14.5 (건조제품은 30.0~41.0)	-
산도(1N NaOH mL/100g)	32~53 (건조제품은 제외한다.)	-
대장균	n=5, c=1, m=0, M=10	

- 로열젤리; 일벌의 인두선에서 분비되는 분비물인 로열젤리를 식용에 적합하도록 이물을 제거한 것이거나 이를 건조한 것을 말함.
- 로열젤리제품; 로열젤리를 제조·가공한 것을 말함.

### 3-1-3. 화분가공식품

- 화분식품이라 함은 화분을 껍질 파쇄, 추출, 농축, 정제 등의 공정을 거친 것이거나 이를 가공한 것을 말하며, 원료 화분은 꿀벌에 의해 채취된 것이거나 기타의 방법으로 채취된 것으로 이물이 섞여 있지 않아야 함.

<화분가공 식품 유형>

유형	가공화분	화분함유제품
수분(%)	8.0이하 (액상제품은 제외한다.)	10.0이하 (액상제품은 제외한다.)
조단백질(%)	18.0이상 (건조물로 환산)	2.0이상
타르색소	검출되어서는 아니 된다.	
대장균	n=5, c=1, m=0, M=10	

- 가공화분; 꿀벌 또는 인공적으로 채취한 화분에서 이물을 제거하고 껍질을 파쇄한 것 또는 효소처리하여 추출한 것을 농축하거나 분말화한 것을 말함.
- 화분함유제품; 화분(30.0% 이상) 또는 화분추출물(고형분으로서 10.0% 이상)을 주원료로 하여 제조·가공한 것을 말함.

### 3-2 캐나다

- 캐나다 벌꿀 규격 및 기준을 확인하기 위해 캐나다 법무부에서 검색한 결과, 벌꿀은 오염되지 않아야 하며, 식용 가능하고, 위생적인 방법으로 채취한 것을 사용하여야 한다고 명시되어 있음.
- 벌꿀의 등급을 부여하여 캐나다 1호, 2호, 3호가 있음. 이 규정은 꿀이 액상인 동안 색깔로 분류해야 하며, 아래의 규정에 따라 등급이 부여됨.

#### <캐나다 벌꿀 등급 규정>

1. 꿀벌의 일을 통해 꽃이 피거나 식물의 살아있는 부분에 분비된 꿀에서 추출하여야 함.
2. 액체, 점성 또는 부분적으로 또는 전체적으로 결정화된 점조도
3. 히드록시메틸푸르푸랄 함량 40mg/kg 이하
4. 청결하며, 인간의 식용가능성에 심각한 영향을 끼치지 않아야 함

### 3-3 미국

- 미국은 아직 꿀에 대한 식품 규격 및 기준이 명확하지 않으나, FDA에서는 벌꿀을 소스로 분류하였음.
- FDA의 꿀 정책으로는 특정 식물 또는 꽃송이가 'Orange blossom honey 또는 clover honey 와 같은 벌꿀의 주요 꽃 소스인 경우 식물 또는 꽃이름으로 꿀 제품에 표시함. 꿀 생산자의 경우 라벨에 지정된 식물이나 꽃이 꿀의 주요 원천임을 나타내어야 함.

### 3-4 호주·뉴질랜드

- 호주·뉴질랜드 식품기준법에서 꿀(Honey)은 꽃의 꿀, 식물의 살아 있는 부분의 분비물, 식물의 살아 있는 부분에서 식물의 즙액을 빼는 곤충이 배출한 분비물에서 꿀벌이 수집하여 자신의 특정 물질을 사용해 변형, 결합한 후 벌집에 보관하여 숙성시키는 천연 당 물질을 의미함.
- 꿀로써 판매되는 식품의 요건에는 꿀이어야 하고 60% 이상의 환원당과 21% 이하의 수분이 존재하여야 함.

## 4. 국내 벌꿀 가공품 분류 기준 (안)

### 4-1. 국내,외 벌꿀 가공품

- 국내 식품공전상의 일반가공식품의 기준 규격은 식품의 유형에 따라 기준규격, 시험방법등이 규정되어 있음.
- 벌꿀류는 위에서 정의한 벌집꿀, 벌꿀, 사양벌집꿀, 사양벌꿀로 유형이 구분되어 있으며, 유형별 기준규격이 설정 되어 있음.
- 별도의 벌꿀가공품에 대한 기준 규격은 설정되어 있지 않으며, 다양한 원, 부재료로 사용이 가능하며 사용량을 식품 및 기타 표시 기준에 의해 표시 하고 있음.
- 해외에서도 꿀 제품에 대한 기준 규격은 구분되어 있으나 가공품에 대한 분류는 별도로 구분되어 있지 않음

4-2. 벌꿀가공품 기준(안) 개발

1) 벌꿀 함유 당류 가공품 (당첨가 벌꿀)

- 정의 ; 벌꿀함유 당류라 함은 벌꿀을 원료로하여 기타 설탕류, 시럽류, 올리고당류, 포도당류, 과당류, 물엿류 또는 이를 가공한 당류를 포함한 가공품을 말한다.
- 원료등의 구비조건 ; 벌꿀은 식품공전 29-7항 벌꿀류의 정의에 의한 벌꿀 기준 규격에 따른다.
- 제조, 가공 기준; 벌꿀을 원료로한 당류 가공품의 각각의 적정 제조 조건에 따른다.
- 규격;
  - 벌꿀 (%) 60% 이상
  - 수분(%) 25% 이하
  - 타르색소 불검출
  - 인공감미료 불검출
  - 중금속 (납) mg/kg 1.0 이하

2) 표시기준

식품공정의 표시기준에 따른다.

① 품명

당첨가벌꿀에 있어서는 “가당벌꿀” 이라고 표시한다.

② 원재료의 함량비율 또는 중량

당첨가벌꿀에 사용한 당류의 원재료에 해당하는 중량의 비율을 표시한다.  
사용하는 단위는 퍼센트(%) 또는 그램(g)으로 한다.

<< 표시예 >>

- 원재료의 비율: 설탕 0%
- 원재료의 중량: 벌꿀 0g

3) 표시장소, 글자의 크기 등

- 2개의 규정에 의해 필수표시 사항은 용기 또는 포장의 잘 보이는 곳에 인쇄 또는 인쇄한 라벨을 붙이는 방법으로 표시할 것.
- 또는 품명의 표시사항은 식품공전 제품표시기준에 준해 명칭(품명)란에, 그 이외에 표시사항을 아래의 방법으로 표시할 것.

바. 수집벌꿀의 성분분석 결과(강원도 보건환경연구원)

● 분석 벌꿀 목록

샘플 번호	샘플 정보	시료구 분	밀원	원산지
X-139	오뚜기벌꿀아카시아	양봉	아카시아	국산
X-140	오뚜기벌꿀잡화	양봉	잡화	국산
X-141	윤상복벌꿀가족(대추나무)	양봉	대추	국산
X-142	방산꿀(잡화꿀)	양봉	잡화	국산
Y-040	강원도석청	토종		국산
Y-041	2016토종각두꿀 각두꿀	토종		국산

Y-042	2017토종각두꿀 대청봉	토종		국산
Y-043	2016.9. 토종각두꿀 점봉산	토종		국산
W-063	순수벌꿀	국외수집		
W-064	하치미쯔(중국)	국외수집		중국
W-065	하치미쯔(캐나다산)	국외수집		캐나다
W-066	아카시아벌꿀	국외수집	아카시아	
W-067	아카시아허니(프랑스)	국외수집	아카시아	프랑스
W-068	아카시아허니(헝가리)	국외수집	아카시아	헝가리
W-069	하치미쯔(캐나다,아르헨티나)	국외수집		캐나다
W-070	로얄젤리첨가하치미쯔(아르헨티나)	국외수집		아르헨티나
W-071	하치미쯔(아카시아)	국외수집	아카시아	
W-072	하치미쯔(꿀)	국외수집	꿀	
W-073	하치미쯔(벚꽃)	국외수집	벚꽃	
W-074	하치미쯔(사과)	국외수집	사과	
W-075	아카시아하치미쯔(우크라이나,미국,프랑스)	국외수집		우크라이나, 미국, 프랑스
W-076	하치미쯔(중국,이탈리아,프랑스)	국외수집		중국외
W-077	하치미쯔(일본)	국외수집		일본
W-078	하치미쯔(백화,일본)	국외수집	백화	일본
W-079	하치미쯔(중국)	국외수집		중국
V-001	지리산 마천 토봉 아로니아꿀	토봉	아로니아	국산
V-002	지리산 마천 토봉 잡화꿀	토봉		국산
W-080	하치미쯔(클로버)	국외수집	클로버	
W-081	하치미쯔(민들레)	국외수집	민들레	
W-082	하치미쯔(참피나무)	국외수집	참피나무	
W-083	하치미쯔(백화)	국외수집	백화	
W-084	Raw Honey(white clover, blossom)	국외수집		
W-085	순수 하치미쯔(캐나다)	국외수집		캐나다
W-086	아르헨티나산 순수 하치미쯔	국외수집		아르헨티나
W-087	일본 꿀벌 하치미쯔(나가사키현)	국외수집		일본
W-088	일본 꿀벌 하치미쯔(효고현)	국외수집		일본
W-089	국산북해도하치미쯔	국외수집		일본
W-090	아카시아밀봉	국외수집	아카시아	
W-091	하치미쯔(북해도)	국외수집		일본
W-092	하치미쯔(사쿠라, 벚꽃)	국외수집	벚꽃	일본
W-093	하치미쯔(링고, 사과)	국외수집	사과	
W-094	하치미쯔(아카시아)	국외수집	아카시아	
W-095	하치미쯔(백화꿀)	국외수집	백화	
W-096	Queen Bee Fruit honey(블루베리)	국외수집	블루베리	
W-097	Queen Bee Fruit honey(레몬)	국외수집	레몬나무	
W-098	Queen Bee Fruit honey(딸기)	국외수집	딸기	
W-099	Queen Bee Fruit honey(키위)	국외수집	키위	
W-100	Queen Bee Fruit honey(피조아)	국외수집	피조아	



W-101	Queen Bee Manuka Honey MGO 50+	국외수집	마누카	
W-102	Queen Bee Manuka Honey MGO 80	국외수집	마누카	
W-103	Queen Bee Manuka Honey MGO 100+	국외수집	마누카	
W-104	Queen Bee Manuka Honey MGO 250+	국외수집	마누카	
W-105	Queen Bee Manuka Honey MGO 400+	국외수집	마누카	
W-106	Queen Bee Manuka Honey MGO 550+	국외수집	마누카	
W-107	Queen Bee Manuka Honey MGO 100+(큰통)	국외수집	마누카	
W-108	Queen Bee Manuka Honey MGO 550+(큰통)	국외수집	마누카	
W-109	Manuka Honey pure honey	국외수집	마누카	
W-110	Manuka Honey MGO100	국외수집	마누카	
W-111	Manuka Honey MGO200	국외수집	마누카	
W-112	Manuka Honey MGO400	국외수집	마누카	
W-113	Manuka Honey MGO1000	국외수집	마누카	
W-114	ROCKY ICE HONEY(CANADA)	국외수집		캐나다
X-143	강원도 허니원(밤꽃꿀)	양봉	밤	
X-144	강원도 허니원(아카시아꿀)	양봉	아카시아	
X-145	강원도 허니원(야생화꿀)	양봉	야생	

● 벌꿀 이화학적 성분 분석

샘플 번호	수분(%)	과당(%)	포도당(%)	전화당(%)	자당(%)	HMF (mg/kg)	인공감미료	비고
X-139	18.10	45.08	28.85	73.93	0.00	3.73	불검출	
X-140	18.60	43.90	28.40	72.30	0.00	14.54	불검출	
X-141	17.10	37.99	26.90	64.90	1.08	0.00	불검출	
X-142	17.60	44.47	28.24	72.71	0.17	13.42	불검출	
Y-040	19.00	37.12	31.76	68.88	1.99	0.00	불검출	
Y-041	17.00	41.07	34.52	75.59	0.38	2.51	불검출	
Y-042	18.20	38.93	33.60	72.53	0.39	4.35	불검출	
Y-043	20.00	38.13	33.79	71.91	1.48	0.00	불검출	
W-063	17.50	39.51	33.97	73.48	0.48	21.98	불검출	
W-064	18.10	40.16	37.18	77.34	0.00	27.17	불검출	
W-065	17.60	38.64	37.77	76.41	0.00	18.91	불검출	
W-066	17.00	43.63	31.29	74.92	0.06	15.36	불검출	
W-067	18.20	42.67	25.36	68.03	0.00	4.01	불검출	
W-068	17.10	42.66	28.47	71.13	1.17	12.27	불검출	
W-069	17.60	38.24	35.29	73.52	1.32	15.57	불검출	
W-070	17.70	38.13	33.23	71.35	1.55	25.96	불검출	
W-071	18.00	42.40	27.90	70.31	1.67	2.92	불검출	
W-072	17.40	42.81	28.16	70.97	2.01	4.01	불검출	
W-073	16.40	38.28	30.81	69.09	0.00	4.25	불검출	
W-074	18.00	37.05	31.06	68.11	0.00	17.46	불검출	

W-075	17.40	38.29	33.58	71.88	1.38	3.26	불검출	
W-076	17.60	42.64	35.98	78.62	0.06	20.32	불검출	
W-077	17.40	39.39	31.13	70.52	0.19	15.64	불검출	
W-078	17.50	40.46	39.59	80.05	0.00	15.77	불검출	
W-079	17.40	38.36	37.99	76.35	0.22	22.83	불검출	
V-001	21.40	35.56	31.23	66.79	1.34	11.37	불검출	
V-002	16.60	36.83	31.11	67.94	1.14	55.67	불검출	
W-080	19.40	39.28	29.04	68.33	0.00	6.42	불검출	
W-081	17.60	40.06	32.25	72.31	1.15	16.86	불검출	
W-082	19.40	37.31	32.27	69.58	0.15	0.00	불검출	
W-083	17.90	39.51	30.22	69.73	3.17	4.44	불검출	
W-084	13.00	39.82	31.90	71.72	1.24	15.79	불검출	
W-085	18.40	41.58	33.99	75.58	0.00	23.35	불검출	
W-086	16.00	39.18	34.27	73.45	0.00	23.59	불검출	
W-087	18.60	40.46	31.17	71.64	0.00	17.30	불검출	
W-088	18.60	40.47	28.95	69.42	0.00	77.39	불검출	
W-089	18.40	36.53	29.59	66.12	0.00	8.02	불검출	
W-090	18.20	40.02	28.63	68.65	0.00	116.02	불검출	
W-091	18.40	38.91	28.89	67.80	0.00	14.63	불검출	
W-092	16.20	38.18	31.79	69.98	0.00	6.02	불검출	
W-093	18.60	39.35	31.52	70.86	0.00	7.65	불검출	
W-094	18.90	40.84	27.59	68.42	1.05	5.36	불검출	
W-095	18.60	37.43	32.45	69.87	0.00	10.09	불검출	
W-096	17.90	38.02	32.47	70.49	0.00	17.06	불검출	
W-097	17.70	34.02	26.11	60.13	0.00	62.40	불검출	
W-098	17.40	36.03	25.63	61.66	0.00	14.43	불검출	
W-099	17.80	35.09	25.14	60.23	0.00	30.36	불검출	
W-100	17.50	34.12	24.92	59.04	0.00	19.66	불검출	
W-101	18.00	37.49	29.89	67.38	0.00	33.20	불검출	
W-102	19.40	38.24	32.17	70.42	2.19	30.09	불검출	
W-103	16.70	37.76	29.85	67.60	2.54	21.92	불검출	
W-104	18.40	41.56	34.59	76.14	1.66	21.03	불검출	
W-105	19.40	40.96	33.96	74.92	1.40	20.37	불검출	
W-106	19.40	40.39	33.20	73.58	1.75	18.58	불검출	
W-107	18.40	37.40	31.40	68.80	2.20	33.27	불검출	
W-108	19.80	41.15	32.96	74.11	1.68	25.81	불검출	
W-109	17.60	36.41	31.59	68.01	2.22	15.76	불검출	
W-110	17.20	38.36	33.42	71.78	2.03	27.66	불검출	
W-111	18.20	39.14	34.46	73.60	1.75	24.23	불검출	

W-112	17.40	40.79	35.81	76.60	1.30	24.69	불검출	
W-113	19.50	41.63	35.30	76.93	1.31	46.18	불검출	
W-114	16.60	38.84	39.40	78.24	1.90	12.05	불검출	
X-143	18.80	39.66	22.15	61.81	3.34	9.04	불검출	
X-144	17.80	45.10	29.95	75.06	1.74	13.66	불검출	
X-145	16.60	42.20	25.59	67.78	3.48	8.43	불검출	

● 항목별 성분 결과

- 수분 (규격기준: 20.0% 이하)

구분	시료수	평균(%)	표준편차	최소	최대	비고
X-시료	7	17.8	0.8	16.6	18.8	
Y-시료	4	18.6	1.3	17.0	20.0	
W-시료	52	17.9	1.1	13.0	19.8	
v-시료	2	19.0	3.4	16.6	21.4	
합계	65	18.3	1.6	15.8	20.0	

- 전화당 (규격기준: 60% 이상)

구분	시료수	평균(%)	표준편차	최소	최대	비고
X-시료	7	69.8	5.0	61.8	75.1	
Y-시료	4	72.2	2.8	68.9	75.6	
W-시료	52	71.1	4.6	59.0	80.0	
v-시료	2	67.4	0.8	66.8	67.9	
합계	65	70.1	3.3	64.1	74.7	

- 자당 (규격기준: 7.0% 이하)

구분	시료수	평균(%)	표준편차	최소	최대	비고
X-시료	7	1.4	1.5	0.0	3.5	
Y-시료	4	1.1	0.8	0.4	2.0	
W-시료	52	0.8	0.9	0.0	3.2	
v-시료	2	1.2	0.1	1.1	1.3	
합계	65	1.1	0.8	0.4	2.5	

- 히드록시메틸푸르푸랄 (규격기준: 80mg/kg 이하)

구분	시료수	평균(%)	표준편차	최소	최대	비고
X-시료	7	9.0	5.5	0.0	14.5	
Y-시료	4	1.7	2.1	0.0	4.3	
W-시료	52	21.1	19.3	0.0	116.0	
C-시료	2	33.5	31.3	11.4	55.7	
합계	65	16.3	14.6	2.8	47.6	

- 인공감미료 (규격기준: 불검출) : 65건 모두 불검출

## 2) 제 2세부 과제

### 가. 신속한 사양꿀 판별법 개발

#### ● 연구목적

- 꿀이란 꿀벌들이 꽃 꿀, 수액 등 자연물을 채집하여 벌집에 저장한 것을 채집 하여 숙성시킨 것을 말한다(1). 꿀은 장내 미생물의 정상작용을 위한 prebiotics, 항산화제, 항균성, 항 돌연변이 등의 효능이 있어 건강기능성 식품으로 취급되었다(2-5). 이러한 효능으로 인해 꿀의 수요는 증가하였지만, 천연 밀원의 부족으로 꿀의 생산이 제한적이라 공급이 많이 부족한 상황이다. 이를 해결하기 위해 국내에서는 사양 꿀의 판매를 허가하였다. 사양 꿀이란 장마철이나 동절기에 설탕을 꿀벌의 먹이로 이용하여 생산하는 꿀이다. 국내에서는 2009년도에 사양 꿀의 판매가 허가되면서 꽃 꿀과 사양 꿀의 분류를 위해서 꿀 판매 시 꿀의 출처를 표기하는 자율표시제를 시행하였다(18). 하지만 꽃 꿀과 사양 꿀의 분별이 전문성을 요하고 있고 또한 분별에 대한 까다로움이 있어 이를 악용하는 사례들이 있다. 이러한 문제는 꽃 꿀 품질의 저하를 초래하고, 소비자들의 국산 꿀에 대한 신뢰도를 저하시켜 궁극적으로는 꽃 꿀을 생산하는 농가에 피해를 입히고 있다.
- 현재 국내뿐만 아니라 국외에서도 꽃 꿀의 고급화를 위해 두 꿀을 판별하는 여러 실험법이 사용되고 있다. 판별법 중에는 high performance liquid chromatography(HPLC)(6), electrophoresis(7), capillary gas chromatography(8,9), anion exchange liquid chromatography(10), stable carbon isotope ratio analysis(SCIRA)(11,12) 그리고  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy(13) 등의 여러 방법이 존재한다. 그 중 가장 일반적으로 적용되는 방법은  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 의 동위원소 비율을 검출하는 방법인 SCIRA이다.
- 사양 꿀의 생산에 밀원으로서 이용되는 설탕은 사탕수수 기원과 사탕무 기원으로 나눌 수 있는데 이들은 각각 Calvin-Benson 광합성 회로(C3)와 Hatch-Slack 광합성회로(C4)의 서로 다른 광합성 경로를 가지고 있다. 이 결과로 사탕수수 기원과 사탕무 기원의 설탕은 탄소의 동위원소 비율이 달라지고, 꽃 꿀과 사양 꿀의 탄소 동위원소 비율도 달라진다. 이러한 원리를 기반으로 꿀의 탄소의 동위원소 비를 측정함으로써 꽃꿀과 사양 꿀을 구별할 근거로 제시하고 있다(14-17). 그러나 사양꿀의 제조에 사용한 꿀이 사탕 무 기원의 설탕일 경우에는 사양꿀과 꽃

꿀을 구별 할 수 없게 된다. 실제로 양봉장 부근에서 사탕무 설탕의 폐 포장지가 발견되고 있는 실정이다. 국내의 경우 사탕무 설탕의 유통을 통제하므로써 규제가 가능하다고 보나 외국에서 수입한 꿀의 경우에는 전혀 구분 할 수 없으므로 설탕 유래의 물질을 검출하여 사탕무 기원이거나 사탕 수수 기원이거나 관계없이 구별 할 수 있는 분석 방법의 개발이 시급하다..

- 설탕의 생산 정제과정을 살펴보면 고온처리, 산, 알칼리 처리 등 가혹한 조건을 거치게 되므로 생성된 불순물은 미량이나마 설탕에 잔존하게 된다. 대표적인 예로 꿀의 가열 여부를 판단하는데 사용하는 5-hydroxy methyl furfural(5-HMF)를 들 수 있다. 벌꿀의 숙성 과정 중 잔존 하게 될 이런 불순물들은 가열한 원료 기원의 물질로서 판단 할 수 있으며 설탕을 급여한 꿀이라는 판단 근거가 될 수 있다.
- 따라서 본 연구에서는 사탕 수수 및 사탕 무 설탕 기원의 생산시 공통적으로 생산되는 공통적인 불순물 물질을 확인하고 그 물질을 지표 물질로 삼아 사양 꿀을 신속하게 판별하는 방법을 제시하고자 하였다.

#### ● 재료 및 방법

##### a) 재료 및 시약

- 실험에는 쓰인 꿀들은 국내외에서 시판중인 것을 수집하여 사용하였다. 통제된 사육 환경에서 인공적인 사양을 하여 제작한 꿀의 밀원으로 사탕수수 설탕, 사탕무 설탕을 사용하였다. 시약으로는 Dansyl chloride(Sigma Aldrich, USA), 2-nitrophenylhydrazine hydrochloride(NPH) (Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd, Japan), 2, 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Kanto Chemical Co., INC, Japan), pyridine (Kanto Chemical Co., INC, Japan), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (1-EDC) (Sigma-aldrich, USA), hydrochloric acid (㈜대정화금), sodium hydroxide(㈜대정화금) 등의 특급품 시약을 사용하였다.
- TLC plate는 HPTLC Silica gel 60 F254 (glass plates 20 × 10 cm) (MERCK, Germany) 를 사용하였다.

##### b) 꿀의 2,4-Dinitrophenyl hydrazine(DNPH) 유도체 분석

- 벌꿀을 증류수에 50%(w/v)로 희석한 후 원심분리(14,000rpm, 5분)하여 화분을 제거하여 얻은 꿀 희석액 500μL 와 0.1%(w/v) DNPH(in 2N HCl) 500μL를 혼합 후 상온에서 차광하여 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 benzene 500μL를 가하고, vortexing(2분)과 원심분리(14,000rpm 5분)를 하여 상등액을 취했다.
- 상등액 500μL를 80 °C에서 완전히 evaporation 한 후 benzene을 50μL 첨가하여 재 용해하였다. 재 용해한 benzene 용액은 TLC에 5μL spotting 하여 Benzene : Ethyl acetate (1 : 4, v/v) 용매로 전개 하였다. 전개 후 TLC plate를 건조 한 후 5%(w/v) NaOH( in 80% EtOH)를 도포한 후 hot plate 에서 가열하여 발색하였다.

##### c) 각종 꿀의 DNPH 유도체 분석

- 꿀벌에게 사탕수수 설탕만 먹여서 생산한 꿀, 사탕무 설탕만을 먹여 생산한 꿀, 꽃 꿀을 채집하여 생산한 꿀, 설탕과 꽃 꿀을 혼합하여 생산한 꿀, 시판되고 있는 사양 꿀과 사탕수수 설탕을 이용한 DNPH 유도체를 TLC에 전개하여 비교 분석하였다.

- 또한 국내외에서 구입한 수종의 토봉, 양봉 꿀 역시 DNPH 유도체화 하여 TLC상에서 특이 물질 유무를 확인 분석하였다.

d) High performance liquid chromatography (HPLC)를 통한 분리 정제 및 분석

- Preparative-HPLC 를 이용한 특이 물질 분리 정제 : HPLC 기기는 YL 9100(주 영린기기)을 사용하였고, 분리 정제를 위한 column으로는 prep-C18 column (21.2mm × 250mm 10µm, Agilent, USA)을 사용하였으며, column temperature 25 °C, mobile phase는 H<sub>2</sub>O와 MeOH 30대 70 비율로 혼합하여 사용하였다. 검출은 352nm, flow rate는 6mL/min으로 흘려주었다.
- 분석용 HPLC를 이용한 특이 물질 분석 : preparative-HPLC와 동일한 기기를 사용하였으며, column으로 TC-C18 column (250mm × 4.6mm 5µm, Agilent, USA)을 사용하였고, flow rate 0.8mL/min으로 흘려주었다. mobile phase와 column temperature, 검출 U.V는 preparative-HPLC와 동일하다.

e) Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) 측정을 통한 분자 구조 분석(19)

- GC (Agilent 7890A) column은 HP-5MS (30mm × 0.25mm, 0.25µm) 사용하였다. Column flow 1mL/min 로 He 기체를 사용하였다. Inlet temperature 230 °C, oven 100 °C(0.1min)로 시작하여 18 °C/min로 증가 시켜 최종 온도 330 °C로 상승 시키고, 330 °C에서 3분간 holding 하였다. MS (Agilent 5975C) ion source로 electro ionization(EI)로 70 eV를 사용하였다. Ion source temperature는 280 °C이며 scan range은 50-450 m/z를 사용하였다. Solvent delay time은 4.5min 이다.

f) 표적물질 합성물과 비교

- 꿀의 판별에 주요한 표적 물질은 HPLC 분석을 통해 설탕액에서 분리하였다. 표적물질의 예상 구조를 참고하여 인공적으로 합성한 표적 물질의 NMR을 통해 구조 분석하였다.

g) 사탕수수 착즙액 DNPH 유도체 분석

- 사탕 꿀의 특이 물질은 밀원인 설탕에서 유래한 것으로 보고 설탕의 제조과정과 동일한 처리과정을 사탕수수 착즙액에 적용하여 실제로 사탕 꿀의 특이 물질이 생성되는지 확인하였다. 사탕수수는 시판되고 있는 착즙용 사탕수수를 구매하였고 착즙액의 열처리는 150 °C에서 착즙액을 evaporation 하였고 후에 다시 복원하여 재 용해 하였다.

h) 꿀의 Methylglyoxal 함량 분석

- 꿀의 Methylglyoxal(MGO) 함량은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 시료는 전처리 과정을 거치는데 다음과 같다. 꿀의 희석액을 30% 로 제조한 후 꿀 희석액 이나 MGO standard 1.2mL에 2% o-phenyldiamine 0.6mL를 혼합한 후 암실에서 16시간 반응 하여 준비했다. 그 후에 HPLC를 통해 MGO 함량을 분석하였다.

● 결과 및 논의

a) 꿀의 2,4-Dinitrophenyl hydrazine(DNPH) 유도체 분석을 통한 특이 물질 탐색

- DNPH는 carbonyl 화합물과 쉽게 반응하여 유도체를 형성하는데 생성된 유도체의 패턴이 꽃 꿀과 사탕 꿀에서 다르게 나타나므로 국내외의 다양한 시료를 대상으로 반응시켜 차이점을 분석하였다.

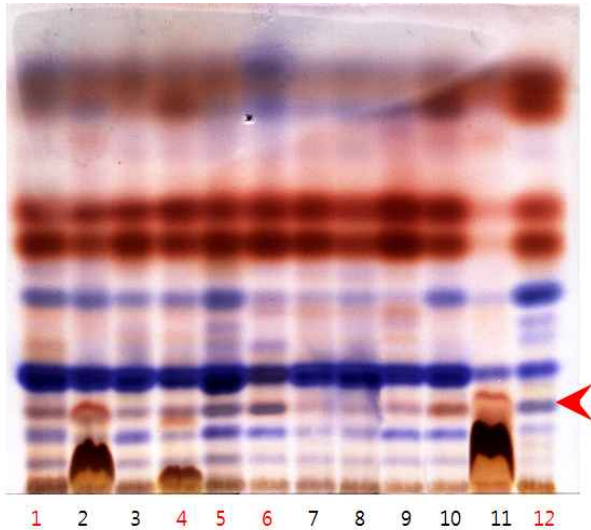


Figure 1. DNP-derivative analysis with TLC

Developing solvent (chloroform : ethanol = 3 : 2, v/v). Lane 1 : 사양 꿀 a , 2 : 잡화 꿀 a, 3 : 아카시아 꿀 a, 4 : 사양 꿀 b, 5 : 아카시아 꿀 b, 6 : 잡화 꿀 b, 7 : 잡화 꿀 c, 8 : 밤 꿀, 9 : 생 꿀 (잡화), 10 : 아카시아 꿀 c, 11 : 잡화 꿀 c, 12 : 사탕수수 설탕

- Fig. 1의 분석 결과를 보면 설탕과 본 연구에서 인위적으로 제조한 사양 꿀에서만 검출 되고, 2, 7, 8, 11번 등 lane에서는 검출되지 않는 band가 확인되었다(화살표). 이 물질이 사양 꿀 특이 물질이라 추정하고 있으며, 설탕으로 사양한 꿀에서만 검출 되어, 설탕에서 유래한 물질이라 추정할 수 있다. 그러나 파란색 밴드 위치에 갈색의 밴드가 겹쳐서 판단의 혼란을 가져오기 때문에 두 밴드를 분리시키는 실험을 진행하였다.

#### b) 사양 꿀을 이용한 DNP-유도체 분석

- 꿀벌에게 사탕수수 설탕만을 먹여 생산한 꿀, 사탕무 설탕만을 먹여 생산한 꿀, 꽃 꿀을 채집하여 생산한 꿀, 꽃 꿀과 설탕을 혼합하여 생산한 꿀, 시판되고 있는 사양 꿀과 사탕수수 설탕을 이용한 DNP-유도체를 TLC를 통해 비교 분석하였다.
- 분석한 결과 사탕수수 설탕을 먹여서 생산한 꿀, 사탕무 설탕을 먹여 생산한 꿀, 꽃 꿀과 설탕을 혼합한 꿀, 시판되고 있는 사양 꿀과 사탕수수 설탕에서는 특이 물질로 추정 되는 물질이 검출되었으나, 꽃 꿀을 채집하여 생산한 꿀에서는 검출되지 않아 사양 꿀 특이 물질임을 확인 하였다. 또한 사양 꿀 특이 물질이 원료인 설탕과 설탕을 먹인 꿀에서 공통적으로 검출되므로 설탕의 제조 과정에서 유래된 물질로 추정하였다.
- 방법의 간편화를 위해 기존에 사용되었던 DNP-반응법을 여러 가지로 조정하였다. 실제 현장에서 판별법을 쓸 경우 사양 꿀 특이물질의 검출 한계를 알아둘 필요가 있다. 그러므로 50% (w/v) 꿀 희석액보다 더 희석된 시료를 제작하여 DNP-유도체 분석을 하였다. 그 결과 꿀 희석액은 50% (w/v) 보다 8배 더 희석된 4% (v/v) 꿀 희석액 에서도 사양꿀의 특이물질이 관찰 되었다. 그 이상 희석된 시료에서는 육안으로 확인이 쉽지 않았다. 설탕용액의 경우는 40%

(w/v) 설탕용액의 2배 희석액, 20% (v/v)에서 보이고 그 이상 희석된 용액에서는 육안으로 확인이 쉽지 않았다.

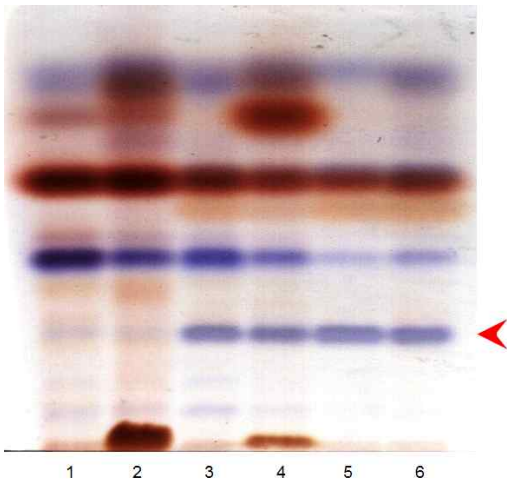


Figure 2. Analysis of feeding honey

Developing solvent (benzene : ethyl acetate = 1 : 4, v/v)

lane 1 : 꽃 꿀 a, 2 : 꽃 꿀 b, 3 : 혼합 꿀 a, 4 : 혼합 꿀 b, 5 : 사탕수수 설탕 사양 꿀, 6 : 사탕무 설탕 사양 꿀, 7 : 시판 사양 꿀, 8 : 사탕수수 설탕

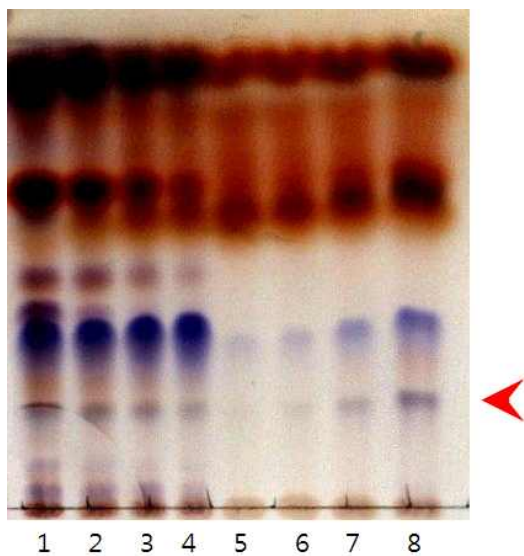


Fig 3. various dilution sample of feeding honey DNP derivative analysis

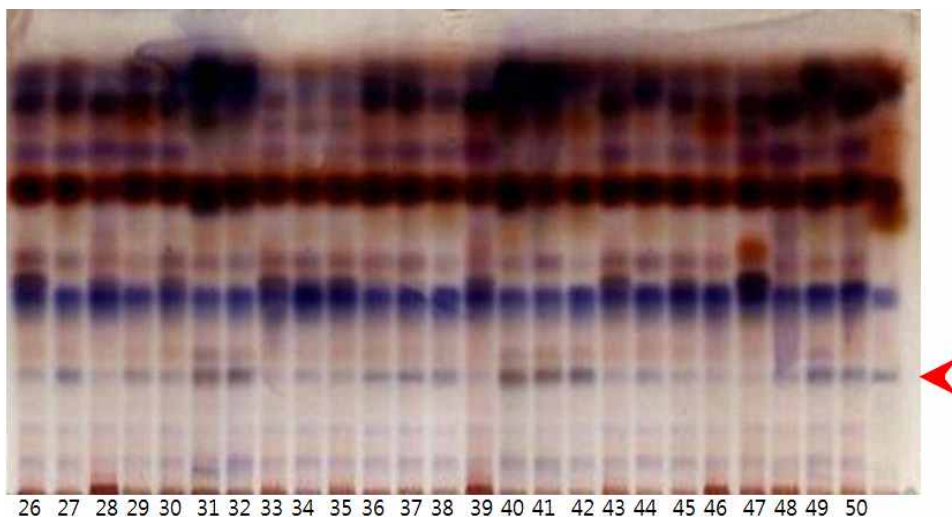
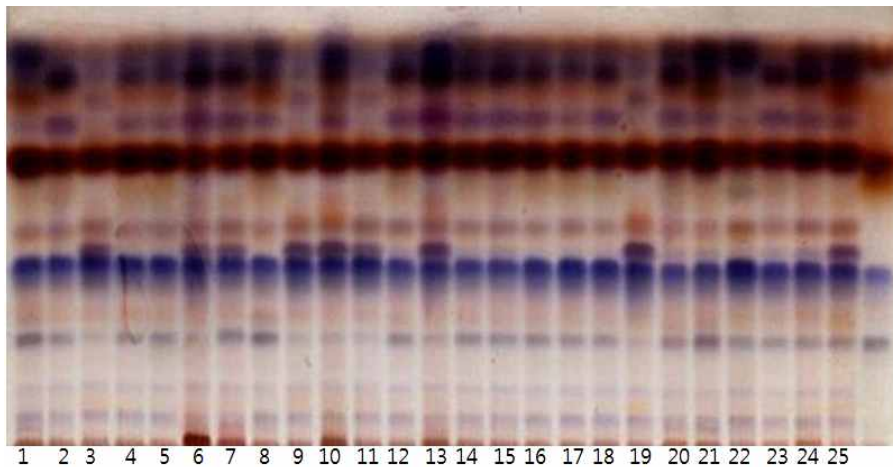
Lane 1 : 꿀 용액 (50%, w/v), 2 : 1의 2배 희석, 3 : 1의 4배 희석, 4 : 1의 8배 희석, 5 : 8의 8배 희석, 6 : 8의 4배 희석, 7 : 8의 2배 희석 8 : 설탕 용액 (40% , v/v)

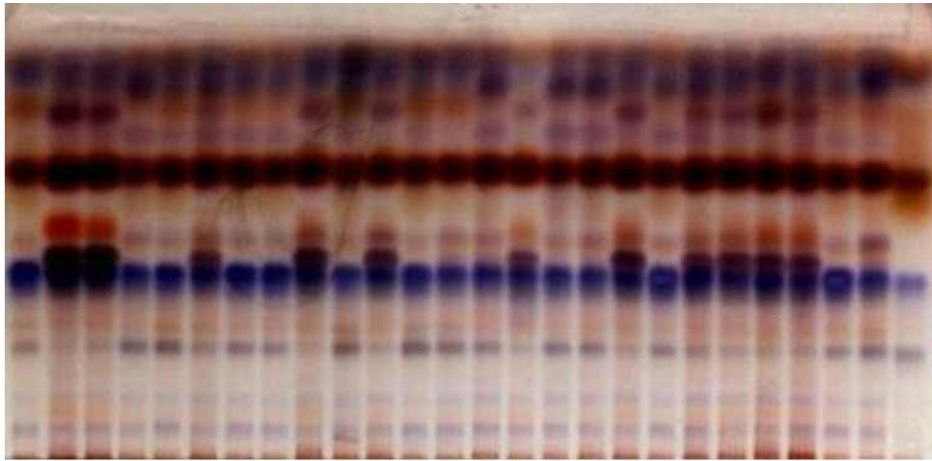
- 위의 결과를 종합하여 DNP 유도체 분석법을 정립하여 국내외에서 구매한 꿀 sample을 가지고 DNP 유도체를 분석해 보았다.



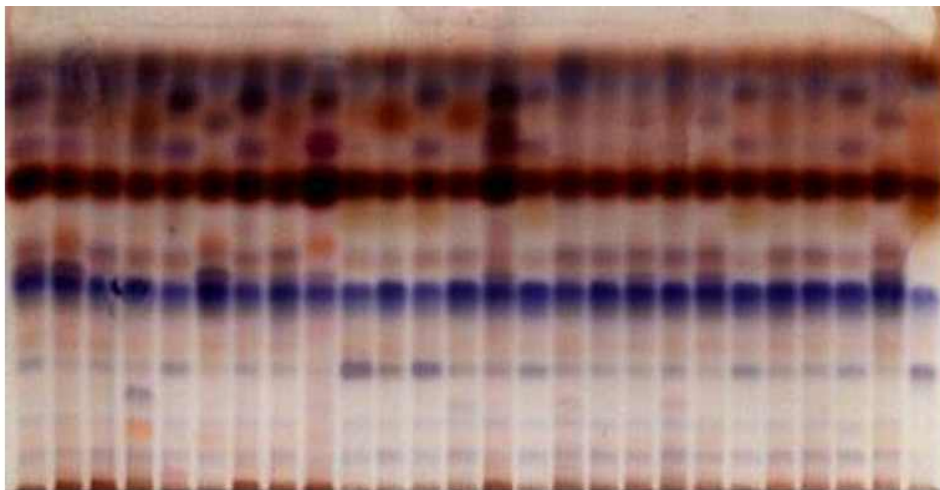
c) 꿀의 TLC 판별

- 위에서 언급한 여러 가지 유도체 분석 방법 중 사양 꿀의 특이물질 판별에 있어서 최적화 된 방법으로 국내외에서 구매한 꿀을 분석 하였다. 방법은 다음과 같다.
- 꿀은 증류수를 이용하여 50%(w/v)로 희석한 후 원심분리(14,000rpm, 5분)하여 화분을 제거하였다. 위 과정으로 희석된 꿀 상등액 500 $\mu$ L 와 2N HCl에 용해한 0.1%(w/v) DNPH 용액 500 $\mu$ L 를 혼합, vortexing (1분) 후 상온에서 차광하여 1시간 반응시켰다. 반응 후 반응액에 benzene 500 $\mu$ L를 가하고, vortexing(2분)과 원심분리(14,000rpm 5분)를 하여 상등액을 취했다.
- 상등액 500 $\mu$ L를 80  $^{\circ}$ C에서 완전히 evaporation 한 후 benzene을 50 $\mu$ L 첨가하여 재 용해하였다. 재 용해한 benzene 용액은 TLC에 실리카겔G박층 하단에서 2 cm의 일직선상에 5 $\mu$ L spotting 하여 Benzene : Ethyl acetate (1 : 4, v/v) 용매로 전개 하였다. 전개 후 TLC plate를 건조 한 후 80% ethanol에 용해한 5% (w/v) NaOH 용액을 도포하였다. 도포 후 TLC plate는 hot plate 를 이용하여 가열해서 발색하였다.
- 분석한 결과 국내 양봉 꿀과 토종 꿀에서 특이 물질의 유무가 검출 확인 되었다. 해외 꿀에서도 역시 특이 물질이 검출 되어 사양 꿀 판별의 가능성을 보여주었다. 각각의 TLC plate에서 마지막 번호는 설탕-DNPH 유도체를 전개하여 비교하였다.

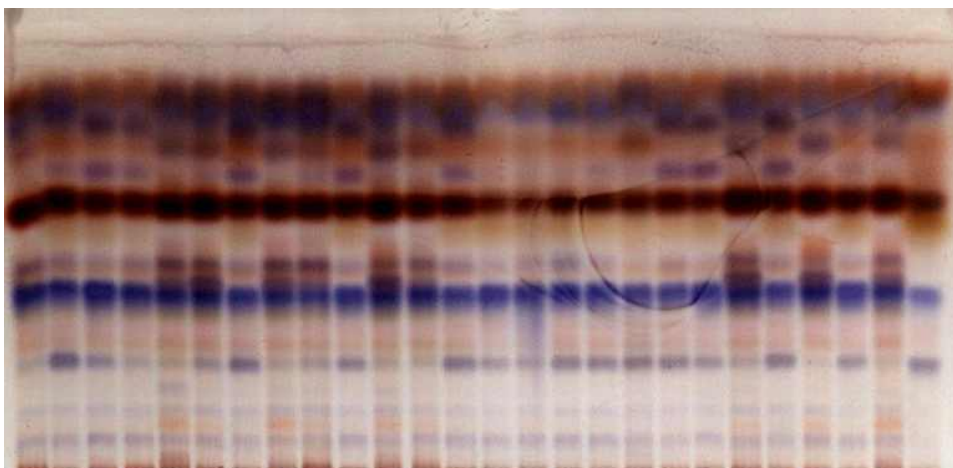




51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75



76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100



101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125

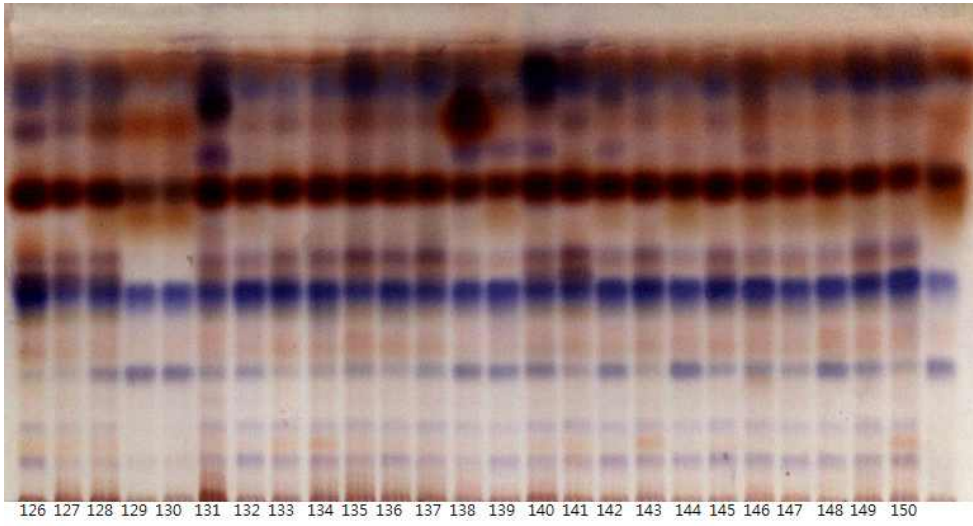
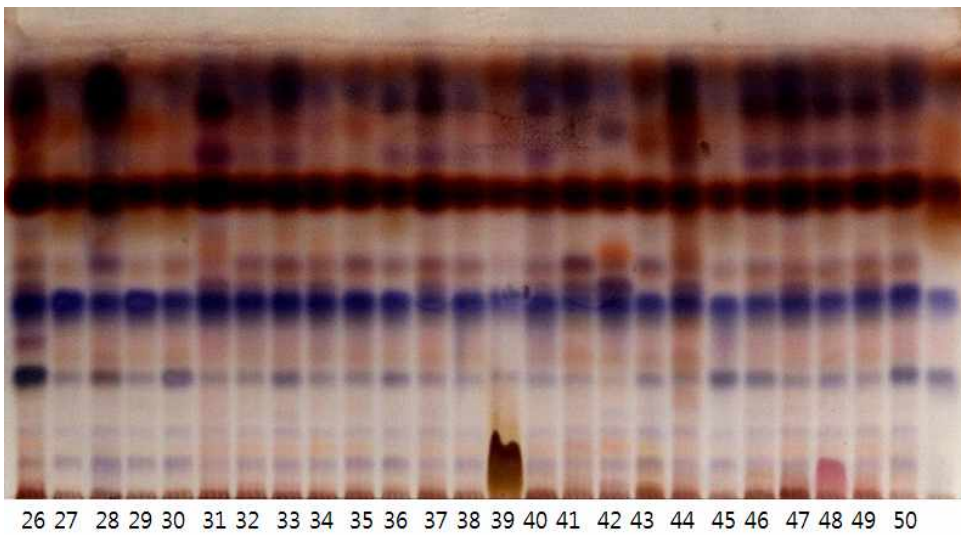
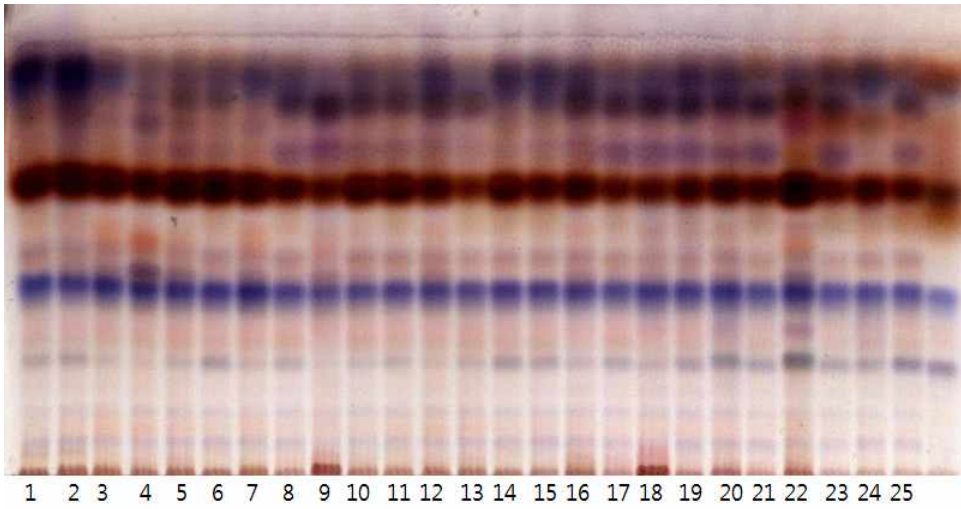
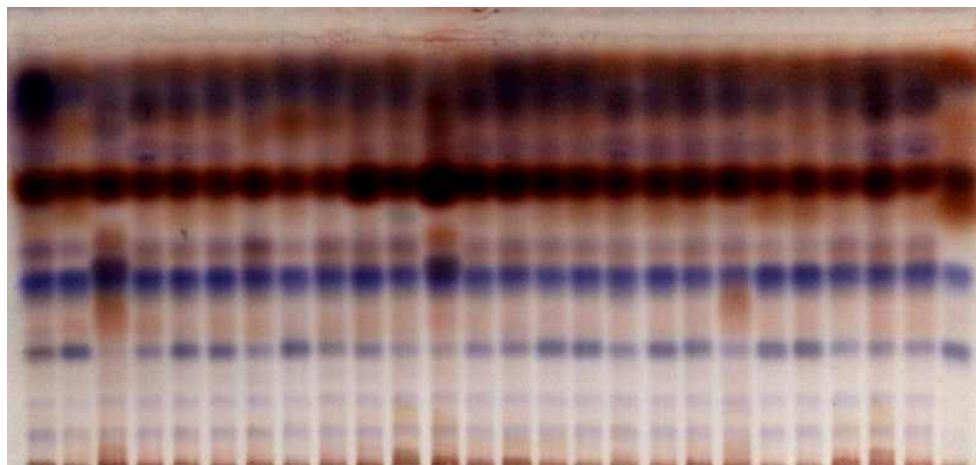


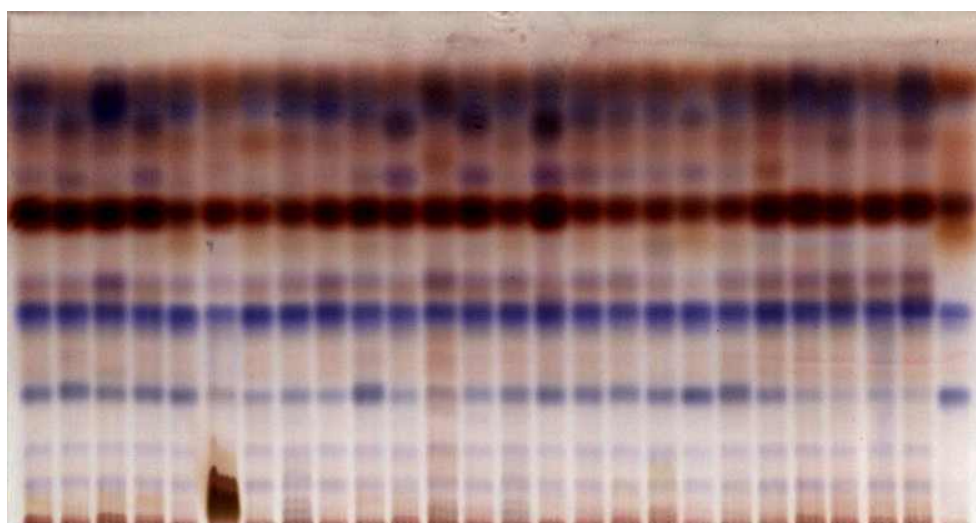
Fig 4. X honey series DNP-derivative analysis



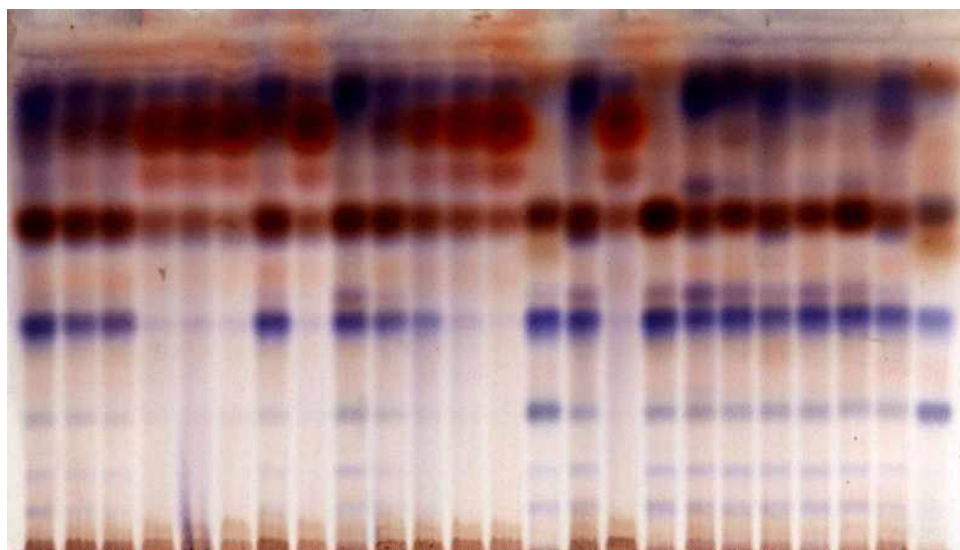




51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75

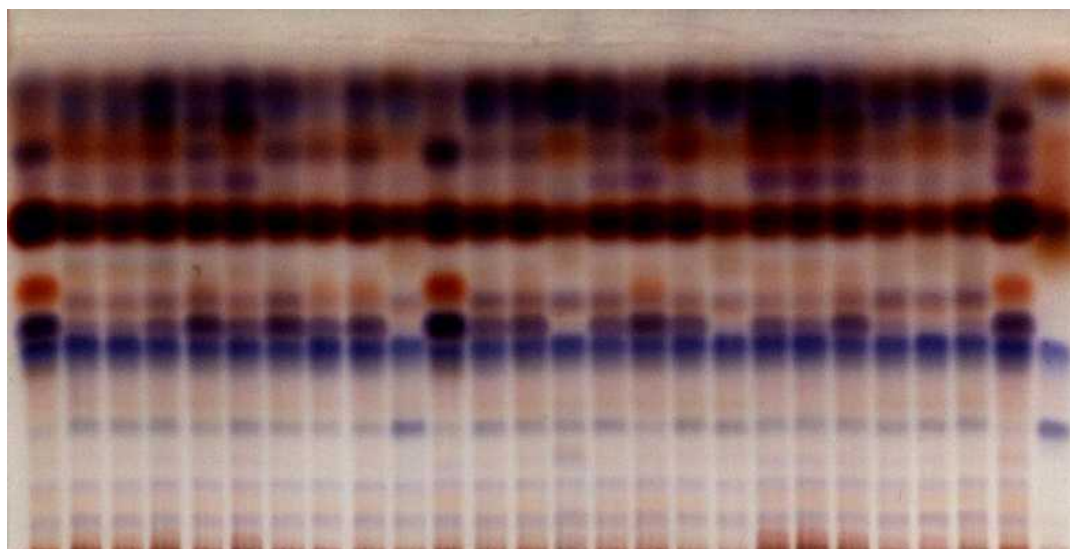


76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

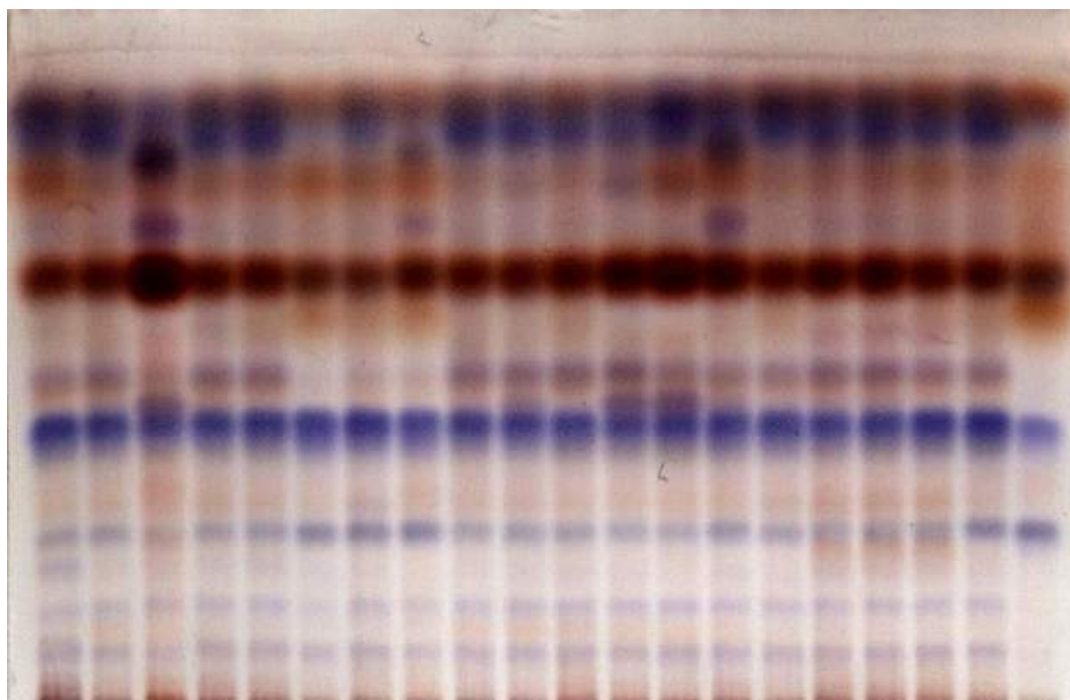


101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123

Fig 5. W series honey DNP-derivative analysis



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25



26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44

Fig 6. Y series honey DNP-H derivative analysis

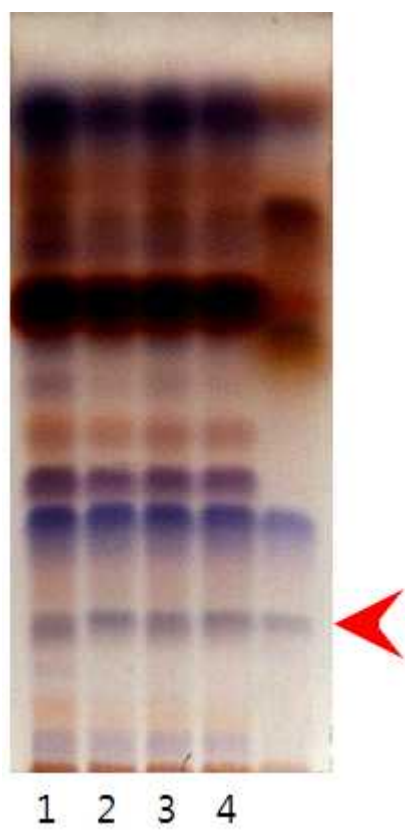
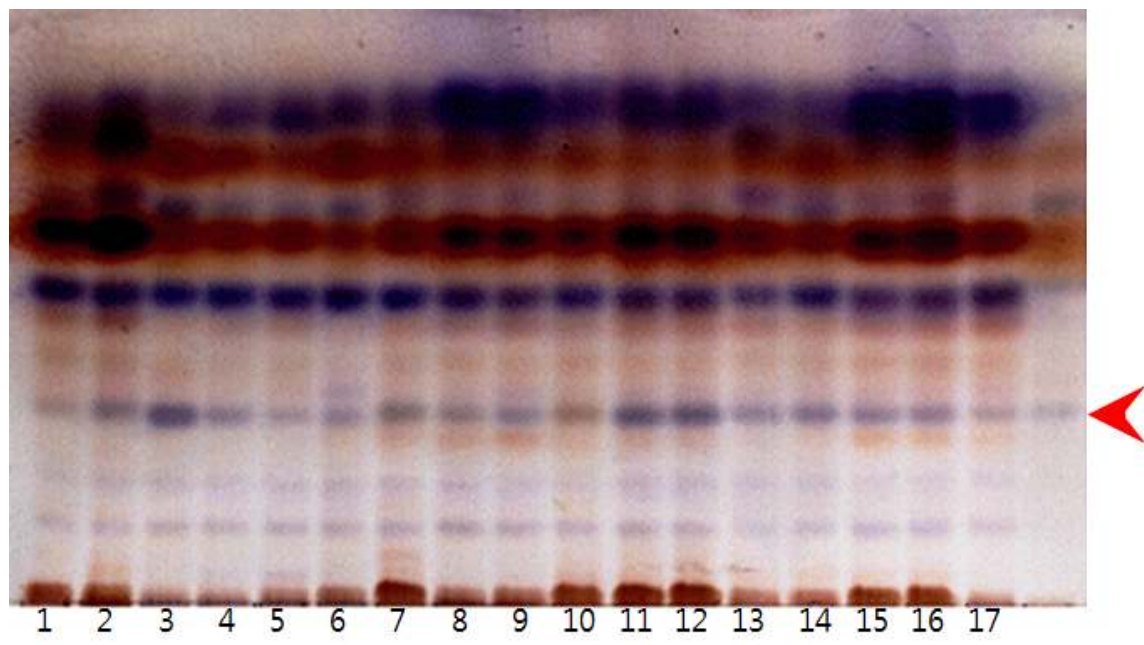


Fig 7. C, A series honey DNPH derivative analysis

d) 사양 꿀 특이 물질의 HPLC 분석

- TLC에 의한 사양 꿀 특이물질 분석은 손쉬운 검출은 가능하나 정량은 곤란하므로 HPLC를 이용하여 특이 물질을 분석하였다. TLC 와 같은 방법으로 DNPH 유도체를 만들어 HPLC로 분석하였다. HPLC 기기는 YL 9100(주 영린기기)을 사용하였고, 분리 정제를 위한 column으로는 prep-C18 column (21.2mm × 250mm 10µm, Agilent, USA)을 사용하였으며, column temperature 25 °C, mobile phase는 H2O와 MeOH 30대 70 비율로 혼합하여 사용하였다. 검출은 352nm, flow late는 0.8mL/min으로 흘려주었다. 분석에 사용한 시료로는 1) 사탕무 설탕, 2) 사탕무 설탕 사양 꿀, 3) 사탕수수 설탕, 4) 사탕수수 설탕 사양 꿀, 5) 꽃 꿀, 6) 시판 사양 꿀 로 하였다. 2), 4) 시료는 본 연구를 위하여 제한된 환경에서 사양한 꿀이다.
- 그 결과 35분 부근에 발견되는 peak의 면적으로 설탕의 혼입 정도를 예측 할 수 있을 것으로 판단된다. 이를 위하여 더 많은 시료를 대상으로 peak의 면적과 혼입 정도를 파악 하여야 할 것이다. 설탕의 혼입은 동절기 또는 장마 기간에 불가피 하게 공급되는 사료용 설탕이 차지하는 부분도 고려해야 할 것이다. 본 연구에서 제시된 방법은 설탕을 시용한 사양에서 설탕의 비중을 파악하는데 도움이 될 것으로 판단한다.

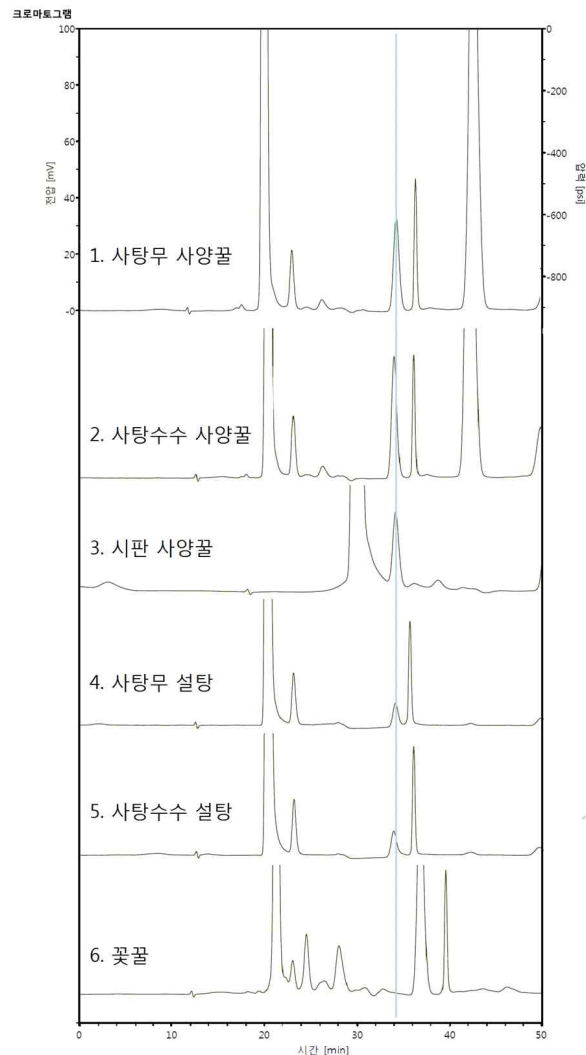


Fig. 8. 사양 꿀 특이 물질의 HPLC 분석



e) 설탕 중의 사양꿀 특이 성분 생성의 확인

- 사양 꿀의 특이물질은 밀원인 설탕에서 유래한 불순물인 것으로 판단된다. 그러므로 실제로 설탕을 제조 할 때처럼 사탕수수 착즙액에 설탕의 제조 과정과 동일한 열처리를 하여 사양 꿀의 특이물질이 생성하는지 확인 하였다. 그 결과는 Fig 9과 같다.
- 사탕수수 착즙액은 열처리를 하게 되면 특이 물질 band 위치 주변에 새로운 band가 생기는 것을 확인했다. 설탕도 특이물질의 미세한 양의 증가가 보였다. 이는 사양 꿀의 특이 물질은 밀원인 설탕에서 기인한 것이고, 이 불순 물질의 생산 경로는 설탕의 제조과정 중 발생하는 열처리에서 생성되는 것으로 예상 된다.
- 가공 꿀을 생산 할 때도 열처리를 하는 것으로 알려져 있다. 그럼 가공 꿀의 열처리 과정에서 사양 꿀의 특이 물질이 생긴다면, 특히 꽃 꿀에서도 특이물질이 열처리에 의해 발생한다면 사양 꿀과 꽃 꿀의 구분은 어려워진다. 그러므로 열처리한 꽃 꿀도 DNPH 유도체 분석이 필요하다. 그 결과는 Fig 10 과 같다. 꽃 꿀에서는 열처리를 하여도 사양 꿀의 특이물질이 생성되지 않았다. 따라서 사양 꿀의 특이물질은 설탕의 제조 과정 중 생성 되는 화합물에 의한 것이라고 판단되고 있다.

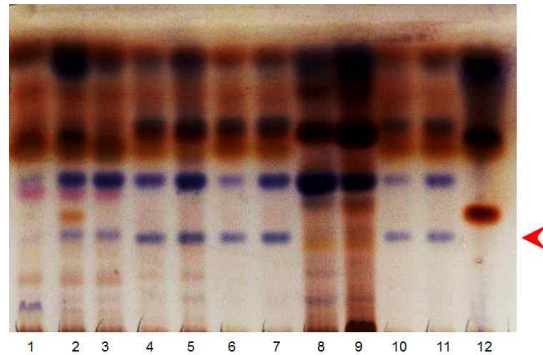


Fig 9. DNPH derivative analysis of sugar cane juice

lane 1 : 사탕수수 착즙액, 2 : 사탕수수 착즙액 10mL + Dihydroxyacetone 1mg, 3 : 비가열 사탕수수 착즙액 , 4 : 비가열 갈색 설탕, 5 : 가열 갈색 설탕, 6 : 비가열 Sucrose, 7 : 가열 Sucrose, 10 : 사탕수수 설탕, 11 : 사탕무 설탕, 12 : Dihydroxyacetone 1mg/mL

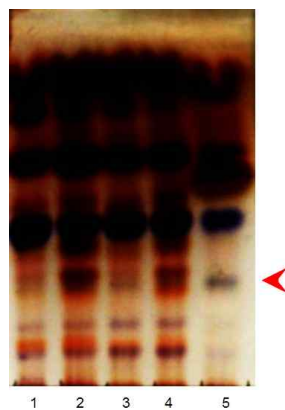


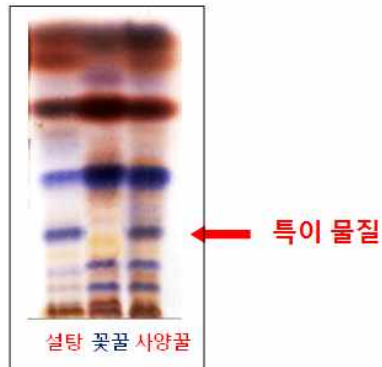
Fig 10. DNPH derivative analysis of bee-honey

lane 1 : 비가열 토종 꿀 1, 2 : 가열 토종 꿀 1, 3: 비가열 토종 꿀 2, 4 : 가열 토종 꿀 2, 5 : 사탕무 설탕



f) 사양꿀 특이 물질 분리

- 사양꿀의 특이물질을 분리하여 구조 결정 한다면 그 유래를 추적 할 수 있고 또한 후에 사양꿀의 판별법 개발에 있어서 지표물질로 사용 되어 질 수 있기 때문에 분리 및 구조 결정은 필요한 과정이다.



- 사양꿀에 포함된 특이물질의 분리를 위한 방법으로 silica gel을 이용한 flash column, 과 UV 검출기가 장착된 중압액체크로마토그래피(MPLC, medium pressure liquid chromatography), UV 검출기와 RI 검출기가 장착된 고성능 액체크로마토그래피(HPLC, high-performance liquid chromatography), 액체크로마토그래피 질량분석법(LC-MS, liquid chromatography -mass spectrometry), 분취용 얇은막크로마토그래피(preparative-TLC, thin layer chromatography) 등의 방법을 시도하였다. 분리된 물질의 구조 결정을 위한 방법으로 핵자기공명분광법 (1H NMR, 13C NMR), 적외선 분광법(IR), 질량분석법(Mass) 등을 통해 화학구조를 규명하고자 하였다.
- **설탕 메탄올 추출물의 제조** : 설탕에 포함된 특이성분의 분리 분석을 위한 시료로 설탕의 메탄올 추출물을 사용하였다. 곱게 분쇄된 설탕 300 g을 메탄올 600 mL에 24시간 교반하여 용해시키고 여과한 후 감압 농축하여 설탕 메탄올 추출물을 얻었다.
- **DNPH 반응물의 제조** : 특이 물질의 크로마토그래피 분석을 위하여 설탕 메탄올 추출물의 DNPH 반응물을 사용하였다. 건조된 설탕 메탄올 추출물의 40% 수용액을 만든 뒤 반응 플라스크에 수용액 5 mL와 0.1% DNPH (in 2N HCl) 용액 5 mL를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 차광하여 교반하였다. 1시간 반응 후 benzene 5 mL를 첨가하고 원심분리(14,000 rpm)하여 상등액 4 mL를 취고 10배 농축하여 분석 시료로 사용하였다.
- **HPLC를 이용한 특이물질의 분리** : 특이물질의 분리조건을 탐색하기 위하여 HPLC를 이용한 분리 분석을 시도하였다. 영린기기의 YL-9100장비를 활용하여 C-18(TC-C18) 컬럼을 통한 분리 분석을 시도하였고 분석조건은 아래와 같다(Table 1).

Table 1. 설탕의 DPNH 반응물 분석용 HPLC 분석조건

Instrument	YL-9100 (Young Lin instruments, Korea)
Column	TC-C18 (250 mm × 4.6 mm, particle size 5 μm, Agilent, USA)
Flow rate	0.8 mL/min
Column Temperature	25 °C
Detection	UV 254, 320, 352 nm
Solvent	Water (A), Methanol (B)
Isocratic elution	0 - 60 min, 70% B

최적의 UV 검출 파장을 찾기 위해서 244, 320, 352 nm에서 각각 분석해본 결과 가장 감도가 높은 352 nm 파장에서 Prep-HPLC 를 이용한 분석을 진행하였다(Fig. 11).

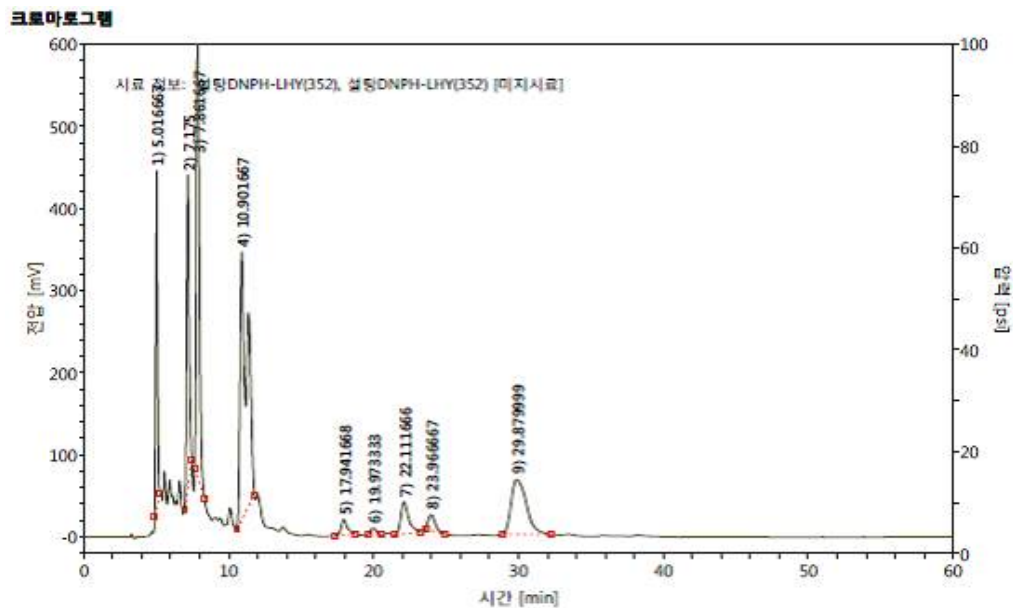


Fig 11. 설탕 DPNH 반응물의 HPLC 분석 크로마토그램 (352 nm)

- 분취용 액체크로마토그래피(pre-HPLC)를 이용한 특이물질의 분리 : 위 실험을 통해 얻은 분리조건을 적용하여 분취용 HPLC를 이용하여 1분 단위로 분획하고, 분획물은 각각 농축시킨 후 TLC 분석을 통해 특이물질의 확인을 시도하였다.

Table 2. 설탕 DPNH 반응물의 prep-HPLC 분석조건

Instrument	YL-9100 (Young Lin instruments, Korea)
Column	TC-C18 (250 mm × 21.2 mm, particle size 10 μm, Agilent, USA)
Flow rate	6.0 mL/min
Column Temperature	25 °C
Detection	UV 352 nm
Solvent	Water (A), Methanol (B)
Isocratic elution	0 - 130 min, 70% B

Prep-HPLC를 통해 분석한 설탕 DNPH 반응물의 크로마토그램은 아래와 같았다(Fig. 12).

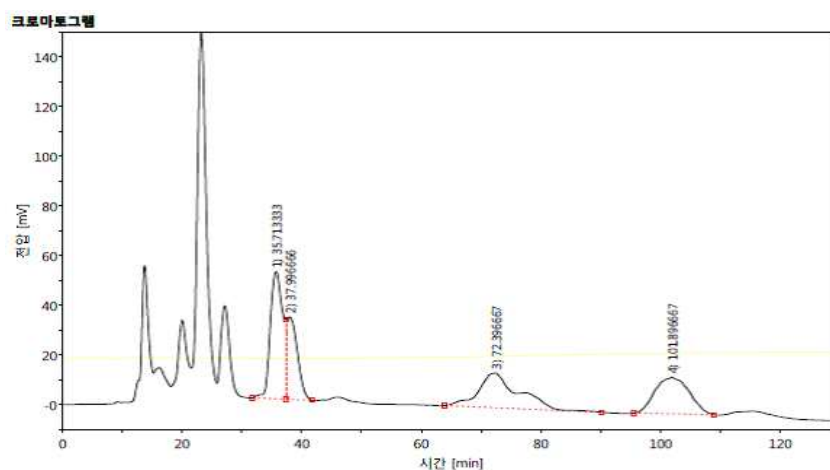


Fig 12. 설탕 DNPH 반응물의 prep-HPLC 분석 크로마토그램

Prep-HPLC를 통한 분획물을 각각 농축하여 TLC를 분석해 본 결과 111, 113분 분획물에서 특이물질에 해당하는 spot이 관찰됨에 따라 목적 화합물의 분리 조건을 확인하였다.

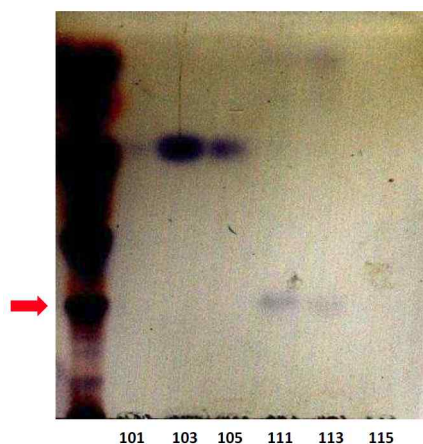


Fig 13. prep-HPLC 분획물의 TLC 크로마토그램

111, 113분 분획물에 포함된 특이성분의 감응시간(retention time)을 확인하기 위해서 다시 HPLC 분석을 진행하였지만 특정 peak가 관찰되지 않았다(Fig 14).

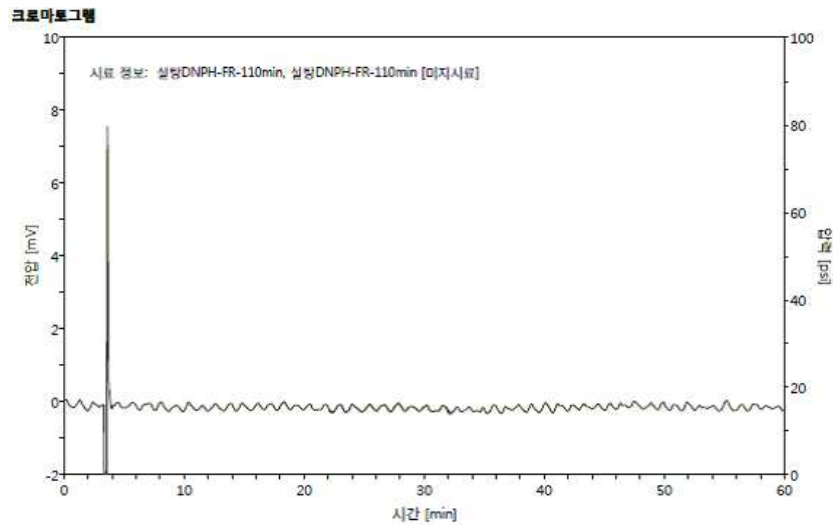


Fig 14. 111, 113분 분획물의 HPLC 분석 크로마토그램

설탕에 존재하는 특이성분은 UV의 특정 파장에서 검출되지 않았고 설탕 속에 포함된 당과 특이성분을 분리할 수 있는 조건을 탐색하기 위하여 당 분석을 위한 컬럼을 사용하고 굴절률 검출기를 사용하여 분리조건의 탐색을 시도하였다.

Table 3. 당 분석 컬럼을 이용한 HPLC 분석 조건

Instrument	YL-9100 (Young Lin instruments, Korea)
Column	Carbax carbohydrate column (SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> ) (250 mm × 4.6 mm, particle size 5 μm, Agilent, USA)
Flow rate	1.4 mL/min
Column Temperature	30 °C
Detection	RI, 35 °C
Solvent	Acetonitrile (A), Water (B)
Isocratic elution	0 - 20 min, 25% B

설탕에 존재하는 특이성분은 UV의 특정 파장에서 검출되지 않았고 설탕 속에 포함된 당과 특이성분을 분리할 수 있는 조건을 탐색하기 위하여 당 분석을 위한 컬럼을 사용하고 굴절률 검출기를 사용하여 분리조건의 탐색을 시도하였다. Glucose, fructose, sucrose 표준물질과의 비교를 통해 설탕 DNPH 반응물에는 세 가지 당에 해당하는 peak이외에 특이성분으로 예상되는 peak는 관찰되지 않았고, 굴절률 검출기는 상대적으로 감도가 높지 않아 설탕의 DNPH 반응물에 존재하는 특이성분의 농도가 상대적으로 낮아 검출한계 이내 포함되어 있음을 알 수 있었다. 또한, silica gel(KP-sil), C-18(HS-C18, TC-C18), amine(Zobax, KP-NH<sub>2</sub>) 컬럼 등 다양한 컬럼을 사용하여 분획을 거쳐 분석한 결과 분리하고자 하는 특이 성분은 당과의 분리가 어려웠다. 결과적으로 특이성분은 VU 흡수 파장에서는 검출되지 않는 설탕에 미량 포함된 성분으로 예측하였다.

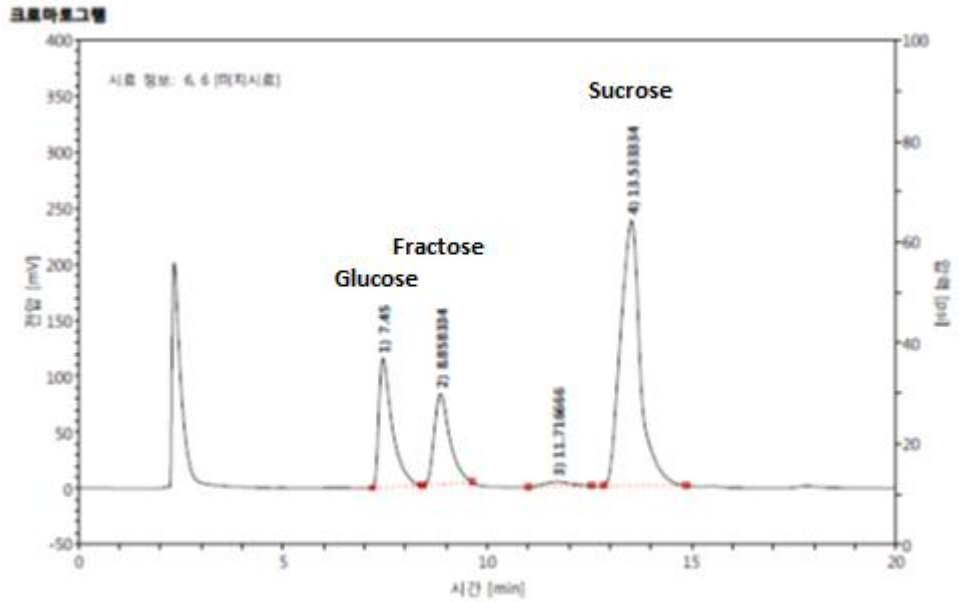


Fig 15. 설탕 DNPH 반응물의 당 분석 컬럼을 사용한 HPLC-RID 크로마토그램

- 분취용 얇은막크로마토그래피(**prep-TLC**)를 이용한 특이물질의 분리 : 사양끝에 존재하는 특이물질의 구조를 규명하기 위해서 DNPH(2,4-di-nitrophenylhydrazine)와 반응하여 생성된 물질을 prep-TLC를 통해서 분리하였다(Fig. 16). (전개용매; EtOAc/Benzene = 4/1, Rf = 0.38) 얇은 막 크로마토그래피(thin layer chromatography; TLC)는 Merck사 Silica gel 60 F254 를 사용하였다.

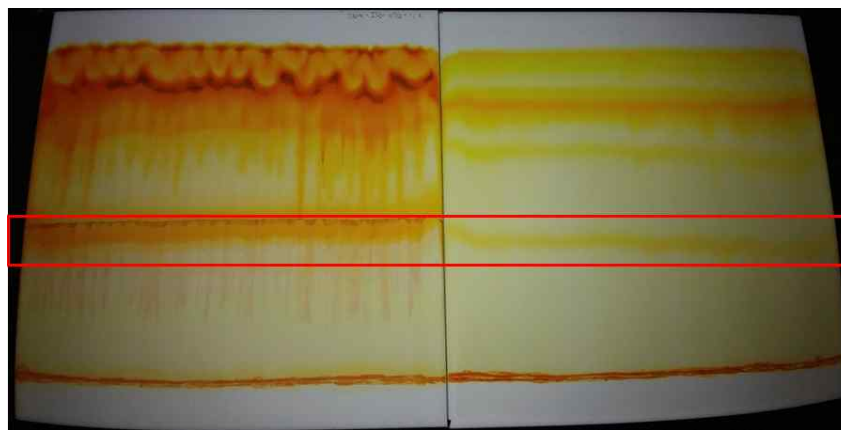


Fig 16. 특이 물질의 분리를 위한 prep-TLC 크로마토그램

- 액체크로마토그래피 질량분석법(LC-MS)을 이용한 특이물질의 분석 : 설탕에 포함된 특이성분의 분자량을 확인하기 위해서 액체크로마토그래피 질량분석법을 적용하였다. 설탕의 DNPH 반응물과 prep-TLC를 통해 분리된 물질을 각각 LC/MS를 통해 분석하였다. 결과적으로 TIC (총 이온량) 스펙트럼에서 시간이 변함에 따라 peak의 양상이 변화하는 것을 관찰 하였고, 이로부터 특이 물질은 화학적으로 불안정하여 질량분석기를 통한 검출이 어려운 것을 알 수 있었다.

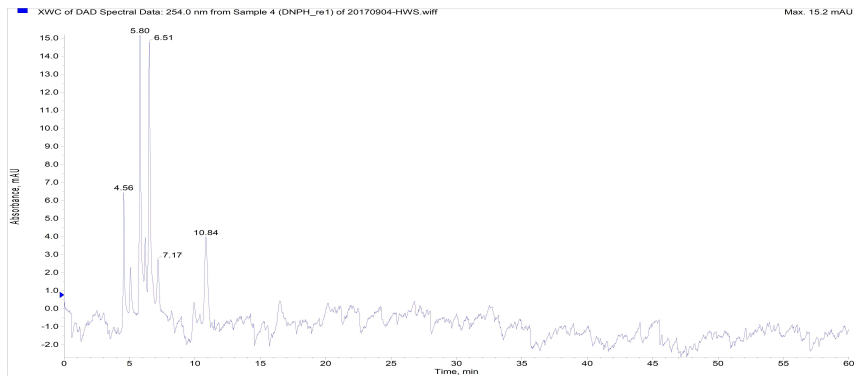


Fig 17. LC/MS 분석 - UV spectrum

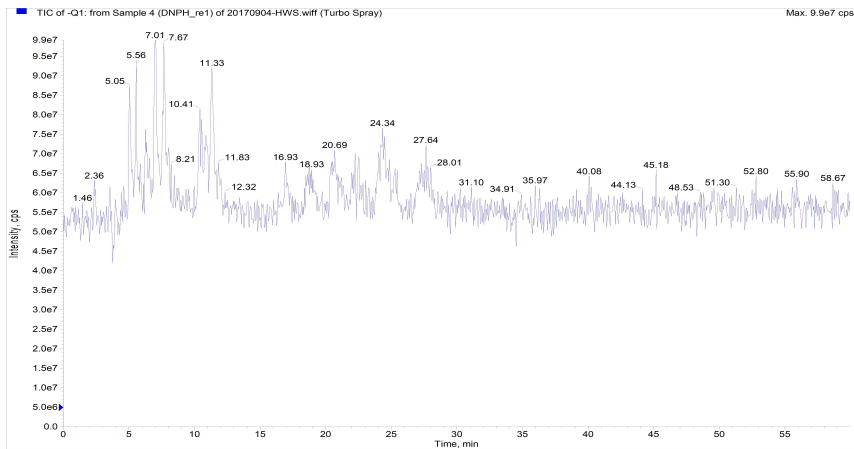


Fig 18. LC/MS 분석 - TIC spectrum

결과적으로 설탕에 포함된 특이성분은 당에 미량 포함된 물질로 높은 감도의 검출법이 요구되고 UV 파장에서 흡수되지 않으며 화학적 안정성이 낮은 물질이기 때문에 분취용 TLC를 이용하여 분리하고 착색을 통한 검출이 가장 효과적인 방법이다.

f) 사양꿀 특이 물질의 구조 결정

- **NMR을 이용한 특이성분의 구조 예측** : prep-TLC를 통해 분리된 물질의 화학구조를 확인하기 위해 핵자기공명 스펙트럼을 확인하였다. 스펙트럼은 Bruker ADVANCE III 400 NMR을 사용하였고, 용매로는 TMS(tetramethylsilane)를 내부 표준물질로 사용한 acetone을 사용 하여  $\delta$  (ppm)값을 기록하였다.  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼을 확인한 결과 9.0 ppm에서 관찰된 singlet peak로부터 DNPH와 반응한 물질이 aldehyde의 양성자(proton)를 포함하고 있음을 예측할 수 있었고, 8.1-8.5 ppm에 관찰된 peak는 dinitrophenyl기에 존재하는 3개의 양성자임을 확인하였다. 6.5와 6.9 ppm에서 각각 관찰된 peak로부터 2개의 양성자를 포함하는 헤테로고리 화합물로 furan고리를 예측하였다. 4.6 ppm에 관찰된 singlet peak로부터 furan 고리에 연결된 -CH<sub>2</sub>- 기를 확인하였고, 2.8 ppm에 관찰된 6개 양성자에 해당하는 singlet peak로부터 -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, N-dimethyl

기를 예측하였다(Fig 19).

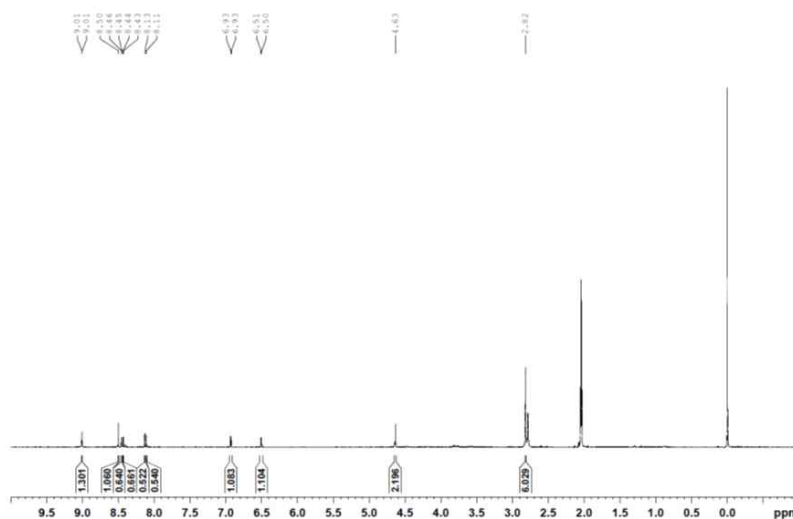


Fig 19. 특이 물질의 분리를 위한 prep-TLC 크로마토그램

특이물질: red-brown solid.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Acetone- $d_6$ ):  $\delta$  9.01 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.44 (d,  $J = 9.26$  Hz, 1H), 8.11 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 6.93 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 6.50 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 2.81 (s, 6H).

$^1\text{H NMR}$  스펙트럼을 통해 확인한 결과로부터 DNPH와 반응한 특이물질의 화학구조를 아래 두 화합물로 예측하였다(Fig 20).

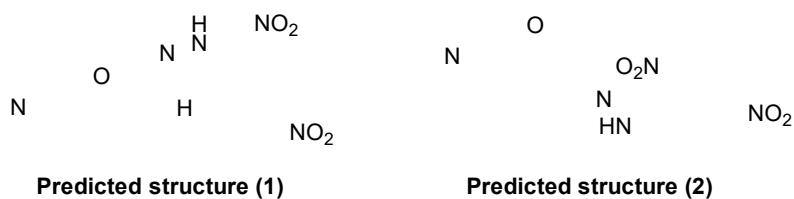


Fig 20.  $^1\text{H NMR}$  스펙트럼을 통해 예측된 화합물

명확한 구조 결정을 위해  $^{13}\text{C NMR}$  스펙트럼을 얻기 위한 실험을 시도하였으나 DNPH와 반응한 특이 물질이 빠르게 분해되어  $^{13}\text{C NMR}$  스펙트럼을 얻지 못했다.

- 예측된 화합물의 합성을 통한 구조 결정 : 예측한 두 가지 화합물은 5-((dimethylamino)methyl)furan-2-carbaldehyde (1a) 또는 5-((dimethylamino)methyl)furan-3-carbaldehyde (2a)가 DNPH와 반응하여 각각 생성될 수 있

으며, 두 물질을 각각 합성하고 사양으로부터 분리된 특이 물질과  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼의 비교 해석을 통해 예측한 구조를 규명하고자 하였다(Fig 21).

Fig 21. 예상 화합물 **1**의 합성 scheme

5-((Dimethylamino)methyl)furan-2-carbaldehyde (**1a**)의 합성을 위하여 (5-((dimethylamino)methyl)furan-2-yl)methanol을 산화제인  $\text{MnO}_4$ 로 처리하여 화합물 **1a**를 얻었고,  $^1\text{H}$  NMR을 통해 합성된 화합물의 구조를 확인하였다(Fig 22).

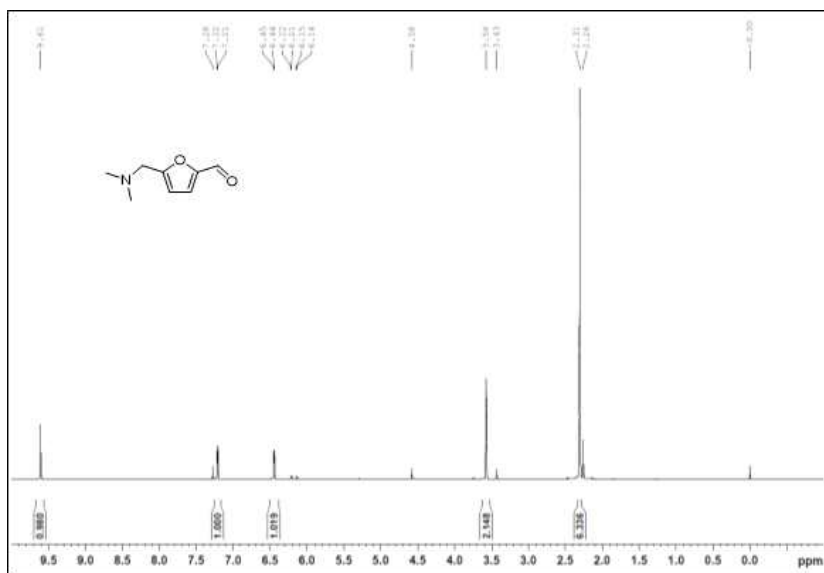


Fig 22. 5-((Dimethylamino)methyl)furan-2-carbaldehyde (**1a**)의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼

5-((Dimethylamino)methyl)furan-2-carbaldehyde (**1a**) : yellow solid,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Acetone- $d_6$ ):  $\delta$  9.61 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 6.45 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 3.58 (s, 2H), 2.31 (s, 6H).

합성된 **1a** 화합물을  $\text{H}_2\text{SO}_4$  촉매 존재 하에서 DNPH와 반응시켜 목적화합물(1)을 얻었다. 합성된 목적화합물의 화학구조 확인을 위하여  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼을 확인하였다(Fig 23).



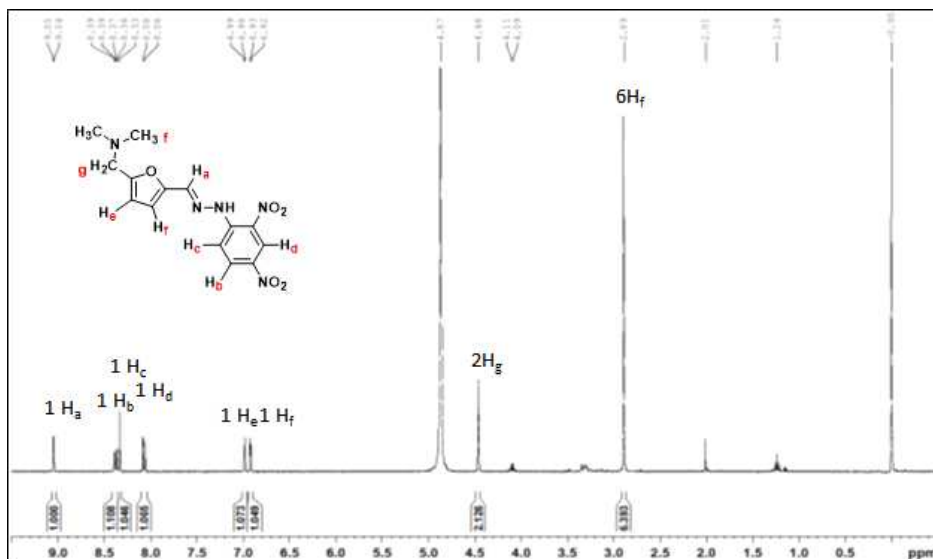


Fig 23. 예상 화합물 1의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼

(Z)-1-(5-((2-(2,4-dinitrophenyl)hydrazono)methyl)furan-2-yl)-N,N-dimethylmethanamine (1) : red-brown solid.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Acetone- $d_6$ ):  $\delta$  9.05 (s, 1H), 8.37 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.07 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 6.98 (d,  $J$  = 3.4 Hz, 1H), 6.92 (d,  $J$  = 3.4 Hz, 1H), 4.46 (s, 2H), 2.89 (s, 6H).

합성을 통해 얻은 예측 화합물(1)의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼과 사양꼴로부터 분리된 특이물질의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼을 비교한 결과 서로 상이한 것을 확인하였다(Fig 24). 특히, furan 고리의 두 양성자의 화학적 이동값이 많은 차이를 보임에 따라 furan 고리에 존재하는 두 개의 치환기가 서로 다르게 연결된 구조이성질체로 예측될 수 있으며 결과적으로 특이물질은 예상구조(2)임을 알 수 있다. 보다 명확한 증명을 위해 예상구조(2)의 합성을 시도하였으나 전구체(2a)의 합성을 위한 시약이 상업적 확보가 어려울 뿐 아니라 화학적 안정성이 낮아 빠르게 분해됨에 따라 Scifinder 검색에서도 합성법 등이 알려지지 않은 화합물임을 알 수 있었다.

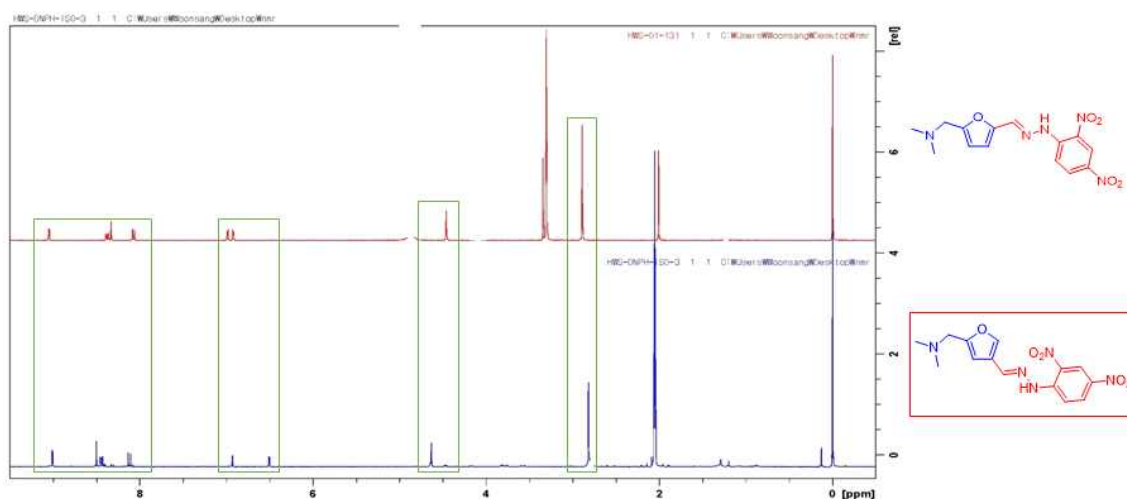


Fig 24. 합성을 통한 예상화합물(1, 위)과 사양꼴로부터 분리된 특이물질(2, 아래)의  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼

특이물질(1)의 화학적 안정성을 확인하기 위해 prep-TLC 분리 후, 빠른시간내에  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼을 확인해야 하며, 같은 시료를 10분 경과 후  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼을 다시 확인 하였을 때 분해가 일어나고 있음을 확인하였다(Fig. 25). 이 결과는 LC/MS 실험 결과와 일치하는 결과로 특이물질(1)의 화학적 안정성이 낮음을 뒷받침한다.

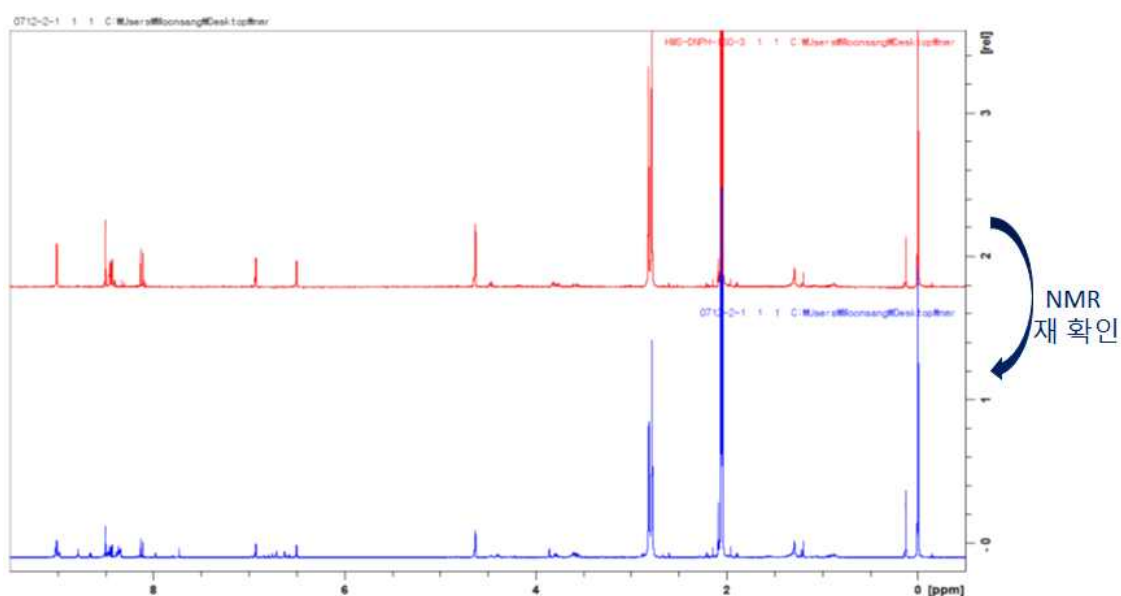


Fig 25.  $^1\text{H}$  NMR을 통한 화합물 2의 화학적 안정성 확인

사양풀로부터 분리된 특이물질과 합성된 예상화합물(1)의 비교 확인을 위해서 TLC 분석을 시도한 결과, Rf값에 차이가 나타남에 따라 두 물질이 서로 상이함을 알 수 있었고, 무엇보다도 예상화합물(1)이 사양풀 샘플에도 존재함을 확인하였다(Fig 24). 예상화합물 (1)과 (2)는 5-HMF와 4-HMF로부터 각각 유래되어있음 확인하였고, 결과적으로 사양 풀에는 두 가지 물질 모두 포함될 수 있음을 뒷받침할 수 있다(Fig 28, 29). 그리고 예상화합물 (1)과 (2)는 구조 이성질체 관계에 있어서 극성도가 유사하여 Rf 값과 화학적 특성(안정성 등)이 유사할 수 있음을 예상할 수 있다. 아래 Fig 26의 TLC 비교 결과, 예상화합물 (1) 샘플이 일정 시간 경과 후 사양 풀 샘플과 유사한 TLC 양상을 나타냄으로부터 분해 양상이 비슷함을 확인하였고, 본 결과는 예상화합물 (1)과 (2)의 화학적 특성(작용기 등)이 유사하다는 것을 뒷받침한다.

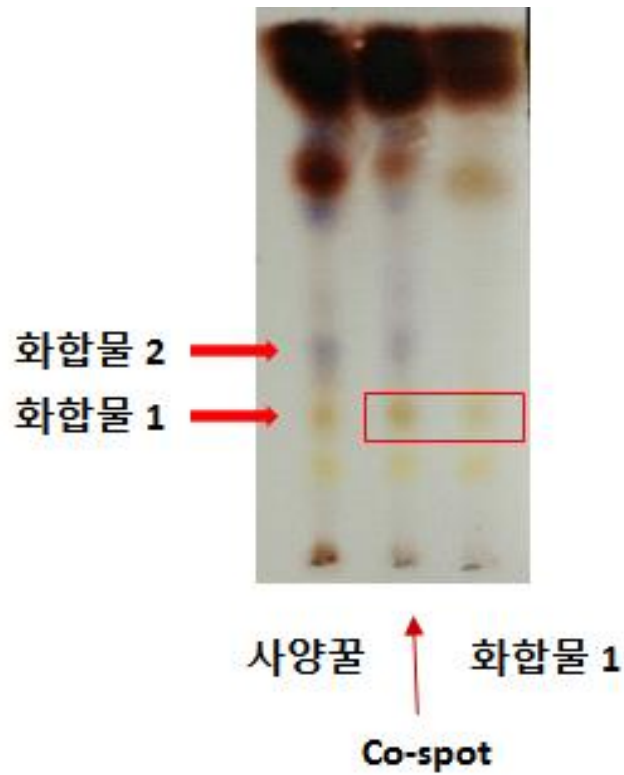


Fig 26. 사양꿀 샘플과 합성 화합물 (1)의 TLC 비교

- 질량분석기(Mass)를 이용한 분석 : 예측한 물질에 대한 분자량 확인을 위하여 prep-TLC를 이용하여 목적물질을 분리하고, 분리된 물질을 질량분석기에 주입하여 예상분자량 확인을 시도하였다. 분리된 물질의 낮은 화학 안정성 때문에 예상분자량에 해당하는 330 m/z peak는 관찰되지 않았고 분석 시간이 지남에 따라 빠르게 분해됨을 확인할 수 있었다(Fig 27).

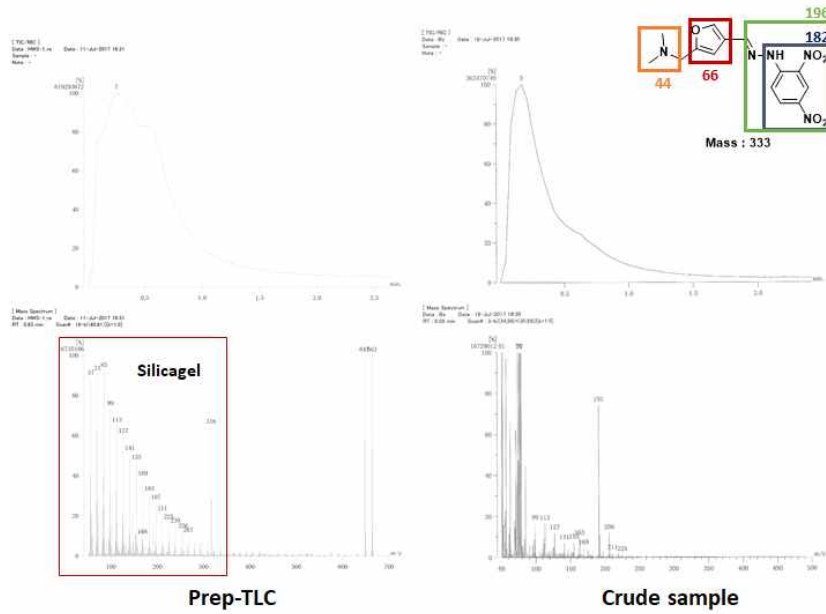


Fig 27. prep-TLC를 통해 분리된 물질의 질량분석 스펙트럼

- 사양꿀에 포함된 특이물질(2)의 생성 메커니즘 : 사양꿀에 포함된 특이물질(2)는 5-((dimethylamino)methyl)furan-3-carb- aldehyde (2a)와 DNPH의 반응을 통해 생성될 수 있고, 화합물 2a는 4-HMF(4-hydroxymethylfural)로부터 생성될 수 있음을 예상할 수 있다. 4-HMP는 DHA(dihydroxyacetone)의 반응을 통해 생성된 D-dendroketose의 고리화 반응을 통해 생성되는 것으로 예상할 수 있다(Fig. 28).

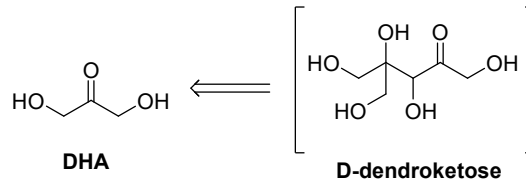


Fig 28. 사양꿀에 포함된 특이물질(2)의 생성 메커니즘

위에 제시된 메커니즘에 대한 과학적 근거자료로 Y. Fu와 공동연구자들에 의해 발표된 논문에 따르면 DHA와 GLYD(glyceraldehyde, 2,3-di- hydroxypropanal)로부터 4-HMF와 5-HMF가 생성될 수 있음이 보고된 바 있다(Fig 29). DHA가 염기 존재하에서 다른 한분자의 DHA와 반응하여 D-dendroketose가 생성되고, 분자내 고리화 반응을 통해 branched-chain hexoses가 생성되며, 3분자의 물이 제거되어 4-HMF가 얻어진다. DHA로부터 D-dendroketose가 합성되는 메커니즘은 W. A. Szarek와 공동연구자들의 논문에도 잘 증명되어 있다(Carbohydr. Res. 1977, 53, 101). 그리고 DHA가 염기존재하에서 이성질화(isomerization)되어 GLYD가 생성되고 다른 한분자의 DHA와 반응하면 fructose가 생성되며 분자내 고리화 반응과 탈수반응(Maillard 반응)을 거쳐 5-HMF가 얻어진다(ACS Sustainable Chem. Eng. 2016, 4, 1707).

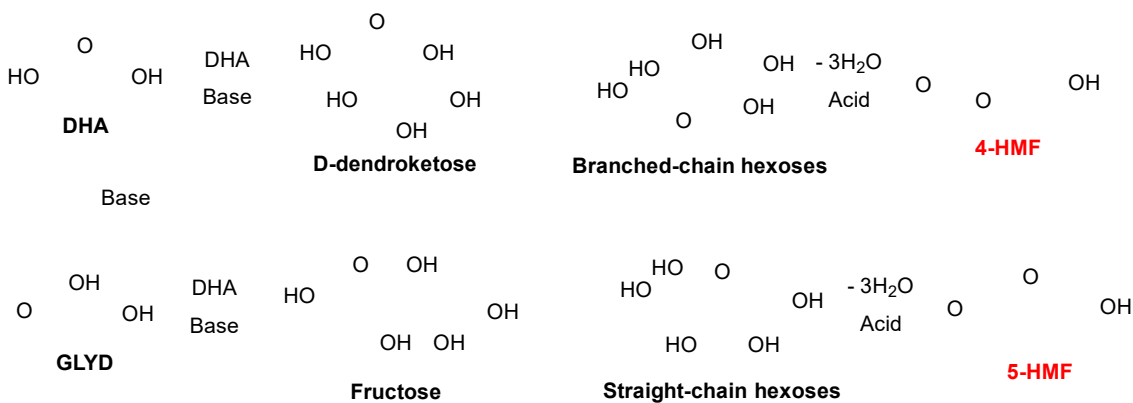


Fig. 29. DHA로부터 4-HMF 또는 5-HMF의 생성 메커니즘

4-HMF로부터 5-((dimethylamino)methyl)furan-3-carbaldehyde(2a)가 생성되는 메커니즘은 V. A. Yaylayan과 공동연구자들에 의한 연구 논문에 보고된 바 있다(Fig 30). HMF는 아미노산 존재하에서 열적분해(thermal decomposition)되어 다양한 화합물로 전환되며 특히 furan 고리에 도입된 aldehyde가 (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-, dimethylaminomethyl기로 전환될 수 있음이 보고되었다. 아

미노산이 formaldehyde와 반응하여 생산 sarcosine이 4-HMF와 iminium 염이 생성되고 카복실기 제거(decarboxylation)를 거쳐 Amadori 자리옮김(rearrangement)반응을 통해 5-((dimethylamino)methyl)furan-3-carb- aldehyde(2a)가 얻어진다(J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 10104).

Fig 30. 4-HMF로부터 화합물 2a의 생성 메커니즘

결론적으로 사양꿀에 포함된 특이물질은 5-((dimethylamino)methyl)furan- 3-carbaldehyde(2a)임을 알 수 있고, 이 물질은 설탕의 제조과정에서 생성된 D-dendroketose로부터 유래된 물질임을 예측할 수 있으며, 예상 메커니즘은 기존에 보고된 연구논문의 내용을 기반으로 제안한다(Fig 31).

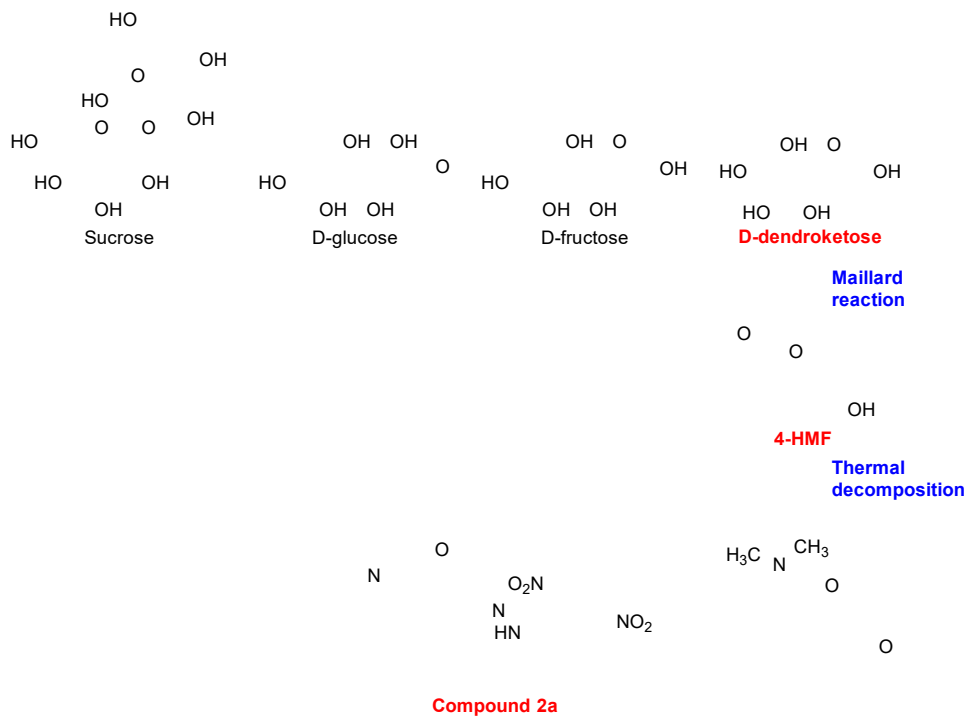


Fig 31. 사양꿀 특이 물질의 생성 예측 메커니즘

● **사양꿀 특이 물질의 분석방법의 표준화**

- 이상의 연구 결과를 토대로 사양꿀 특이 물질을 분석하기 위하여 다음과 같은 분석 방법의 제시한다.
- **사양꿀 특이 물질의 검출(TLC 방법)** : 꿀 1g에 증류수 1 mL를 가하여 잘 혼화 한 후 원심분리(14,000rpm, 5분)하여 화분 및 기타 물 불용해 물질을 침전으로 제거한다. 원심분리 한 꿀 상등액 500 $\mu$ L와 2N HCl에 용해한 0.1% (w/v) DNPH 용액 500 $\mu$ L를 혼합하고 vortexing (1분)하여 잘 섞은 후 상온에서 차광하여 1시간 반응시킨다. 반응 후 반응액에 benzene 500 $\mu$ L를 가하고, 1 분간 vortexing 하여 DNPH 유도체를 benzene 층으로 이행시킨 후 10,000 rpm 에서 5분간 원심분리 한 후 상등액 500 $\mu$ L을 취하여 시험관으로 옮긴다. 시험관을 80 °C water bath에 넣고 완전히 건조 한 후 여기에 benzene 50 $\mu$ L를 가하여 재 용해하였다. 재 용해한 benzene 용액은 HPTLC에 5 $\mu$ L spotting 한 후 Benzene : Ethyl acetate (1 : 4, v/v) 용매로 전개한다. 전개 후 TLC plate를 잘 건조 한 후 80% (v/v) ethanol에 용해한 5% (w/v) NaOH 용액을 도포하고 hot plate를 이용하여 가열한다. 갈색~ 청색의 다양한 spot 이 나타나며 plate 가장 자리의 background가 발색되려고 할 때 까지 가열을 계속한다. 발색한 TLC plate는 흡습을 하고 쉽게 퇴색이 되므로 발색이 끝난 후 scanner로 scan하여 저장한다.

- **사양꿀 특이 물질의 정량(HPLC 방법)**

(1) 시료의 전처리

꿀 10g에 증류수 10 mL를 가하여 잘 혼화 한 후 후 원심분리(14,000rpm, 5분)하여 화분 및 기타 물 불용해 물질을 침전으로 제거한다. 원심분리 한 꿀 상등액 10 mL와 2N HCl에 용해한 0.1% (w/v) DNPH 용액 10 mL를 혼합하고 vortexing (1분)하여 잘 섞은 후 상온에서 차광하여 1시간 반응시킨다. 반응 후 반응액에 benzene 10 mL를 가하고, 1분간 vortexing 하여 DNPH 유도체를 benzene 층으로 이행시킨 후 10,000 rpm 에서 5분간 원심분리 한 후 상등액 10 mL을 취하여 시험관으로 옮긴다. 시험관을 80 °C water bath에 넣고 완전히 건조 한 후 여기에 benzene 50 $\mu$ L를 가하여 재 용해하였다. 재 용해한 benzene 용액을 HPLC용 분석 시료로 한다.

(2) 시료의 HPLC 분석

분리를 위한 column으로는 TC-C18 column (21.2mm × 250mm 10 $\mu$ m, Agilent, USA)을 사용하여, column temperature 25 °C, mobile phase는 H<sub>2</sub>O와 MeOH 30대 70,. 검출은 352nm, flow rate는 0.8mL/min으로 한다. 37분 부근의 peak의 면적으로부터 사양꿀 특이 물질의 양을 측정한다(Fig 8 참조).

● **Methylglyoxal 함량 분석**

- Methylglyoxal (MGO)은 뉴질랜드 마누카 꿀의 특이물질로서 정기적으로 섭취했을 시 생리적으로 이점을 가질 수 있다. 또한 MGO의 생산경로 중 전구체인 dihydroxyacetone (DHA)은 사양꿀의 특이물질로 예상되는 4-hydroxymethylfurfural (4-HMF)의 생산경로 중 전구체이기도 하다.

- 꿀의 MGO 함량은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 시료는 전처리 과정을 거치는데 다음과 같다. 꿀의 회석액을 30% 로 제조한 후 꿀 회석액 이나 MGO standard 1.2mL에 2% o-phenyldiamine 0.6mL를 혼합한 후 암실에서 16시간 반응 하여 준비했다. 분석조건은 다음과 같다.

Table 4. MGO 분석 조건

Instrument	YL-9100 [㈜영린기기]
Column	TC-C18 (C18, 250mm X 4.6mm)
Flow-rate	1mL/min
Temperature	30 °C
Solvent	0.075% Acetic acid(A) and Methanol(B) Gradient
Detector	UV 312nm

Gradient elution

Time	A (%)	B (%)
0	90	10
5	58	42
30	45	55
31	0	100
34	0	100
35	90	10
70	90	10

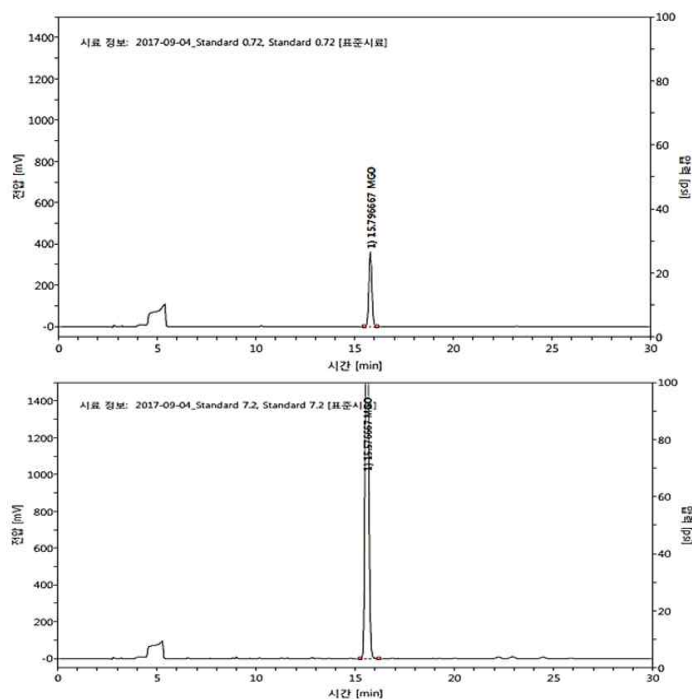


Fig 32. MGO standard 0.72µg/10µL, 7.2 µg/10µL



Table 5. MGO standard content

Methylglyoxal standard	
peak 면적값	MGO STD 농도 (μg/10μL)
897.654	0.18
1480.903	0.36
3844.751	0.72
9882.092	1.8
15373.565	3.6
30970.809	7.2

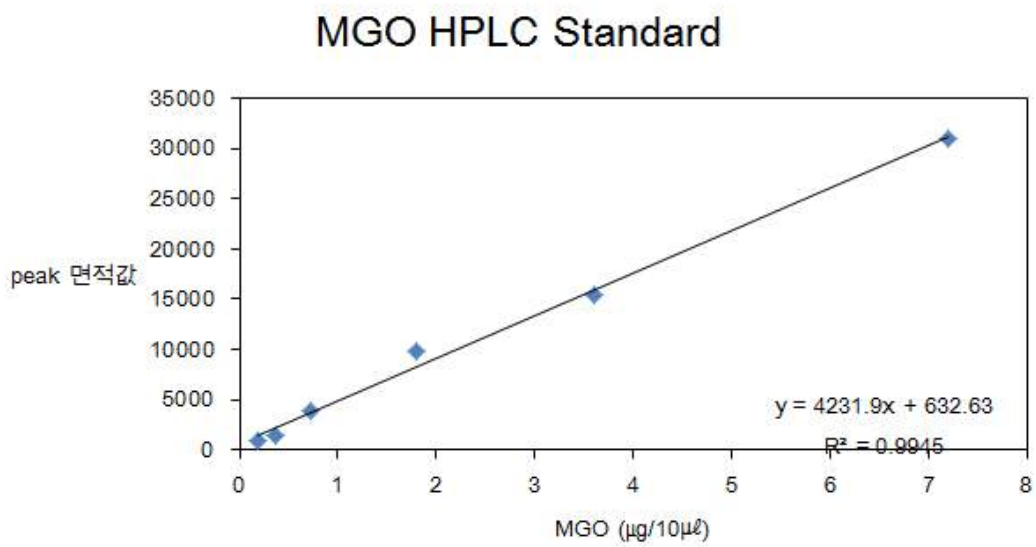
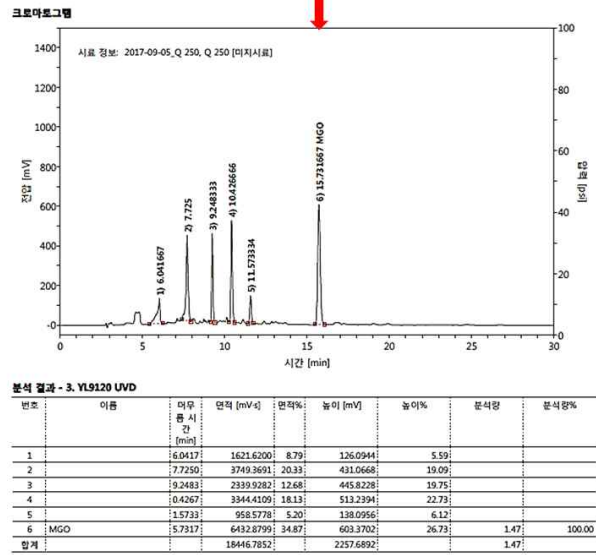


Fig 33. MGO standard calibration curve

A



B

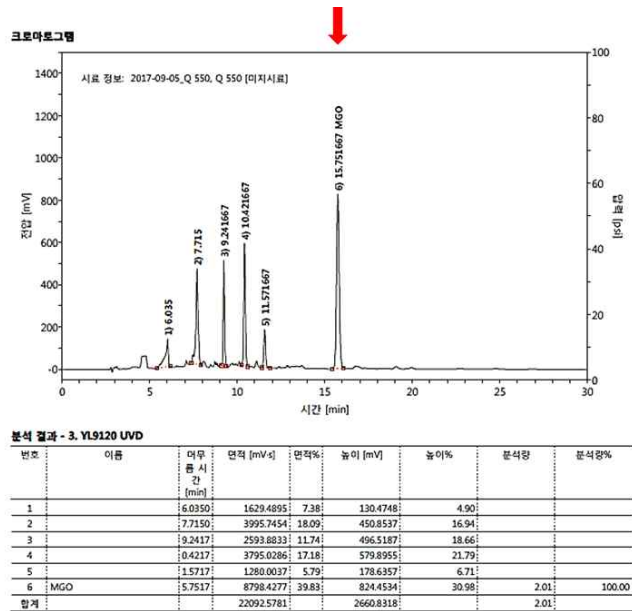


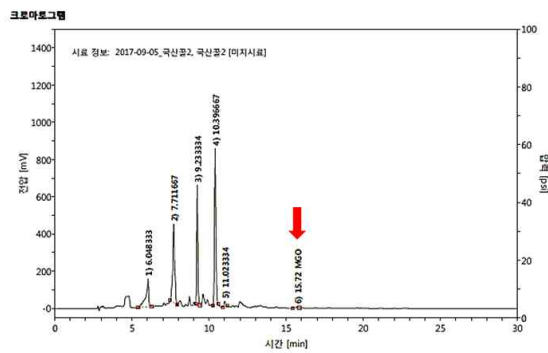
Fig 34. Queen Bee MGO 250+,550+ MGO 함량  
 A : Queen Bee MGO 250+, B : Queen Bee MGO 550+

Table 6. Manuka 꿀의 MGO 함량

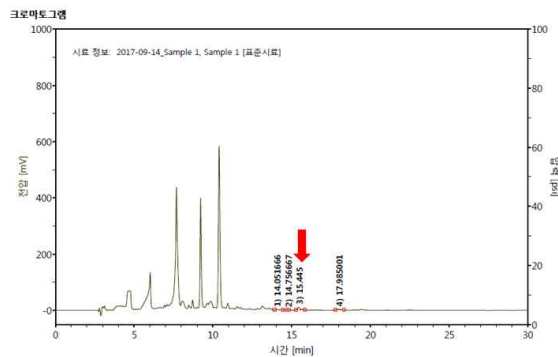
sample	MGO 농도 (mg/꿀1kg)	제품 표기 MGO 농도 (mg/꿀1kg)
Queen Bee MGO 100+	143.7	100
Queen Bee MGO 250+	490.0	250
Queen Bee MGO 550+	670.3	550
Natural Honey MGO 100+	134.3	100
Natural Honey MGO 200+	288.3	200
Natural Honey MGO 400+	442.7	400
Natural Honey MGO 1000+	1117.0	1000

국산, 외국산, 중국, 일본 꿀을 대상으로 MGO 함량을 측정하였다. 그 결과 극소량의 MGO가 함유되어 있는 것을 확인 했다.

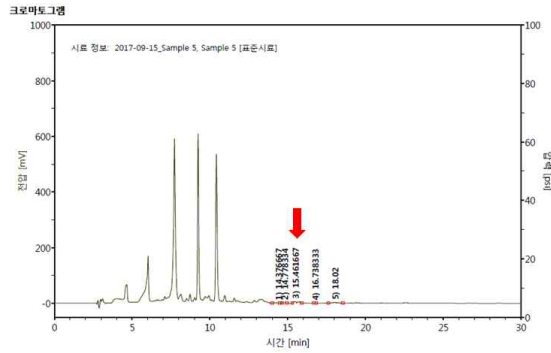
A



B



C



D

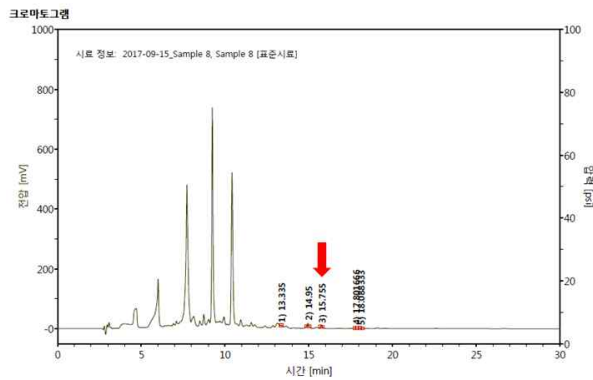


Fig 35. MGO content of native, foreign, China, Japan honey  
 A : 국산, B : 외국산, C : 중국산, D : 일본산

Table 7. Honey list using MGO content analysis (foreign)

서양 꿀	구입처	원산지	MGO 농도 (ug/꿀1kg)
nectaflor(야생꽃꿀)	일본	스위스	N.D.
nectaflor(숲꿀)	일본	스위스	N.D.
nectaflor(벚꽃꿀)	일본	스위스	12.4
Airborne(클로버꿀)	일본	뉴질랜드	N.D.
Airborne(라타꿀)	일본	뉴질랜드	N.D.
miel de citronnier(레몬나무꿀)	일본	프랑스	17.8
miel de lavande maritime(라벤더꿀)	일본	프랑스	N.D.
lune de miel (오렌지나무꿀)	일본	프랑스	N.D.
lune de miel (아카시아꿀)	일본	프랑스	20.1
lune de miel (꿀)	일본	프랑스	11.9
THE FINEST HONEY (아카시아꿀)	일본	루마니아	N.D.
THE FINEST HONEY (클로버꿀)	일본	캐나다	N.D.
THE FINEST HONEY (오렌지꿀)	일본	멕시코	11.9
THE FINEST HONEY (해바라기꿀)	일본	루마니아	N.D.

THE FINEST HONEY (로즈마리꿀)	일본	스페인	9.7
THE FINEST HONEY(잡화꿀)	일본	쿠바	N.D.
캐나다 퓨어 허니	일본	캐나다	11.4
ROYAL FIR HONEY	일본	독일	N.D.
miel de citronnier	일본	프랑스	N.D.
아카시아꿀	일본	독일	11.8
Mielizia Arancio de Sud d'Italia	일본	이탈리아	N.D.
Mielizia Eucalpto della Costa Ionica	일본	이탈리아	N.D.

Table 8. Honey list using MGO content analysis (Japan, China)

일본 꿀	구입처	원산지	MGO 농도 (ug/꿀1kg)
THE FINEST HONEY (연꽃꿀)	일본	일본	5.8
THE FINEST HONEY (잡화꿀)	일본	일본	N.D.
THE FINEST HONEY (토치)	일본	일본	4.7
PETIT HONEY(후쿠라시)	일본	일본	22.5
PETIT HONEY(꿀꿀)	일본	일본	N.D.
PETIT HONEY(아카시아꿀)	일본	일본	N.D.
미즈바시(베밀꿀)	일본	일본	18.7
미즈바시(토치)	일본	일본	N.D.
미즈바시(연꽃꿀)	일본	일본	N.D.
일본 꿀별 하치미쓰(나가사키현)	일본	일본	15.7
일본 꿀별 하치미쓰(효고현)	일본	일본	N.D.
국산 북해도 하치미쓰	일본	일본	21.7
아카시아밀봉	일본	일본	N.D.
하치미쓰(북해도)	일본	일본	13.9
중국꿀	구입처	원산지	MGO 농도 (ug/꿀1kg)
중국꿀-1	일본	중국	N.D.
중국꿀-2	일본	중국	N.D.
하치미쓰(중국)	일본	중국	N.D.

● Methylglyoxal(MGO) 성분의 유해 논란

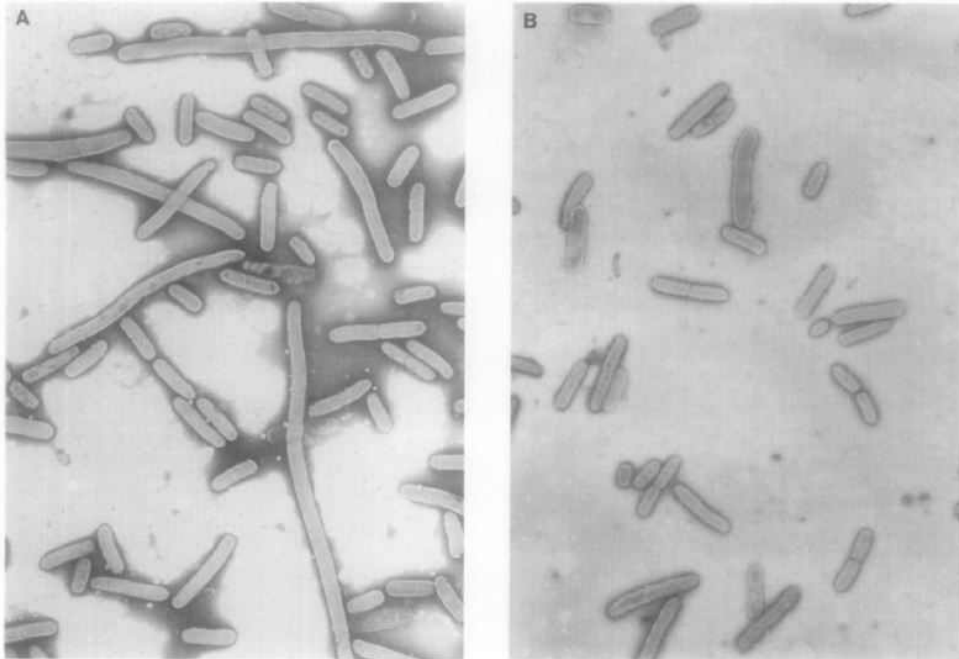
- 뉴질랜드 산 꿀의 고함량 methylglyoxal 성분을 특화전략으로 홍보하고 있으며, 가격 또한 매우 높게 책정되어져 있다. 위의 함량분석표에서도 보여 주었지만, 세계 각국의 꿀은 methylglyoxal 함량이 검출한계를 못 미칠 정도로 미량 함유되어 있을 정도이다.
- 그러나, methylglyoxal 성분의 유해성 논란은 여전히 진행중에 있다. 그 몇가지 사례를 논문을 통해서 확인하고자 한다.

1) MGO는 대장균의 세포분열을 방해한다. : 아래의 논문은 MGO를 분해하는 효소를 발현시킨 대장균은 세포분열을 원활히 하며 증식하지만, MGO를 분해하는 효소가 없는 대장균은 세포분열을 하지 못하여 증식하지 못함을 보여주고 있다.

MOLECULAR CLONING OF THE PSEUDOMONAS PUTIDA GLYOXALASE I GENE  
IN ESCHERICHIA COLI

Hae-ik Rhee, Kousaku Murata, and Akira Kimura

Research Institute for Food Science, Kyoto University, Uji,  
Kyoto 611, Japan



2) MGO는 AGE(advanced glycation endproducts) 생성을 유도한다. : 여러 가지 유해논란에  
놓여져 있는 AGE는 MGO로부터 생성되어지는 것으로 밝혀졌다. 아래의 그림은 그 생성 기작과  
AGE의 유해기능을 잘 정리해 놓았다.

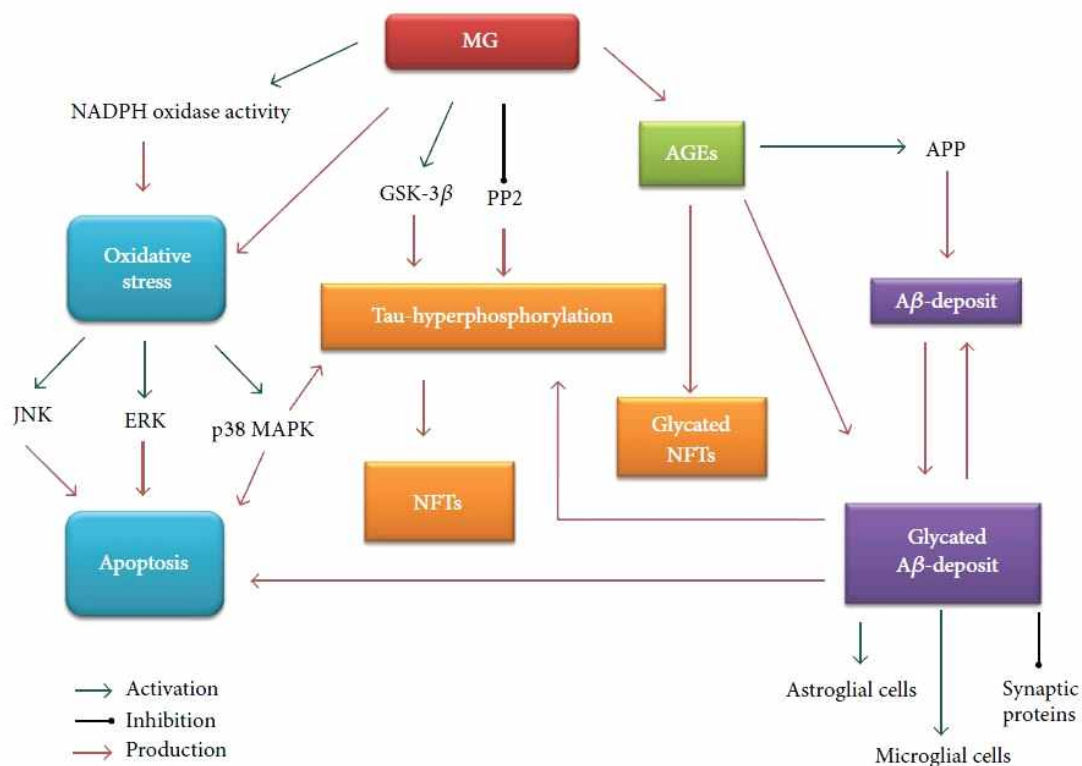


FIGURE 2: Role of MG and MG-derived AGEs in AD.

3) AGE는 복부비만, 당뇨를 유발한다. : PNAS 2012년 논문에 게재된 논문에 의하면 AGE를 투여한 마우스에서 복부비만과 당뇨가 관찰되어짐을 보고 하였다.

## Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1

Weijing Cai<sup>a</sup>, Maya Ramdas<sup>a</sup>, Li Zhu<sup>a</sup>, Xue Chen<sup>a</sup>, Gary E. Striker<sup>a,b</sup>, and Helen Vlassara<sup>a,b,1</sup>

Departments of <sup>a</sup>Medicine and <sup>b</sup>Geriatrics, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY 10029

Edited by\* Marc Feldmann, Imperial College London, London, United Kingdom, and approved July 27, 2012 (received for review April 10, 2012)

4) AGE는 Alzheimer's Disease의 amyloid 생성에도 관여한다. : 아래의 논문에 게재된 내용은 AGE는 Alzheimer's Disease의 amyloid 생성에도 관여하고 있음을 보여준다.

Hindawi Publishing Corporation  
BioMed Research International  
Volume 2014, Article ID 238485, 12 pages  
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/238485>



## Review Article

# Role of Methylglyoxal in Alzheimer's Disease

Cristina Angeloni,<sup>1</sup> Laura Zambonin,<sup>2</sup> and Silvana Hrelia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department for Life Quality Studies, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Corso d'Augusto 237, 47900 Rimini, Italy

<sup>2</sup> Department of Pharmacy and Biotechnology, Alma Mater Studiorum, University of Bologna, Via Irnerio 48, 40126 Bologna, Italy

Correspondence should be addressed to Cristina Angeloni; [cristina.angeloni@unibo.it](mailto:cristina.angeloni@unibo.it)

Received 13 December 2013; Revised 28 January 2014; Accepted 30 January 2014; Published 9 March 2014

Academic Editor: Tullia Maraldi

### ● 결론

- 기존의 사양 꿀 판별법 중 널리 쓰이는 방법인 탄소 동위원소 비 측정법은 꿀의 밀원은 주로 C3 식물이며, 설탕의 원료는 C4 식물인 사탕 수수라는 점을 착안하여 12C/13C비율 차이를 측정하여 판별하는 방법이다. 그러나 C3 식물 기원의 설탕을 이용한 사양 꿀이 생산되면서 탄소 동위원소 비 측정으로는 사양 여부를 판별하기에는 부적절한 방법이 되었다. 따라서 본 실험에서는 고가장비가 필요하지 않으며 C3 식물인 사탕무 설탕을 이용한 사양 꿀도 판별할 수 있는 판별법이 필요하다고 판단하여 사양 꿀의 특이 물질을 탐색하고 이를 이용한 판별법을 개발하고자 하였다.
- 본 연구에서는 사양 꿀의 특이 물질을 탐색하기 위해 꿀의 성분을 DNPH 유도체를 사용하여 TLC로 분석하였고, C3 식물인 사탕무 설탕에서도 특이 물질로 추정되는 물질이 검출 되는지 실험한 결과, 사양 꿀과 사탕수수 설탕, 사탕무 설탕에서 검출 되어 C3 식물인 사탕무 설탕을 이용한 사양 꿀 판별에 단점을 보완할 수 있음을 확인하였다.
- 특이 물질로 추정한 물질이 실제 사양 꿀 특이 물질인지 확인하기 위해 사탕수수 설탕 사양 꿀, 사탕무 설탕 사양 꿀, 꽃 꿀, 설탕과 꽃 꿀을 혼합한 꿀을 이용하여 DNPH 유도체를 분석하였다. 그 결과 사탕수수 설탕이나 사탕무 설탕 등 설탕을 밀원으로 공급하여 생산한 꿀에서만 특이 물질로 추정되는 물질이 검출이 되었고, 꽃 꿀을 채집하여 생산한 꿀에서는 검출되지 않아 사양 꿀의 특이 물질임을 확인하게 되었다.
- 사양꿀 특이물질은 사탕무 수수나 사탕 무 기원 설탕에서 동시에 존재하는 물질이므로 사양꿀



특이 물질은 사양에 사용된 설탕에 기인한다는 것을 알 수 있다. 원리적으로 꿀은 설탕을 효소적으로 분해하여 농축시킨 것으로 원료가 설탕이란 점에서는 공통점을 갖는다. 그러나 꽃꿀의 생성과정을 보면 열, 극단적 pH 등에 노출이 되지 않으나 설탕의 경우를 보면 사탕무 착즙액의 농축으로 부터 가혹한 조건에 노출이 되어 있으므로 예산치 못한 부반응이 진행되어 불순물을 생성할 여지가 있다. 따라서 사탕수수 착즙액으로부터 사양꿀 특이물질의 존재 여부를 추적하였다. 그 결과 사탕무 착즙액에는 특이 물질이 존재하지 않았으나 가열 농축 과정을 거치면서 특이 물질이 생성되는 것을 확인하였다. 그 이후의 설탕 제조 과정에서의 생성 여부는 본 연구의 방향과는 거리가 있어 생성 여부만 확인하였다. 즉 설탕 제조 과정 중 생성된 사양꿀 특이 물질은 설탕의 정제 과정 중에도 완전히 제거 되지는 않고 남아 있으며 사양꿀의 밀원으로 사용될 경우 꿀의 농축, 숙성 과정을 거치면서도 화학적 수식 없이 남아 있게 된다는 것을 알 수 있다. 시약용 설탕에서는 사양꿀 특이 물질이 검출되지 않는다.

- 개발된 사양 꿀의 판별법은 판별 결과를 해석할 때 사용되는 특이 물질이 규명된다면 사양 꿀이 함유하고 있는 불순물의 유래를 추적 할 수 있고 또한 후에 사양 꿀의 판별법 개발에 있어서 지표물질로 사용 되어 질 수 있다. 그러나 정제가 진행될수록 이 물질의 안정성은 급격히 떨어져 순수한 상태의 정제품 획득에는 실패하였다. 그러나 이 물질의 구조에 관한 제한적인 데이터와 이를 근거로 한 문헌상의 데이터를 기반으로 본 물질의 생성 예상 메카니즘을 예측하였으며 5-((dimethylamino)methyl) furan-3-carbaldehyde로 제안을 한다.
- 뉴질랜드의 마누카 꿀에 다량 함유되어 있는 methylglyoxal은 기능성을 부각하며 고가로 판매되고 있으며 함유량에 따라 가격의 차이가 크게 나고 있다. 마누카 꿀 중 methylglyoxal은 밀원인 마누카 꽃에 함유되어 있는 dihydroxyacetone이 꿀의 저장 농축 과정 중 비효소적으로 전환이 되어 생성이 된다. 꽃 꿀 중의 dihydroxyacetone은 마누카 꽃의 특징적인 성분이며 마누카 꽃으로부터 채밀한 꿀의 특징적인 성분으로 전환 되기도 한다. 한국 꿀에서의 methylglyoxal 함유 여부 및 개발 가능성을 보기 위하여 methylglyoxal 함량을 분석하였다. 그러나 methylglyoxal 함량은 뉴질랜드의 마누카 꿀을 제외한 국산, 외국산, 중국, 일본 꿀에서는 그 양이 극소량으로 나타나 상품적인 가치가 없음을 알았다.

● 참고문헌

1. 식품 공전 제5 식품별 기준 및 규격, 29 기타식품류, 29-7 벌꿀류
2. Sanz, M. L., Polemis, N., Morales, V., Corzo, N., Drakoularakou, A., Gibson, G. R., et al. In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2914 - 2921 (2005).
3. Frankel, S., Robinson, G. E., & Berenbaum, M. R. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 37(1), 27 - 31 (1998).
4. Weston, R. J., & Brocklebank, L. K. The oligosaccharide composition of some New Zealand

- honeys. *Food Chemistry*, 64, 33 - 37. (1999).
5. Wang, X. H., Andrae, L., & Engeseth, N. J. Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6923 - 6928 (2002).
  6. Abdel-Aal ESM, Ziena HM and Youssef MM, Adulteration of honey with high fructose corn syrup detection by different methods. *Food Chem* 48, 209-212 (1993).
  7. Marshall T and Williams KM, Electrophoresis of honey characterization of a complex biological matrix by silver staining. *Anal Biochem* 167, 301-303 (1987).
  8. Low NH and Sporns P, Analysis and quantitation of minor disaccharides and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography. *Food sci* 53, 558-561 (1988).
  9. Low NH and South W, Determination of honey authenticity by capillary gas chromatography *AOAC Int* 78, 1210-1218 (1995).
  10. Low NH, Food authenticity analysis by anion-exchange liquid chromatography. *Am Lab* 28, M35 (1996).
  11. White JW and Winters K, Honey protein as internal standard for stable carbon isotope ratio detection of adulteration of honey. *Assoc off Anal Chem* 72, 907-911 (1989).
  12. White JW, Winters J, Martin P and Rossmann A, Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. *AOAC Int* 81, 610-619 (1998).
  13. Low NH, Brisbane T, Bigam G and Sporns P, C-13 nuclear magnetic resonance for the qualitative and quantitative analysis of structurally similar disaccharides. *Agric Food Chem* 36, 953-957 (1988).
  14. Calvin, M., & Bassham, J. A. *The photosynthesis of carbon compound*. New York : Benjamin (1962).
  15. Hatch, M., & Slcak, C. R. Further studies on a new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in sugar cane and its occurrence in other plant species. *Biochemical Journal* 102, 417-422 (1967).

16. Hatch, M. D., Slack, C. R. Photosynthetic CO<sub>2</sub> Fixation pathway. Annual Review of Plant Physiology, 21, 141-162 (1979).
17. G.J. Padovan, D. De Jung, L.P. Rodrigues, J.S. Marchini. Detection of adulteration of commercial honey sample by the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotopic ratio. Food Chemistry 82, 633-636 (2003).
18. 한국양봉협회. 식약청 - 천연벌꿀, 사양벌꿀과 구분 판매실시 - 식약청, 벌꿀자율표시제 시범. 양봉협회보 346, 18-19 (2009).
19. J. AMUTHA ISWARYA DEVI, A. KOTTAI MUTHU. Gas chromatography mass spectrometry analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of saccharum spontaneum linn. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol 6 suppl 2 (2014)

#### 나. 탄소동위원소비를 이용한 신속진위판별을 위한 매뉴얼

##### 1. 준비물 및 샘플채취

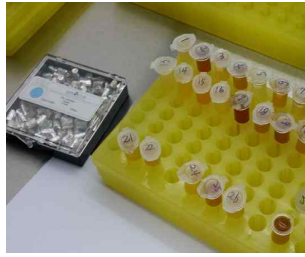
- ① 준비물: 15ml 팔콘튜브, 샘플수저(식약스푼), 티슈, 스텐드(렉) 등
- ② 농축하는 꿀: 농가이름과 번호를 적은 후 농축장에서 1드림당 15ml 1개씩 채취
- ③ 숙성 꿀: 농가에서 드림통이나 말통에 담겨진 꿀에 용기별로 농가 이름과 번호를 쓰고 각각 15ml 한 개씩 샘플을 채취한다. 이때 용기별로 다른 스푼을 사용한다.

##### 2. 분석시료 준비

- ① 검사 샘플 준비 : 채취한 꿀은 검사하기 편하게 1.5ml 에피튜브에 농가이름과 번호, 날짜, 꿀 종류를 기입하여 준비한다.
- ② 수분, 당도 검사 : 시료채취 후 남은 13.5ml을 이용하여 수분과 당도를 측정한다.
- ③ 튜브캡슐 만들기 : 1.5ml 튜브에 담긴 샘플을 스타츄라와 핀셋을 이용하여 100마이크로그램 정도의 꿀을 스타츄라에 찍어 튜브캡슐에 넣어 분석할 시료를 만든다. 튜브캡슐은 공처럼 동그랗게 만들어 분석을 위해 준비한다. 이때 튜브캡슐이 기계에 찍히지 않도록 동그랗게 잘 만들어야한다.
- ④ 동그랗게 만든 튜브캡슐 샘플을 번호 순서대로 쉘플레이트에 넣어 준비한다.
- ⑤ 분석 시작 전 세종류의 가스(O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, 헬륨)를 확인하고 분석을 시작한다. 시료분석은 분석기에 따른 매뉴얼로 진행한다(별첨).



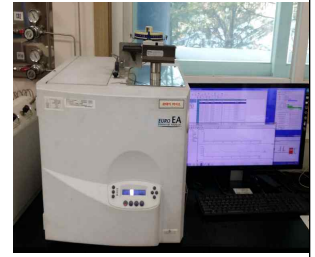
[샘플준비]



[분석시료준비]



[분석시료 튜캡슐 제작]



[기기분석]

그림 2. 탄소동위원소를 이용한 신속진위판별 분석 진행 사진

3. 분석결과 보기

분석한 수치가 -23.5미만으로 나오면 분석된 시료는 꽃에서 유래한 벌꿀로 인정한다.

표 1. 2017년도 벌꿀 샘플 채취 및 분석 결과

꿀 종류	채밀 날짜	벌꿀 샘플 탄소원소비 검사결과							
		1차(%)	13c 2차(%)	13c 3차(%)	13c 평균(%)	표준 편차	수분 (%)	당도 (Brix)	
정리채밀	4월25일	-23.46	-23.46	-23.50	-23.5	±0.02	17.1	81.5	
양봉꿀	야생화 (벚+절레 등)	5월12일	-24.87	-24.93	-24.83	-24.9	±0.05	19.7	78.9
	아카시아	5월23일	-25.54	-25.31	-25.61	-25.5	±0.16	15.6	83.9
	야생화 (밤꽃+기타)	6월08일	-24.80	-24.88	-24.77	-24.8	±0.06	15.4	83.5
	평균(%)					-25.1		16.9	82.1
	표준편차					±0.38		±2.43	±2.78
토종꿀	1차 채밀	9월11일	-26.52	-26.58	-26.6	-26.6	±0.04	18.5	79.6
	2차 채밀	11월22일	-25.68	-25.63	-25.65	-25.7	±0.03	20.9	77.7
	평균(%)		-26.6	-26.11	-26.13	-26.3		19.7	78.7



그림 3. 채취 및 수집 벌꿀 샘플 주관기관 제출 사진

표 2. 자체확보 꿀 시료의 탄소동위원소비 양평균농업기술센터 추가 자체분석 결과

(단위 : %)

번호	상품명	탄비 검사 결과 (%)					수분	당도	비고
		1차	2차	3차	평균	표준편차			
w-177	Pure Honey	-24.18	-23.97	-24.16	-24.1	±0.12	14.6	84.0	호텔용 20g 프라스틱 소포장, 비매품
w-178	Miele Millefiori	-24.40	-24.36	-24.38	-24.4	±0.02	18.6	79.5	호텔용 30g 유리병소포장, 비매품
w-179	Fagel's Honey	-21.66	-21.58	-21.65	-21.6	±0.04	14.0	84.7	호텔용 20g 프라스틱 소포장, 비매품
x-173	양양벌꿀 (피나무꿀)	-24.96	-25.00	-24.93	-25.0	±0.04	17.5	81.2	구룡양봉
x-174	양양벌꿀 (엄나무꿀)	-22.56	-22.63	-22.71	-22.6	±0.08	17.7	80.9	구룡양봉

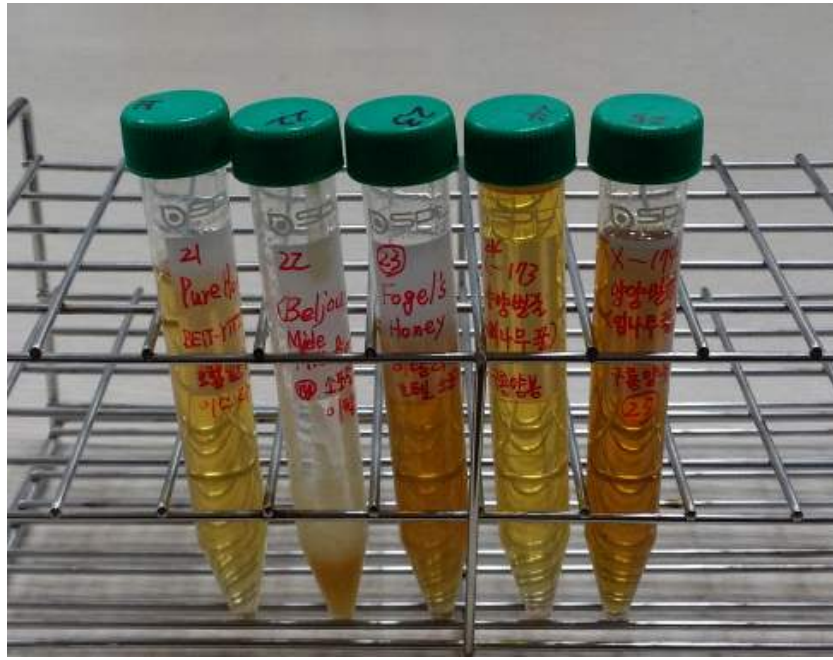


그림 4. 채취 및 벌꿀 추가 검사 샘플 사진

#### 다. 탄소동위원비 분석기관간 차이 비교

벌꿀 시료의 탄소동위원소비 분석 기관간의 차이 유무를 알아보기 위하여 주관기관인 강원대학교에서 수집 제공한 시판중인 꿀 시료 9점과 양평군농업기술센터에서 자체 확보한 시료 5점과 2017년 외국에서 구입한 6점의 시료(표 2, 그림 3)등 총 20점의 시료에 대해 국내 주요 분석기관 3개소에서 3반복 시험으로 탄소동위원소비 등 품질을 분석하여 비교하였다.

##### 1) 양평군농업기술센터 분석 결과

양평군농업기술센터에서 자체 분석한 결과는 표 3. 과 같았다.

표 3. 꿀 시료의 탄소동위원소비 등 양평군농업기술센터 분석 결과 (단위 : %)

순번	번호	상품명	탄비 검사 결과 (%)					수분	당도	비고
			1차	2차	3차	평균	표준편차			
1	x-044-1	청밀아카시아	-24.3 3	-24.3 5	-24.5	-24.4	±0.09	18.4	80.0	양봉농협 (안성)
2	x-073-1	윤상복 벌꿀가족(잡화)	-22.84	-22.74	-22.79	-22.8	±0.05	17.6	80.9	강원 황성군
3	x-119	벌꿀 pure honey	-24.1 7	-24.1 4	-24.0 8	-24.1	±0.05	18.0	80.6	충북 제천양봉영농
4	x-139	오뚜기벌꿀 (아카시아)	-25.8 8	-25.7 8	-25.8	-25.8	±0.05	18.5	79.9	강원도 영월군
5	x-171	또바기꿀 (아카시아)	-25.6 1	-25.5 7	-25.6 5	-25.6	±0.04	15.6	83.9	양평군농업 기술센터
6	x-172	또바기꿀 (아카시아)	-24.6 8	-24.5 3	-24.5 3	-24.6	±0.09	15.4	83.5	양평군농업 기술센터
7	x-151	비트 사양꿀	-25.5 4	-25.4 9	-25.5 5	-25.5	±0.03	26.1	72.3	양평군농업 기술센터

8	w-051	하치미쯔	-24.7 8	-24.7 8	-24.8 6	-24.8	±0.05	18.5	79.8	일본산
9	w-053	ROYAL FIR HONEY	-23.6	-23.7 4	-23.6 8	-23.7	±0.07	17.4	81.0	독일산
10	w-171	Pure Honey (예루살렘 마운틴)	-22.94	-22.89	-22.82	-22.9	±0.06	15.0	83.6	이스라엘산
11	w-172	Miele di acacia	-23.9 1	-24.0 6	-24.0 5	-24.0	±0.08	17.5	80.5	이탈리아산 (수비아코)
12	w-173	Miele di Castagno	-24.9	-24.8 1	-24.8 5	-24.9	±0.05	16.2	82.0	이탈리아산 (수비아코)
13	w-174	Mieledi Sulla	-24.8 3	-25.0 1	-25.0 3	-25.0	±0.11	16.3	80.4	이탈리아산 (수비아코)
14	w-175	Miele Millefiori	-24.6 9	-24.7 1	-24.6 7	-24.7	±0.02	15.3	82.0	이탈리아산 (수비아코)
15	w-176	Miele di Girasale	-24.7 9	-24.8 4	-24.7 9	-24.8	±0.03	17.4	80.7	이탈리아산 (수비아코)
16	c-011	야생국화꿀	-25.7 8	-25.8 1	-25.8 7	-25.8	±0.05	19.0	79.4	중국산 북건성상점
17	y-024	충주팜	-24.9 1	-25.5 4	-24.8 8	-25.1	±0.37	17.8	80.8	충북 충주시
18	y-031	지리산쌍용휴 게소토종(별집 )	-12.09	-12.09	-11.73	-12.0	±0.21	14.5	84.2	전북 남원시
19	y-039	2015년 토봉꿀	-20.63	-20.45	-20.33	-20.5	±0.15	21.2	77.2	양평군농업 기술센터
20	y-171	천년세월 토종꿀	-26.3 6	-26.2 8	-26.4 4	-26.4	±0.08	18.5	79.6	양평군농업 기술센터

## 2) 한국양봉농협 분석 결과

한국양봉농협에서 분석한 결과는 표 4. 와 같았다.

표 4. 꿀 시료의 탄소동위원소비 한국양봉농협 분석 결과

(단위 : ‰)

순 번	번호	상품명	탄비 검사 결과 (%)					표준 편차	비고
			1차	2차	3차	평균			
1	x-044-1	청밀아카시아	-24.9	-24.8	-24.9	-24.9	±0.06	양봉농협(안성)	
2	x-073-1	윤상복 벌꿀가족(잡화)	-23.1	-23.1	-23.1	-23.1	±0.00	강원 횡성군	
3	x-119	벌꿀 pure honey	-24.7	-24.7	-24.7	-24.7	±0.00	충북 제천양봉영농	
4	x-139	오뚜기벌꿀 (아카시아)	-26.6	-26.7	-26.7	-26.7	±0.06	강원도 영월군	
5	x-171	또바기꿀 (아카시아)	-26.5	-26.5	-26.5	-26.5	±0.00	양평군농업기 술센터	
6	x-172	또바기꿀 (아카시아)	-26.5	-26.6	-26.5	-26.5	±0.06	양평군농업기 술센터	
7	x-151	비트 사양꿀	-25.8	-25.8	-25.9	-25.8	±0.06	양평군농업기 술센터	
8	w-051	하치미쯔	-24.6	-24.6	-24.6	-24.6	±0.00	일본산	

9	w-053	ROYAL FIR HONEY	-24.6	-24.6	-24.6	-24.6	±0.00	독일산
10	w-171	Pure Honey (예루살렘 마운틴)	-23.6	-23.7	-23.6	-23.6	±0.06	이스라엘산
11	w-172	Miele di acacia	-24.8	-24.7	-24.8	-24.8	±0.06	이탈리아산 (수비아코)
12	w-173	Miele di Castagno	-25.6	-25.6	-25.6	-25.6	±0.00	이탈리아산 (수비아코)
13	w-174	Mieledi Sulla	-25.7	-25.7	-25.8	-25.7	±0.06	이탈리아산 (수비아코)
14	w-175	Miele Millefiori	-25.5	-25.4	-25.5	-25.5	±0.06	이탈리아산 (수비아코)
15	w-176	Miele di Girasole	-25.7	-25.7	-25.7	-25.7	±0.00	이탈리아산 (수비아코)
16	c-011	야생국화꽃	-26.7	-26.7	-26.7	-26.7	±0.00	중국산 북건성 상점
17	y-024	충주팍	-25.5	-25.5	-25.5	-25.5	±0.00	충북 충주시
18	y-031	지리산IC쌍용휴게소 토종(벌집)	-12.0	-12.1	-12.0	-12.0	±0.06	전북 남원시
19	y-039	2015년 농가분 비매품 토봉꿀	-21.3	-21.3	-21.2	-21.3	±0.06	양평군농업기술센터
20	y-171	천년세월 토종꿀 2017. 센터채취토종꿀	-27.4	-27.5	-27.4	-27.4	±0.06	양평군농업기술센터

### 3) 한국양봉협회 양봉산물연구소 분석 결과

한국양봉협회 양봉산물연구소에서 분석한 결과는 표 5. 와 같았다.

표 5. 꿀 시료의 탄소동위원소비 한국양봉협회 분석 결과 (단위 : ‰)

순번	번호	상품명	탄비 검사 결과 (‰)					표준편차	비고
			1차	2차	3차	평균			
1	x-044-1	청밀아카시아	-24.1	-24.1	-24.3	-24.2	±0.12	양봉농협(안성)	
2	x-073-1	윤상복 벌꿀가족(잡화)	-23.4	-23.4	-23.4	-23.4	±0.00	강원 횡성군	
3	x-119	벌꿀 pure honey	-24.1	-24.4	-24.2	-24.2	±0.15	충북 제천양봉영농	
4	x-139	오뚜기벌꿀 (아카시아)	-25.3	-25.2	-25.2	-25.2	±0.06	강원도 영월군	
5	x-171	또바기꿀 (아카시아)	-25.2	-25.2	-25	-25.1	±0.12	양평군농업기술센터	
6	x-172	또바기꿀 (아카시아)	-24.8	-24.6	-24.5	-24.6	±0.15	양평군농업기술센터	
7	x-151	비트 사양꿀	-25	-25	-25	-25.0	±0.00	양평군농업기술센터	
8	w-051	하치미즈	-24.9	-24.9	-24.9	-24.9	±0.00	일본산	



9	w-053	ROYAL FIR HONEY	-24.1	-24.3	-24.2	-24.2	±0.10	독일산
10	w-171	Pure Honey (예루살렘 마운틴)	-23.7	-23.7	-23.9	-23.8	±0.12	이스라엘산
11	w-172	Miele di Acacia	-24.3	-24.1	-24.1	-24.2	±0.12	이탈리아산 (수비아코)
12	w-173	Miele di Castagno	-24.6	-24.6	-24.8	-24.7	±0.12	이탈리아산 (수비아코)
13	w-174	Mieledi Sulla	-24.7	-24.7	-24.54	-24.6	±0.09	이탈리아산 (수비아코)
14	w-175	Miele Millefiori	-24.7	-24.7	-24.4	-24.6	±0.17	이탈리아산 (수비아코)
15	w-176	Miele di Girasole	-24.9	-24.6	-24.6	-24.7	±0.17	이탈리아산 (수비아코)
16	c-011	야생국화꽃	-25	-25.2	-25.2	-25.1	±0.12	중국산 북건성 상점
17	y-024	충주팍	-24.7	-24.7	-24.5	-24.6	±0.12	충북 충주시
18	y-031	지리산IC쌍용휴게소 토종(벌집)	-13	-12.9	-13.3	-13.1	±0.21	전북 남원시
19	y-039	2015년 농가분 비매품 토봉꿀	-21.6	-21.6	-21.4	-21.5	±0.12	양평군농업기술센터
20	y-171	천년세월 토종꿀 2017. 센터채취토종꿀	-24.3	-25.2	-25.2	-24.9	±0.52	양평군농업기술센터

#### 4) 분석기관간 탄소동위원소비 분석 결과 비교

위 3개 기관에서 각각 분석한 탄비값의 평균값은 아래와 같았다.

표 6. 꿀 시료의 탄소동위원소비 평균 분석 기관별 탄소비의 평균값 비교 결과 (단위 : ‰)

순번	번호	상품명	탄비 검사 결과 비교 (‰)					비교
			양평센터 (a)	양봉농협 (b)	양봉협회 (c)	평균 (a~c)	표준편차 (a~c)	
1	x-044-1	청밀아카시아	-24.4	-24.9	-24.2	-24.5	±0.36	양봉농협(안성)
2	x-073-1	윤상복 벌꿀가족(잡화)	-22.8	-23.1	-23.4	-23.1	±0.31	강원 횡성군
3	x-119	벌꿀 pure honey	-24.1	-24.7	-24.2	-24.4	±0.30	충북 제천양봉영농
4	x-139	오뚜기벌꿀 (아카시아)	-25.8	-26.7	-25.2	-25.9	±0.72	강원도 영월군
5	x-171	또바기꿀 (아카시아)	-25.6	-26.5	-25.1	-25.7	±0.69	양평군농업기술센터
6	x-172	또바기꿀 (아카시아)	-24.6	-26.5	-24.6	-25.2	±1.11	양평군농업기술센터
7	x-151	비트 사양꿀	-25.5	-25.8	-25.0	-25.5	±0.42	양평군농업기술센터
8	w-051	하치미쯔	-24.8	-24.6	-24.9	-24.8	±0.15	일본산

9	w-053	ROYAL FIR HONEY	-23.7	-24.6	-24.2	-24.2	±0.46	독일산
10	w-171	Pure Honey (예루살렘 마운틴)	-22.9	-23.6	-23.8	-23.4	±0.48	이스라엘산
11	w-172	Miele di acacia	-24.0	-24.8	-24.2	-24.3	±0.40	이탈리아산 (수비아코)
12	w-173	Miele di Castagno	-24.9	-25.6	-24.7	-25.0	±0.49	이탈리아산 (수비아코)
13	w-174	Miele di Sulla	-25.0	-25.7	-24.6	-25.1	±0.56	이탈리아산 (수비아코)
14	w-175	Miele Millefiori	-24.7	-25.5	-24.6	-24.9	±0.48	이탈리아산 (수비아코)
15	w-176	Miele di Girasole	-24.8	-25.7	-24.7	-25.1	±0.55	이탈리아산 (수비아코)
16	c-011	야생국화꿀	-25.8	-26.7	-25.1	-25.9	±0.79	중국산 북건성 상점
17	y-024	충주팍	-25.1	-25.5	-24.6	-25.1	±0.43	충북 충주시
18	y-031	지리산IC쌍용휴게소 토종(벌집)	-12.0	-12.0	-13.1	-12.4	±0.62	전북 남원시
19	y-039	2015년 농가분 비매품 토종꿀	-20.5	-21.3	-21.5	-21.1	±0.55	양평군농업 기술센터
20	y-171	천년세월 토종꿀 2017. 센터채취토종꿀	-26.4	-27.4	-24.9	-26.2	±1.27	양평군농업 기술센터
계	20종	서양종 15종, 동양종 5종 / 국산 : 11종, 외국산:9종						

표 7. 꿀 시료의 기관별 탄소동위원소비 탄소비 분석값의 차이 비교 결과 (단위 : %)

순번	번호	상품명	탄비 검사 결과 비교 (%)					비고
			양평센터 (a)	양봉농협 (b)	양봉협회 (c)	탄비값 차이 (a-b)	탄비값 차이 (a-c)	
1	x-044-1	청밀아카시아	-24.4	-24.9	-24.2	0.47	-0.23	양봉농협(안성)
2	x-073-1	윤상부 벌꿀가죽(잡화)	-22.8	-23.1	-23.4	0.31	0.61	강원 횡성군
3	x-119	벌꿀 pure honey	-24.1	-24.7	-24.2	0.57	0.10	충북 제천양봉영농
4	x-139	오뚜기벌꿀 (아카시아)	-25.8	-26.7	-25.2	0.85	-0.59	강원도 영월군
5	x-171	또바기꿀 (아카시아)	-25.6	-26.5	-25.1	0.89	-0.48	양평군농업 기술센터
6	x-172	또바기꿀 (아카시아)	-24.6	-26.5	-24.6	1.95	0.05	양평군농업 기술센터
7	x-151	비트 사양꿀	-25.5	-25.8	-25.0	0.31	-0.53	양평군농업 기술센터
8	w-051	하치미즈	-24.8	-24.6	-24.9	-0.21	0.09	일본산
9	w-053	ROYAL FIR HONEY	-23.7	-24.6	-24.2	0.93	0.53	독일산
10	w-171	Pure Honey (예루살렘 마운틴)	-22.9	-23.6	-23.8	0.75	0.88	이스라엘산
11	w-172	Miele di acacia	-24.0	-24.8	-24.2	0.76	0.16	이탈리아산 (수비아코)

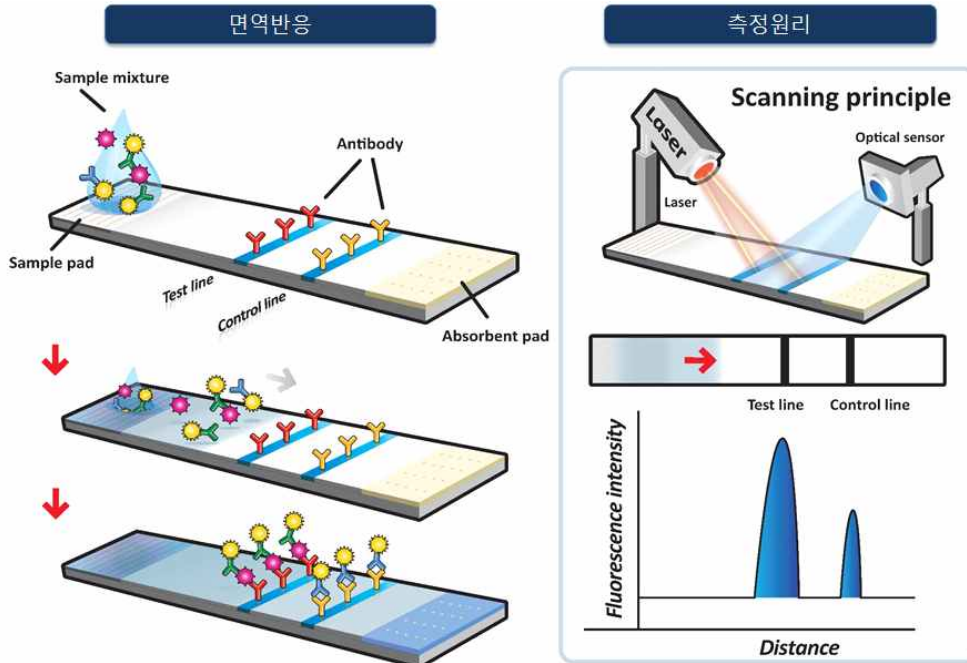
12	w-173	Miele di Castagno	-24.9	-25.6	-24.7	0.75	-0.19	이탈리아산 (수비아코)
13	w-174	Mieledi Sulla	-25.0	-25.7	-24.6	0.78	-0.31	이탈리아산 (수비아코)
14	w-175	Miele Millefiori	-24.7	-25.5	-24.6	0.78	-0.09	이탈리아산 (수비아코)
15	w-176	Miele di Girasale	-24.8	-25.7	-24.7	0.89	-0.11	이탈리아산 (수비아코)
16	c-011	야생국화꿀	-25.8	-26.7	-25.1	0.88	-0.69	중국산 복건성 상점
17	y-024	충주팜	-25.1	-25.5	-24.6	0.39	-0.48	충북 충주시
18	y-031	지리산IC쌍용휴게소 토종(벌집)	-12.0	-12.0	-13.1	0.06	1.10	전북 남원시
19	y-039	2015년 농가분 비매품 토봉꿀	-20.5	-21.3	-21.5	0.80	1.06	양평군농업기술센터
20	y-171	천년세월 토종꿀 2017. 센터채취토종꿀	-26.4	-27.4	-24.9	1.07	-1.46	양평군농업기술센터
계	20종	서양종 15종, 동양종 5종 / 국산 : 11종, 외국산:9종						

- 양평군농업기술센터, 한국양봉농협, 한국양봉협회 양봉산물연구소의 각 기관에서 분석한 벌꿀의 탄소동위원소비 검사값을 비교 분석한 결과 양평군농업기술센터와 한국양봉협회의 분석치는 거의 유사하게 나왔으며, 양봉농협에서의 분석치는 다른 두 기관의 분석치 보다 낮은값(덜 민감함)으로 나왔으며, 세 기관간 분석치의 큰 차이는 없었음.

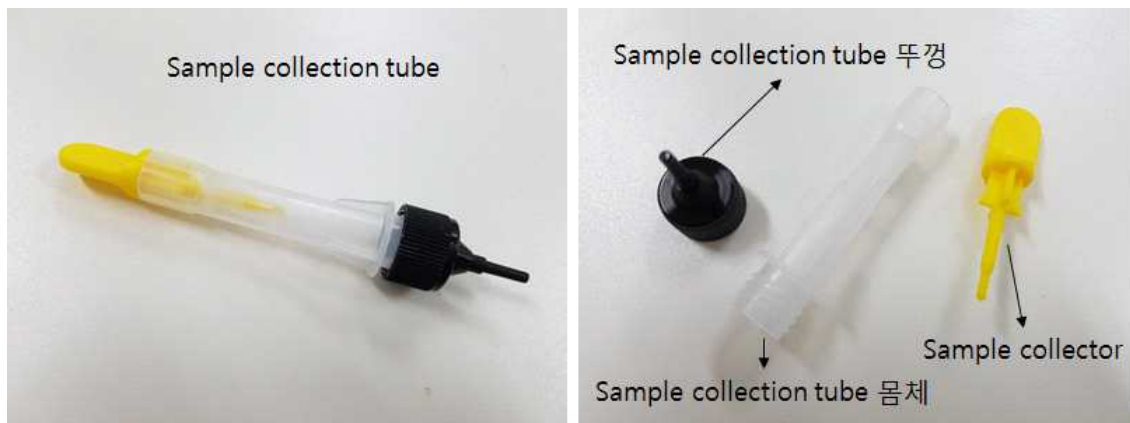
### 3) 제 1협동 과제

#### 가. 별꽃감별용 신속검사 카트리지 시제품 제작

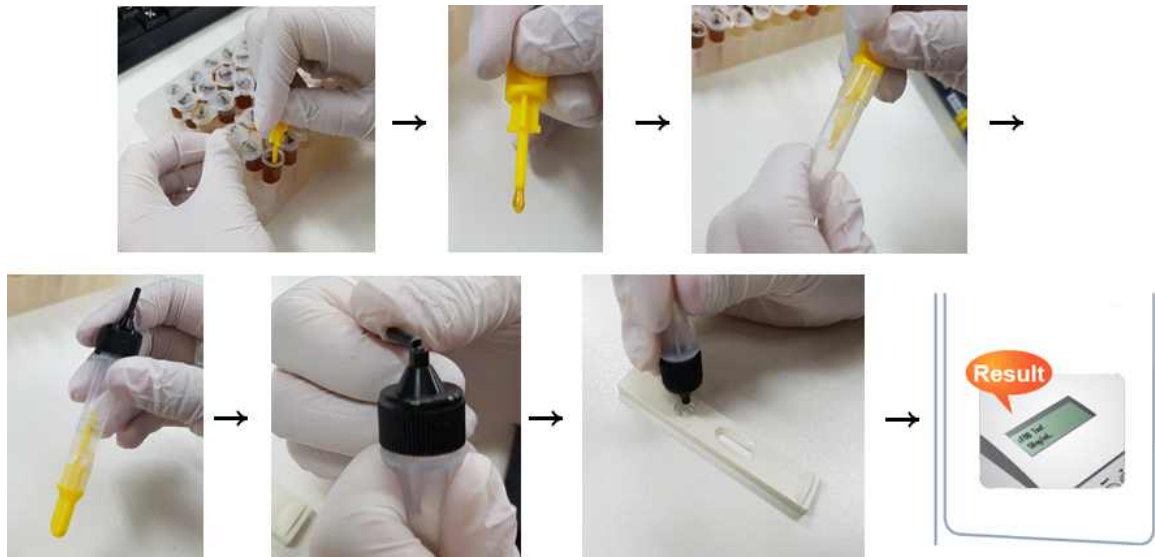
- 별꽃감별용 신속검사 카트리지는 제1세부과제에서 제공한 단클론항체를 제1협동과제에서 고순도로 정제하여 확보한 항체를 바탕으로 제작하였다. 본 카트리지는 항원항체 면역반응을 이용하여 탐지항체에 표지된 형광의 세기에 의해 꿀에 포함된 별꽃 타입의 농도를 정량화 할 수 있도록 개발되었다. 반응 모식도는 다음과 같다.



그리고 점도가 높은 벌꿀 sample을 채취 후 바로 측정할 수 있도록 제 1협동과제에서 보유하고 있는 sample collection tube를 활용한 시험방법을 확정하였다.



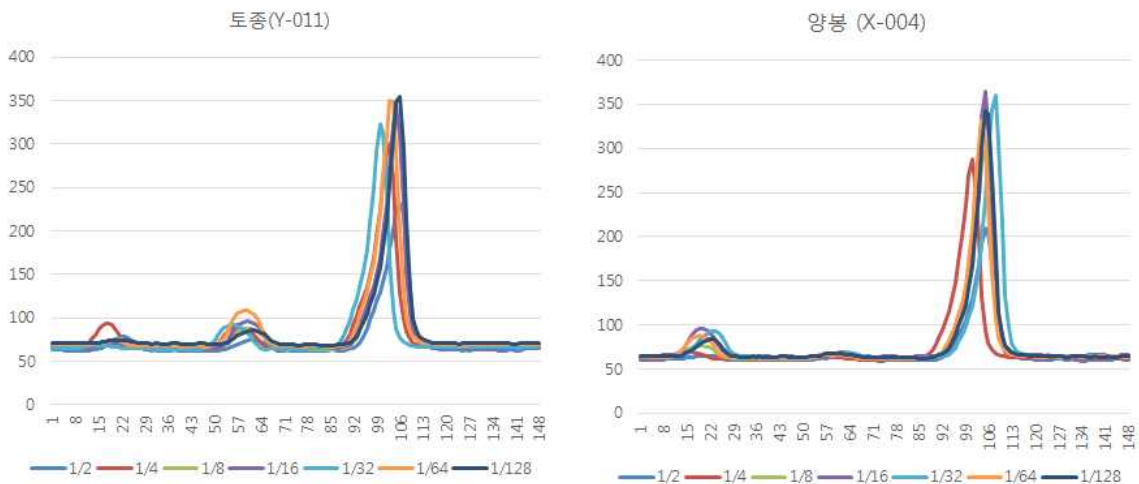
아래 그림과 같이 벌꿀 sample을 collector로 채취한 후 detection buffer가 들어있는 collection tube에 넣고 sample과 buffer가 혼합이 되도록 잘 섞어준다. sample collection tube 상단의 mixture가 나올 수 있도록 배출구를 부러뜨린 후 카트리지에 3방울을 적하한다. 12분간 면역반응이 진행되고 이후 형광의 세기가 기기를 통해 표기된다.



이렇게 기본 포맷이 확정된 토종/양봉 카트리지 시제품을 5,000T 제작하여 기초 성능평가 및 유효성 평가를 위해 사용되었다.

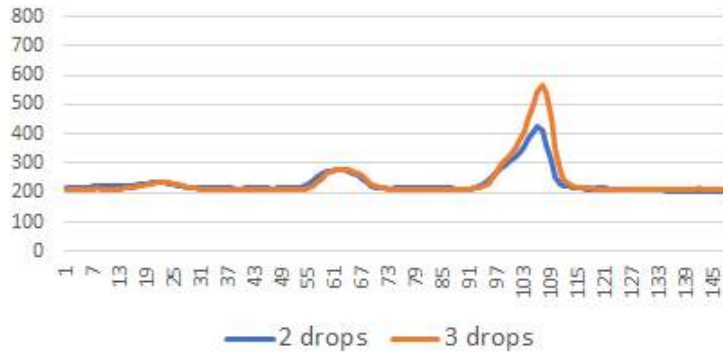
#### 나. 최저검출한계, 검사 정확성, 재현성 평가

- 토종 및 양봉 sample을 각각 serial dilution하여 1/2부터 1/128까지 형광세기를 측정하였다. 아래 그림은 토종과 양봉 sample의 희석배율을 나타낸 것이며, Y축이 형광세기를 나타낸다. 측정 결과 1/16부터 1/64 구간에서 형광 세기가 높게 나타나는 것으로 확인되어, 최종적으로 sample 이 detection buffer 1:32 비율로 혼합이 되도록 detection buffer 양을 설정하였다.



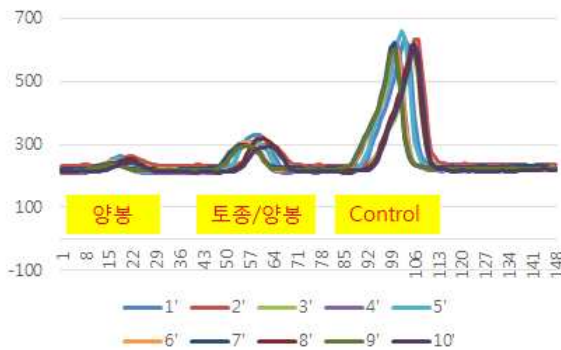
- 또한 카트리지에 적하는 mixture 양을 확정하기 위한 기초평가를 실시하였다. sample collection tube에서 적하되는 한 방울의 양은 대략 40ul에서  $\pm 4ul$ 의 오차를 보이고 있다. 2방울과 3방울간의 실험 결과, 테스트 면적에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, control의 형광세기가 큰 차이를 나타내었다. 특히, 2방울의 경우, control 면적값의 변이가 다소 높게 나타나서 mixture의 적하 양을 3방울로 확정하였다.

Loading Drop 양에 따른 결과

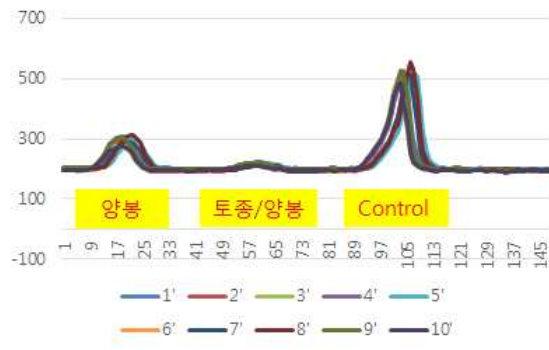


- 이를 통해 최저검출한계와 검사 정확성을 확인하려 하였으나, 토종 및 양봉에 내재된 각 sample의 정확한 농도를 확인할 수 있는 기준이 명확하지 않아, 재현성과 제공된 sample의 구분이 가능한지 유효성 평가를 진행하였다.

토종 (Y-011)



양봉 (X-004)



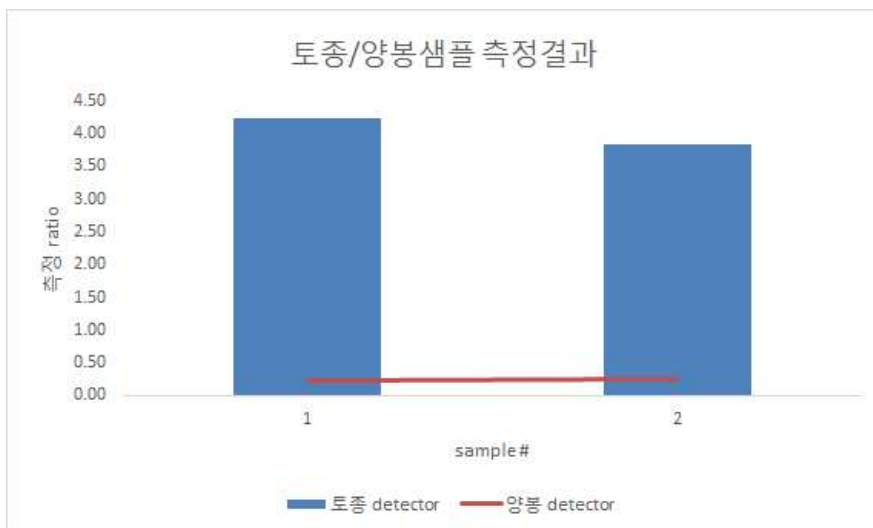
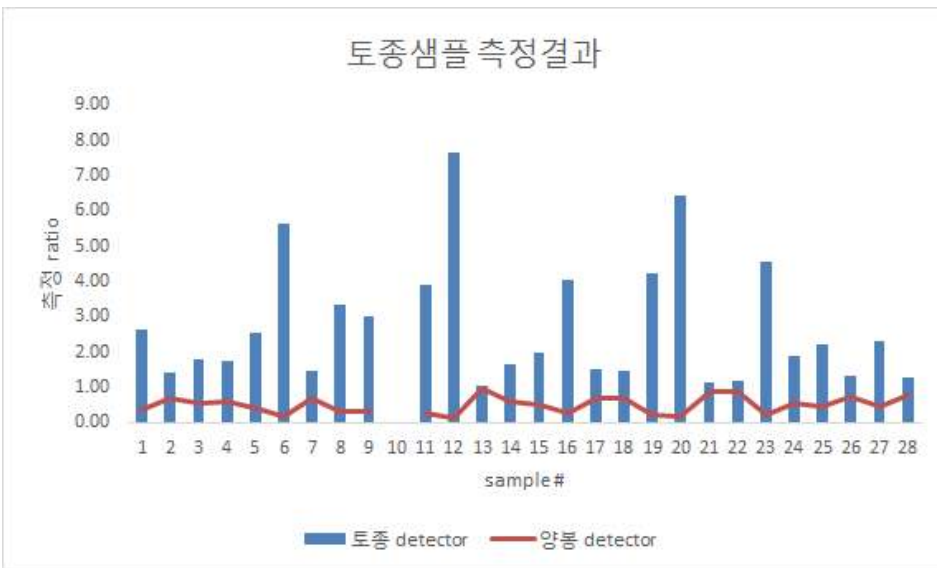
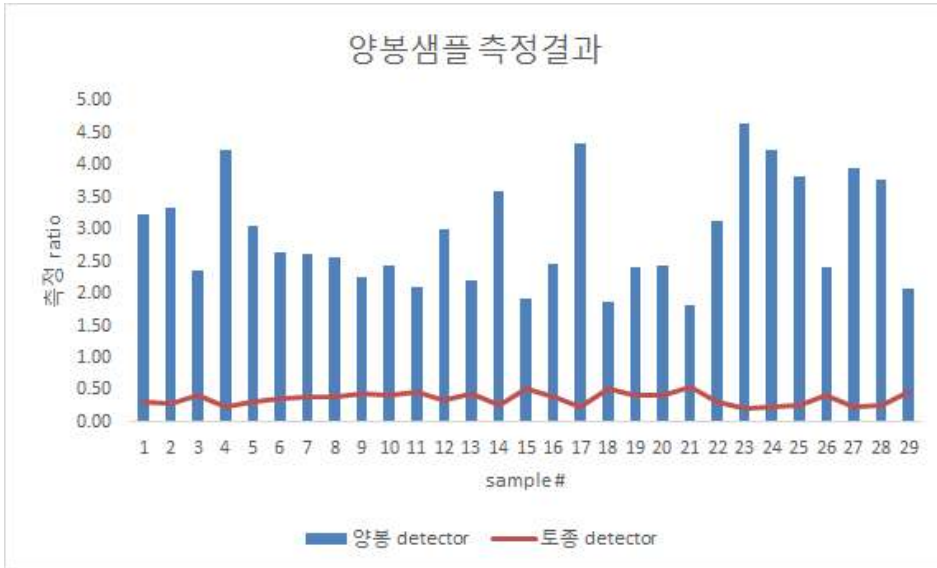
토종 sample	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	avg	sd	cv
양봉 면적값	349	248	222	251	349	189	163	333	144	260	251	74.6	29.7
토종 면적값	1079	670	757	918	932	900	717	1020	712	807	851	139.4	16.4
Control_면적값	3552	3422	3091	3467	3879	3239	3139	3375	3080	3342	3359	244.2	7.3
양봉_Ratio	0.10	0.07	0.07	0.07	0.09	0.06	0.05	0.10	0.05	0.08	0.074	0.02	24.6
토종_Ratio	0.30	0.20	0.24	0.26	0.24	0.28	0.23	0.30	0.23	0.24	0.253	0.03	13.5

양봉 sample	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'	10'	avg	sd	cv
양봉 면적값	747	865	760	925	841	803	829	921	905	737	833	70.9	8.5
토종 면적값	157	149	100	152	162	107	111	66	144	104	125	31.9	25.5
Control_면적값	1689	2424	2204	2441	2461	2469	2339	2610	2475	2210	2332	257.8	11.1
양봉_Ratio	0.44	0.36	0.35	0.38	0.34	0.33	0.35	0.35	0.37	0.33	0.360	0.03	9.1
토종_Ratio	0.09	0.06	0.05	0.06	0.07	0.04	0.05	0.03	0.06	0.05	0.055	0.02	32.8

다. 다양한 형태의 벌꿀 시료를 이용한 유효성 평가

- 제1세부과제로부터 양봉 30검체, 토종 28검체, 토종/양봉 혼합 2검체를 제공받아 제1협동과제에서 제작한 시제품을 통해 유효성 평가를 진행하였다. 양봉과 토종검체 측정결과에서 양봉 및 토종 선정은 측정 ratio 1을 기준으로 하였으며, 양봉검체 측정결과, 형광세기값이 1.83에서 4.65까지 측정되었고, 토종샘플에서는 1.02에서 7.68까지 측정되었다. 다만, 토종샘플에서 양봉과 확실하게 구분이 되지 않는 몇 개 샘플이 있어 이 부분은 추가 검증이 필요하다. 그리고 토종/양봉 샘플에서는 시제품으로 측정한 결과는 양봉샘플에 가까운 것으로 확인되었다.





#### 4) 제 2협동 과제

##### 가. 특이 올리고당의 인조꿀 지표물질로서 정밀분석과 간이검사 방법의 개발 절차

- 벌꿀에 혼입된 사탕무 설탕의 지표 물질로서 betaine의 분포 분석
  - Betaine은 사탕무에 다량 함유되고 있어 사탕무 설탕 제조 과정 중에 완전히 제거되지 않아 사탕무 설탕에 미량 남아 있다. 한편 벌꿀 내 betaine의 분포에 대한 연구가 제한적이지만 검출되지 않는 것으로 보고된 논문이 있다. 본 연구에서 아카시아꿀, 잡화꿀, 밤꿀, 사탕무 설탕 및 사탕무 설탕 사양 벌꿀 내 betaine의 분포를 조사하였다.
  - Betaine의 HPLC를 이용한 분석: 2mL 벌꿀 용액(약 10%, pH 3)을 Strata SCX SPE cartridge에 주입한 후 cartridge를 증류수와 methanol로 세척하고 5% ammonia (methanol)을 통과시켜 betaine을 함유한 시료를 추출하였다. 추출된 시료를 10% magnesium oxide와 100mM 4-bromophenyl triflate와 반응시켜 betaine 유도체를 합성하였다. Luna SCX HPLC column을 사용하여 분석하였으며 용출 용매로 5mM tetramethyl ammonium, 10mM glycolic acid, 7.5% water, 92.5% acetonitrile을 사용하였다.
  - SPE와 TLC를 이용한 betaine의 간이 분석 방법: 25% 밤꿀과 0.1% betaine을 함유한 수용액 7.5mL을 Strata X-C SPE cartridge에 주입한 후 증류수와 methanol로 세척하고 5% ammonia (methanol)을 betaine을 함유한 시료를 제조하여 TLC로 분석하였다. TLC에서 사용한 용매는 1-butanol-acetic acid-water (40:10:10)을 사용하였으며 아이오딘 증기에 24시간 동안 염색하였다.
- 벌꿀에 혼입된 사탕무 설탕의 지표 물질로서 raffinose의 분포 분석
  - Galactose oxidase를 이용한 raffinose의 분석: 벌꿀 (약 10%) 용액 1mL을 Envi-Carb SPE cartridge에 주입하고 증류수로 세척한 후 methanol-ethanol (3:1)을 통과시켜 raffinose를 함유한 시료를 용출하였다. 질소 가스로 농축건조된 시료에 0.9mL의 증류수에 용해하였다. 0.1mL의 phosphate 완충용액과 10 $\mu$ L의 galactosidase 용액을 가하여 30 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시킨 후 425nm에서 흡광도를 측정하였다.
- 벌꿀에 혼입된 고과당 시럽과 전화당 시럽의 지표 물질로서 difructose anhydride의 분석
  - 고과당 시럽과 전화당 시럽을 벌꿀의 증량제로서 첨가할 수 있다. 고과당 시럽과 전화당에는 difructose anhydride가 함유되어 있다고 보고되며 이는 효소 반응 또는 가열에 의해 발생할 수 있다.
  - 효모 처리와 TLC를 이용한 difructose anhydride의 간이 분석: 10g의 시료를 멸균 증류수에 용해하여 50mL로 만든다. 0.5g의 빵효모(Instant yeast, Societe Industrielle Lesaffre, France)를 가한다. 30 $^{\circ}$ C에서 1일, 2일, 3일 동안 150rpm에서 교반하면서 배양한다. 1 mL의 시료를 채취하여 7,000 $\times$ g에서 5분동안 원심분리하고 상등액을 채취하여 0.22 $\mu$ m cellulose acetate filter membrane에 여과하여 냉동 보관하였다. TLC는 silica gel plate에 1-butanol-ethanol-water (2:1:1)를 용매로 사용하여 전개하였으며  $\alpha$ -naphthol-sulfuric acid를 사용하여 발색하였다.
  - 효모 처리와 GC를 이용한 difructose anhydride의 분석: 효모 처리한 시료 150 $\mu$ L와 IS (0.5% phenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) 20 $\mu$ L를 가한 후 동결 건조하였다. 동결 건조된 시료에 1-(trimethylsilyl)imidazole 150 $\mu$ L과 pyridine 1mL을 가하고 80 $^{\circ}$ C에서 1 시간 가열하였다. Trimethylsilyl 당 유도체를 분석하기 위해 사용한 GC column은 ZB-5 (30m $\times$ 0.25mm $\times$ 0.25 $\mu$ m)이었으며 injector 온도는 260 $^{\circ}$ C이고 detector 온도는 300 $^{\circ}$ C이었다. Column oven 온도는



190℃에서 1분, 190℃에서 310℃까지 분당 5℃의 비율로 온도가 24분 동안 증가하고 310℃에서 15분 동안 유지하였다.

**나. 토종꿀과 양봉꿀의 특이 DNA를 판별할 수 있는 PCR 방법의 개발 절차**

- 양봉꿀과 토종꿀의 특이 primer의 염기서열 결정
  - 양봉꿀과 토종꿀의 특이 primer의 염기서열은 cytochrome C oxidase 유전자로부터 결정하였다. 토종벌(*Apis cerana*)와 양봉벌(*Apis mellifera*)의 mitochondria의 cytochrome oxidase subunit I 유전자의 염기서열은 Genebank의 DQ020245와 KJ396191을 참고로 조사하였다. 이 두 파일의 염기서열을 비교하여 토종꿀과 양봉꿀의 특이 primer의 염기서열을 아래 표 1과 같이 결정하였다.

표 1. 토종꿀과 양봉꿀의 특이적 검출을 PCR에서 사용한 primer의 염기 서열

검출 벌꿀	Primer	염기서열	DNA 크기 (bp)
양봉꿀	M2-F	3081-CATCACTTGAATGATTAATAATTTTTTACCA-3109	206
	M2-R	3286-TTATTTTTTAAATTAATATGAATTAAGTGGGG-3256	
양봉꿀	M5-F	3084-CACTTGAATGATTAATAATTTTTTACCACCT-3112	133
	M5-R	3216-CTTAAGTTCAATGCACTTATTCTGCC-3191	
토종꿀	C6-F	454-GGAGGGGGAGATCCAATTTA-474	178
	C5-R	621-ACCTAATATTGCGTAAATTATACCTAGATTT-591	

- 벌꿀 DNA의 추출
  - 10% 벌꿀 용액 50mL을 원심분리하여 얻은 침전물을 1mL의 TE 완충용액으로 2회 세척한 후 180μL TE 완충용액을 가한 후 20μL의 Chelex resin을 가한 후 100℃에서 가열 처리하여 원심분리하고 상등액(DNA 용액)을 채취하여 PCR 시료로서 사용하였다.
- PCR 시료 제조
  - Gold multiplex PCR kit (Bioneer)의 tube에 DNA 용액 1μL, 각 primer (10mM) 1μL를 가한 후 증류수를 가하여 20μL의 PCR 반응액을 만들었다. DNAEngine gradient cycler (Bio-Rad)를 사용하여 PCR 반응을 진행하였다.
- PCR 반응 조건
  - 양봉꿀과 토종꿀 검출하는 primer를 동시에 반응시키는 duplex PCR을 수행하였으며 반응조건은 94℃에서 5분간 가열한 후 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초를 35회 반복하여 반응하였으며 마지막으로 72℃에서 30분 반응하였다.
- 전기영동
  - PCR 반응액을 1× TAE 완충용액에 용해한 3% NuSieve 3:1 agarose gel을 사용하여 70V에서 전기영동하고 0.5mg/mL 용액에서 염색한 후 자외선을 비추어 사진을 촬영하였다.
- 면역 크로마토그래피 분석
  - 금 나노입자 분산액은 염화금을 탄산으로 환원하여 제조하였다. 금 나노입자 분산액 1mL과 streptavidine (SA) (0.5mg/mL) 60μL를 혼합하고 5% bovine serum albumin 100μL를 가하고 혼합하였다. 원심분리하여 상등액을 제거하고 5% BSA, 0.1% polyethyleneglycol 100μL를 가하여 금-SA conjugate를 제조하였다. 금-SA conjugate를 conjugate pad에 분사하여 흡착시키고 37℃에서 건조하였다. monoclonal anti-TAMRA 항체, rabbit anti-digoxigenin

antibody 및 rabbit anti-SA 항체를 각각 2개의 시험선과 1개의 시험선으로서 nitrocellulose filter에 흡착시키고 30℃에서 건조시켰다. 이 검사지를 플라스틱 시험 키트에 삽입하였다. PCR 반응용액 10μL와 PBST 90μL의 혼합액을 시험 키트의 시료 주입부에 가한 다음 5분 후에 금 나노입자 결합 밴드들 형성된 것을 확인하고 사진촬영하였다.

**다. 특이 올리고당의 인조꿀 지표물질로서 정밀분석과 간이검사 방법의 개발**

- 벌꿀에 혼입된 사탕무 설탕의 지표 물질로서 betaine과 raffinose의 분석
  - 미국, 프랑스, 일본에서 생산된 사탕무설탕 3제품과 사탕무설탕 사양꿀의 betaine과 raffinose의 함량을 조사하였다 (표 2). 사탕무설탕 3 제품 중에서 일본산 사탕무설탕이 betaine과 raffinose의 함량이 모두 가장 높았다. 사탕무설탕 사양꿀은 betaine 함량이 벌꿀 사양 원료로 사용한 프랑스산 사탕무설탕에 비해 45%이었으며 raffinose 함량은 83%에 도달하였다. 사탕무설탕 사양꿀의 수분 함량(20% 이상)과 사양 중 꽃꿀이 혼입되었을 것을 감안하면 raffinose 함량이 너무 높았다.

표 2. 사탕무설탕과 사탕무설탕사양꿀의 betaine과 raffinose의 함량

시료	Betaine (mg/kg)		Raffinose (mg/kg)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
사탕무설탕 (미국)	25	1	410	1
사탕무설탕 (프랑스)	27	4	470	16
사탕무설탕 (일본)	243	35	1,300	36
사탕무설탕 사양꿀	12	0	390	11

- 시중에서 구입한 아카시아꿀 17제품에 대한 betaine과 raffinose의 함량을 분석하였다 (표 3). 아카시아꿀의 betaine 함량은 0.4-5.2 mg/kg이고 raffinose 함량은 3-143 mg/kg이었다. Betaine 함량이 높은 시료 4와 시료 9는 또한 raffinose 함량이 높았으나 시료 14는 betaine 함량이 낮았음에도 raffinose 함량이 높았다.

표 3. 국산 아카시아꿀의 betaine과 raffinose의 함량

시료 번호	Betaine (mg/kg)		Raffinose (mg/kg)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
1	1.1	0.5	24	1
2	0.5	0.0	21	11
3	0.5	0.2	24	5
4	0.6	0.3	5	4
5	5.2	2.4	143	6
6	0.9	0.1	49	1
7	0.4	0.0	19	1
8	0.7	0.0	12	17
9	3.6	0.1	116	3
10	1.5	0.0	22	27
11	2.8	0.3	34	34
12	2.2	0.2	37	25
13	0.5	0.0	81	64
14	1.4	0.0	126	3
15	1.4	0.5	67	81
16	1.1	0.1	43	7
17	1.7	0.4	3	4

- 시중에서 구입한 잡화꿀 12제품에 대한 betaine과 raffinose의 함량을 분석하였다 (표 4). 아카시아꿀의 betaine 함량은 0.0-2.5 mg/kg이고 raffinose 함량은 120-1,400 mg/kg이었다. Betaine의 함량은 표1의 사탕무설탕 사양꿀 보다 낮았으나 raffinose 함량이 더 높은 시료가 4개 되었다. 따라서 잡화꿀의 경우에는 화밀로부터 raffinose가 유입되는 것으로 사료된다. 따라서 raffinose 함량으로부터 사탕무설탕의 혼입 여부를 알 수 없다.

표 4. 국산 잡화꿀의 betaine과 raffinose의 함량

시료 번호	Betaine (mg/kg)		Raffinose (mg/kg)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
1	0.6	0.2	120	93
2	1.7	0.2	220	14
3	0.1	0.2	120	33
4	0.1	0.1	350	160
5	1.0	0.2	1,400	270
6	2.5	0.4	420	230
7	1.2	0.0	330	160
8	1.7	0.4	330	45
9	1.7	1.0	150	36
10	1.0	0.5	550	230
11	2.0	0.2	530	130
12	0.0	0.0	130	35

- 시중에서 구입한 사양꿀 5제품에 대한 betaine과 raffinose의 함량을 분석하였다 (표 5). 사양꿀의 betaine 함량은 0.0-0.5 mg/kg이고 raffinose 함량은 0-20 mg/kg이었다. 시중에서 판매되는 사양꿀은 사탕수수 설탕으로 사양하여 채밀한 사양꿀임을 확인하였다.

표 5. 국산 사양꿀의 betaine과 raffinose의 함량

시료 번호	Betaine (mg/kg)		Raffinose (mg/kg)	
	평균	표준편차	평균	표준편차
1	0.0	0.0	0	0
2	0.5	0.1	19	1
3	0.2	0.2	0	0
4	0.0	0.0	20	11
5	0.3	0.4	20	11

- 이상의 결과에서 보면 아카시아꿀이 다수의 시료가 0-1mg/kg의 betaine 함량을 나타냈으며 일부 시료가 높은 betaine 함량 (3-5mg/kg)을 보이고 있었다. 잡화꿀도 다수의 시료가 0-1mg/kg의 betaine 함량을 보이고 있으며 1 시료가 2-3 mg/kg의 betaine 함량을 보였다. 사양꿀은 전체가 betaine의 함량이 0.5 mg/kg 이하이었다. 반면에 다수의 아카시아꿀의 raffinose 함량이 100mg/kg 이하이었으며 잡화꿀은 100mg/kg이었다. 일부 아카시아꿀이 100-150mg/kg의 raffinose 함량을 나타냈으며 betaine 함량 또한 높았다. 종합적으로 결론을 내리면, raffinose 분석은 아카시아꿀에 사탕무설탕의 혼입을 검출할 수 있는 방법인 반면에 betaine 분석은 아카시아꿀과 잡화꿀에 사탕무설탕 사양꿀의 혼입을 검출하는 적당한 방법으로 결론을 지었다.

표 6. 국산 밤꿀의 betaine의 함량

시료 번호	Betaine (mg/kg)	
	평균	표준편차
1	16.9	1.7
2	14.6	0.4
3	12.8	0.4
4	4.6	0.7
5	5.9	0.3
6	26.9	2.6
7	12.1	1.1
8	8.5	1.6
9	3.8	1.1
10	10.6	3.00

- 표 6에 기술한 바와 같이 국산 밤꿀 10개 시료의 betaine 함량은 다양하여 3.8~26.9mg/kg의 범위에 있었다. 특히 시료 6의 경우는 26.9mg/kg은 사탕무 설탕의 betaine 함량에 근접하였다. 한편으로는 시료 4, 5 및 6은 아카시아꿀에 근접하는 betaine 함량을 보였다. 이 실험 결과로부터 알 수 있는 것은 일부 밤꿀에 사탕무 설탕이 다량 혼입될 가능성을 보이고 있지만, 본 연구에서 사용한 betaine 분석 방법으로는 정상적인 밤꿀의 정확한 betaine 함량을 얻을 수 없어 확정적인 결론을 내리기가 불가능하였다. 국산 밤꿀에 혼입될 수 있는 사탕무 설탕을 검출하기 위해서는, 더 정확한 betaine 분석 방법을 개발하는 것이 필요하다.

● 벌꿀에 혼입된 사탕무 설탕의 지표 물질로서 betaine의 간이 검사 방법

- 밤꿀에 betaine을 0.25%의 농도로 첨가한 시료를 SPE로 추출한 시료를 TLC로 분석하여 간이검사 방법으로서 개발하고자 하였다 (Fig 1). 그러나 0.01%(100mg/kg) 이하의 betaine을 TLC로 검출할 수 없었다.



Fig 1. 밤꿀과 betaine 첨가 밤꿀의 TLC 분석  
A: betaine, B: 밤꿀, C: 0.25% betaine 첨가 밤꿀

● 벌꿀에 혼입된 고과당 시럽과 전화당 시럽의 지표 물질로서 difructose anhydride의 분석

1) 효모 처리와 TLC를 이용한 difructose anhydride의 간이 분석

- TLC에서 difructose anhydride는 fructose와 sucrose의 중간의 이동도를 가진다고 보고되었다. 벌꿀과 고과당시럽 및 전화당을 효모로 처리하여 시료에 높은 농도로 함유되어 있는 fructose, glucose 등의 효모가 발효할 수 있는 당류를 제거하고 가용성 당류를 제거하고 효모

가 이용하지 않는 difructose anhydride를 TLC로 검출하고자 한다.

- Fig 2에서 시판 고과당시럽 용액에 효모를 접종하여 1, 2, 3일 배양한 후 균체를 제거하고 얻은 상등액을 TLC로 분석하였다. 1일 배양액에는 fructose 등의 발효할 수 있는 당이 남아 있으나 3일 발효한 배양액에는 고과당시럽의 주성분인 fructose와 glucose가 완전히 제거되었음을 확인할 수 있었으며 fructose와 sucrose 보다 이동성이 약간 높은 당류 밴드와 함께 다수의 3당류 이상의 올리고당이 분포하였다. Sucrose 보다 이동성이 약간 높은 band가 difructose anhydride로 추정된다. 전화당 시럽에 유통되지 않아 설탕을 invertase로 분해하여 제조한 전화당 용액을 효모 처리한 후 TLC로 분석하였으나 difructose anhydride를 검출하지 못했다.

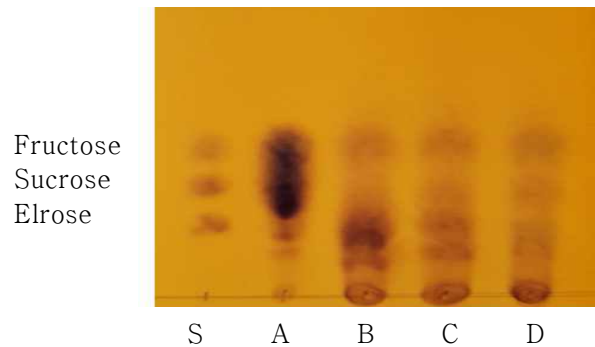


Fig 2. 효모 처리한 고과당시럽의 TLC ( S: 표준당, A: 0일, B: 1일, C: 2일, D: 3일)

- Fig 3에서는 아카시아꽃을 60~100℃에서 30분간 열처리한 후 효모를 접종하고 3일간 배양한 후 얻은 배양액의 상등액 시료를 TLC로 분석하였다. 가열 온도가 증가할수록 difructose anhydride로 추정되는 sucrose 보다 이동도가 높은 band가 생성되었으며 90℃와 100℃에서 뚜렷하게 보였다. 이 결과로부터 벌꿀의 가열에 의해서 difructose anhydride가 생성될 수 있음을 알 수 있었다.

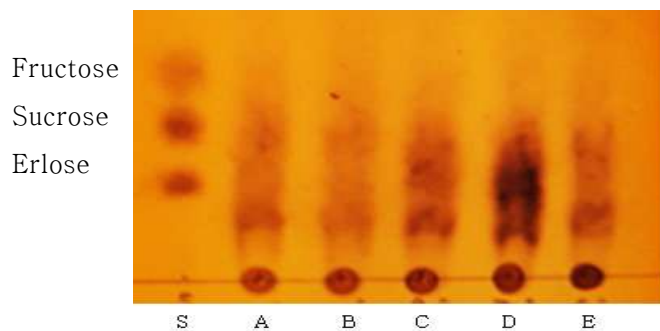


Fig 3. 60~100℃에서 열처리한 후 3일간 효모 배양한 아카시아꽃의 TLC  
(S: 표준당, A: 100℃, B: 90℃, C: 80℃, 70℃, E: 60℃)

## 2) 효모 처리와 GC를 이용한 difructose anhydride의 분석

- Difructose anhdride는 두 개의 fructose가 두 개의 글리코시드 결합에 의해 결합된 이당류의 일종이며 9종류가 있다. GC로 분석하면 sucrose 보다 일찍 칼럼에서 용출된다,

- Fig 4에서 difructose anhydride의 peak가 고과당시럽에서 5개 이상 검출되었으며 설탕과 invertase 처리 설탕에서 거의 검출되지 않았다. 60℃에서 가열처리한 아카시아꽃에서 difructose anhydride가 약하게 검출되었으며 100℃에서 가열한 아카시아꽃에서는 difructose anhydride가 강하게 검출되었다. 또한 고과당시럽과 100℃에서 가열한 아카시아꽃의 difructose anhydride의 peak의 형태가 비슷하였다. 따라서 고과당시럽이 함유한 difructose anhydride는 고과당시럽을 농축하기 위한 가열 공정에 의해 생성되는 것으로 사료된다.

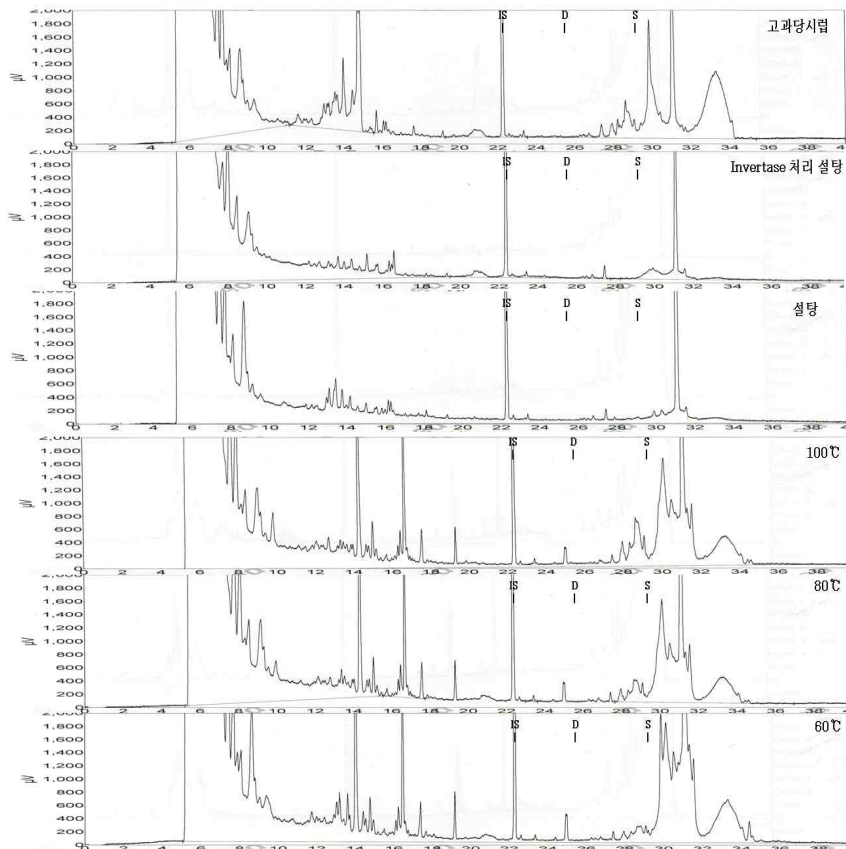


Fig 4. 효모 처리한 시료 (고과당시럽, 전화당 용액, 설탕, 가열처리한 아카시아꽃)의 GC 그림.

IS: Internal standard, D: DFAIII, S: sucrose.

#### 라. 토종꿀과 양봉꿀의 특이 DNA를 판별할 수 있는 PCR 방법의 개발

##### ● 양봉꿀 농도 별 duplex PCR 결과

- 토종꿀에 양봉꿀이 0%, 1%, 5%, 10%, 50%, 90%, 100% 혼합된 10% 벌꿀 용액으로부터 DNA를 추출하여 duplex PCR을 사용하여 조사하였다.

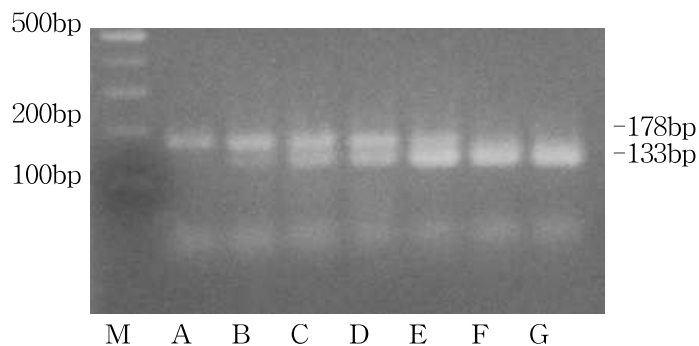


그림 2. 양봉꿀과 토종꿀이 혼합된 벌꿀에 대해 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M5F와 M5R의 양봉꿀 특이 primer를 사용한 PCR 반응. M: 100bp DNA ladder, A: 0%, B: 1%, C: 5%, D: 10%, E: 50%, F: 90%, G: 100%

- 그림 2에서 보는 바와 같이 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer는 토종꿀에서 178bp의 DNA가 합성되었으며 M5-F와 M5-R의 양봉꿀 특이 primer는 양봉꿀에서 133bp의 DNA가 합성되었다. 1% 양봉꿀을 함유하고 있는 토종꿀에서도 133bp DNA가 검출되었다.

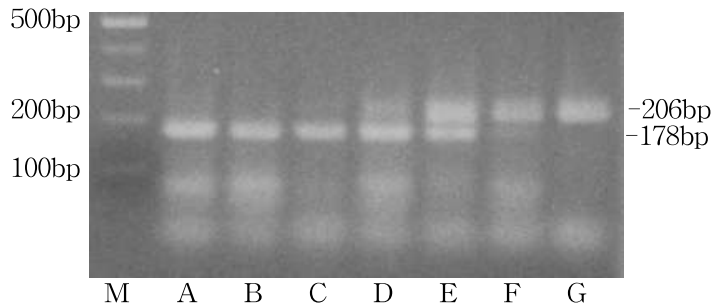


그림 3. 양봉꿀과 토종꿀이 혼합된 벌꿀에 대해 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M2F와 M2R의 양봉꿀 특이 primer를 사용한 PCR 반응. M: 100bp DNA ladder, A: 0%, B: 1%, C: 5%, D: 10%, E: 50%, F: 90%, G: 100%

● 시판 토종꿀의 PCR 분석에 의한 진위 여부 판별

- 그림 3에서 보는 바와 같이 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer는 토종꿀에서 178bp의 DNA가 합성되었으며 M2-F와 M2-R의 양봉꿀 특이 primer는 양봉꿀에서 206bp의 DNA가 합성되었다. 5% 양봉꿀을 함유하고 있는 토종꿀에서도 206bp DNA가 검출되었으나 1%에서는 검출되지 않았다.

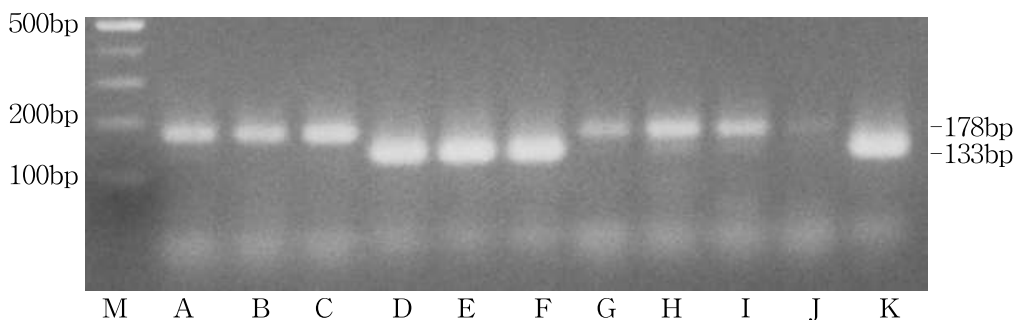


그림 4. 국내에서 수집한 토종꿀과 양봉꿀의 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M5F와 M5R의 양봉꿀 특이 primer를 사용한 PCR 반응의 agarose 전기영동. M: 100bp DNA ladder, A-J: 토종꿀 K: 양봉꿀

- 원주 지역에서 수집한 토종꿀(A-C), 인터넷을 통해 구입한 토종꿀(D-F), 강원도 기타 지역에서 수집한 토종꿀(G-J)와 양봉꿀(K)에서 DNA를 추출하여 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M5F와 M5R의 양봉꿀 특이 primer를 사용하여 PCR 반응을 하여 합성된 DNA를 agarose 전기영동으로 분석하였다 (그림 4). 토종꿀 시료 중에서 인터넷으로 구입한 토종꿀이 양봉꿀 특이 DNA (133bp)가 검출되었으며 토종꿀 특이 DNA는 검출되지 않았다.

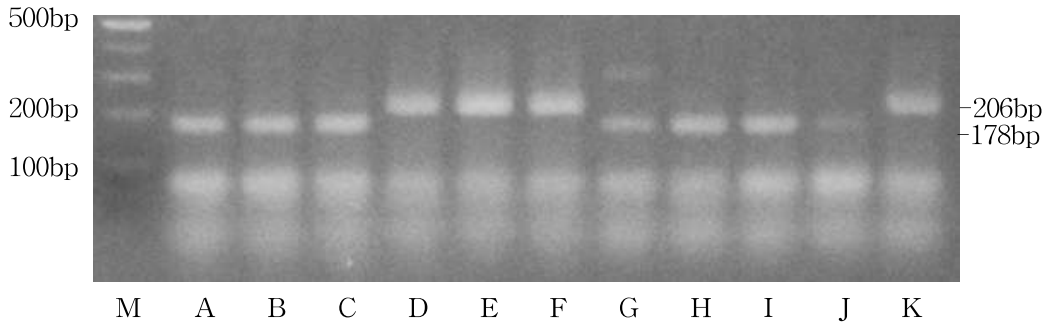


그림 5. 양봉꿀과 토종꿀이 혼합된 벌꿀에 대해 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M2F와 M2R의 양봉꿀 특이 primer를 사용한 PCR 반응의 agarose 전기영동. M: 100bp DNA ladder, A-J: 토종꿀, K: 양봉꿀

- 그림 4에서 사용한 동일한 양봉꿀과 토종꿀 시료에서 DNA를 추출하여 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M2F와 M2R의 양봉꿀 특이 primer를 사용하여 PCR 반응을 한 결과를 agarose 전기영동으로 분석하였다 (그림 5). 토종꿀 시료 중에서 인터넷으로 구입한 토종꿀이 양봉꿀 특이 DNA (206bp)가 검출되었으며 토종꿀 특이 DNA는 검출되지 않았다. 기타 다른 토종꿀은 토종꿀 특이 DNA (178bp)가 검출되었으며 양봉꿀은 양봉꿀 특이 DNA(206bp)가 검출되었다.
- 그림 4에서 사용한 동일한 양봉꿀과 토종꿀 시료에서 DNA를 추출하여 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M5F와 M5R의 양봉꿀 특이 primer를 사용하여 PCR 반응을 한 결과를 먼역크로마토그래피로 분석하였다. (그림 6). 토종꿀 시료 중에서 인터넷으로 구입한 토종꿀이 양봉꿀로서 검출되었다.

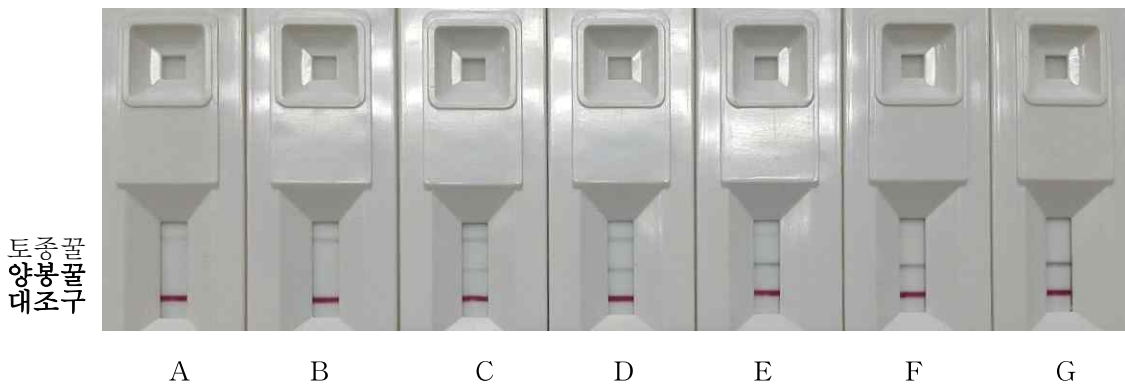


그림 6. 국내에서 수집한 토종꿀의 C-6F와 C-5R의 토종꿀 특이 primer와 M5F와 M5R의 양봉꿀 특이 primer를 사용한 PCR 반응의 먼역크로마토그래피 시험. M: 100bp DNA ladder, A-G: 토종꿀



### 3-4. 연구개발 성과

#### (1) 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주 저자명	호	페이지	SCI 여부	게재일
1	Detection of Korean native honey and European honey by using duplex polymerase chain rection and immunochromatograohic assay	Korean Journal for Food Science of Animal Resource	최석호	37	599-605	SCIE	2017.8
2	The monoclonal antibody for discrimination of natural honey against artificial honey	Jounal of the Science of Food and Agriculture	이득찬		Submissi on	SCI	투고일 2018.1. 2
3	Discrimination of sugar feeding honey and natural honey	Food Chemistry	이해익		투고준비 중	SCI	
4	Development and application the monoclonal antibody for finding out the origin of honey by immunological method	Food Research International	이득찬		투고준비 중	SCI	

#### (2) 국내 및 국제 학술회의 발표

No	학술회의 명칭	제목	발표자	발표일시	국내/국제학회
1	2015년 제30차 한국양봉학회 춘계학술대회	면역학적 방법에 의한 꿀의 판별	이득찬, 이해익	2015년3월16일	국내학회
2	44th APIMONDIA international Apicultural Congress	Immunological discrimination of honey by honey major protein	김희웅, 이해익, 이득찬	2015년9월16일	국제학회
3	2016년 제31차 한국양봉학회 춘계학술대회	단일클론 항체를 이용한 면역학적 꿀 판별법	이득찬, 이해익	2016년3월24일	국내학회
4	2017년 제32차 한국양봉학회 춘계학술대회	꿀벌기원의 MRJP 특이적 단클론 항체 개발 및 이용	조태리, 이해익, 이득찬	2017년4월13일	국내학회
5	2017년 제32차 한국양봉학회 춘계학술대회	양봉꿀과 토종꿀의 판별을 위한 단일클론항체 개발	조태리, 이해익, 이득찬	2017년4월13일	국내학회
6	The International Conference of KoSFA and 49th Annual Meeting	Detection of Korean native honey and European honey by using duplex polymerase chain rection and immunochromatograohic	김창규, 최석호	2017년5월18일	국제학회

		assay		
--	--	-------	--	--

(3) 생명자원(생물자원)

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	Honey T	KCLRF-BP-00371	한국세포주은행	2016
2	Honey Y	KCLRF-BP-00372	한국세포주은행	2016
3	Honey TY	KCLRF-BP-00373	한국세포주은행	2016

(4) 지식재산권 (특허)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	벌꿀 구별용 단클론 항체 및 이를 이용한 벌꿀 구별 방법 및 그 조성물	대한민국	이득찬 이해익	2016.09. 20	10-2016-0 119917				100
2	가짜 벌꿀 구별용 단클론 항체 및 이를 이용한 벌꿀 구별 방법 및 그 조성물	대한민국	이득찬 이해익	2016.09. 20	10-2016-0 119918				100
3	서양꿀벌과 동양꿀벌의 판별 방법 및 프라이머 세트, 그 진단 키트	대한민국	최석호 김창규 이득찬	2017.	10-2017-0 108010				100

(5) 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	인력양성	1차년도		3	2		4	1						5
2	인력양성	2차년도		3	4		3	4						7
3	인력양성	3차년도		7	5		6	6						12
합계				13	11		13	11						24

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

4-1. 목표달성도																			
(1) 최종 성과 목표																			
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 제1세부과제: 토종 및 양봉꿀 판별 기술 개발           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 토종 및 양봉꿀 단클론 항체 3개 개발: 3개의 단클론 항체 개발 완성(생물자원 3건 등록, 특허 2건 출원, 논문 1편 투고, 논문 1편 준비중)</li> <li>- 단클론 항체 정제 및 특성 분석(3종): 3개 단클론 항체 정제 및 3개 항체의 특성 분석 완료</li> <li>- 단클론 항체 ELISA법 개발 및 시제품 제작 (1종)</li> <li>- 벌꿀 가공품의 분류기준안 제안(1종): 제안서 1종 개발 완료</li> </ul> </li> <li>● 제2세부과제: 사양꿀 및 인조꿀의 판별 기술 개발           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사양꿀 특이성분 분리 및 정제 (1개 성분이상): TLC 밴드의 특이성분 분리 정제 완료(논문 1건 준비중)</li> <li>- 사양꿀 특이성분 구조 결정 (1개 이상): 분리 정제된 성분을 TLC-MS interface, HPLC, IR, HRMS, NMR, X-Ray구조 결정 후 후보물질 동정</li> <li>- 사양꿀 및 인조꿀 미량 분석 기술 개발(1종): TLC 방법에 의한 분석기술법 개발 완료</li> <li>- 벌꿀시료의 탄소동위원소비 측정 매뉴얼 표준화: 측정 기관별 탄소동위원소비 측정 완료 후 측정 오차범위 등에 따른 측정 매뉴얼 작성 완료</li> </ul> </li> <li>● 제1협동과제: 벌꿀 판별 키트 양상 체계 구축           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 벌꿀 형태별 단클론항체 고정화: 정제 항체(3개)별 반응성 검토 완료</li> <li>- 벌꿀 형태별 측정 조건 검토 (5포인트 이상): 고점도 벌꿀의 희석 배수 별, 형광 conjugator의 농도에 따른 반응 조건 검토 완료</li> <li>- 동시검사를 위한 3-line 적용: 벌꿀 동시 검사를 위한 3-line 적용을 위한 설계 완성 및 적용평가와 반응성 확인.</li> <li>- 벌꿀 판별 키트 개발(1종): 벌꿀 판별 키트 시제품 제작 및 현장 활용 매뉴얼 개발 완료(시제품 1종 제작)</li> </ul> </li> <li>● 제2협동과제: 탄수화물 및 유전자 기원 특이성분의 벌꿀 판별 지표물질 개발           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사탕무설탕 특이 올리고당의 정밀분석과 간이검사법 개발: Envi-Carb SPE cartridge (Supelclean)을 이용하여 벌꿀 raffinose를 추출 방법 개발 완료</li> <li>- 토종꿀과 양봉꿀의 특이 DNA 판별법 개발(PCR 반응 조건 결정): 양봉꿀과 토종꿀 특이 프라이머의 염기 서열을 결정하였고, PCR 반응 조건을 설정하였으며, 이로 인해 실제 수집시료인 토종꿀과 양봉꿀 분별이 가능하였음(특허 1건 출원, 논문 1편 게재)</li> </ul> </li> </ul>																			
성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증		학술성과		교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치	논문		학술발표	정책활용			홍보전시		
											SCI	비SCI							

최종목표	3	2		1		2				1	4		2		24		1	7**
1차년도	목표														8			
	실적												2	1	5			
2차년도	목표	1											1		8			
	실적	2											1		7			
3차년도	목표	2									2		1		8			3
	실적	1				2					1		3		12			3
소계	목표	3				2					2		2	-	24			3
	실적	3				2					1		6	1	24			3
달성율	100					100					50		300	초과	100			100
종료 1차년도				1						1							1	1
종료 2차년도											2							2
종료 3차년도		2																1
종료 4차년도																		
종료 5차년도																		
소계		2		1						1	2						1	4

\*\* RFP의 최종성과물의 보고서 및 매뉴얼

- 3차년도 3건: 신속 판별 기술이 적용된 키트형 시제품 및 누구나 간편하고 정확하게 검사할 수 있는 현장 활용 매뉴얼 1부, 탄소 동위원소 측정 표준화 매뉴얼 1부, 미량 성분분석 매뉴얼 1부
- 종료 1차년도 1건: 개발 기술의 현장 보급 확산을 위한 관련 연구 보고서 1부
- 종료 2차년도 2건: 개발 시제품 대상, 사용현장에서 실증시험을 통한 문제점 보완 및 성능평가 보고서 1부, 해외 벌꿀과 비교한 국산 토종꿀 우수성 검증 보고서 1부
- 종료 3차년도 1건: 관련기관, 업체대상 개발제품, 매뉴얼 활용 성과 보고서 1부

(2) 연도별 연구개발목표 및 평가 착안점

● 1차년도

구분	세부연구개발 목표	가중치(%)	평가의 착안점 및 기준
1세부과제	토종 및 양봉 꿀 특이적 단클론 항체 개발	40	- 벌꿀의 수집 및 성분분석 (100개 이상) - 토종 및 양봉 꿀 주요단백질 분리 정제 (단일)

			단백질 확인) - 토종 및 양봉꿀 공동 인식의 단클론 항체 2개 이상 개발 - 벌꿀 가공품에 대한 해외사례 조사 및 분석 (1개국)
2세부과제	사양 꿀 및 인조 꿀의 특이성분 분석	30	- 사양꿀 특이성분 분리방법 개선 (30%) - 사탕무 기원 사양꿀 수집 (1점 이상) - 벌꿀시료의 탄소동위원소비 반복 측정 (5개 시료 5반복)
1협동과제	벌꿀 감별을 위한 신속 검사 카트리지가 설계 및 시약 개발	15	- 표준시료의 구축 및 검증 (5포인트 이상 검증) - Sample pad별 시료처리 능력 검토 (5포인트 이상 검증) - 고점도 벌꿀 시료 처리 방법 (5포인트 이상)
2협동과제	Betaine의 분포 분석 및 벌꿀 판별을 위한 PCR 법 개발	15	- HPLC를 이용한 벌꿀의 특이성분 분석 (벌꿀 5종 이상) - PCR 반응을 위한 DNA 추출 방법 구축(70% 이상)

● 2차년도

구분	세부연구개발 목표	가중치(%)	평가의 착안점 및 기준
1세부	단클론 항체를 이용한 ELISA 분석법 개발	40	- 토종 및 양봉꿀 단클론 항체 각 2개 이상 개발 - 단클론 항체 정제 및 특성 분석 (2종) - 단클론 항체 ELISA법 개발(1종) - 벌꿀 가공품의 국내시장 조사 및 분석 (5종 이상)
2세부	사양 꿀 및 인조 꿀(가짜 꿀) 특이 성분의 분리 정제 및 구조 규명	35	- 사양꿀 특이성분 분리 및 정제 (1개 성분 이상) - 사양꿀 특이성분 구조 결정 (1개 이상) - 기관별 벌꿀시료의 탄소동위원소비 반복 측정 (3개 기관 이상)
1협동	벌꿀 감별을 위한 단클론항체 적용 및 기초평가	15	- 벌꿀 형태별 단클론항체 고정화 (2개) - 벌꿀 형태별 측정 조건 검토 (5포인트 이상) - 동시검사를 위한 3-line 적용 (5개 이상 시료의 검증)
2협동	벌꿀 당의 정밀분석 방법 및 벌꿀 판별을 위한 PCR 법 개발	10	- raffinose와 theandrose의 분석 (2가지 방법 이상) - 벌꿀의 PCR 반응 조건 결정 (80% 이상)

● 3차년도

구분	세부연구개발 목표	가중치(%)	평가의 착안점 및 기준
1세부	인조꿀, 토종꿀 및 양봉꿀 판별을 위한 ELISA 분석법의 표준화	30	- 인조, 토종, 양봉 꿀 ELISA 분석법의 적용에 의한 판별 여부 (1건) - 단클론 항체 ELISA분석법 표준화 (1종) 및 시제품제작 (1건)

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- 수집한 벌꿀의 ELISA 분석법에 의한 전수조사 및 분석 결과 (100 종이상)</li> <li>- 벌꿀 성분 분석 자료의 통계적 비교 (1건)</li> <li>- 벌꿀 가공품 규격화안 마련 (1건)</li> </ul>
2세부	사양 꿀 및 인조 꿀(가짜 꿀) 특이 성분의 분석 방법 표준화	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 사양 꿀 특이 성분의 미량 분석 기술 개발 및 표준화 (1건)</li> <li>- 국내외 꿀의 methylglyoxal 함량 (25개 이상)</li> <li>- 탄소 동위원소비 측정결과 보정화 및 표준화안 개발 (1건)</li> </ul>
1협동	벌꿀 진위 판별 카트리리지 시제품 제작 및 유효성 평가	30	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 벌꿀감별용 신속검사 카트리리지 시제품 제작 (1건)</li> <li>- 수집한 벌꿀의 키트분석에 의한 전수조사 및 분석 결과 (100 종이상)</li> </ul>
2협동	Difuctose anhydride의 간이검사 방법 및 Dual PCR 방법에 의한 양봉꿀과 토종꿀 판별법 개발	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 전화당과 이성화당 내 difuctose anhydride의 간이검사 방법 개발 (SPE와 TLC의 재료와 조건 결정 1건)</li> <li>- 벌꿀의 PCR 반응 조건 결정 (1건)</li> </ul>

#### 4-2. 관련분야 기여도

- 본 연구에 의해 개발된 토종꿀과 양봉꿀을 공통으로 인식하는 항체 1종, 토종꿀만을 특이적으로 인식하는 항체 1종, 양봉꿀만을 특이적으로 인식하는 항체 1종은 단클론 항체로서 현재까지 세계적으로 개발된 바가 없음.
- 따라서 개발된 항체는 토종꿀과 양봉꿀, 인조꿀 판별할 수 있는 키트에 이용할 수 있음. 이에 의해 꿀에 대한 소비자의 신뢰도를 회복시킴으로써 양봉 산업의 발전을 기대할 수 있음
- 또한 본 과제에서 개발된 사양꿀과 꽃꿀 판별법은 탄소동위원소비 측정법의 맹점을 보완할 수 있는 방법으로 이후 꽃꿀의 신뢰성을 회복하므로서 꿀의 수요를 확대하고 양봉농가의 소득증대에 기여할 것으로 판단됨

## 5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<p><b>(1) 연구개발결과물</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 인조꿀(가짜꿀), 토종꿀, 양봉꿀을 신속 정확하게 판별할 수 있는 판별법 개발</li> <li>● 현장맞춤형 인조꿀, 토종꿀 및 양봉꿀 판별 키트의 개발</li> <li>● 현장맞춤형 키트의 양산체제 구축</li> <li>● 사양꿀의 특이성분 분석법 개발로 꽃꿀 진위 여부 판별 가능</li> <li>● 품질 인증을 위한 기초자료 제공</li> </ul> <p><b>(2) 연구개발결과물 활용</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 기술적 측면           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 인조꿀과 토종꿀, 양봉꿀의 판별이 가능해 짐: 양질의 벌꿀 품질 인증</li> <li>- 판별 키트의 양산 체계가 구축됨: 품질 인증 기관에서 사용가능하며, 식품공전상의 꽃꿀을 양봉꿀과 토종꿀로 구분하여 등재하는 작업 진행 가능</li> <li>- 꽃꿀과 사양꿀의 판별이 가능해 짐: 양질의 벌꿀 품질 인증</li> </ul> </li> <li>● 경제 산업적 측면           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발된 판별법에 의해 꿀에 대한 소비자의 신뢰도를 회복시킴으로써 양봉 산업의 발전</li> <li>- 각 지방에서 생산되는 벌꿀의 토산품 개발의 필요성에 따라 양질의 벌꿀 품질인증</li> <li>- 꽃꿀의 신뢰성을 회복하므로써 꿀의 수요 확대에 의한 양봉농가의 소득증대</li> <li>- 각종 꿀 관련 가공품 제조의 활성화</li> </ul> </li> </ul>		

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<p>- 해당사항 없음</p>		

## 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09									
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">보안등급 분류</th> <th style="width: 40%;">보안</th> <th style="width: 40%;">일반</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td style="text-align: center;">0</td> </tr> <tr> <td><b>결정 사유</b></td> <td colspan="2">“ 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음”</td> </tr> </tbody> </table>			보안등급 분류	보안	일반			0	<b>결정 사유</b>	“ 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음”	
보안등급 분류	보안	일반									
		0									
<b>결정 사유</b>	“ 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음”										

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)		

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>1. 연구실 안전점검(연안법 제8조)</p> <p>가. 연구실 안전점검</p> <p>1) 개요 : 연구실 내 잠재되어 있는 위험요소의 발견과 개선대책의 수립</p> <p>2) 실시시기 : 2013.05 - 2013.06</p> <p>3) 점검대상 : 이공계대학 소속 연구·실험실</p> <p>4) 실시방법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구실 안전점검 전문기관에 용역 의뢰</li> <li>- 산업위생, 화공, 기계, 전기, 소방 각 분야별 전문가 투입, 점검 실시</li> </ul> <p>5) 점검내용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연안법 제7조에서 정한 사항의 점검</li> <li>- 연구실 실내 공기질(VOC, CO, CO<sub>2</sub>, DUST 등) 측정</li> </ul> <p>나. 일상점검</p> <p>1) 개요 : 연구활동종사자가 연구개발활동 시작 전 연구실 안전상태를 점검</p> <p>2) 실시시기 : 매일</p> <p>3) 점검대상 : 이공계대학 소속 연구·실험실</p> <p>4) 실시방법</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구활동종사자가 연구실의 상태에 대하여 육안점검 실시</li> <li>- 점검결과를 안전점검 일지에 기록 보관(2년간)</li> </ul> <p>5) 점검내용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구에 활용되는 실험기자재 및 실험재료의 이상유무, 보호구 점검</li> </ul> <p>2. 교육·훈련(연안법 제18조)</p>		



가. 개요 : 연구실 안전관리에 관한 정보를 연구활동종사자에게 제공

나. 교육방법

1) 자체 안전교육 실시요청

- 교육구분 : 신규 채용에 따른 교육·훈련
- 교육방법
  - 시설관리과에서 제작·배부하는 교재 배부
  - 책임교수 주도 하 안전교육 실시
  - 자체교육결과를 안전교육대장에 기록하여 보관
- 교육대상 : 신규채용 등에 따른 교육·훈련 대상자

2) 온라인 안전교육 실시

- 교육구분 : 정기 교육·훈련
- 교육방법
  - 강원대학교 연구실 안전정보시스템에 안전교육 콘텐츠 탑재하여 학기별 6시간의 교육과정 제공
  - 연구활동종사자는 연간 12시간의 온라인 교육 이수하여야 함
- 교육대상 : 연구실에 소속된 상시 연구활동종사자(대학생, 대학원생, 연구원)

3) 집합식 안전교육

- 교육구분 : 정기 교육·훈련
- 교육방법
  - 연구실 안전교육 전문기관에 용역 의뢰하여 전문 안전교육 실시
- 교육대상
  - 신규 채용 등에 따른 교육·훈련, 정기 교육·훈련 미이수자
  - 대학원생, 연구원 등 고위험·고난이도의 연구를 수행하는 연구활동 종사자

참고) 법정 교육이수 시간

구 분	교육대상	교육시간
신규 채용 등에 따른 교육·훈련	신규채용된 연구활동종사자 (계약직 포함)	8시간 이상
	신규 연구개발활동에 참가하는 연구활동종사자 (대학생·대학원생 등)	2시간 이상
정기 교육·훈련	연구활동종사자	반기별 6시간 이상
특별안전 교육·훈련	중대 사고 발생 및 연구내용 변경 등 필요성이 인정되는 연구활동종사자	2시간 이상

3. 건강검진(연안법 제18조)

- 가. 개요 : 연구활동종사자의 건강상태 확인 및 건강증진에 기여  
 나. 실시시기 : 2013.10 중  
 다. 대상 : 화학약품을 취급하거나 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자  
 라. 검진내용 : 일반건강검진

일반검진 항목(기본검사)

1. 검진상담료	7. HDL콜레스테롤
2. 흉부방사선검사	8. 트리글리세라이드
3. 요단백	9. AST(SGOT)
4. 혈색소	10. ALT(SGPT)
5. 식전혈당	11. 감마지피티
6. 총콜레스테롤	12. 혈청크레아티닌

4. 연구활동종사자 보험(연안법 제14조)

가. 개요 : 연구활동종사자가 연구개발활동(교과과정 포함)중에 발생한 사고로 인한 부상·질병·신체장해·사망 등 생명 및 신체상의 손해를 보상하는 보험

나. 보험명 : 연구활동종사자 보험

다. 보장기간

- 2012.06.08 ~ 2013.06.08(보험기간 만료 후 1년 단위 재계약)

라. 가입대상

- 강원대학교 춘천캠퍼스 연구활동종사자
- 국적, 소속, 전공, 신분, 연령 등과 관계없이 본교가 인정하는 연구 활동종사자

마 . 보 상 범 위

구 분	지 급 사 유	보 장 한 도
사 망	사망·질병 사망·치료 중 사망	1억원
후유장해	교육과학기술부장관이 최근 고시한 『연구실사고에 대한 보상기준』 이상 지급	1억원
부 상	교육과학기술부장관이 최근 고시한 『연구실사고에 대한 보상기준』 이상 지급	1천만원

※ 1인당 보상금액이며, 사고인원수 또는 사고발생수에 제한을 두지 않음

5. 기타 연구실에서 실행 가능한 안전조치 사항

- 안전보건표지 부착(산업안전보건법 참조)
- 연구수행에 필요한 안전보호구 확보
- 연구실 실정에 맞는 안전수칙 마련
- 연구실 안전확보를 위한 정기회의 개최 및 결과 기록 보관
- 물질안전보건자료(MSDS) 비치 및 관련 교육 실시
- 고압가스 및 화학약품, 실험폐기물 안전 취급·보관 대책 마련 등

### 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	벌꿀 구별용 단클론 항체 및 이를 이용한 벌꿀 구별 방법 및 그 조성물	강원대학교	발명자	대한민국		2016.09.20	단독사사	
2	특허	가짜 벌꿀 구별용 단클론 항체 및 이를 이용한 벌꿀 구별 방법 및 그 조성물	강원대학교	발명자	대한민국		2016.09.20	단독사사	
3	특허	서양꿀벌과 동양꿀벌의 관별 방법 및 프라이머 세트, 그 진단 키트	상지대학교	발명자	대한민국		2017	단독사사	
4	논문	Detection of Korean native honey and European honey by using duplex polymerase chain rection and immunochromatographic assay	상지대학교	교신 저자	Korean Journal for Food Science of Animal Resource		2017.08.31	단독사사	SCIE
5	논문	The monoclonal antibody for discrimination of natural honey against artificial honey	강원대학교	교신 저자	Journal of the Science of Food and Agriculture		Submission	단독사사	SCI

### 11. 기타사항

코드번호	D-13

## 12. 참고문헌

코드번호	D-14
<ol style="list-style-type: none"><li data-bbox="188 416 1031 450">1. 식품 공전 제5 식품별 기준 및 규격, 29 기타식품류, 29-7 벌꿀류</li><li data-bbox="188 512 1434 640">2. Sanz, M. L., Polemis, N., Morales, V., Corzo, N., Drakoularakou, A., Gibson, G. R., et al. In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>, 53(8), 2914 - 2921 (2005).</li><li data-bbox="188 703 1434 786">3. Frankel, S., Robinson, G. E., &amp; Berenbaum, M. R. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. <i>Journal of Apicultural Research</i>, 37(1), 27 - 31 (1998).</li><li data-bbox="188 848 1434 931">4. Weston, R. J., &amp; Brocklebank, L. K. The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. <i>Food Chemistry</i>, 64, 33 - 37. (1999).</li><li data-bbox="188 994 1434 1122">5. Wang, X. H., Andrae, L., &amp; Engeseth, N. J. Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>, 50(23), 6923 - 6928 (2002).</li><li data-bbox="188 1184 1434 1267">6. Abdel-Aal ESM, Ziena HM and Youssef MM, Adulteration of honey with high fructose corn syrup detection by different methods. <i>Food Chem</i> 48, 209-212 (1993).</li><li data-bbox="188 1330 1434 1413">7. Marshall T and Williams KM, Electrophoresis of honey characterization of a complex biological matrix by silver staining. <i>Anal Biochem</i> 167, 301-303 (1987).</li><li data-bbox="188 1476 1434 1559">8. Low NH and Sporns P, Analysis and quantitation of minor disaccharides and trisaccharides in honey, using capillary gas chromatography. <i>Food sci</i> 53, 558-561 (1988).</li><li data-bbox="188 1621 1434 1704">9. Low NH and South W, Determination of honey authenticity by capillary gas chromatography <i>AOAC Int</i> 78, 1210-1218 (1995).</li><li data-bbox="188 1767 1434 1850">10. Low NH, Food authenticity analysis by anion-exchange liquid chromatography. <i>Am Lab</i> 28, M35 (1996).</li><li data-bbox="188 1912 1434 1995">11. White JW and Winters K, Honey protein as internal standard for stable carbon isotope ratio detection of adulteration of honey. <i>Assoc off Anal Chem</i> 72, 907-911 (1989).</li></ol>	

12. White JW, Winters J, Martin P and Rossmann A, Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. *AOAC Int* 81, 610-619 (1998).
13. Low NH, Brisbane T, Bigam G and Sporns P, C-13 nuclear magnetic resonance for the qualitative and quantitative analysis of structurally similar disaccharides. *Agric Food Chem* 36, 953-957 (1988).
14. Calvin, M., & Bassham, J. A. *The photosynthesis of carbon compound*. New York : Benjamin (1962).
15. Hatch, M., & Slack, C. R. Further studies on a new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in sugar cane and its occurrence in other plant species. *Biochemical Journal* 102, 417-422 (1967).
16. Hatch, M. D., Slack, C. R. Photosynthetic CO<sub>2</sub> Fixation pathway. *Annual Review of Plant Physiology*, 21, 141-162 (1979).
17. G.J. Padovan, D. De Jung, L.P. Rodrigues, J.S. Marchini. Detection of adulteration of commercial honey sample by the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotopic ratio. *Food Chemistry* 82, 633-636 (2003).
18. 한국양봉협회. 식약청 - 천연벌꿀, 사양벌꿀과 구분 판매실시 - 식약청, 벌꿀자율표시제 시범. 양봉협회보 346, 18-19 (2009).
19. J. AMUTHA ISWARYA DEVI, A. KOTTAI MUTHU. Gas chromatography mass spectrometry analysis of bioactive constituents in the ethanolic extract of *saccharum spontaneum* linn. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 6 suppl 2 (2014)
20. 세계농업 2014년 v. 167
21. 한국양봉협회 2014년