

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
농생명산업기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003712-01

한봉 산업 육성을 위한 토종꿀의 특성 및 기능 분석연구

2021. 11. 04.

주관연구기관 / 서울대학교
협동연구기관 / 경기대학교

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

최종보고서							보안등급					
							일반[○], 보안[]					
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	사업명	농생명산업기술개발사업						
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원				내역사업명	생명자원 부가가치제고						
공고번호	-			총괄연구개발 식별번호		318093-03-1-CG000						
				연구개발과제번호		318093-3						
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB03	50%	LB1805	30%	LB1708	20%					
	농림식품과학기술 분류	RA0306	50%	PA0204	25%	PA0105	25%					
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	한봉 산업 육성을 위한 토종꿀의 특성 및 기능 분석연구										
	영문	Study on characteristics and functional analysis of <i>Apis cerana</i> honey for developing the beekeeping industry in Korea										
연구개발과제명	국문	재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석										
	국문	토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정										
	국문	소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시										
주관연구개발기관	기관명	서울대학교산학협력단			사업자등록번호	119-82-03684						
	주소	(08826)서울특별시 관악구 신림동 산 56-1 서울대학교 농업생명과학대학 200동 6102호			법인등록번호	114371-0009224						
연구책임자	성명		이승환		직위	교수						
	연락처	직장전화	-		휴대전화	-						
		전자우편	-		국가연구자번호	-						
연구개발기간	전체		2018. 11. 20 - 2021. 08. 19 (2년 9개월)									
	1단계		2018. 11. 20 - 2021. 08. 19 (2년 9개월)									
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발비 외 지원금		
		현금	현금	현물	지방자치단체	기타()		현금	현물		합계	
	총계	814,000	-	-	-	-	-	814,000	-	814,000	-	
	1단계	1년차	222,000	-	-	-	-	-	222,000	-	222,000	-
		2년차	296,000	-	-	-	-	-	296,000	-	296,000	-
3년차	296,000	-	-	-	-	-	296,000	-	296,000	-		
공동연구개발기관	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편		비고					
	공동연구개발기관	서울대학교	이승환	교수	-	-	공동	대학				
		경기대학교	윤병수	교수	-	-	공동	대학				
		서울대학교	문정훈	교수	-	-	공동	대학				
위탁연구개발기관	주식회사 커넥서스 컴퍼니	윤성영	대표	-	-	위탁	대학					
연구개발기관 외 기관	-	-	-	-	-	-	-	-				
	-	-	-	-	-	-	-	-				
연구개발담당자 실무담당자	성명		임가운		직위	-						
	연락처	직장전화	-		휴대전화	-						
		전자우편	-		국가연구자번호	-						

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2021년 11월 04일
연구책임자: 서울대학교 산학협력단 이승환 (인)

주관연구개발기관의 장: 서울대학교 산학협력단장 최해천 (직인)
공동연구개발기관의 장: 서울대학교 산학협력단장 최해천 (직인)
공동연구개발기관의 장: 경기대학교 산학협력단장 윤여강 (직인)
위탁연구개발기관의 장: 주식회사 커넥서스컴퍼니 대표 윤성영 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2021년 11월 04일
연구책임자: 서울대학교 산학협력단 이승환 (인)

주관연구개발기관의 장: 서울대학교 산학협력단장 최해천 (직인)
공동연구개발기관의 장: 서울대학교 산학협력단장 최해천 (직인)
공동연구개발기관의 장: 경기대학교 산학협력단장 윤여강 (직인)
위탁연구개발기관의 장: 주식회사 커넥서스컴퍼니 대표 윤성영 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	농생명산업기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	-		
내역사업명 (해당 시 작성)	-			연구개발과제번호	318093-3		
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0307 곤충 생명공학	60%	LB0305 곤충 분류/동정/생태	20%	LB2001 농림수산식품 경영/경 제	20%
	농림식품 과학기술분류	PA0204 영양·기능성 평가	50%	PA0201 기능성식품 및 소재	25%	PA0104 식품저장·유통	25%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	한봉 산업 육성을 위한 토종꿀의 특성 및 기능 분석연구						
연구개발과제명	재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석						
	토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정						
	소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시						
전체 연구개발기간	2018. 11. 20. ~ 2021. 8. 19.						
총 연구개발비	총 814,000 천원 (정부지원연구개발비: 814,000천원)						
연구개발단계	기초[0] 응용[] 개발[] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)	착수시점 기준() 종료시점 목표()		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)	-						
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)	-						
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	지역별 생산된 토종꿀의 성분 및 기능성을 분석하고, 이를 바탕으로 고 품질 토종꿀브랜드의 생산 및 관리체계를 설정하는 연구를 수행하여 국내 한봉산업의 경쟁력과 토종꿀의 부가가치 제고					
	전체 내용	<p>□ 주관 제1세부(서울대학교 이승환) : 재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 생육(발육 단계, 계절별 봉군 변동 등) 비교 분석 ○ 재래꿀벌의 채밀 행동(일주활동, 밀원식물 선호성) 비교 연구 ○ 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 및 개화기에 대한 현장 조사를 통한 연중 밀원식물 연계성 모델 연구 <p>□ 제1협동(경기대학교 윤병수) : 토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 토종꿀 주산지별 생산된 토종꿀의 성분 및 특성을 분석 ○ 지역별 생산된 토종꿀의 기능성 분석 ○ 지역별 기능성 성분을 포함한 토종꿀 품질관리 기술 개발 ○ 토종꿀의 품질을 체계적으로 관리하기 위한 필수 요소와 개개의 관리 방법 및 향후 인증 시 필요한 요건과 세부 방법 제시 <p>□ 제2세부(서울대학교 문정훈) : 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 토종꿀을 둘러싼 내외부 환경분석 ○ 토종꿀 브랜드 아이덴티티 수립 및 홍보마케팅 전략 방향성 제시 ○ 토종꿀 상품화 및 브랜드 운영 전략 제시 					

□ 정량적 성과

○ 특허출원 : 3건

- ① 토종꿀에서 어피니티 컬럼을 이용한 잔류 유전자 분리방법
- ② 한봉화밀 상표 출원
- ③ 천밀야화 상표 출원

한봉화밀 상표 출원	천밀야화 상표 출원
	

○ 기술이전 : 2건

- ① 스토리텔링 개발을 위한 토종꿀 특성 발굴 노하우: (주)커넥서스컴퍼니 기술이전
- ② 스토리텔링 개발을 위한 토종꿀 특성 발굴 노하우

○ 제품화 : 4건

<p>명인명촌 토종꿀 진육고</p> 	<p>프롬 자연 토종꿀 2020</p> 
<p>프롬 자연 토종꿀 2021</p> 	<p>프롬 자연토종꿀 2021-토종꿀 600g 단품</p> 

○ 학술논문 : 한국양봉학회등 9건

○ 학술발표 : 한국양봉학회등 17건

○ 교육지도 : 3건

- ① 교육명 : 꿀벌의 다양성
- ② 교육명 : 어떻게 먹어야 할 것인가? 지속가능한 미래를 위해

	<p>③ 교육명 : 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시</p> <p>○ 인력양성 : 7건</p> <p>① 석사 : 3명 인력양성</p> <p>② 박사 : 4명 인력양성</p> <p>○ 정책활용 : 2건</p> <p>① 토종꿀 특성에 기반한 상품기획 및 마케팅 전략 제안</p> <p>② 소비자 신뢰도 제고를 위한 토종꿀 품질인증방법 제안</p> <p>○ 홍보전시 : 9건</p> <p>① [문정훈의 맛있는 혁신] 들꽃의 魂, 토종벌의 비상을 위해</p> <p>② 위잉위잉 토종벌과 토종꿀 (1): 토종벌이란 무엇?</p> <p>③ 위잉위잉 토종벌과 토종꿀 (2): 토종꿀이란 무엇일까요?</p> <p>④ 토종꿀_각 지역의 들꽃들이 녹아있는 진한 금빛의 향연</p> <p>⑤ 양봉산업 미래, 토착 밀원식물에 있다</p> <p>⑥ 까다롭게 먹읍시다.- (9) 토종꿀의 달콤한 부활</p> <p>⑦ [더 테이블] 1년에 딱 한번의 달콤함, 토종꿀</p> <p>⑧ 믿고 먹는 토종꿀을 만들기 위해 생산자, 연구자, 마케터가 뭉쳤다.</p> <p>⑨ [전문가의 눈] 꿀벌의 공익적 가치와 '양봉직불제'</p> <p>□ 정성적 성과</p> <p>○ 주관 제1세부(서울대학교 이승환) : 재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석</p> <p>① 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 생육, 채밀 등과 관련된 3가지 관점(생활사, 채밀력, 채밀활동)에서의 차이점 제시</p> <p>② 주요 밀원식물(주밀원, 보조밀원, 화분원 등)의 지역별 개화 시기 파악</p> <p>③ 재래꿀벌 선호 밀원식물의 계절연계성 모델 제시(제1연구대상지(인제군 한계리): 52종, 제2연구대상지(가평군 목동리): 38종)</p> <p>④ 주요(중부지역) 한봉단지의 정밀 밀원식생도 사례 제작</p> <p>○ 제1협동(경기대학교 윤병수) : 토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정</p> <p>① 토종꿀과 사양꿀에서의 사탕무 및 사탕수수 고유 유전자 분리법 개발</p> <p>② 고유 유전자에 의한 사양꿀 판별 유전자 검사법 개발</p> <p>③ 주밀원의 화분 유전자에 의한 토종꿀 지역별 특성 규명</p> <p>④ 시판중인 토종꿀에 유전자 검사법의 적용</p> <p>⑤ 국산 토종꿀의 등급별 기준 설정</p> <p>○ 제2세부(서울대학교 문정훈) : 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시</p> <p>① 토종꿀 브랜드 아이덴티티 기반 상품화 프로세스 수립</p> <p>② 소비자 선호에 기반한 토종꿀 상품화 전략 수립 및 상품 개발 (위탁과제)</p> <p>③ 지역성을 강조한 프리미엄 토종꿀 가공품 개발</p> <p>④ 식재료의 본질에 기반한 브랜드 운영 전략 도출</p> <p>⑤ 소비자 신뢰도 제고를 위한 토종꿀 품질인증방법 제시</p>
<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<p>① 지역별 밀원단지 조성을 위한 우수 밀원 자원 확보방안 제안</p> <p>② 양봉 및 밀원림 직불제 등 정책제안</p> <p>③ 국내 밀원자원 정밀 분석을 위한 밀원식생도 제작 국책사업 제안</p> <p>④ 토종꿀 브랜드의 운영 계획 수립 및 토종꿀만의 가치를 담은 브랜드 개발</p> <p>⑤ 우수한 토종꿀 품질 평가 기술로 고급브랜드화 유도 및 관리체계 구축</p> <p>⑥ 토종꿀의 표준화 지표 설정을 통한 고급 브랜드 관리 기술 제공</p> <p>⑦ 국내 토종꿀의 표준화로 생산자 및 소비자의 인식 개선</p> <p>⑧ 국산 토종꿀의 신뢰성 확보로 농가 및 소비자 보호</p> <p>⑨ 국내 양봉계의 고품질 토종꿀의 생산 및 농가 소득 제고</p>

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	-											
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	9	3	1	-	-	-	-	생명 정보	생물 자원		-	정보
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설·장비명	규격(모델명)	수량	구입 연월일	구입가격(천원)	구입처(전화)	비고(설치장소)	ZEUS 등록번호			
	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
국문핵심어 (5개 이내)	재래꿀벌		토종꿀		특성		밀원식물		토종꿀브랜드			
영문핵심어 (5개 이내)	<i>Apis cerana</i>		<i>Apis cerana</i> honey		Characteristics		Honey plants		Honey Brands			

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “한봉 산업 육성을 위한 토종꿀의 특성 및 기능 분석연구

”(개발기간 : 2018. 11. 20 ~ 2021. 08. 19)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 11. 04.

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 최해천 (인)

협동연구기관명 : 경기대학교 산학협력단 윤여강 (인)

참여기관명 : 주식회사 커넥서스컴퍼니 윤성영 (인)

주관연구책임자 : 서울대학교 이승환

협동연구책임자 : 경기대학교 윤병수

세부연구책임자 : 서울대학교 문정훈

참여기관책임자 : 주식회사 커넥서스컴퍼니 윤성영

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	10
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	17
가. 연차별 연구개발 목표 및 수행내용	17
1) 주관 제1세부	17
2) 제1협동	18
3) 제2세부	19
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	20
가. 정성적 연구개발성과	20
1) 재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석	20
2) 토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정	155
3) 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시	268
나. 정량적 연구개발성과	281
4. 목표 미달 시 원인분석	289
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	291
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	293
7. 별첨 자료	294

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발 목표

1) 연구개발의 개요

벌꿀은 무한한 잠재력과 경제적 가치가 우수한 양봉산물 중 하나로 약용, 공업용, 화장품 원료 등 다양한 고부가가치 소재로 사용하고 있으며 인류가 오래전부터 애용한 천연건강식품이다. 국제연합농업식량기구(FAO)의 1993-2013년 사이 벌꿀 생산량 통계를 보면 세계적으로 약 7,300만군의 꿀벌이 160만톤 정도의 벌꿀을 생산하고 있다.

국내 한봉산업은 동양종꿀벌(Asian honeybee, Oriental honeybee) 또는 토종꿀벌이라고 불리는 재래꿀벌(*Apis cerana*)을 이용하며, 국내에서는 8아종 중, 공격성이 낮고 사양에 유리한 *A. cerana cerana*를 삼국시대인 기원전 37~19년경에 도입하여 토종꿀 생산에 이용해왔다(Oh et al., 2016). 1990년대 초에는 약 28,000여 가구에서 300,000만군의 재래꿀벌이 사양되었다(그림 1).

반면, 양봉꿀벌(*Apis mellifera*)을 이용하는 양봉산업은 1900년도 초에 국내에 도입되었지만, 1970년대 후반부터 사양이 늘어남에 따라 봉군수가 증가하여 2014년 기준 19,903농가, 1,800,000봉군의 규모(농림축산식품부, 2015)로 성장했다. 그리고 2012년 기준 연간 양봉꿀벌에 의한 벌꿀 생산량은 26,629톤으로 약 2,300억원(통계청, 2010)에 달하는 수입을 창출하는 중요한 농가수입원이 되었다.



그림 1. 국내 양봉꿀벌(*Apis mellifera*)과 재래꿀벌(*Apis cerana*) 양봉농가수(왼쪽)와 봉군수(오른쪽) 비교 (농림축산식품부, 2015; FAOstat, 2016; Oh et al., 2016)

양봉꿀벌의 국내도입으로 한봉은 산업비중이 상대적으로 감소하였고, 2009년 이후 재래꿀벌의 급격한 개체군 쇠퇴를 유발한 낭충봉아부패병(KSBV, Korea Sacbrood Virus)의 대발생으로 인하여 한봉농가는 큰 위기를 맞았다. 그 결과, 2012년 기준 재래꿀벌은 약 28,000여 가구, 300,000만군에서 4,000여 가구, 149,172군으로 규모가 급격히 감소했으며, 꿀 생산량 또한 줄어 전체 벌꿀생산량인 26,927톤 중 토종꿀은 298톤(1.1%)으로 양봉꿀벌의 생산량과 격차가 매우 커진 상황이다(표 1).

표 1. 국내 양봉꿀벌(*Apis mellifera*)과 재래꿀벌(*Apis cerana*)의 벌꿀 생산량

연도	2000	2002	2004	2006	2008	2009	2010	2011	2012	2013
양봉꿀벌	-	-	-	-	26,327	22,272	23,982	20,936	26,629	-
재래꿀벌	-	-	-	-	1,256	756	345	202	298	-
계	17,741	20,000	15,651	22,939	27,583	23,028	24,327	21,138	26,927	25,000

(농림축산식품부, 2015; FAOstat, 2016; Oh et al., 2016)

재래꿀벌은 비록 양봉꿀벌보다 활력이 낮고, 벌꿀 생산량이 적지만 시중에서 판매되는 토종꿀은 1되(2.4kg)에 40~50만원으로, 1되에 4~5만원에 거래되는 양봉꿀에 비해 약 10배가 높은 경제적 가치를 지닌다. 기온 등의 환경적 요소에 대한 적응능력이 뛰어나며, 꿀벌 기생성 응애, 미국부저병(American foulbrood) 등 특정 병해충에 대한 저항력이 우수하다. 그 때문에, 인도, 태국, 베트남, 네팔 등 동남아시아뿐만 아니라 우리나라를 포함한 중국, 일본 등 동아시아 지역에서도 넓게 이용되고 있다(Oh et al., 2016). 무엇보다도 재래꿀벌은 20세기 초 국내 도입이 시작된 양봉꿀벌보다 훨씬 긴 2,000년 이상의 역사를 가지는 하나의 전통 또는 문화유산으로, 이를 보존, 계승해야 할 가치를 가지고 있다(Jung, 2014).

국내 관계기관은 2010년 이후, 피해 대책으로 낭충봉아부패병 방역지침을 마련하였고, 제 2종 가축전염병으로 지정하여 긴급 방역 조치체계를 구축했다. 또한, 낭충봉아부패병의 진단법이나 이산화염소를 이용한 치료제 개발 등의 연구를 진행하는 등 재래꿀벌을 복원시키기 위한 노력이 지속되고 있다.

현재 토종꿀은 농도가 진하고, 면역력 증진에 효과가 있으며, 피부염, 위염, 궤양 등 다양한 병에 효능이 있다고 알려져 있어 식품뿐만이 아니라 건강 보조식품으로도 많이 이용되어 왔다(Oh et al., 2016).

하지만, 아직, 국내 유통되는 토종꿀에 대해서 양봉꿀벌에 의해 생산되는 벌꿀과 비교한 토종꿀 고유의 특성에 대한 연구가 부족함은 물론, 각 지역별/시기별로 생산되는 토종꿀의 성분과 품질의 표준화가 되어 있지 않아, 고품질 그리고 가성비를 중요하게 생각하는 소비자들의 눈높이를 맞추기에는 부족한 부분들이 많아, 토종꿀에 대한 소비자들의 지속적인 호감을 사기에는 부족한 면들이 많다.

한편, 대부분 전통적인 방법으로 소규모 농가에 의해 생산되는 토종꿀의 특성상 국내 한봉 산업은 영세하고 낙후된 시장구조에 머물러 있을 뿐만 아니라, 토종꿀, 양봉꿀, 사양꿀의 차이를 육안으로 구별하기 어렵다는 점을 이용하여 일부 “설탕꿀” 또는 “가짜토종꿀”과 같은 비양심적인 생산 및 판매로 벌꿀에 대한 소비자의 불신은 토종꿀이 제 가치를 평가받지 못하는 원인이 되고 있다.

이와는 상대적으로 양봉 선진국인 뉴질랜드에서는 마누카꿀을 국가 브랜드화 하였고, UMF(Unique Manuka Factor), MGO(Methylglyoxal), NPA(Non-Peroxide Activity), TA(Total Activity level) 등과 같이 자국산 벌꿀의 고유 특성을 과학적 데이터를 바탕으로 표준화하고, 그 기능성에 대한 평가를 적극적으로 홍보하여 전 세계 소비자들의 긍정적 평가를 받고 있고, 이는 마누카꿀의 높은 가격에도 불구하고 국제 경쟁력을 높여 전 세계로 수출할 수 있는 기반을 갖추었다(그림 2, 3).

즉, 국내 소비자들이 갖고 있는 기존의 토종꿀에 대한 고착화된 이미지에 대한 개선이 필요한 시점이며 인식의 확대와 이미지 개선은 국내 토종꿀 생산자의 수익 개선과 밀접한 관련이 있다. 특히, 토종꿀벌과 사양꿀벌의 차이에 대한 정확한 정보가 부재하여, 소비 측면에서 토종꿀 자체에 대한 이해와 이미지 향상이 동시에 이루어져야 한다. 차별화 요인이 브랜드 아이덴티티에 반영되어야 토종꿀 생산자의 경쟁력 제고에 기여할 수 있다.

이와 같이, 상대적으로 높은 가격의 토종꿀이 국내외적으로 지속적 경쟁력을 갖추기 위해서는, 마누카꿀의 예와 같이 과학적 연구결과를 바탕으로 한 성분과 품질에 대한 생산물의 표준화, 함유 성분의 기능성 평가, 그리고 지역별 생산물의 브랜드화를 통해 소비자들의 긍정적 관심을 끌 수 있는 홍보전략의 개발 등이 절실한 실정이다.



그림 2. 마누카꿀 상품의 표식

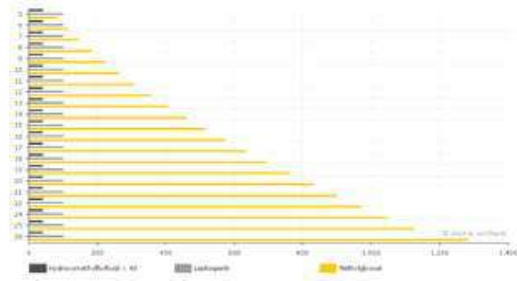


그림 3. 메틸글리옥살 함유량에 따른 UMF 구분

따라서 본 연구의 목표는(그림 4) 국내 사육되고 있는 재래꿀벌의 생육특성, 방화 / 채밀 행동의 특성 등을 양봉꿀벌과 비교하여 재래꿀벌의 생물학적 특성 및 수밀 능력 등을 비교 평가하고, 토종꿀이 주로 생산되는 지역의 밀원식물의 식재 현황, 지역별 / 계절별 밀원 식물의 개화기, 연중 연계성 등을 파악하여 지역별 주요 밀원식물(주밀원식물 4종이상, 보조밀원 5종이상, 주요 화분원 5종 이상)에 대한 밀원식물의 계절연계성 모델을 제시하며, 한국한봉협회에서 선정한 지역별(주산지별 2~3개소) 토종꿀의 성분 및 특성을 분석하고, 토종꿀 주요 생산자 단체와 긴밀한 협의를 통하여 연구를 진행하고, 각 지역별 주요 밀원식물과 연계된 지역특산 토종꿀의 성분특성을 표준화하여 지역브랜드화를 위한 지표를 설정하고, 지역별 표준화된 토종꿀의 기능성에 대한 기초 data를 구축하고, 토종꿀의 지역별 품질을 유지관리하기 위한 필수 요소와 품질 관리 기술을 개발하며, 토종꿀의 핵심 아이덴티티를 수립하기 앞서서 토종꿀의 위치를 정치적, 문화적, 사회문화적, 인구통계적 등 다각적인 관점에서 분석하여 장기적인 관점에서 토종꿀의 시장 포지셔닝을 계획하고, 토종꿀의 핵심 아이덴티티를 직관적이고 쉽게 인지 및 식별할 수 있는 브랜드 네임, 로고, 심볼 등의 개발하여 브랜드 1식을 출원함과 동시에, 그 고유의 가치가 시장에서 혼재되지 않도록 체계적인 브랜드 전략(홍보마케팅 전략, 상품화 전략 등)을 수립하고자 하였다.



그림 4. 연구개발 대상의 기본 모식도

2) 연구개발 대상의 국내·외 현황

가) 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

양봉꿀벌이 생산한 벌꿀에 대한 생리활성 구명 및 구성성분 분리에 대한 연구(아까시나무 꿀의 에틸아세테이트 추출물로부터 헬리코박터 필로리균에 대해 항균활성을 나타내는 생리활성 물질인 아브시스산 분리(김세건 등, 2016)/ 국내 벌꿀을 이용한 멜라닌 생성 억제 활성 구명(한상미 등, 2010)은 진행되었지만, 토종꿀을 대상으로 한 기능성연구는 이루어지지 않았다. 천연벌꿀에 대한 품질평가는 식품의약품안전처 ‘식품공전’에 수분(20%이하), 산도(40이하), 전화당(60%이상), 자당(7%이하), HMF(80 mg/kg이하), 이성화당(음성) 분석 등을 사용하며, 사양꿀은 주로 C12 및 C13의 탄소동위원소비율을 사용하여 판별이 이루어지고 있다. 이와 같은 품질평가를 위한 분석법이 토종꿀에도 적용될 수 있는지에 대한 연구가 필요하다. 기존에 국내 재래꿀벌의 사육에는 피나무, 버드나무 등의 속을 깎아 만든 재래식 벌통이 이용되었다. 그러나, 21세기로 들어서며 재래꿀벌의 크기와 생태에 맞는 개량형 벌통이 개발되어 주로 이용되고 있다 (Oh et al., 2016).

2018년 들어 농촌진흥청에서 토종벌에 대한 낭충봉아부패병 저항성 계통의 신품종을 개발하였으며, 생존 일수 및 일벌 출현율 등에서 큰 개선을 보여주었다. 해당 품종은 시범적으로 일부 농가에 도입되고 있다. 재래꿀벌과 양봉꿀벌 간 외부형태적 형질변이비교(Lee & Choi, 1986), 염색체비교(Yim & Jang, 1990), 미토콘드리아 DNA비교(Kim et al., 2009) 등에 관한 연구는 수행되었지만, 두 종간에 나타나는 생육에 관한 차이연구는 부재한 실정이다. 국내에서는 양봉꿀벌을 대상으로 아까시나무 꽃의 유밀기간 중 벌통의 증체량을 측정하고 이를 봉군의 수밀능력으로 산정하여 우수계통을 선발하는 연구가 수행되었다(Lee et al., 2005; Lee et al., 2014). 하지만, 재래꿀벌을 대상으로 한 수밀력 연구는 이루어지지 않았으며, 두 종간 수밀력 차이를 비교분석한 연구 또한 전무하다.

국내 밀원식물에 관한 연구는 Choi (1973)가 230여종의 밀원을 기록함으로써 시작되었으며, 이후 Lee (1996)는 198종, Paik (2000)는 200종, Ryu (2003)는 555종의 밀원을 정리하여 제시하였다. 가장 최근에는 Ryu (2007)에 의해 565종의 밀원식물이 정리되었다. 하지만, 각 밀원에 대한 실질적인 꿀벌의 선호성에 대한 평가는 거의 이루어지지 않았다.

2015년~2017년에 농림축산식품부에서 보고된 “고정식 양봉을 위한 복합밀원단지 조성 기술 개발”에서는 시기별 밀원이나 화분원으로써 이용가치가 높은 밀원식물 20종(초본: 8종, 목본: 12종)을 선정하여 시기별 밀원식물 연계도를 작성하였다. 하지만, 이는 주로 양봉꿀벌의 선호성에 기준을 두어 제시된 자료로, 재래꿀벌이 주요밀원식물에서 나타내는 채밀 특성 및 선호도에 대한 연구가 추가적으로 이뤄져야할 시점에 있다.

(2) 시장현황

국내 양봉산업(벌꿀, 프로폴리스, 화분, 로열젤리, 봉독 등)의 생산액 규모는 총 4256억원으로 추산되었다(한국양봉협회, 2015). 국내 꿀 생산량은 2013년 24,600톤으로 전체 봉산물의 97.8%에 해당하며, 생산액은 전체 봉산물의 약 65%에 해당하는 2,737억 원을 차지하는 것으로 나타났다(한국양봉협회, 2013). 2013년 국내 꿀 자급률은 97.2%에 달하며, 2005년 이후 95%이상의 수준을 유지하고 있다(한국양봉협회, 2013). 천연벌꿀은 한-베트남 FTA 품목으로 선정되어, 관세율이 단계적으로 낮아질 계획에 있으며, 베트남산 꿀 가격은 국산 꿀의 10% 수준에 불과하기에 국내 양봉산업에 큰 위협이 될 수 있다는 우려가 있다(연합뉴스, 2015). 더불어 대외정책연구원의 ‘한-베트남 FTA 영향평가’에 따르면 15년간 우리나라의 벌꿀생산 감소액은 663억원에 달할 것으로 추정했다. 실제로 베트남의 주력 수출 꿀인 아까시나무꿀 및 고무나무꿀의 수출단가가 1kg당 2.7달러로, 국내 동일 품목의 1/10에 해당하는 가격이다(농촌진흥청, 2015).

국내 꿀 소비현황을 살펴보면, 대형마트, 기업형 슈퍼 등의 대형 소매점에서의 구매행동이 점차 줄고 있으며, 전통시장, 로컬푸드매장, 온라인 등의 소형 소매점을 통한 직거래 비율이 늘고 있다(농촌진흥청 소비자패널 1146가구 자료, 2018). (그림 6)



그림 6. 꿀 구매 장소별 구매액 추이

나) 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

Anklam (1998)은 벌꿀에 포함된 아미노산, 단백질, 아로마화합물, 당, 효소활성, 발효물질, 플라보노이드, 유기산, 페놀화합물, 화분 등을 통해 벌꿀의 밀원을 판별하는 분석법을 제시하였다. 벌꿀의 주성분인 과당, 포도당, 수분함량을 분석하는 방법으로 Near-Infrared (NIR) transfectance spectroscopy방법이 이용되었다(García-Alvarez et al., 2000). 벌꿀 성분 분석에 대한 관심이 높아지자 physicochemical parameters를 이용한 분석 연구가 이어졌다(Felsner et al., 2004). 또한, multiple linear regression analysis과 같이 벌꿀 성분 분석을 위한 보다 발전된 방법이 제시되었다. X-ray 형광분석법(fluorescence spectroscopy)을 통해 슬로베니아 벌꿀에서 16가지의 성분이 검출되었으며, 아까시나무, 라임, 밤, 가문비나무, 전나무, 감로 등 밀원에 따라 화학적 성분구성이 다르게 나타나는 것이 확인되었다(Golob et al., 2005).

벌꿀의 미네랄 분석에는 F-AAS (Flame atomic absorption spectroscopy)와 ICP-OES (Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry)방법이 이용되는 것으로 나타났다. 이를 통해 화밀과 감로꿀이 구분가능하다는 것이 밝혀졌다(Lachman et al., 2007).

루마니아에서는 화학계량학적 분석법(chemometric analysis)에 의해 자국에서 생산된 벌꿀이 3가지 화학적 형태를 띠며 구분되는 것을 확인하였다(Purcarea et al., 2016).

외국에서는 식물체에 잔류한 농약 등이 봉산물에 유입될 경우의 위험성을 인지하고 이에 관련한 연구가 계속되고 있으며(Woo & Cha, 1997; Cernansky, 2017; Ruiz-Toledo et al., 2018), 이를 통해 꿀 등의 봉산물에 대한 식품 안정성 및 품질을 높이고 있다.

사우디아라비아에서는 고유종인 *Apis mellifera jementica*와 유입종인 *Apis mellifera carnica*에 대한 생식력, 개체군변동, 채밀활동 등에 대한 생육 및 채밀 특성에 관한 연구를 수행하였다. 그 결과, 같은 조건에서 토착종인 *Apis mellifera jementica*가 더 높은 생식력, 개체군 증가율, 채밀력을 나타내 유입종 보다 우수함을 규명하였다(Ali, 2011).

독일에서는 자국 내 길러지고 있는 *Apis mellifera* 계통을 대상으로, 여왕벌과 일벌의 발육 기간을 측정하는 연구를 수행하여 생육특성을 제시하였다(Rembold & Kremer, 1980). 또한, 나이지리아에서는 해당지역의 고유 자생종인 *Apis mellifera adansonii*에 대한 발육실험을 진행하여 수벌, 여왕벌, 일벌과 같은 각 단계별 기간을 측정하여 생활사를 제시하였다(Malaka & Amund, 2011).

카메룬에서는 *Syzygium guineense*에 나타나는 *Apis mellifera adansonii*의 방문빈도를 측정함으로써 주요 밀원에 대한 방화특성 관한 연구를 수행하였다(Denis et al., 2011).

국내 양봉시장이 아까시나무, 싸리, 밤나무, 피나무 등 국내에 자생하는 식물에 의존하여 봉산물을 얻는 데 반해, 미국 등의 국가는 자생 식물 외에도 아보카도꿀, 블루베리꿀, 알파파꿀 등 작물에서 얻을 수 있는 꿀을 개발하여 상품의 다양성을 높였다(Woo & Cha, 1997).

태국에서는 *Apis cerana*를 이용한 양봉에 코코넛 목재를 쓰는 등의 고전적인 방법을 이용하는 경우가 많으며, 태국 북부는 양봉꿀벌의 성공적인 도입으로 *Apis cerana*를 키우는 농가가 많이 없다(Wongsiri et al., 2000). 아시아권의 국가들 상당수가 *Apis cerana* 사육 시 고전적인 벌통을 이용하여, 환경별 편차가 나타난다.

(2) 시장현황

2016년 기준 꿀 생산액이 가장 많은 나라는 중국이며, 그 뒤를 터키, 이란, 미국, 러시아, 인도 등이 잇고 있다(FAO, 2017) (그림 8)

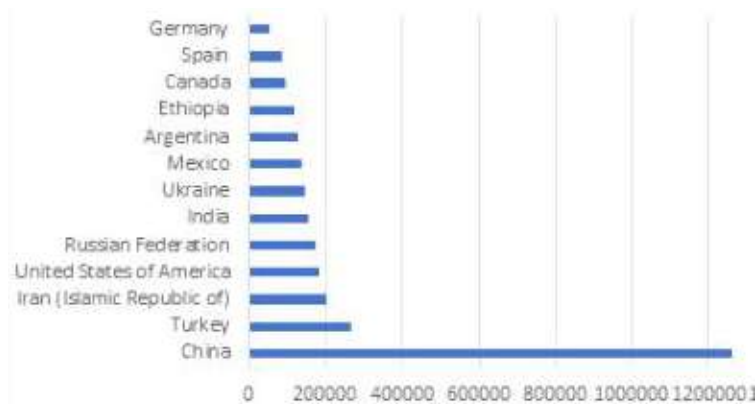


그림 8. 2016년 국가별 꿀 생산액 (단위: 1,000 Int. \$)

한편, 꿀 소비량의 경우 2018년 기준 중앙아프리카 공화국이 가장 많으며 (9.62g/1인)이며, 다음으로 뉴질랜드 (5.55g/1인), 슬로베니아(4.4g/1인) 순으로 나타났다(World Atlas, 2018). (그림 9)

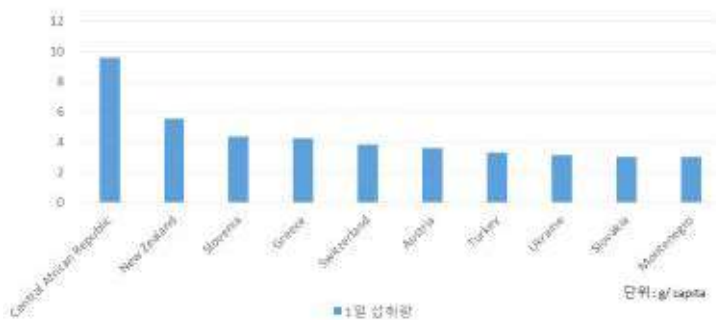


그림 9. 2018년 국가별 1인당 하루 평균 꿀 섭취량

3) 최종목표

지역별 생산된 토종꿀의 특성 조사와 기능 분석을 통한 토종꿀의 경쟁력과 부가가치 증대

가) 정량적 목표

- (1) 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 생육, 채밀 등과 관련된 3가지 관점(생활사, 채밀력, 채밀활동)의 차이점 제시
- (2) 주요 토종꿀 생산지에서의 주요밀원 5종 이상을 포함한 계절별 밀원식물 연계성 제시

- (3) 한국한봉협회와 토종꿀 주요 생산자와 긴밀한 협의를 통해 연구를 진행하고, 지역선정(한국양봉협회 주도) 및 생산된 토종꿀의 성분(주 대상 성분 3종) 결과 제시
- (4) 표준화된 토종꿀의 기능성(3종 이상)에 대한 기능성 분석결과 제시
- (5) 표준화된 토종꿀 브랜드의 품질관리기준(관리요소 3종 이상) 제안
- (6) 성공적인 토종꿀 브랜드화를 위하여 내외부 환경분석 연구결과 1식을 제시하고, 이를 바탕으로 주산지 특성을 반영한 토종꿀 아이덴티티 수립을 통해 토종꿀 브랜드 1건 등록 및 3건 출원 (이 중 1건은 사업 종료 1년차에 출원)
- (7) 2차년도에 수립한 토종꿀 아이덴티티를 바탕으로 상품화 및 브랜드 운영모델에 대한 연구결과 1식 제시
- (8) 특허출원 6건, 특허등록 1건, 기술실시(이전) 1건, 제품화 3건, 학술논문 5건, 학술발표 5건, 교육지도 5건, 인력양성 6명, 정책제안 1건, 홍보전시 7건 등

4) 세부목표

- 가) 주관 제1세부(서울대학교 이승환): 재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원 식물 구성 분석
- 나) 제1협동(경기대학교 윤병수): 토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정
- 다) 제2세부(서울대학교 문정훈): 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시
 - (1) 주요기능
 - (가) 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 생육, 채밀 등 비교를 통한 재래꿀벌의 차별화된 특성제시
 - (나) 지역별 토종꿀의 특성화를 위한 주요 토종꿀 생산지의 계절별 밀원식물 연계성 파악
 - (다) 토종꿀 품질평가 기준 및 품질관리시스템 구축
 - (라) 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시
 - (2) 주요 성능치
 - (가) 지역별 및 시기별 주요 밀원 목본 3수종, 초본 3수종 이상 선발
 - (나) 토종꿀의 품질평가 기준 마련을 위한 시중에 판매하는 토종꿀 탐색
 - (다) 현실적인 브랜드 전략 수립을 위해 재래꿀벌을 둘러싼 내외부 환경을 반영
 - (3) 핵심 기술
 - (가) 꿀벌의 생활사, 개체군 변동, 채밀력, 채밀활동을 분석할 수 있는 과학적 실험설계능력
 - (나) 꿀벌 및 기타 방화곤충, 밀원식물에 대한 정확한 종 동정능력
 - (다) 토종꿀의 밀원 유전자 데이터베이스 구축 및 동정(지역별 토종꿀의 기능성 분석)
 - (라) 벌꿀 내 존재하는 밀원 유전자 검출법(지역별 기능성 성분 포함 토종꿀 품질관리기술 개발)
 - (마) 토종꿀에서의 사양꿀 판별을 위한 사탕수수 혹은 사탕무 유전자의 검출법(토종꿀의 품질을 체계적으로 관리하기 위한 필수 요소와 개개의 관리 방법 및 향후 인증 시 필요한 요건과 세부 방법 제시)
 - (바) 토종꿀 시장의 내외부 환경분석을 기반으로 한 전략적 상황분석능력
 - (사) 토종꿀 아이덴티티 수립 능력

(4) 적용범위(또는 서비스)

- (가) 주요 토종꿀 생산단지(관련기관 및 단체)의 밀원식물 확보 방안 제시
- (나) 비교연구를 통한 재래꿀벌의 차별화된 경쟁력 제시 및 브랜딩화에 기여
- (다) 지역 및 시기별 주요 밀원에 대한 연계도를 제공함으로써, 안정적이고 지속가능한 토종 꿀 생산 및 지역 토종꿀 브랜드화에 기여
- (라) 토종꿀의 밀원별 성분 및 기능성 구명 등 종합적인 품질관리체계 구축으로 신뢰 확보와 소비 확대, 토종꿀 브랜드 선호도 증대
- (마) 국내외 꿀 산업의 상황에 맞는 토종꿀의 브랜드 아이덴티티를 수립하여, 현실적이고 구체적인 토종꿀의 홍보 전략 및 산업의 활성화를 위한 브랜드 운영 전략 제시 가능

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

가. 연차별 연구개발 목표 및 수행 내용

1) 주관 제 1세부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2019)	재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석	재래꿀벌과 양봉꿀 벌의 생육(발육단계, 계절별 봉군변동) 비교 분석	일벌, 여왕벌, 수벌 (재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 생활사 조사	-재래꿀벌과 양봉꿀벌의 계급별, 발달단계별 측정 및 비교 발달 시기 측정 및 비교
		재래꿀벌이 선호하 는 밀원에 대한 실험과 현장 조사를 통한 세밀한 분석	재래꿀벌과 양봉꿀벌의 채밀력 차이 조사	-아까시나무 및 밤나무 개화기의 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 무게측정을 통한 채밀력 확인
		재래꿀벌의 채밀 행동(일주활동, 밀원식물 선호성) 비교 연구	주요 토종꿀 생산지에 식재된 주요 밀원식물 및 개화기 조사	-강원도 인제군 한계리와 경기도 가평군 목동리 2지역에 대한 식생 분포도 확인
2차 년도 (2020)	재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석	재래꿀벌이 선호 하는 밀원에 대한 실험과 현장 조사를 통한 세밀한 분석	주요 밀원식물의 방화곤충상 분석을 통한 밀원별 재래꿀벌 구성 비율분석	-봄, 여름, 가을에 개화하는 주요 밀원식물 대상으로 한 조사 시기별 개화한 밀원식물에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
		한봉업자를 대상으로 한 선호 밀원 설문조사	주요 토종꿀 생산지에 식재된 주요 밀원식물 및 개화기 조사	-강원도 인제군 한계리와 경기도 가평군 목동리 2지역에 대한 식생 분포도 추가 조사
3차 년도 (2021)	토종꿀 주산지 밀원식물 구성 및 개화기에 대한 현장 조사를 통한 연중 밀원식물 연계성 모델 연구	구두조사를 통한 한봉 농 가 선호 밀원 확인	구두조사를 통한 한봉 농 가 선호 밀원 확인	-서울 구로, 경기도 가평군 목동리, 강 원도 인제군 용대리에 대한 밀원 설 문조사 실시
		토종꿀 주산지 밀원식물 구성 및 개화기에 대한 현장 조사를 통한 연중 밀원식물 연계성 모델 연구	목록화된 밀원식물의 계절 연계도 작성 및 평가	-토종꿀 생산지에 식재된 총 89종 (목본: 56종, 초본:33종) 목록화 및 연계도 완성

2) 제 1협동

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2019)	토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정	사양꿀 제작에 사용되는 사탕수수와 사탕무에 대한 유전자 데이터베이스 구축	사양꿀 판별 유전자 검사법의 개발	- GenBank에 보고된 사탕무 및 사탕수수의 고유 유전자에 대한 데이터베이스 구축 - 사탕수수, 사탕무의 고유 유전자 증폭을 위한 specific primer의 선별
		토종꿀 내 사양꿀 함유량 검사를 위한 사탕무 및 사탕수수 유전자 검출법 개발	토종꿀에 함유된 잔류 DNA (residual DNA)의 분리	- 토종꿀에 함유된 잔류 DNA 분리를 위한 최적 binding buffer 개발 - 토종꿀에 함유된 잔류 DNA (residual DNA) 분리를 위한 최적 washing buffer 개발 - 토종꿀에 함유된 잔류 DNA 분리를 위한 최적 Elution buffer 개발 - 토종꿀에 함유된 잔류 DNA 분리를 위한 최적 affinity column 선별 - 토종꿀에 함유된 잔류 DNA 분리를 위한 최적 벌꿀 시료의 양 비교 - 토종꿀 시료에서 회수/손실된 DNA의 양 비교
		지역별 토종꿀 생산에 사용되는 주밀원의 유전자 데이터베이스 구축	주밀원 유전자에 대한 데이터베이스 구축	- GenBank에 아까시나무, 벗나무, 밤나무의 고유 유전자 정보를 기반으로 표준 DNA를 제작하기 위한 Molecular cloning을 진행 - 주밀원 화분 유전자 증폭을 위한 specific primer의 선별 - 제작된 주밀원 화분유전자 증폭용 primer들의 detection PCR
2차 년도 (2020)		국산 토종꿀 성분 분석 및 지표 후보 물질의 분리	HPLC를 이용한 지표 후보 물질의 분리	- 한봉협회를 통한 국내 토종꿀의 수집 수집된 토종꿀에 대한 벌꿀 일반 성분 분석 - 한봉협회 제공 토종꿀 시료에 대한 지표후보 물질의 분리 (HPLC)
		국산 토종꿀의 품질 평가 분석법의 최적화	수분함량, F/G ration, HMF, 탄소동위원소비, HPLC 등의 방법을 사용한 고유물질 분석 시도	- 토종꿀에 함유된 화분 유전자의 분석을 통한 토종꿀의 품질 평가방법을 추구하였으며, 사양꿀이 아닌 토종꿀을 추구하기 위하여 사탕수수 특이 detection PCR 및 Nested PCR 그리고 사탕무 특이 detection PCR 및 Nested PCR을 적용
		국산 토종꿀의 등급 기준 설정	서양종 벌꿀의 등급 기준 설정과의 비교를 통한	- 아까시아꿀의 등급화 결과를 기준으로 유용성과 장단점을 고려하여 등급 도입 검토

			토종꿀 등급 기준 설정	-기본 성분 분석에 의한 토종꿀의 등급 기준의 제안
3차 년도 (2021)		주밀원 유전자에 대한 정량법 구축	주밀원 화분 유전자 증폭을 위한 specific primer의 선별	-NCBI 데이터를 활용한 각 밀원식물 고유의 염기서열 부위 분석
		사탕무 및 사탕수수 유전자에 대한 정량법 구축	사탕무우의 특이 유전자 검출 및 정량을 위한 프라이머 구축	-사탕무 및 사탕수수 고유 유전자를 선별하고, 이를 클론화하여 확보하고, 이에 대하여 가장 민감한 프라이머쌍들을 선별하여, 각 고유 유전자에 대한 정량법을 구축
		실제 시판되고 있는 토종꿀에의 적용	실제 시판되고 있는 토종꿀에 유전자 검사법의 적용	-천연토종꿀 검증을 위한 유전자 검사법의 적용

3) 제 2세부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2019)	소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시	토종꿀을 둘러싼 내외부 환경분석	토종꿀 시장에 영향을 줄 수 있는 외부 환경 분석	-PEST 분석을 사용하여 토종꿀 시장에 영향을 줄 수 있는 외부 환경 분석 - VRIO 분석을 통한 사업 핵심역량 진단 - SWOT 분석을 통한 전략 도출
			토종꿀의 핵심역량 및 자원 분석을 통한 차별화 요인 발굴	- 빅데이터 분석을 통한 꿀 소비 트렌드 분석 - 설문조사를 통한 국내 꿀 소비자들의 인식 및 소비 특성 도출
			꿀 소비 트렌드 및 소비자 특성 분석	- 국내 주요 꿀 상품화 사례 조사 - 해외 주요 꿀 상품화 사례 조사 - 국내 한봉 주 산지 특성조사
2차 년도 (2020)	토종꿀 브랜드 아이덴티티 수립	토종꿀 브랜드 아이덴티티 수립	데이비드 아커의 브랜드 아이덴티티 구축 모델을 활용하여 단계적으로 설계	- 토종꿀의 지역성을 브랜드 핵심 아이덴티티로 수립하고, 확장 아이덴티티로 다양성, 혁신성, 고급화 도출 - 토종꿀 브랜드 아이덴티티 모델을 활용한 가치·편익 제안
			통합적 마케팅 커뮤니케이션(IMC)을 통해 토종꿀 홍보마케팅 전략 방향성 제시	- 지역 특산물과 함께 지역적인 특성을 살린 프리미엄 토종꿀 가공품 홍보 전략 수립 - 각 지역의 토종꿀을 담은 제품에 대한 홍보 방향성 제시
			토종꿀 홍보 콘텐츠 개발	각 지역에 대한 토종꿀 스토리텔링 개발

3차 년도 (2021)	소비자 선호에 기반한 토종꿀 상품화 방향성 제시	토종꿀 브랜드 아이덴티티를 활용한 상품화 전략 도출 및 상품 개발	- 스토리텔링 개발 후 활용 방안 제시 - 토종꿀 브랜드 아이덴티티 기반 상품화 프로세스 수립 - 소비자 선호에 기반한 토종꿀 상품화 전략 수립 및 상품 개발 - 토종꿀 브랜드 아이덴티티(지역성)를 강조한 프리미엄 토종꿀 가공품 개발
	토종꿀 산업 활성화를 위한 브랜드 운영 전략 제시	토종꿀의 차별화 요인에 초점을 맞춘 브랜드 운영 전략 및 품질인증방법 제시	- 식재료의 본질에 기반한 브랜드 운영 전략 도출 - 소비자 신뢰도 제고를 위한 토종꿀 품질인증방법 제시

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

가. 정성적 연구개발성과

1) 주관 제 1세부: 재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석

가) 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 생육(발육 단계, 계절별 봉군 변동 등) 비교 분석

(1) 연구 수행을 위한 재래꿀벌 봉군 확보 (그림 10)

- 재래꿀벌은 연구수행 중 낭충봉아부패병에 의한 피해를 최소화시키기 위해 3지역의 한봉장에서 길러진 봉군을 확보함(병에 대한 내성정도가 다른 계통을 확보하기 위함)
- 강원도 홍천군 내촌면, 경상남도 통영시 욱지면, 충청남도 천안시 병천면에서 위치한 토봉농가에서 재래꿀벌 봉군을 확보하여 연구에 이용함
- 확보한 봉군은 분봉을 통해 증식을 시켰으며, 최종적으로 서울대학교 관악캠퍼스에 5봉군(생활사 및 채밀력 차이조사 수행), 강원도 인제군 한계리에 5봉군(채밀활동 차이 조사 수행)을 설치하여 연구에 이용함



그림 10. 서울대학교 관악캠퍼스와 강원도 인제군 한계리에 설치된 재래꿀벌 봉군 및 관리

(2) 연구 수행을 위한 양봉꿀벌 봉군 확보 (그림 11)

- 양봉꿀벌은 경기도 의왕시 오전동, 강원도 홍천군 남면에 위치한 양봉농가에서 봉군을 확보하여 연구에 이용함
- 확보한 봉군은 분봉을 통해 증식을 시켰으며, 최종적으로 서울대학교 관악캠퍼스에 10봉군(생활사 및 채밀력 차이조사 수행), 강원도 인제군 한계리에 10봉군(채밀활동 차이조사 수행)을 설치하여 연구에 이용함



그림 11. 서울대학교 관악캠퍼스와 강원도 인제군 한계리에 확보된 양봉꿀벌 봉군 및 관리

나) 일벌, 여왕벌, 수벌 (재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 생활사 조사

(1) 연구방법

(가) 일벌(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 생활사 조사

- 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 서울대학교 관악캠퍼스에 설치한 5봉군을 이용하여 일벌에 대한 생활사 조사를 수행함
- 봉군당(5봉군 이용) 한 소비(벌집을 지어올린 소초)에 8cm x 8cm의 조사구역(그림 12)을 설정함
- 조사구역에서 산란시점이 확인된 10개체를 대상으로 단계별(알 - 유충 - 봉개 - 성충) 발육기간을 측정함(재래꿀벌의 경우에는 낭충봉아부패병 발병으로 인한 봉군 간 세력의 불균등으로 인해 3봉군 내 50개체를 선정하여 조사를 실시함)
- 재래꿀벌의 경우에는 6월 15일~7월 8일, 양봉꿀벌의 경우에는 6월 15일~7월 15일(산란 지연으로 재래꿀벌보다 7일 연장조사실시) 사이에 두 종의 각 봉군당(5봉군) 동시간대에 산란된 10개체를 지속적으로 추적하여 조사함(총 반복수: 재래꿀벌, 양봉꿀벌 각 5봉군 x 10개체 = 50개체)
- 3시간을 주기로 조사구역 내 변동사항을 확인하였으며, 특히 산란시점, 유충부화시점, 봉개시점, 성충우화시점을 중점적으로 확인해 각 단계별 발육기간을 측정함
- 자연조건에서 꿀벌은 유충이 성숙하면 봉개를 하는 습성이 있기 때문에 유충의 봉개전 기간과, 봉개후 성충우화 시기로 구분하여 조사함

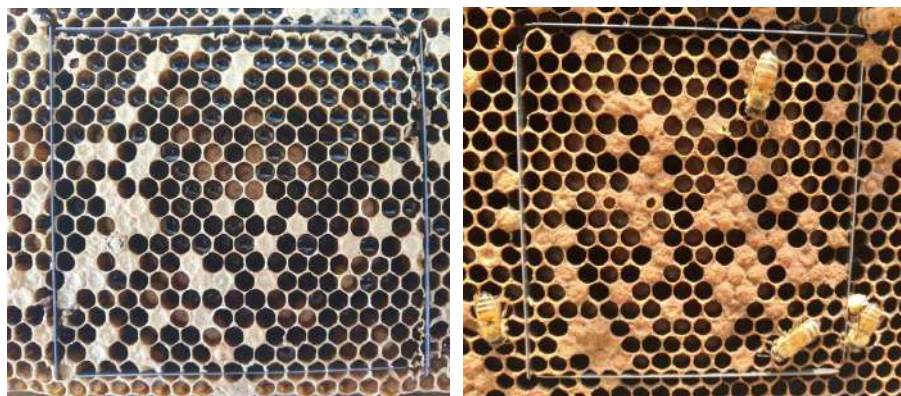


그림 12. 생활사 조사를 위한 조사구역(8cm x 8cm) 설정
(왼쪽: 재래꿀벌 소비, 오른쪽: 양봉꿀벌 소비)

(나) 여왕벌(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 생활사 조사

- 여왕벌은 자연적인 조건에서 개체수 확보가 어렵기 때문에, 이충(부화한지 2일이 지난 유충을 인공왕관에 이식)을 통해 여왕벌에 대한 생활사 조사를 수행함
- 산란을 받기 위해 여왕봉이충기를 재래꿀벌과 양봉꿀벌 봉군에 설치함(그림 13)
- 하지만 재래꿀벌의 경우, 많은 수의 알을 받는데 어려움이 있어 자연적으로 소비에

- 서 부화한 유충을 왁스로 코팅된 인공왕관에 이충함. 양봉꿀벌의 경우에는 여왕봉 이충기에 받은 알을 왁스로 코팅되지 않은 인공왕관에 이충함
- 산란시점과 유충부화시점이 확인된 20개체의 유충을 각 무왕봉군에 설치를 하였으며, 3시간을 주기로 변동사항을 확인함
 - 특히 봉개(번데기)시점, 성충우화시점을 중점적으로 확인해 각 단계별 기간을 측정



그림 13. 산란유도를 위한 여왕봉이충기 설치와 산란시점 확인

(다) 수벌(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 생활사 조사

- 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 서울대학교 관악캠퍼스에 설치한 재래꿀벌 3봉군, 양봉꿀벌 5봉군을 이용하여 수벌에 대한 생활사 조사를 수행함(재래꿀벌의 경우 봉군간 세력 불균등으로 인해 균일화된 3봉군만을 선정)
- 봉군당 수벌집이 형성된 특정 소비에 산란시점이 확인된 10개체를 한 단위로 하여 각 5단위(반복)에 대한 단계별(알-유충-봉개-성충) 발육기간을 측정함
- 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 5월 1일~31일 사이에 두 종의 각 단위로 설정된 개체를 지속적으로 추적하여 조사함(총 반복수: 재래꿀벌, 양봉꿀벌 각 10개체(단위) x 5 단위 = 50개체)
- 3시간을 주기로 조사구역 내 변동사항을 확인하였으며, 특히 산란시점, 유충부화시점, 봉개시점, 성충우화시점을 중점적으로 확인해 각 단계별 발육기간을 측정함
- 자연조건에서 꿀벌은 유충이 성숙하면 봉개를 하는 습성이 있기 때문에 유충의 봉개전 기간과, 봉개 후 성충우화 시기로 구분하여 조사함

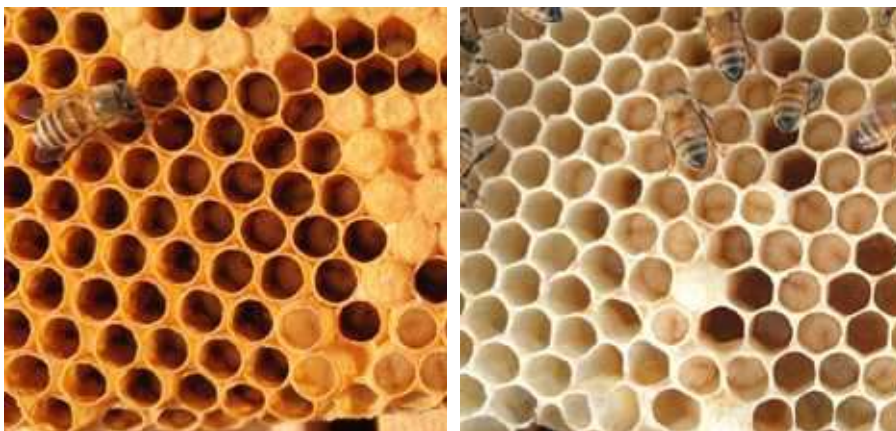


그림 14. 수벌 생활사 조사를 위한 수벌집 설정
(왼쪽: 재래꿀벌 소비, 오른쪽: 양봉꿀벌 소비)

(라) 재래꿀벌과 양봉꿀벌 봉군 내부 온도 측정

- 발육실험에서 중요한 환경조건인 온도를 측정하기 위해 온도 데이터로거를 발육기간 조사기간인 6월 15일~7월 15일 사이에 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 특정봉군 내부에 설치함(그림 15)
- 온도는 매일 15분을 주기로 기록되었으며, 조사시 외에는 외부에 노출되지 않음



그림 15. 봉군 내부온도 측정을 위한 온도 데이터로거 설치
(왼쪽: 재래꿀벌 봉군, 오른쪽: 양봉꿀벌 봉군)

(2) 연구결과

(가) 일벌(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 생활사

- 재래꿀벌과 양봉꿀벌에서 나타난 일벌의 성장단계별 발육기간은 표 4, 5와 같음
- 재래꿀벌의 경우에는 알기간(73.1시간), 유충기간(96.7시간), 봉개(번데기)기간(264.3시간)으로 산란 후 성충우화까지 434.2시간(약 18일)이 걸리는 것으로 나타남
- 양봉꿀벌의 경우 알기간(72.8시간), 유충기간(114.6시간), 봉개(번데기)기간(286.6시간)으로 산란 후 성충우화까지 463.52시간(약 19일)이 걸리는 것으로 나타남

표 4. 재래꿀벌 봉군별 일벌의 성장단계별 발육기간(시간: 평균 ± 표준편차)

봉군	알기간 (산란 후 유충부화)	유충기간 (유충부화 후 봉개)	봉개(번데기) 기간 (봉개 후 성충우화)	총 발육기간 (산란 후 성충우화)
A	73.9 ± 1.6	96.9 ± 2.3	264.0 ± 0.0	434.6 ± 2.7
B	72.8 ± 1.4	96.0 ± 0.0	264.0 ± 0.0	432.6 ± 1.3
C	72.8 ± 1.4	97.0 ± 1.5	265.5 ± 1.6	435.5 ± 2.3
D	73.1 ± 1.6	97.5 ± 1.6	264.5 ± 1.2	435.0 ± 1.9
E	72.8 ± 1.4	96.0 ± 0.0	263.4 ± 1.3	432.6 ± 1.3
계	73.1 ± 1.4	96.7 ± 1.5	264.3 ± 1.2	434.2 ± 2.3

표 5. 양봉꿀벌 봉군별 일벌의 성장단계별 발육기간(시간: 평균 ± 표준편차)

봉군	알기간 (산란 후 유충부화)	유충기간 (유충부화 후 봉개)	봉개기간 (봉개 후 성충우화)	총 발육기간 (산란 후 성충우화)
A	72.7 ± 1.3	114.7 ± 2.0	286.7 ± 2.2	474.0 ± 3.4
B	73.1 ± 1.6	115.1 ± 1.6	288.0 ± 1.6	476.2 ± 3.1
C	73.0 ± 1.5	114.7 ± 1.3	286.3 ± 2.2	474.0 ± 2.6
D	72.7 ± 1.3	114.7 ± 1.3	287.0 ± 1.5	474.3 ± 1.0

E	72.7 ± 1.3	114.0 ± 2.6	285.3 ± 1.0	472.0 ± 3.4
계	72.8 ± 1.4	114.6 ± 1.8	286.6 ± 1.9	474.1 ± 3.0

- 집계된 일별(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 성장단계별 발육기간은 표 6과 같음
- 알기간은 두 종 모두 유사한 발육기간(약 3일)을 나타냈지만 유충기간과 봉개(번데기)기간에서는 각각 재래꿀벌이 양봉꿀벌보다 약 1일 더 빠른 것으로 나타남
- 결론적으로 산란 후 성충우화까지는 재래꿀벌이 양봉꿀벌보다 약 1~2일 더 빠른 것으로 확인됨
- 일별(재래꿀벌)의 성장단계별 발육기간(일)이 제시된 Koetz (2013)에 따르면, 알기간은 3일, 유충기간은 5일, 봉개(번데기)기간은 11일로 산란 후 성충우화까지 총 발육기간이 19일로 나타남
- 본 연구에서 일별(재래꿀벌)의 알기간, 봉개(번데기)기간은 유사하게 나타났지만, 유충기간에서 1일 차이를 보임
- 일별(양봉꿀벌)의 성장단계별 발육기간(일)이 제시된 Fasasi et al. (2011), Koetz (2013), Yadav et al. (2017)에 따르면, 알기간(3일)을 제외한 유충기간(5~6일) 및 봉개(번데기)기간(11~13일), 총 발육기간(19~21일)은 문헌 간에 1~2일 정도의 차이를 나타냄
- 본 연구에서 일별(양봉꿀벌)의 성장단계별 발육기간은 기존 연구의 종합결과(각 단계에서 보이는 1~2일정도 차이 고려)와 유사한 결과를 보임

표 6. 일별(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 성장단계별 발육기간(시간: 평균 ± 표준편차)

	알기간 (산란 후 유충부화)	유충기간 (유충부화 후 봉개)	봉개(번데기)기간 (봉개 후 성충우화)	총 발육기간
재래꿀벌	73.1 ± 1.4 (약 3일)	96.7 ± 1.5 (약 4일)	264.3 ± 1.2 (약 11일)	434.2 ± 2.3 (약 18.1일)
양봉꿀벌	72.8 ± 1.4 (약 3일)	114.6 ± 1.8 (약 4.7일)	286.6 ± 1.9 (약 12일)	463.5 ± 3.0 (약 19~20일)

(나) 여왕벌(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 생활사

- 재래꿀벌과 양봉꿀벌에서 나타난 여왕벌의 성장단계별 발육기간은 표 7과 같음
- 재래꿀벌의 경우에는 연이은 낭충봉아부패병의 발병과 양봉에 의한 도봉으로 3차년도에 재실험을 실시하였으나, 낭충봉아부패병의 재발로 인하여 여왕벌의 성장단계별 발육기간은 추적하지 못하여 문헌을 활용하여 기재하였음
- 여왕벌(재래꿀벌)의 성장단계별 발육기간(일)이 제시된 Koetz (2013)에 따르면, 알기간 3일, 유충기간은 4~5.5일 및 봉개(번데기)기간은 6~7.5일로 산란 후 성충우화까지 총 발육기간이 13~16일로 나타남
- 양봉꿀벌의 경우에는 알기간(72.6시간), 유충기간(116.1시간), 봉개(번데기)기간(187.2시간)으로 산란 후 성충우화까지 376.2시간(약 15~16일)이 걸리는 것으로 나타남
- 집계된 여왕벌(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 성장단계별 발육기간 자료(표 7)에 따르면, 대체적으로 두 종에서 유사한 각 단계별 발육기간을 보이지만 재래꿀벌이 양봉꿀벌보다 약 1~2일 더 빨리 발생하는 경우가 있을 수 있음을 확인함

표 7. 여왕벌(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 성장단계별 발육기간(시간: 평균 ± 표준편차)

	알기간 (산란 후 유충부화)	유충기간 (유충부화 후 봉개)	봉개(번데기)기간 (봉개 후 성충우화)	총 발육기간
재래꿀벌	72.9 ± 1.4 (약 3일)	(약 4~5.5일)	(약 6~7.5일)	(약 13~16일)
양봉꿀벌	72.6 ± 1.2 (약 3일)	116.1 ± 2.3 (약 4.8일)	187.2 ± 1.5 (약 7.8일)	376.2 ± 2.1 (약 15~16일)

*종별 20개체를 대상으로 함(조사도중 죽은 개체 제외)

*재래꿀벌의 유충기간, 봉개(번데기)기간, 총 발육기간은 Koetz (2013)를 참고하여 제시함

- 여왕벌(양봉꿀벌)의 성장단계별 발육기간(일)이 제시된 Fasasi et al. (2011), Koetz (2013), Yadav et al. (2017)에 따르면, 알기간(1.7~3일), 유충기간(3.8~5일) 및 봉개(번데기)기간(5~10.2일), 총 발육기간(13~16일)에서 문헌 간에 1~5일 정도의 차이를 나타냄
- 본 연구에서 여왕벌(양봉꿀벌 및 재래꿀벌)의 성장단계별 발육기간은 기존 연구의 종합결과(각 단계에서 보이는 1~3일정도 차이 고려)와 유사한 결과를 보인 것으로 확인됨

(다) 수벌(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 생활사

- 재래꿀벌과 양봉꿀벌에서 나타난 수벌의 성장단계별 발육기간은 표 8, 9와 같음
- 재래꿀벌의 경우에는 알기간(74.5시간), 유충기간(149.8시간), 봉개(번데기)기간(350.6시간)으로 산란 후 성충우화까지 574.9시간(23.9일)이 걸리는 것으로 나타남
- 양봉꿀벌의 경우에는 알기간(74.4시간), 유충기간(154.8시간), 봉개(번데기)기간(342.9시간)으로 산란 후 성충우화까지 571.1시간(23.8일)이 걸리는 것으로 나타남

표 8. 재래꿀벌 봉군별 수벌의 성장단계별 발육기간(시간: 평균 ± 표준편차)

단위	알기간 (산란 후 유충부화)	유충기간 (유충부화 후 봉개)	봉개(번데기)기간 (봉개 후 성충우화)	총 발육기간 (산란 후 성충우화)
A	73.5 ± 1.6	151.5 ± 1.6	355.5 ± 1.6	580.5 ± 4.7
B	75.3 ± 2.2	150.0 ± 2.4	352.5 ± 1.6	577.8 ± 5.9
C	74.1 ± 1.4	153.3 ± 2.6	351.0 ± 3.5	578.4 ± 5.6
D	75.0 ± 2.4	145.5 ± 1.6	347.4 ± 1.3	567.9 ± 3.2
E	74.7 ± 0.9	148.8 ± 2.1	346.5 ± 1.6	570.0 ± 2.4
계	74.5 ± 1.9	149.8 ± 3.3	350.6 ± 3.9	574.9 ± 6.7

표 9. 양봉꿀벌 봉군별 수벌의 성장단계별 발육기간(시간: 평균 ± 표준편차)

봉군	알기간 (산란 후 유충부화)	유충기간 (유충부화 후 봉개)	봉개기간 (봉개 후 성충우화)	총 발육기간 (산란 후 성충우화)
A	73.5 ± 1.6	154.5 ± 1.6	340.5 ± 3.2	568.5 ± 5.9
B	74.1 ± 1.4	154.8 ± 1.5	345.9 ± 2.5	574.8 ± 3.2
C	76.5 ± 1.6	157.2 ± 1.5	343.5 ± 1.6	577.2 ± 2.1

D	75.0 ± 3.2	154.5 ± 1.6	342.6 ± 2.4	571.2 ± 3.2
E	72.9 ± 1.4	153.0 ± 3.2	342.0 ± 3.2	567.9 ± 5.5
계	74.4 ± 2.3	154.8 ± 2.3	342.9 ± 3.1	572.1 ± 5.4

- 집계된 수별(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 성장단계별 발육기간은 표 10과 같음
- 알기간은 두 종 모두 유사한 발육기간(약 3일)을 나타냈지만 재래꿀벌이 양봉꿀벌보다 유충기간에서는 5시간 빨랐고, 봉개기간에서는 7.7시간 늦은 것으로 나타남
- 결론적으로 산란 후 성충우화까지는 재래꿀벌이 양봉꿀벌보다 약 2.8시간 더 늦은 것으로 확인됨
- Fasasi et al. (2011), Koetz (2013), Yadav et al. (2017)에 따르면, 재래꿀벌의 경우에는 알기간(3일), 유충기간(6일), 봉개(번데기)기간(14일)으로 산란 후 성충우화까지 23일이 걸리는 것으로 나타남
- 양봉꿀벌의 경우에는 알기간(3일), 유충기간(7일), 봉개(번데기)기간(14~15일)으로 산란 후 성충우화까지 24~25일이 걸리는 것으로 나타남
- 위 문헌조사결과 수별(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 성장단계별 발육기간에 따르면, 알기간은 두 종 모두 동일한 발육기간(약 3일)을 나타냈지만 유충기간과 봉개(번데기)기간에서는 각각 재래꿀벌이 양봉꿀벌보다 약 1일 더 빠른 것으로 나타남
- 본 연구에서는 양봉꿀벌의 유충기간이 문헌조사결과 보다 0.5일 빠르게 나타난 것 외 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 성장단계별 발육기간이 대체적으로 유사하게 나타남
- 본 연구에서 일벌의 경우에는 재래꿀벌의 총 발육기간이 양봉꿀벌보다 1일 정도 빠르게 나타났지만, 수벌의 경우에는 재래꿀벌이 양봉꿀벌보다 약 3시간 늦게 나타나는 것으로 확인됨
- 이는 조사기간 중 평균 봉군 내부 온도가 양봉꿀벌(30.2°C)보다 재래꿀벌(28.0°C)에서 약 2.2°C 낮게 유지된 것에서 기인한 것으로 판단됨

표 10. 수별(재래꿀벌과 양봉꿀벌)의 성장단계별 발육기간(시간: 평균 ± 표준편차)

	알기간 (산란 후 유충부화)	유충기간 (유충부화 후 봉개)	봉개(번데기)기간 (봉개 후 성충우화)	총 발육기간
재래꿀벌	74.5 ± 1.9 (약 3일)	149.8 ± 3.3 (약 6일)	343.8 ± 48.4 (약 14일)	575.3 ± 6.9 (약 24일)
양봉꿀벌	74.4 ± 2.3 (약 3일)	154.8 ± 2.3 (약 6.5일)	342.9 ± 3.1 (약 14일)	572.2 ± 5.4 (약 23.8일)

(라) 재래꿀벌과 양봉꿀벌 봉군 내부 온도변화

① 일벌, 여왕벌 생활사 조사기간 중

- 발육조사 기간 재래꿀벌 봉군의 평균 내부온도는 2019년도는 28~31.8°C, 2021년도는 32.15°C로 유지되었으며, 양봉꿀벌 봉군의 평균 내부온도 31.2~34.6°C로 평균기온과 상관없이 좁은 범위에서 일정하게 유지됨(그림 16, 표 11)
- 약 30일 동안 재래꿀벌 봉군의 평균 내부온도(30.3 ± 0.9)는 양봉꿀벌 봉군(32.8 ± 0.5)보다 약 2.5°C 낮게 유지됨
- 두 종간의 봉군 내부 온도 차이는 조사도중 재래꿀벌 봉군에 발병한 낭충봉아부패병에 의한 세력 약화의 영향도 있었을 것으로 사료됨

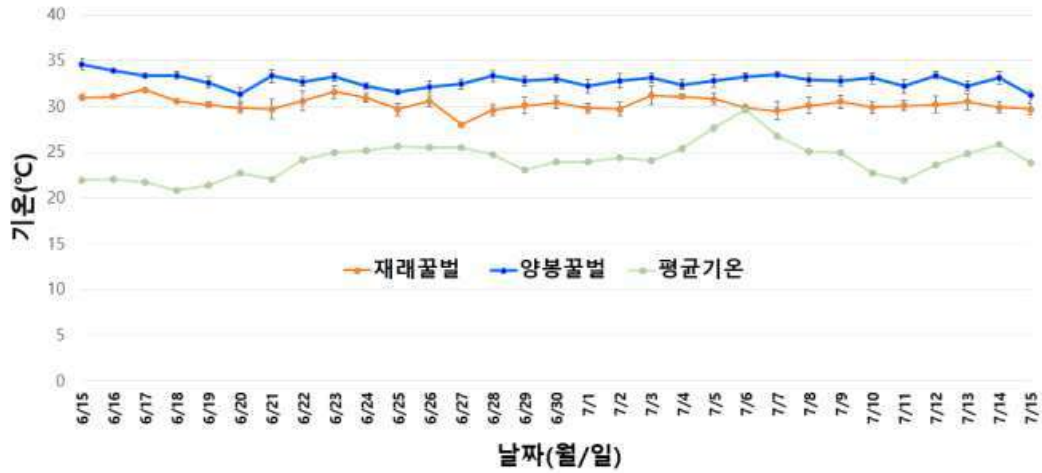


그림 16. 발육조사 기간 재래꿀벌과 양봉꿀벌 봉군의 평균 내부온도(2019년)

표 11. 발육조사 기간에 측정된 재래꿀벌과 양봉꿀벌 봉군 평균 내부온도

날짜 (2019년)	평균기온(°C)	재래꿀벌	양봉꿀벌
6/15	21.9	31.0 ± 1.2	34.6 ± 1.9
6/16	22	31.1 ± 0.7	33.9 ± 0.6
6/17	21.7	31.8 ± 0.4	33.3 ± 0.7
6/18	20.8	30.6 ± 0.6	33.4 ± 1.3
6/19	21.4	30.2 ± 1.1	32.6 ± 1.9
6/20	22.7	29.8 ± 1.6	31.3 ± 2.2
6/21	22.1	29.7 ± 3.4	33.3 ± 2.2
6/22	24.2	30.6 ± 3.5	32.7 ± 1.6
6/23	25	31.6 ± 2.1	33.2 ± 1.4
6/24	25.2	30.9 ± 1.6	32.2 ± 1.1
6/25	25.6	29.7 ± 2.1	31.6 ± 0.9
6/26	25.5	30.6 ± 1.8	32.1 ± 2.1
6/27	25.5	28.0 ± 0.5	32.5 ± 1.8
6/28	24.7	29.6 ± 2.0	33.3 ± 2.1
6/29	23.1	30.1 ± 2.8	32.8 ± 1.8
6/30	23.9	30.4 ± 2.1	33.0 ± 1.5
7/1	23.9	29.8 ± 1.6	32.2 ± 2.2
7/2	24.4	29.7 ± 2.4	32.8 ± 2.4
7/3	24.1	31.2 ± 3.1	33.1 ± 1.7
7/4	25.4	31.1 ± 0.7	32.4 ± 1.5
7/5	27.6	30.8 ± 1.9	32.8 ± 2.2
7/6	29.7	29.8 ± 1.5	33.2 ± 1.4
7/7	26.7	29.5 ± 3.2	33.5 ± 0.9
7/8	25.1	30.1 ± 2.9	32.9 ± 2.1
7/9	25	30.5 ± 2.3	32.8 ± 1.8
7/10	22.7	29.9 ± 2.1	33.1 ± 2.0
7/11	21.9	30.1 ± 1.9	32.2 ± 2.3
7/12	23.6	30.2 ± 2.9	33.4 ± 1.3
7/13	24.9	30.5 ± 2.6	32.2 ± 1.8
7/14	25.9	29.9 ± 1.9	33.1 ± 2.2
7/15	23.8	29.7 ± 2.0	31.2 ± 1.9
	24.2 ± 1.9	30.3 ± 0.9	32.8 ± 0.5

② 수별 생활사 조사기간 중

- 발육조사 기간 재래꿀벌 봉군의 평균 내부온도는 25.2~32.3°C, 양봉꿀벌 봉군의 평균 내부온도 27.5~34.1°C로 평균기온과 상관없이 좁은 범위에서 일정하게 유지됨(그림 17, 표 12)
- 약 30일 동안 재래꿀벌 봉군의 평균 내부온도(28.0 ± 1.9)는 양봉꿀벌 봉군(30.2 ± 1.2)보다 약 2.2°C 낮게 유지됨
- 두 종간의 봉군 내부 온도 차이는 재래꿀벌과 양봉꿀벌 봉군의 세력 불균형에 의한 것으로 사료됨

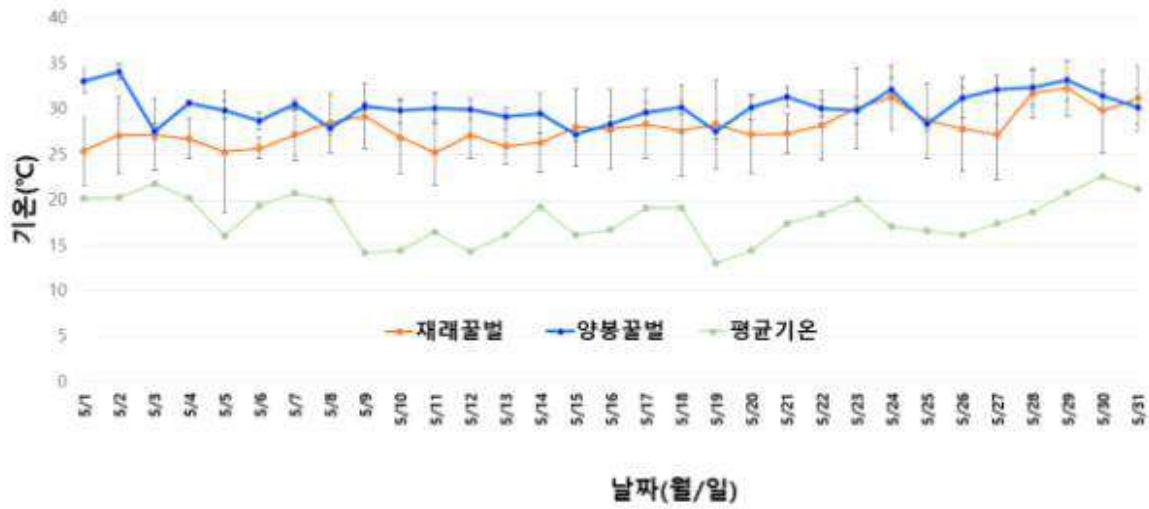


그림 17. 발육조사 기간 재래꿀벌과 양봉꿀벌 봉군의 평균 내부온도(2020년)

표 12. 발육조사 기간에 측정된 재래꿀벌과 양봉꿀벌 봉군 평균 내부온도

날짜	평균기온(°C)	재래꿀벌	양봉꿀벌
5/1	20.2	25.4 ± 3.8	33.1 ± 1.4
5/2	20.3	27.1 ± 4.2	34.1 ± 0.8
5/3	21.8	27.2 ± 3.9	27.5 ± 0.8
5/4	20.2	26.7 ± 2.2	30.7 ± 0.3
5/5	16.0	25.3 ± 6.6	29.9 ± 1.0
5/6	19.4	25.7 ± 1.1	28.7 ± 0.9
5/7	20.7	27.2 ± 2.9	30.5 ± 0.6
5/8	19.9	28.5 ± 3.2	27.9 ± 0.7
5/9	14.2	29.2 ± 3.6	30.3 ± 0.5
5/10	14.4	26.9 ± 4.0	29.8 ± 1.3
5/11	16.5	25.2 ± 3.5	30.1 ± 1.7
5/12	14.3	27.1 ± 2.6	30.0 ± 1.1
5/13	16.1	25.9 ± 1.9	29.2 ± 1.0
5/14	19.3	26.3 ± 3.3	29.5 ± 2.2
5/15	16.1	28.0 ± 4.3	27.2 ± 0.8
5/16	16.7	27.8 ± 4.4	28.3 ± 0.9
5/17	19.1	28.3 ± 3.8	29.6 ± 1.2
5/18	19.1	27.6 ± 5.0	30.2 ± 0.8
5/19	13.0	28.3 ± 4.9	27.5 ± 0.9
5/20	14.4	27.2 ± 4.3	30.2 ± 1.4
5/21	17.4	27.3 ± 2.2	31.4 ± 1.1
5/22	18.5	28.2 ± 3.8	30.1 ± 0.9
5/23	20.1	30.1 ± 4.5	29.8 ± 1.5
5/24	17.1	31.3 ± 3.5	32.2 ± 1.2
5/25	16.6	28.7 ± 4.1	28.4 ± 0.7
5/26	16.2	27.8 ± 4.6	31.2 ± 2.2
5/27	17.4	27.2 ± 4.9	32.1 ± 1.7
5/28	18.7	31.7 ± 2.6	32.4 ± 2.0
5/29	20.7	32.3 ± 3.1	33.2 ± 2.2
5/30	22.6	29.8 ± 4.5	31.5 ± 1.4
5/31	21.2	31.2 ± 3.6	30.2 ± 1.9
	18.0 ± 2.5	28.0 ± 1.9	30.2 ± 1.2

*평균기온은 기상청 자료를 참고로 하여 제시함

*봉군 평균 내부온도는 평균 ± 표준편차 값을 나타냄

(마) 재래꿀벌과 양봉꿀벌 생활사 차이에 대한 논의 및 종합결론

- 재래꿀벌과 양봉꿀벌에서 나타난 일벌, 여왕벌, 수벌의 성장단계별 발육기간은 표 13과 같음
- 본 연구를 통하여 국내 재래꿀벌 및 양봉꿀벌의 일벌, 여왕벌, 수벌에서 나타나는 두 종간 성장단계별 발육기간 차이를 확인함
- 본 연구에서는 재래꿀벌이 양봉꿀벌보다 일벌에서 약 2일, 여왕벌에서 약 1~3일정도 빠른 것으로 나타났으나 수벌에서는 두 종간 큰 차이를 보이지 않음
- 발육조사 기간 재래꿀벌 봉군의 평균 내부온도가 양봉꿀벌에서보다 약 2.5°C 낮게 유지되었음에도 불구하고 재래꿀벌의 일벌은 양봉꿀벌보다 약 2일 더 빠른 발육기간을 나타냄
- 일벌, 여왕벌, 수벌에 대한 발육조사가 수행된 기존 연구(Fasasi et al., 2011; Koetz, 2013; Yadav et al., 2017)에서 제시한 결과에 따르면, 같은 종임에도 불구하고 각 성장단계별 발육기간에 차이를 나타냄
- 이는 발육조사가 수행된 지역에 주어진 환경조건(온도) 및 재료(계통)차이로 인한 것으로 판단됨

표 13. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 성장단계별 발육기간(시간: 평균 ± 표준편차)

구분	알기간 (산란 후 유충부화)	유충기간 (유충부화 후 봉개)	봉개(번데기) 기간 (봉개 후 성충우화)	총 발육기간	
일벌	재래꿀벌	73.1 ± 1.4 (약 3일)	96.7 ± 1.5 (약 4일)	264.3 ± 1.2 (약 11일)	434.2 ± 2.3 (약 18.1일)
	양봉꿀벌	72.8 ± 1.4 (약 3일)	114.6 ± 1.8 (약 4.7일)	286.6 ± 1.9 (약 12일)	474.1 ± 3.0 (약 20일)
여왕벌	재래꿀벌	72.9 ± 1.4 (약 3일)	(약 4~5.5일)	(약 6~7.5일)	(약 13~16일)
	양봉꿀벌	72.6 ± 1.2 (약 3일)	116.1 ± 2.3 (약 5일)	187.2 ± 1.5 (약 8일)	376.2 ± 2.1 (약 16일)
수벌	재래꿀벌	74.5 ± 1.9 (약 3일)	149.8 ± 3.3 (약 6.2일)	343.8 ± 48.4 (약 14.6일)	575.3 ± 6.9 (약 24일)
	양봉꿀벌	74.4 ± 2.3 (약 3일)	154.8 ± 2.3 (약 6.5일)	342.9 ± 3.1 (약 14.3일)	572.2 ± 5.4 (약 23.8일)

* Fasasi et al. (2011), Koetz (2013), Yadav et al. (2017) 참조

다) 봉군의 봉군무게측정을 통한 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 채밀력 차이 조사

(1) 연구방법

(가) 아까시나무 개화기 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 무게측정

(1차: 서울대학교 관악캠퍼스)

- 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 서울대학교 관악캠퍼스에 설치한 각 5봉군을 이용해 채밀력차이 조사를 수행함
- 조사대상 봉군규모: 재래꿀벌 봉군(소비 2~4매 단상), 양봉꿀벌 봉군(소비 17~18매 계상)
- 조사대상 봉군은 주 밀원인 아까시나무 개화기와 그 전후기간을 포함하는 2019년 5월 1일부터 5월 31일 사이에 5일 간격으로 전체 봉군무게를 측정하여 변동추이를 모니터링하고, 2020년도에는 5월 22일부터 6월 2일까지 5일 간격으로 반복실험을 진행함
- 양봉꿀벌의 경우에는 봉군 관리상 채밀이 불가피하였으며, 채밀 전후 봉군의 무게를 측정하여 그 변동량을 고려해 누적해나감
- 봉군무게는 전자식 저울을 이용하였으며, 오전 9시에 무게를 일괄적으로 측정
- 봉군무게의 평균 증감정도를 바탕으로 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 주 채밀기(아까시나무 개화기)에 보이는 채밀력을 비교함

(나) 밤나무 개화기 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 무게측정(2차: 강원도 인제군 한계리)

- 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 강원도 인제군 한계리에 설치한 각 5봉군을 이용해 채밀력차이 조사를 수행하고자 하였음
- 조사대상 봉군규모: 재래꿀벌 봉군(소비 4매 단상), 양봉꿀벌 봉군(소비 16매 계상)
- 조사대상 봉군은 주 밀원인 밤나무 개화기간 전후기간에 5일 간격으로 전체 봉군 무게를 측정하여 변동추이를 모니터링 하고자 하였으나, 재래꿀벌의 낭충봉아부패병 감염으로 인하여 폐사하여 추가 실험을 진행하지 못하였음

(2) 연구결과

(가) 아까시나무 개화기 재래꿀벌의 봉군무게변동(서울대학교 관악캠퍼스)

- 재래꿀벌의 경우 아까시나무 개화기(5~6월)에 5일 간격으로 측정된 봉군당(5봉군) 무게와 평균 증감정도를 표 14, 16에 나타냄
- 조사기간 동안 재래꿀벌의 평균 봉군무게는 10.1~10.6kg으로 좁은 범위에서 변동함
- 양봉꿀벌의 경우 아까시나무가 개화하기 전인 5월 2일~7일과 개화한 12일~17일에 비교적 높은 무게증가정도를 나타냄
- 5월 17일 이후에는 지속적으로 무게증가정도가 감소하여 5월 27일~6월 1일 사이에는 봉군무게가 기존시점에서보다 더 감소하는 것을 보임
- 재래꿀벌의 경우 아까시나무 개화기 수밀력에서 양봉꿀벌에 비해 상대적으로 낮은 수밀력을 보였으며, 이는 재래꿀벌이 양봉꿀벌에 비해 아까시나무 선호도가 낮음을 보여주며, 또한 금년 아까시나무 개화기 전후로 국내 재래종꿀벌의 전국적인 낭충봉아부패병의 발병이 수밀력에 영향을 미친 결과이기도 함

(나) 아까시나무 개화기 양봉꿀벌의 봉군무게변동(서울대학교 관악캠퍼스)

- 양봉꿀벌의 경우 아까시나무 개화기(5월)에 5일 간격으로 측정된 봉군당 무게와 평균 증감정도를 표 15에 나타냄
- 조사기간 동안 양봉꿀벌의 평균 봉군무게는 36.2~61.7kg으로 넓은 범위에서 변동함
- 4월말 벚나무의 개화기가 끝난 이후로는 5봉군 모두 무게가 감소하였지만, 아까시나무가 개화한 12일~17일에는 각 봉군당 약 20kg까지 무게가 증가할 정도로 많은 꿀이 들어오는 것을 확인함
- 하지만, 5월 17일 이후에는 지속적으로 무게증가정도가 감소하였고, 5월 27일~6월 1일 사이에는 일부 봉군에서 무게가 기존시점에서보다 더 감소하는 경우를 보임

표 14. 아까시나무 개화기(5월) 재래꿀벌의 봉군당(5봉군) 측정시점별 봉군무게(증감정도)

봉군	봉군당 무게(kg)							봉군당 무게평균
	5/2	5/7	5/12	5/17	5/22	5/27	6/1	
1	8.0	8.4 (+0.4)	8.6 (+0.2)	8.9 (+0.3)	9.1 (+0.2)	9.1 (0)	9.0 (-0.1)	8.7
2	12.0	12.5 (+0.5)	12.8 (+0.3)	13.0 (+0.2)	13.2 (+0.2)	13.1 (-0.1)	13.0 (-0.1)	12.8
3	12.3	12.4 (+0.1)	12.6 (+0.2)	12.9 (+0.3)	12.9 (0)	12.9 (0)	12.8 (-0.1)	12.7
4	7.1	7.2 (+0.1)	7.2 (+0)	7.5 (+0.3)	7.5 (+0)	7.6 (+0.1)	7.5 (-0.1)	7.4
5	9.6	9.8 (+0.2)	10.0 (+0.2)	10.1 (+0.1)	10.2 (+0.1)	10.2 (0)	10.2 (0)	10.0
계	49	50.3 (+1.3)	51.2 (+0.9)	52.4 (+1.2)	52.9 (+0.5)	52.9 (0)	52.5 (-0.4)	51.6
평균 ± 표준편차	9.8 ± 2.3	10.1 ± 2.4 (+0.8)	10.2 ± 2.5 (+0.1)	10.5 ± 2.4 (+0.3)	10.6 ± 2.5 (+0.1)	10.6 ± 2.4 (0)	10.5 ± 2.4 (-0.1)	10.8 ± 2.4

표 15. 아까시나무 개화기(5월) 양봉꿀벌의 봉군당 무게 평균

봉군	봉군당 무게(kg)							봉군당 무게평균
	5/2	5/7	5/12	5/17	5/22	5/27	6/1	
1	32.5	43.0 (+10.5)	47.8 (+4.8)	49.2 (+19.6)	56.3 (+7.1)	57.9 (+1.6)	60.9 (+3.0)	49.7
2	35.3	44.9 (+9.6)	45.9 (+1.0)	45.6 (+20.2)	52.9 (+7.3)	64.7 (+11.8)	68.3 (+3.6)	51.1
3	32.8	39.9 (+7.1)	41.6 (+1.7)	48.1 (+19.6)	62.4 (+14.3)	63.2 (+0.8)	60.7 (-2.5)	49.8
4	38.2	40.9 (+2.7)	40.4 (-0.5)	42.3 (+18.7)	54.7 (+12.4)	60.5 (+5.8)	58.4 (-2.1)	47.9
5	42.2	41.8 (-0.4)	43.0 (+1.2)	44.8 (+13.5)	50.7 (+5.9)	57.7 (+7.8)	60.4 (+2.7)	48.7
계	181	210.5 (+29.5)	218.7 (+8.2)	230.0 (+11.3)	277.0 (+47)	304.0 (+27)	308.6 (+4.6)	247.1
평균 ± 표준편차	36.2 ± 4.1	42.1 ± 1.9 (+5.9)	43.7 ± 3.1 (+1.6)	46.0 ± 2.7 (+18.3)	55.4 ± 4.4 (+9.4)	60.8 ± 3.1 (+5.6)	61.7 ± 3.8 (+0.9)	49.4 ± 1.2

표 16. 아까시나무 개화기(5월-6월) 재래꿀벌의 봉군당(5봉군) 측정시점별 봉군무게(증감정도)

봉군	봉군당 무게(kg)				봉군당 무게평균
	5/22	5/29	6/5	6/12	
1	10.8	11.5 (+0.7)	15.1 (+3.6)	14.7 (-0.4)	13.0
2	10.8	11.5 (+0.7)	13.8 (+2.3)	12.9 (-0.9)	12.3
3	7.6	8.2 (+0.6)	12.2 (+4)	12.4 (-0.2)	10.1
4	7.2	7.6 (+0.4)	9.8 (+2.2)	9.6 (-0.2)	8.6
5	7.9	8.4 (+0.5)	9.8 (+1.4)	9.5 (-0.3)	8.9
계	44.3	47.2 (+2.9)	60.7 (+13.5)	59.1 (-1.6)	52.8
평균 ± 표준편차	8.9 ± 1.8	9.4 ± 1.9 (+0.5)	12.1 ± 2.4 (+2.7)	11.8 ± 2.2 (-0.3)	10.8 ± 2.0

표 17. 아까시나무 개화기(5월-6월) 양봉꿀벌의 봉군당(5봉군) 측정시점별 봉군무게(증감정도)

봉군	봉군당 무게(kg)				봉군당 무게평균
	5/22	5/29	6/5	6/12	
1	31.6	34.3 (+2.7)	37 (+2.7)	35.2 (-1.8)	34.5
2	33.8	35.7 (+1.9)	36.9 (+1.2)	37.2 (+0.3)	35.9
3	32.8	32.7 (-0.1)	32.9 (+0.2)	30.2 (-2.7)	32.2
4	31.8	30.6 (-1.2)	30.1 (-0.5)	29.8 (-0.3)	30.6
5	32.0	31.7 (-0.3)	33.3 (+1.6)	34.5 (+1.2)	32.9
계	162.0	165.0 (+3.0)	170.2 (+5.2)	166.9 (-3.3)	166.0
평균 ± 표준편차	32.4 ± 0.9 (+3.2)	33.0 ± 2.0 (+0.6)	34.0 ± 2.9 (+1.0)	33.4 ± 3.2 (-0.6)	33.2 ± 2.1

(다) 재래꿀벌과 양봉꿀벌 채밀력 차이에 대한 논의 및 종합결론

- 본 연구에서는 주 채밀기(아까시나무 개화기)에 양봉꿀벌의 봉군무게가 재래꿀벌보다 크게 변동하는 것이 확인되어 상대적으로 양봉꿀벌이 재래꿀벌보다 높은 채밀력을 갖는 것으로 확인됨
- 재래꿀벌의 경우 낭충봉아부패병에 의한 봉군의 세력약화로 조사기간 동안 10.1~10.6kg으로 좁은 범위에서의 변동이 확인됨
- 이는 재래꿀벌 봉군의 세력이 일정한 수준에서 유지 또는 증가함에 따라 정상적인 채밀활동으로 나타난 결과로 판단됨
- 양봉꿀벌의 경우에는 아까시나무 개화기(5/12~17)에 각 봉군당 약 20kg까지 무게가 증가할 정도로 급격한 봉군무게 증가를 보였음
- 아까시나무 개화기(5/29~6/5)에 재래꿀벌의 채밀 증감률이 13kg 가까이 확인 되었으며, 반면 양봉꿀벌의 채밀 증감률은 5.2 kg정도로 확인됨
- 이는 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 벌통 크기 내 개체 수 차이 등에서 비롯되었을 것으로 추정됨

라) 채밀활동분석을 통한 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 시기 및 시간대별 채밀활동 특성차이 조사

(1) 연구방법

(가) 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 채밀활동분석(그림 9)

- 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 강원도 인제군 한계리에 설치한 각 3봉군을 이용해 채밀활동 특성차이 조사를 수행함
- 조사대상 봉군규모: 재래꿀벌 봉군(소비 4매 단상), 양봉꿀벌 봉군(16~17매 계상)
- 채밀활동 조사는 주 밀원인 벚나무 개화기와, 아까시나무 개화기 총 2회 실시함
- 계수기를 이용하여 05시부터 21시 사이에 조사대상 봉군에서 채밀 후 벌통으로 들어가는 개체수를 세어 채밀활동 특성차이 조사를 수행함(그림 9: 왼쪽사진)
- 재래꿀벌과 양봉꿀벌 중 첫 비행을 보인 시점을 기준으로 매시간별 10분 동안

을 조사단위로 설정함

- 천문우주지식포털(<https://astro.kasi.re.kr>)을 참고하여 조사당일 강원도 인제군의 공식 일출과 일몰시간을 확인함



그림 18. 채밀활동 특성조사

(왼쪽: 봉군 출입 개체수 확인, 오른쪽: 봉군 실내의 온도계 설치)

(나) 기온측정

- 꿀벌의 채밀활동과 기온과의 상관관계를 확인하기 위해 조사시간에 온도계를 재래꿀벌과 양봉꿀벌 봉군 외부에 설치하여 기온을 측정함(그림 18: 오른쪽사진)

(2) 연구결과

(가) 벚나무 개화기 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 채밀활동

- 벚나무 개화기 두 종의 시간대별 채밀활동패턴은 그림 19, 표 18과 같이 나타남
- 재래꿀벌은 05시20분, 양봉꿀벌은 05시28분에 첫 비행을 하여, 재래꿀벌이 양봉꿀벌보다 약 8분정도 일찍 채밀활동을 시작하는 것으로 확인됨
- 두 종 모두 일출(05:22) 후 기온이 오름에 따라 채밀활동이 증가하였으며, 14시경에 가장 높은 채밀활동량을 보임
- 봉군 크기에 따라 양봉꿀벌에서 더 많은 개체의 채밀활동이 확인되었지만, 두 종 모두 대체적으로 시간대별 유사한 채밀활동 패턴을 나타냄
- 두 종 모두 일몰(19:26) 후에는 비행을 시작했던 기온으로까지 떨어지기 전 19시50분경에 채밀활동을 중단하는 것을 보였으며(총 채밀활동시간: 14시간30분), 마지막 비행에 대한 종간 유의미한 차이는 보이지 않음

(나) 아까시나무 개화기 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 채밀활동

- 아까시나무 개화기 두 종의 시간대별 채밀활동패턴은 그림 20, 표 19과 같이 나타남
- 재래꿀벌은 04시55분, 양봉꿀벌은 05시05분에 첫 비행을 하여, 재래꿀벌이 양봉꿀벌보다 약 10분정도 일찍 채밀활동을 시작하는 것으로 확인됨
- 두 종 모두 일출 후 기온이 오름에 따라 채밀활동이 증가하였으며, 15시경에 가장 높은 채밀활동량을 보임
- 두 종 모두 일몰 후에는 비행을 시작했던 기온으로까지 떨어지기 전 20시10분경에 채밀활동을 중단하는 것을 보였으며(총 채밀활동시간: 14시간30분), 마지막 비행에 대한 종간 유의미한 차이는 보이지 않음



그림 19. 벌나무 개화기 재래꿀벌 및 양봉꿀벌의 시간대별 채밀활동

표 18. 벌나무 개화기(5월 10일) 시간대별 기온 및 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 봉군출입 개체수

시간	기온(C)	재래꿀벌 (평균 ± 표준편차)	양봉꿀벌 (평균 ± 표준편차)
5시	7.2	7.0 ± 3.6	1.7 ± 0.6
6시	8.4	3.3 ± 0.6	10.0 ± 1.0
7시	9.7	47.7 ± 47.1	18.7 ± 2.5
8시	18.5	180.7 ± 119.2	171.0 ± 40.1
9시	24.3	326.3 ± 162.1	481.3 ± 107.4
10시	27.1	495.0 ± 58.6	937.7 ± 48.0
11시	30.6	801.7 ± 63.1	1141.3 ± 114.5
12시	33.1	649.3 ± 85.6	1471.7 ± 32.1
13시	33.9	920.0 ± 83.5	1625.0 ± 36.5
14시	28	1145.3 ± 106.6	1991.0 ± 317.9
15시	26.4	690.3 ± 71.1	1364.7 ± 71.1
16시	24.8	380.3 ± 31.5	1186.7 ± 153.5
17시	23.1	263.0 ± 37.7	630.3 ± 112.5
18시	19.7	144.7 ± 58.1	366.7 ± 26.7
19시	18.3	2.3 ± 1.5	0.0 ± 0.0
20시	17.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

*각 시간별 50분부터 10분 동안 봉군에 출입하는 개체수를 세어 나타냄.

*각 종당 3봉군을 대상으로 함.



그림 20. 아까시나무 개화기 재래꿀벌 및 양봉꿀벌의 시간대별 채밀활동

표 19. 아까시나무 개화기(5월 29일) 시간대별 기온 및 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 봉군출입 개체수

시간	기온(C)	재래꿀벌 (평균 ± 표준편차)	양봉꿀벌 (평균 ± 표준편차)
5시	8.7	14.7 ± 11.2	5.3 ± 2.1
6시	8.9	32.7 ± 15.0	15.3 ± 3.1
7시	9.8	79.0 ± 15.7	128.7 ± 41.6
8시	15.3	105.3 ± 20.8	261.0 ± 37.6
9시	24.3	215.0 ± 58.7	460.0 ± 32.9
10시	28.2	313.3 ± 168.8	602.3 ± 90.0
11시	29.1	206.7 ± 58.3	686.3 ± 5.1
12시	31.2	204.3 ± 48.4	758.0 ± 58.6
13시	31.4	265.7 ± 95.7	845.3 ± 17.9
14시	31.5	340.3 ± 23.7	866.0 ± 11.1
15시	31.7	447.0 ± 27.9	1450.0 ± 130.2
16시	30.4	368.7 ± 7.6	1284.0 ± 102.4
17시	24.4	341.0 ± 61.1	1124.0 ± 169.7
18시	22.1	191.3 ± 18.9	882.7 ± 30.6
19시	21.2	106.7 ± 32.6	784.3 ± 33.5
20시	18.5	8.0 ± 2.0	6.3 ± 1.5
21시	17.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

*각 시간별 정각부터 10분 동안 봉군에 출입하는 개체수를 세어 나타냄.

*각 종당 3봉군을 대상으로 함.

(다) 재래꿀벌과 양봉꿀벌 채밀활동 차이에 대한 논의 및 종합결론

- 재래꿀벌과 양봉꿀벌에서는 대체적으로 유사한 채밀활동 특성차이를 나타냄
- 두 종 모두 일출 후 기온이 오름에 따라 채밀활동이 증가하여 14 또는 15시에 가장 높은 채밀활동량을 나타냄
- 두 종의 봉군규모를 감안하더라도 벚나무 개화기 조사에 비해 아까시나무 개화기에 재래꿀벌은 양봉꿀벌보다 비교적 낮은 채밀활동력을 보이는 것으로 확인됨(꽃에 대한 종간 선호도 차이에서 비롯된 결과로 판단됨)

마) 재래꿀벌이 선호하는 밀원에 대한 실험과 현장 조사를 통한 세밀한 분석: 주요 토종꿀 생산지에 식재된 주요 밀원식물 및 개화기 조사

(1) 연구방법

(가) 조사대상 지역선정

- 밀원식물 및 개화기 조사대상 지역은 강원도 인제군 한계리(그림 21)와 경기도 가평군 목동리(그림 22)로 총 2개의 한봉 지역을 선정하였으며, 해당지역에 있는 양봉장 기준으로 반경 2km 이내지역을 조사함
- 인제군은 전체 중 88%의 면적이 설악산 서쪽에 위치한 임야이고, 다양한 식생이 분포해있어 양봉에 지리적인 이점을 가진 곳임
- 특히, 인제군의 조사대상 지역은 최저 해발 고도가 최저 400m 내외인 고지대로, 최대 850~900m의 산이 있는 지리학적 특성을 나타냄
- 인제군의 조사대상 지역 기준점 주변으로는 벗나무, 돌배나무, 야광나무, 아까시나무, 피나무류(달피, 찰피 등), 음나무, 광대싸리와 같은 주요 밀원이 다수 분포하며, 그 외 재래꿀벌이 선호하는 초본성 밀원(물봉선, 산국, 향유, 배초향, 환삼덩굴, 개망초류)이 다양하게 서식함
- 가평군의 제2한봉 조사단지는 가평군의 동북 산간지역에 위치하며 단지 북쪽은 해발고도가 1,000m 이상의 높은 산과, 남쪽은 600~800m로 점차 낮아지는 지리학적 특성을 나타냄
- 특히, 가평군의 조사대상지는 화악산(1,468m) 인근지역으로 주변에 북배산(870m), 가덕산(858m), 수덕산(796m), 계관산(736m) 등과 같은 산지가 나타남
- 가평군의 조사대상지 기준점 주변으로는 아까시나무, 피나무, 헛개나무, 밤나무 등 주요 밀원이 다수 분포하며, 그 외 계곡부에는 고추나무, 괴불나무, 산딸기, 다래 등 보조밀원이 다양하게 서식함

(나) 조사대상 지역 주요 밀원식물 개화기 조사

- 본격적으로 밀원식물이 개화하는 4월부터 조사대상 지역 내 현장조사를 통해 주요 밀원의 개화기 시작과 끝을 기록하여 조사함
- 개화기가 조사된 밀원식물은 밀원과 화분으로 구분하여 표를 이용해 개화기를 제시함

(다) 조사대상 지역 주요 밀원식물 분포조사

- 먼저 대상지 주변에 대한 현장조사, 드론을 이용한 항공촬영, 주요 식물종의 임상도를 바탕으로 주요 밀원식물의 존재와 개화기를 파악함
- 개화기에 맞춰 드론을 이용해 주요 밀원식물 분포지역에 대해 집중적으로 항공영상(정사영상)을 확보함
- 추가적으로 도보, 차량을 이용한 육안조사를 통해 항공영상으로 식별이 어려운 관목성, 초본성 밀원식물의 분포를 추가적으로 확보함
- 밀원수가 주로 분포한 부분을 지도에 표시하여 밀원식물 분포도를 작성함

(라) 경계 설정 및 계획 수립 방법

- 양봉, 또는 토봉을 집중적으로 사육하는 농장 또는 부지를 중심지를 두고, 중심지를 기준으로 2Km의 반지름을 가지는 원을 그려 경계를 설정함
- 산림공간정보서비스(FGIS)를 통해 기존 조사 임상도를 확인하고, 구글 어스 및 국가공간정보포털, QGIS에서 제공하는 지도 db 등을 통해 지역의 산지 및 평지 등의 특성을 확인
- 구글 어스에서 가능한 최근 일자의 겨울 시기(11~2월)로 위성사진을 설정해 침엽수림의 면적을 확인 후 확인된 경계 내의 침엽수림은 포토샵이나 일러스트레이터를 통해 검은색으로 표시함
- 위성사진 및 기존 임상도를 바탕으로 조사가 가능하며 밀원식물의 분포가 예상되는 지역들을 선정하며, 각 지역에 대한 조사를 수행함. 조사 시기는 개화기에 맞추며, 보통 4월 초부터 15일 간격으로 9월까지 진행하는 것이 바람직함

(마) 드론 비행 및 촬영 방법

- 본 단계를 진행하기 전에, Pix4d, DJIgo, Pix4dcapture의 이용법 관련 설명서를 숙지가 필요함
- 산지가 많은 지역의 경우 경사가 급하거나 고도가 500m를 넘는 고지대의 경우는 충돌 및 추락의 위험이 높으므로 비행을 지양하며, 조사 대상 산지의 사면 200m 이내 거리에서 DJIgo와 같은 실시간 촬영 프로그램으로 촬영하여 영상으로 판독함. 산지의 정사영상이 필요할 경우에는 조사 목표 지역에서 일정 고도를 확보할 수 있는 지역 및 등산로를 확인한 뒤 충돌에 주의하며 촬영을 진행하였음
- 드론은 Pix4d를 지원하며, 비행시간이 최소 20분 이상이며 배터리 교체가 가능한 모델을 선택함. 드론에 부착된 카메라는 1200만화소 이상인 것을 선택하고 완제품을 구매할 경우 DJI사의 매빅 2 또는 팬텀 4 이상이 적절함
- 스마트폰에 Ctrl+DJI 앱(드론과 Pix4d 이용 스마트폰의 연동 어플) 과 Pix4dcapture를 설치함
- Ctrl+DJI앱에 드론을 연동하고, Pix4dcapture를 실행함
- 실행 후 Grid Mission을 실행함. 드론의 비행 설정 고도는 90~120m를 권장하며, 비행 범위는 디스플레이에 표시된 사각형의 동선을 조정함. 사각형 동선은 비행 시작점(start)가 조종자에 최대한 가깝게 맞추고, 비행 시작점과 주변 지역과의 고도를 고려하여 드론이 산 사면이나 자연물에 충돌하지 않게 지역을 설정함. 비행 동선의 총 시간은 이용 드론의 최대 배터리 이용 시간보다 적어도 5분 이상 적게 하였음 (ex. 제원상 28분 비행 가능 --> 20분 이내 동선 활용)
- 촬영 설정은 톱니바퀴 모양을 누르면 나타나는데, 속도는 Fast로 맞추고, angle은 최대한 vertical로, overlap은 low(70%), face는 forward로 설정함
- 프로젝트를 저장하고 뒤로가기를 눌러서 메인으로 돌아온 뒤, Project list에서 저장된 파일을 클릭함
- Open을 누른 뒤, 우측 하단의 start 버튼을 눌러 비행을 시작함
- 드론이 도착하여 출발점으로 돌아오면 배터리를 교체하고 촬영 자료를 확인한 뒤, 다음 대상지를 촬영함
- 드론 조사를 통해 확인된 밀원은 가까운 시일 내에 기록하고, 주기적으로 임상도에 업데이트함

(바) 차량조사 방법

- 조사 대상지 내의 주요 도로를 확인함
- 차량으로 이동할 수 있는 조사대상지 주요 도로를 모두 포함하는 주행 코스로 설정함
- 차량 내에서 판독이 가능한 길가의 초본류나 개화한 목본류의 경우 그때그때 기록하며, 동정이 어려울 경우에는 일부를 채집하여 추후 동정함. 초기 조사에서는 샛길 및 차량이 다닐 수 있는 임도를 추가로 확인하고, 도로 주변의 밀원 식물 환경에 따라 동선에 추가하거나 제외하였음
- 차량 조사를 통해 확인된 밀원은 가까운 시일 내에 기록하고, 주기적으로 임상도에 업데이트함

(사) 이미지 합성 및 정사영상 제작

- 본 단계를 진행하기 전에, Pix4d, DJIgo, Pix4dcapture의 이용법 관련 설명서를 숙지한 뒤에 수행함
- 프로그램 실행 후 새 프로젝트를 클릭하여 저장위치를 설정한 뒤 드론으로 촬영한 사진을 삽입함
- 이미지 속성, 출력 좌표계 부분을 기본 설정으로 설정함
- 처리 옵션 템플릿은 3D maps로 하고 처리를 시작함
- 처리가 완료된 오쏘모자이크 이미지는 저장 파일 위치에서 확인할 수 있음
- 얻어진 오쏘모자이크 이미지를 기존 차량 조사, 드론 조사 사진들과 비교하여 판독된 밀원식물 면적에 색을 입혀 표시함

(아) 임상도 제작

- (라)에서 얻은 침엽수가 표시된 조사 대상지의 위성 지도를 이용함
- 드론을 이용한 오쏘모자이크 이미지에서 판독된 밀원식물을 위의 이미지에 개별적인 색으로 겹쳐서 표시함. 이때, 겹쳐서 표시한 면적이 표시가 어려울 정도로 좁을 경우 주변 밀원의 표시가 겹치지 않는 선에서 다소 넓게 표시함
- 차량 조사에서 판독된 산 사면과 도로 주변의 밀원식물을 위의 이미지에 개별적인 색으로 겹쳐서 표시함. 이때, 겹쳐서 표시한 면적이 표시가 어려울 정도로 좁을 경우 주변 밀원의 표시가 겹치지 않는 선에서 다소 넓게 표시함

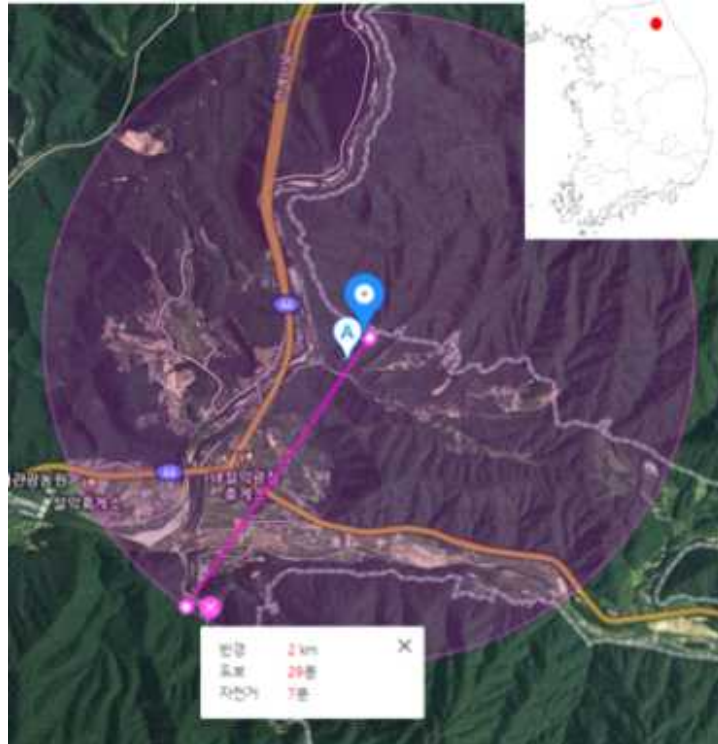


그림 21. 밀원식물 및 개화기 조사를 위해 선정된 연구대상지
(강원도 인제군 한계리)

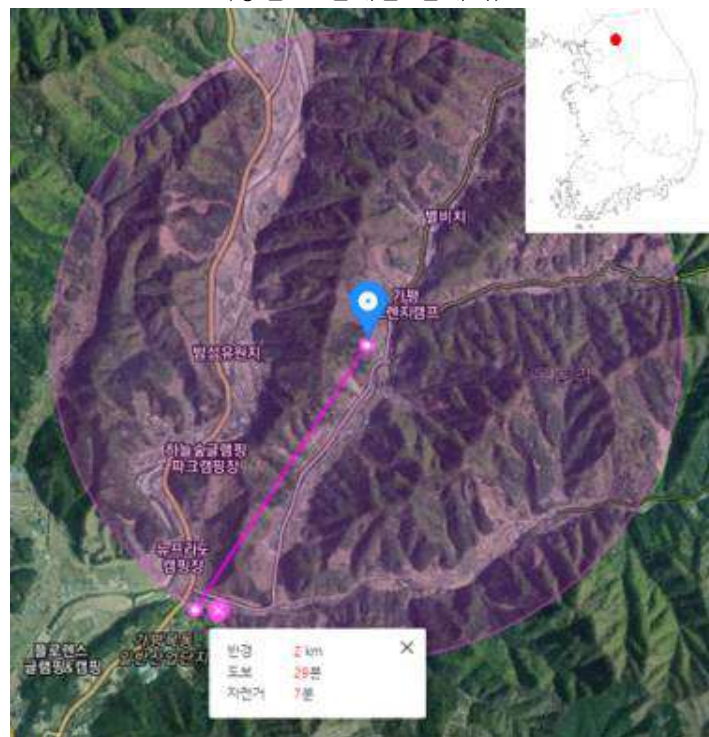


그림 22. 밀원식물 및 개화기 조사를 위해 선정된 연구대상지
(경기도 가평군 목동리)

이용 기기

- * DJI Mavic 2 Zoom (그림 23)
 - 1/2.3inch 센서 카메라, 1200만 화소, 영상 4K 30P까지 촬영 가능
 - 905g, 접이식, 비행시간 최대 31분(실사용 기준25분)
 - 카메라: 광학 2배, 디지털 2배줌 가능, 이미지 합성 지원(파노라마, 고화질 사진)
 - 최대범위 8Km (실사용시 도심지 1~2km, 산지 3km)



그림 23. Mavic 2 Zoom

이용 프로그램(그림 24)

- * Dji go
 - DJI 드론 기본 제공 비행 보조 시스템
 - 기본적인 촬영~파노라마, 타임랩스, 웨이포인트 등 다양한 동작 수행 가능(그림 5)
 - * Qgis
 - 공간정보(GIS)의 분석에 쓰이는 오픈소스 GIS 소프트웨어
 - 개발자들이 게시한 플러그인들을 적용, 국내 지도 확인 및 면적, 위치 등의 분석 가능
 - * Pix4D
 - 정사영상및 3D 지도 작성 소프트웨어
 - 다양한 방법으로 대상 지역의 정보 추출 가능
- 본 연구에서는 주로 정사영상 촬영용으로 이용함(그림 6)



그림 24. DJI go, Qgis, Pix4d



그림 25. DJI go의 기본 인터페이스



그림 26. Pix4d를 이용한 정사영상 촬영 코스 설정과, 실제 촬영된 정사영상을 지도에 겹친 모습
 * 산림청 산림공간정보서비스(FGIS 제공)
 - 국내 전역의 임상 및 조림지 등의 지역 정보 제공(본 연구에서는 임상도 중 일부만 참조)

그림 27. FGIS로 확인한 연구 대상지의 수종별 임상도와 범례



그림 27. FGIS로 확인한 연구 대상지의 수종별 임상도와 범례

(2) 연구결과

(가) 연구대상지 1. 강원도 인제군 한계리

① 조사대상 지역(강원도 인제군 한계리) 주요 밀원식물 개화기

- 본 연구에서는 연구조사 대상지에서 나타나는 주요 밀원식물의 개화기를 파악하기 위해 2019년 4월~10 /2020년 4월~10월/2021년 7월까지 현장조사를 실시함
- 총 51종(목본: 30종, 초본: 21종)의 밀원식물을 확인하였으며, 그 개화시기를 표 20에 나타냄
- 시기별 주요 밀원식물로는 벚나무(4/20~5/10), 아까시나무(5/19~6/1), 밤나무(6/15~7/10), (찰)피나무(6/22~7/20), 배초향(9/1~9/20), 산국(10/6~10/25)가 나타남

② 조사대상 지역(강원도 인제군 한계리) 주요 밀원식물 분포조사

- 12회에 걸쳐 조사가 이루어졌으며, 드론 촬영의 경우 8번의 조사에서 3,500여장의 사진을 합성하여 정사영상을 제작함(그림 28)
- (1차: 19년 4/15; 2차: 5/03; 3차: 5/10; 4차: 5/28; 5차: 6/24, 6차: 20년 4/30, 7차: 5/29, 8차: 6/23, 9차: 7/8, 10차: 8/20, 11차: 9/16, 12차: 21년 4/20)
- 기준점을 중심으로 정사영상을 획득함
- 일부 지역은 차량 등을 이용, 현지 조사를 수행함

표 20. 강원도 인제군 한계리 주요 밀원식물 개화기

밀원식물	4월			5월			6월			7월			8월			9월			10월			
	1-10	11-20	21-30	1-10	11-20	21-30	1-10	11-20	21-30	1-10	11-20	21-30	1-10	11-20	21-30	1-10	11-20	21-30	1-10	11-20	21-30	
생강나무	4/1	4/20																				
매실나무	4/3	4/17																				
개살구	4/4	4/24																				
울벚나무		4/11	4/25																			
산벚나무		4/18	4/30																			
앵두나무		4/18	4/30																			
(산)들배나무	4/20		5/9																			
조팝나무	4/18		5/5																			
(기타)벚나무류	4/20		5/9																			
분꽃나무		4/27		5/11																		
야광나무		5/2	5/16																			
고추나무		5/2		5/25																		
애기똥풀(화분)			5/20		6/13																	
신갈나무(화분)			5/12		6/7																	
신나무			5/16	5/31																		
참나무류(화분)	5/3																					
아까시나무			5/19		6/1																	
구절초				5/29																		
클로버				5/29																		
영경귀				5/29																		
사위질빵				5/22	6/3																	
고광나무				5/22	6/1																	
짚레(화분)				5/22	6/8																	
국수나무(화분)				5/26	6/10																	
다래(화분)				6/1	6/15																	
밤나무				6/15	7/10																	
대추나무				6/23																		
왜당귀				6/24																		
개망초				6/15	7/20																	
옥수수(화분)				6/15																	9/21	
찰피나무				6/22	7/5																	
달피나무				7/1	7/20																	
싸리류						7/13		8/30														
붉나무						7/17											9/17					
해바라기						7/17																9/30
쉬나무						7/27		8/15														
음나무						8/7		8/27														
향유								8/30														9/30
가죽나무								8/20														
두릅나무								8/20														
물봉선																	9/5					10/16
배초향																	9/1	9/20				
들깨																	9/16					
환삼덩굴																	9/16					
이고들빼기																	9/16					
고마리																	9/16					
개여뀌																	9/16					
갈퀴나물																	9/16					
개썩부쟁이																	9/16					10/20
미국썩부쟁이																	9/16					10/20
구절초																						
산국																						10/23
																						10/6
																						10/25

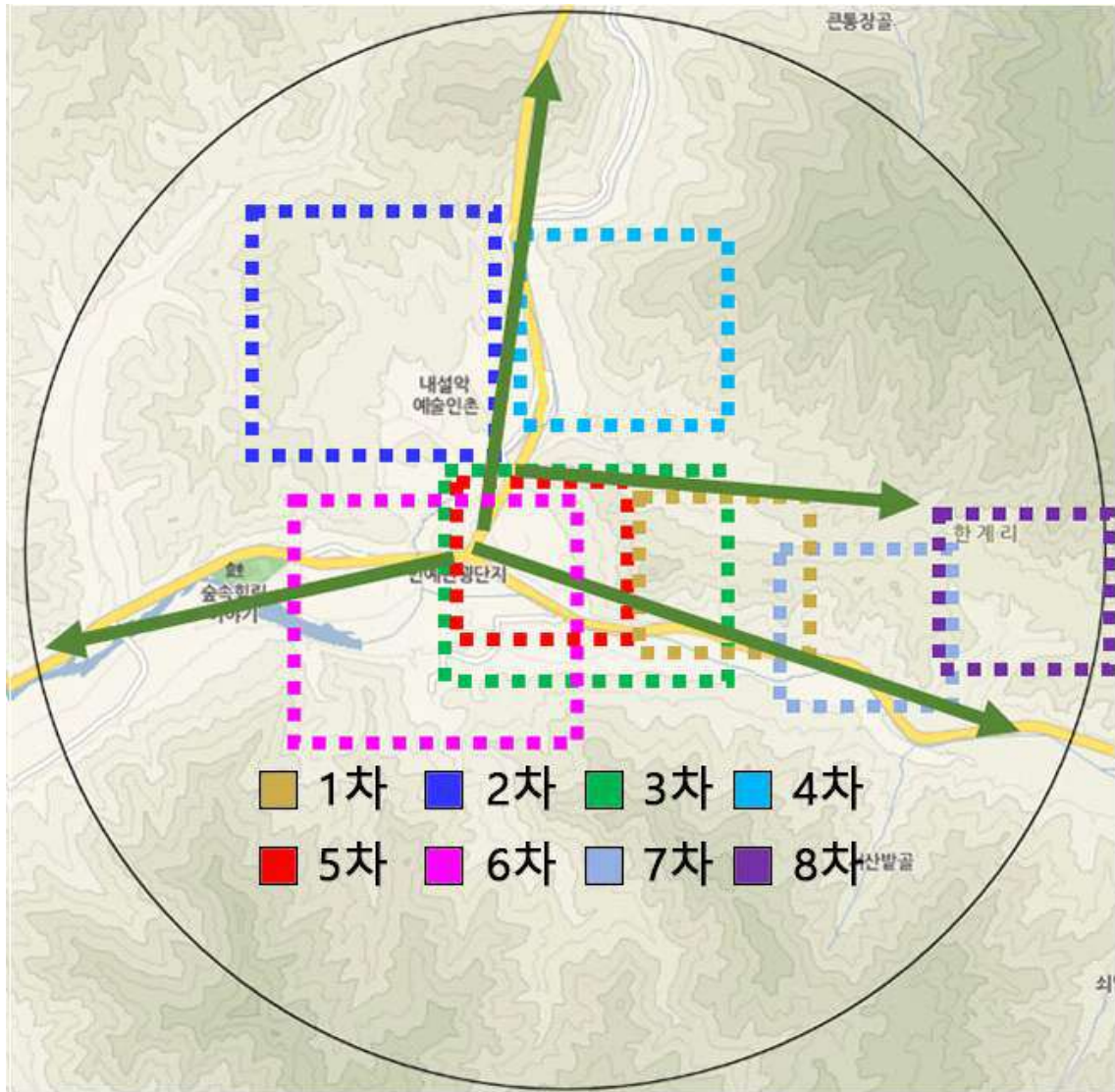


그림 28. 연구 대상지(강원 인제군 한계리) 차수별 항공촬영 및 차량조사 동선
(봉장 중심점 기준 반경2km내. 점선(사각형): 차수별 항공촬영 장소. 화살표: 주요 차량조사)

1차: 2019/4/15 (침엽수 범위 확인)(그림 29, 30)

- 대상지에 신초 발생 및 개화가 활발하지 않음
- 침엽수림 범위 인식, Qgis에서 위성지도와 합성하여 면적 산출 시험
- Google earth를 이용, 연구 대상지의 침엽수림 분포 확인

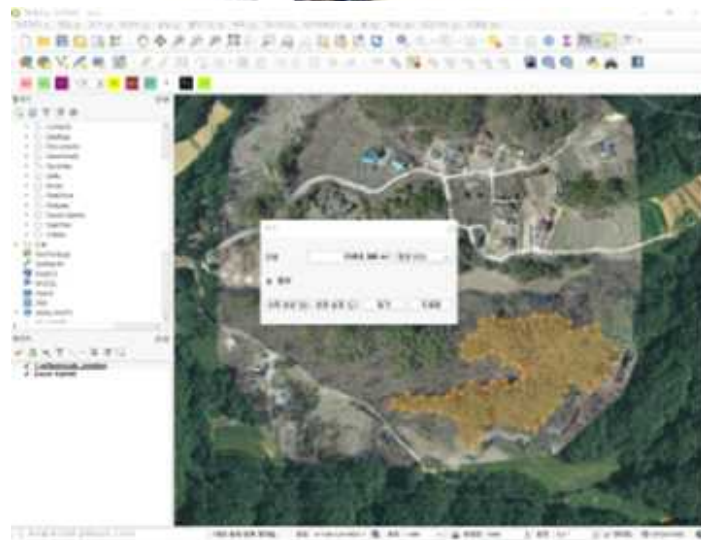


그림 29. 1차 조사로 얻어진 정사영상과 Qgis를 이용한 면적 계산



그림 30. Google earth(2017.11 위성지도)를 기반으로 한 소나무류 식물 분포도
(왼쪽부터; 위성지도-분포도-위성지도와 분포도의 합성)

- 2차: 2019/5/03 (벗나무류, 참나무류 식물 분포 확인)(그림 31, 32)
- 대상지의 참나무류 식물을 중심으로 신초 발생 확인
 - 참나무류 식물의 경우 대상지 주변 산지에 넓게 분포
 - 벗나무류 식물의 경우 모여있지 않고, 대부분 1~2그루 단위로 분포

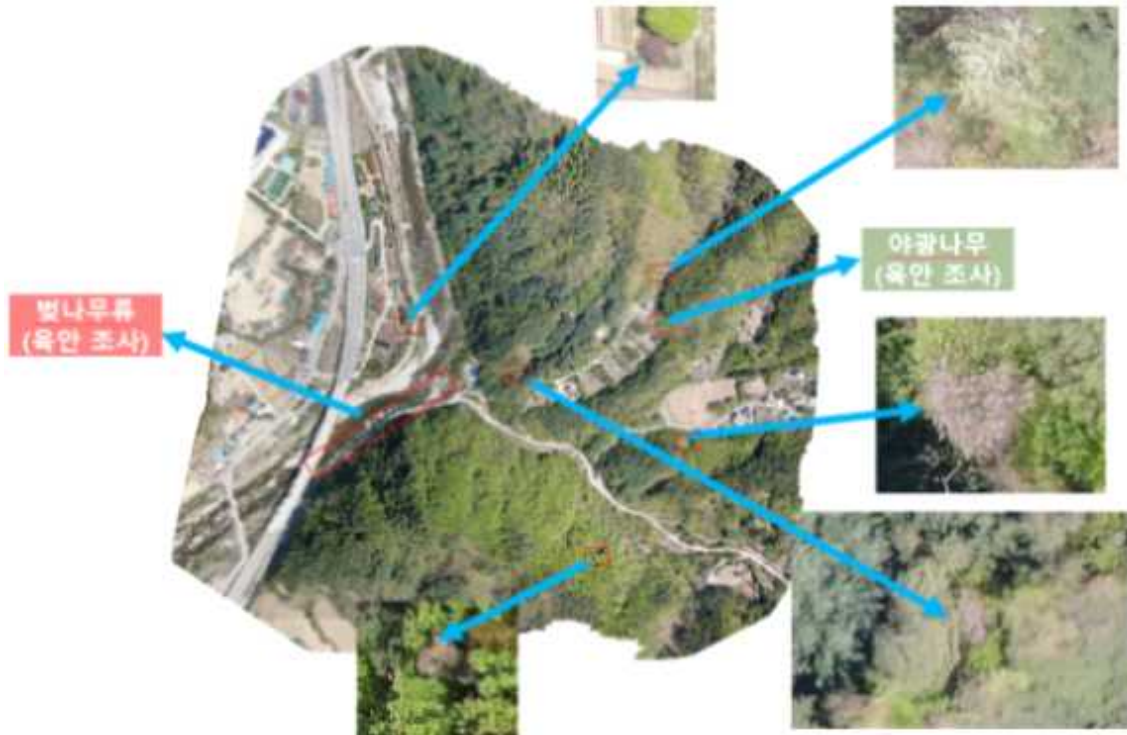


그림 31. 2차 조사로 얻어진 정사영상 내의 벗나무류 밀원식물 분포 현황1

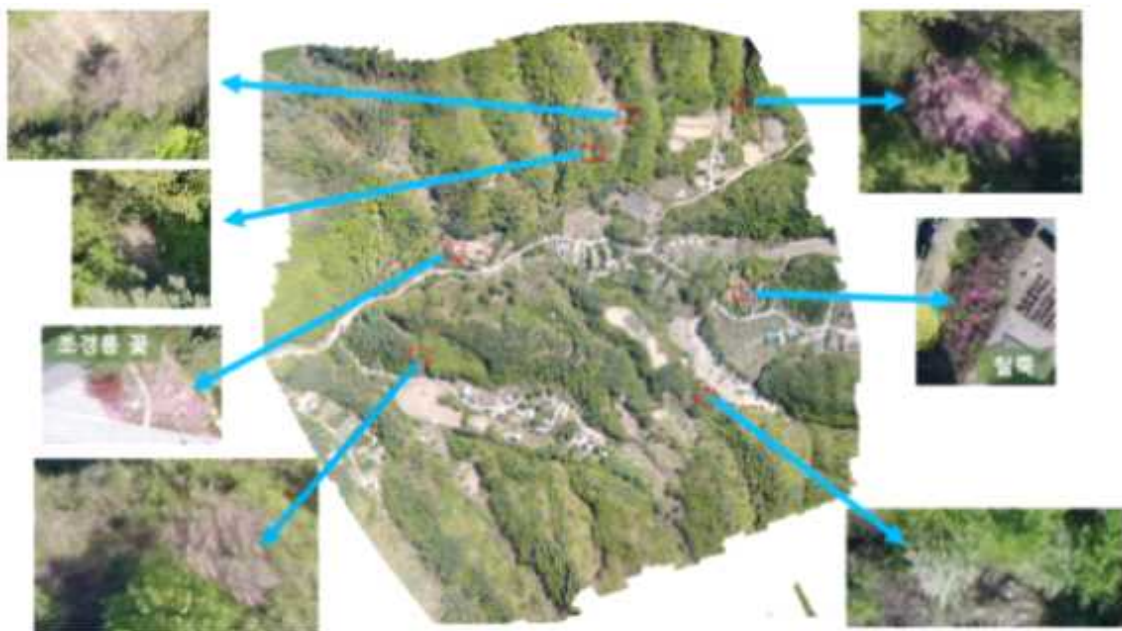


그림 32. 2차 조사로 얻어진 정사영상 내의 벗나무류 밀원식물 분포 현황2

3차: 2019/5/10 (참나무류 등 화분원 식물 분포 확인)(그림 33, 34)

- 대상지 기준점 뒤쪽의 산을 중심으로 조사 진행
- 소나무류 (Pinus sp.), 단풍류 (Acer sp.), 참나무류 (Quercus sp.)가 대부분
- 소나무류 식물의 경우 어두운 녹색으로, 참나무, 단풍나무류는 연두색으로 관찰됨
- 대상지 기준점 인근 조팝, 야광나무 개화
- 정사영상 외에 드론을 이용한 탐사로도 밀원수 확인



그림 33. 3차 조사에서 얻어진 정사영상



그림 34. 정사영상 일부의 확대 모습

4차: 2019/5/28 (아까시나무 분포 확인)(그림 35, 36)

- 내설악예술인촌 중심 저지대(해발250~350m) 및 뒤쪽 산을 중심으로 조사
- 아까시나무 및 늦봄~초여름 개화하는 밀원식물 확인 목적
- 아까시나무 개화를 다수 확인했으나, 판독 가능한 해상도로 촬영되지 못함
- 내설악예술인촌 뒤쪽 산의 임도를 따라 국수나무 다수 발견



그림 35. 조사 대상지 인근 언덕에서 확인된 아까시나무(붉은 화살표)



그림 36. 4차 조사 결과 얻어진 정사영상과 아까시나무 분포 지역 확인시 고려 사항

5차 2019/6/24 (밤나무, 피나무 분포 확인)(그림 37, 38)

- 기준점 주변 지역에 대한 정사영상 획득
- 밤나무, 피나무 등 초여름 개화하는 밀원식물 확인 목적
- 외곽 지역을 차량으로 이동하며 밤나무, 피나무의 분포 확인
- 피나무의 경우 북쪽 사면을 중심으로 분포하며, 정사영상 상에서는 구분이 잘되지 않음. 측면에서 촬영 시 다소 밝은색으로 관찰됨
- 밤나무의 경우 기준점 동쪽에서 다수 발견되었으며, 노란색으로 관찰됨



그림 37. 5차 조사시 찍힌 정사영상과 판독된 피나무. 피나무는 다소 밝은 색으로 나타남



그림 38. 5차 조사시 찍힌 정사영상과 판독된 밤나무. 밤나무는 노란색으로 나타남

6차 2020/4/30 (벚나무, 산돌배나무 및 기타 봄철 밀원 확인)(그림 39~43)

- 1차년도에 조사가 미흡했던 시가지를 중심으로 조사
- 벚나무, 산돌배나무, 철쭉 등 봄에 확인 가능한 밀원 확인 목적
- 주요 도로를 중심으로 산지 사면 및 도로 주변의 밀원수 조사
- 철쭉, 꽃잔디, 산돌배나무가 주로 확인되었으며, 벚나무 또한 중심지 주변에서 다수 확인
- 산괴불주머니 등 초본성 식물의 분포 또한 확인

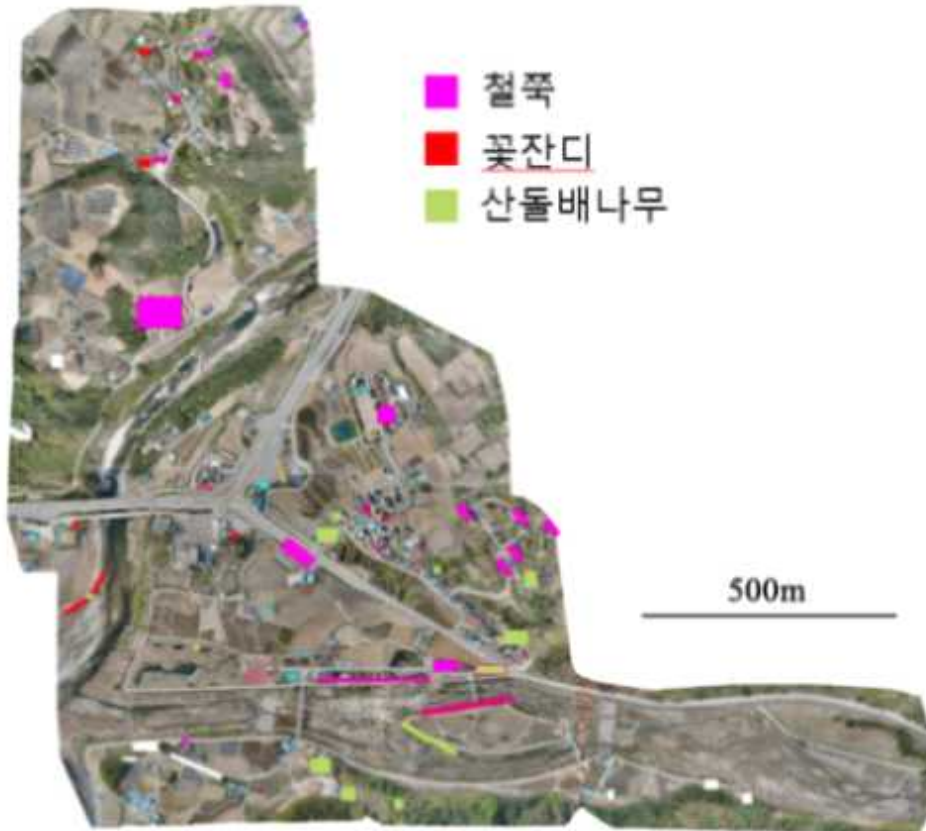


그림 39. 6차 조사시 찍힌 정사영상과 판독된 밀원식물



- 벚나무류
- 산돌배나무
- 조팝나무
- 꽃잔디
- 개나리

그림 40. 6차 조사시 차량조사를 통해 판독된 밀원식물 (조사중심지 주변)



그림 41. 6차 조사시 차량조사를 통해 판독된 밀원식물 (조사지 북부)



■ 벚나무류

그림 42. 6차 조사시 차량조사를 통해 판독된 밀원식물 (조사지 서부)



그림 43. 6차 조사시 차량조사를 통해 판독된 밀원식물 (조사지 동부)

7차 2020/5/29 (아까시나무 및 늦봄 밀원 확인)(그림 44)

- 4차 조사시 판독에 어려움이 있던 아까시나무 중심 조사
- 주요 도로를 중심으로 산지 사면 및 도로 주변의 밀원수 조사
- 정사영상은 기존 자료 이용, 소규모 지역 대상 저공비행을 통해 보다 정확한 자료 획득
- 아까시나무가 잘못 판독되었거나 판독되지 않은 지역 확인, 밀원 분포 해상력 증가
- 구절초 등 초본성 식물의 분포 또한 확인



그림 44. 7차 조사시 차량조사를 통해 판독된 밀원식물

8차: 2020/6/23 (밤나무류 밀원 추가조사 및 임상도 수정)(그림 45~46)

- 기존에 조사되었던 밤나무류의 분포 재조사
- 내설악예술인촌 주변 중심으로 차량조사
- 조사대상지 남부를 중심으로 드론조사 수행. 경작지, 초지 및 구분
- 밤나무류가 식재된 면적 일부를 추가 확인하여 임상도에 반영

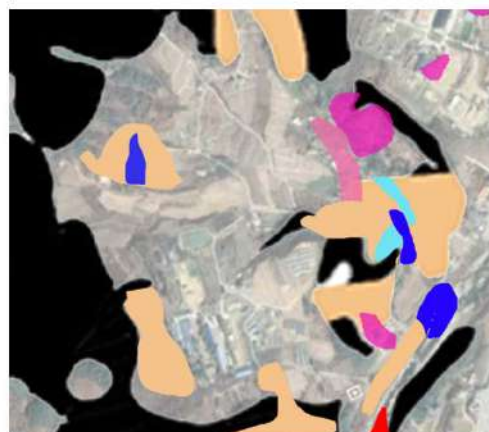


그림 45. 8차 조사시 차량조사를 통해 판독된 밀원식물

9차: 2020/7/8 (피나무류 및 기타 초본성 밀원 확인)(그림 47)

- 도로를 중심으로 조사 대상지 전체에 대한 피나무류 식물 조사, 추가 확인
- 연구중심지 및 조사대상지 북부의 산 사면 및 도로 주변을 따라 찰피나무, 피나무 등의 수종 확인
- 추가 조사된 피나무류 식물의 분포를 기반으로 임상도 일부 수정
- 망초류, 클로버 등의 조사 및 확인



그림 46. 8차 조사시 드론조사를 통해 제작된 정사영상



그림 47. 연구중심지(붉은 별표) 주변의 재조사를 통한 피나무(흰색)의 수정
(좌: 수정전. 우: 수정후)

10차: 2020/8/20 (두릅나무, 엄나무류 및 망초, 들깨, 칩, 환삼덩굴 등 초본성 밀원 확인)(그림 48)

- 차량조사를 통해 경작지에서 감자, 들깨, 참깨 등의 초본류 작물을 재배하는 것을 확인함
- 산지 및 임도 주변으로 칩류 및 환삼덩굴, 사위질빵의 개화를 확인
- 두릅나무, 엄나무류 식물의 조사지 주변 식재 확인
- 붉나무류 식물의 추가 조사 및 임상도 반영

11차: 2020/9/16 (들깨, 쑥부쟁이 등 초본성 밀원 확인)

- 늦여름에 개화하는 두릅나무 및 엄나무류의 조사
- 들깨, 참깨류, 옥수수 등 밀원으로 기능하는 작물의 개화 또는 재배 확인
- 들깨, 참깨류는 벼과 식물보다는 경작 면적이 적었지만, 조사지 내 여러 지역에서 발견됨
- 초지에서 망초, 쑥부쟁이 등의 초본류 확인



그림 48. 조사지에서 발견된 개화 상태의 두릅나무(좌) 및 사위질빵(우)

12차: 2021/4/20 (봄철 벚나무 추가조사)(그림 49)

- 대상지 동부 경계선의 벚나무류, 배나무류 식물 확인
- 홍벚나무, 왕벚나무 등 다양한 벚나무류 식물 확인
- 산돌배나무류의 식재지 확인



그림 49. 조사지 동부 외곽의 벚나무류(분홍색)와 산돌배나무류(녹색)

- ③ 주요 토종꿀 생산지에 식재된 주요 밀원식물 및 개화기에 대한 논의 및 종합결론
- 연구 대상지인 인제군 한계리는 사전 연구지인 서울대학교 관악캠퍼스보다 약 15~20일정도 늦은 개화기를 보임
 - 대상지의 기준점 부근으로 다양한 밀원식물과 화분원 식물이 분포하고 있으며, 기준점에서 1km 이상 벗어난 외곽부에서도 밤나무, 피나무, 아까시나무 등의 주요 밀원 식물을 확인할 수 있었음
 - 아까시나무, 피나무, 밤나무 등은 현지 조사 결과 균락으로 보이는 부분이 관찰되었음
 - 벚나무류 식물은 넓은 면적을 점유하는 경우가 적었으며, 1~2그루가 낮은 밀도로 분포하거나, 도로 주변에 조경수 등으로 식재되어 있는 경우가 많았음
 - 침엽수(주로 소나무, 잣나무류)는 산의 사면을 따라 널리 분포하고 있었음
 - 화분원 식물(주로 참나무류) 또한 산의 사면 및 정상 부근에 넓게 분포하는 것이 확인됨
 - 2차년 본 조사를 통한 자료 보강 결과 초본성 밀원 식물에 대한 자료를 추가하였으며, 아까시나무 등 주요 밀원수에 대한 정사영상에서의 판독을 보완함
 - 3차년도 조사에서 밤나무, 피나무, 엄나무 등 늦봄~여름의 주요 밀원수 등에 대한 해상도 및 초본성 밀원 식물을 대상으로 한 추가 조사 수행

- 밤나무류, 피나무류의 군집을 추가 확인하였으며, 그 외 산돌배나무, 벗나무 등도 일부 조사가 미흡한 지역에서 새로이 발견됨
- 칩, 환삼덩굴, 사위질빵 등의 개화가 3년차에서 새로 확인되었으며, 붉나무류 식물도 일부 자생이 확인됨
- 늦여름~가을철에 개화 및 수확이 이루어지는 들깨, 참깨, 옥수수류 등 밀원으로 쓰일 수 있는 작물들이 조사지 내의 여러 농지에서 재배되고 있는 것이 확인됨
- 결론적으로, 연구 대상지인 인제군 한계리에는 다양한 밀원 식물과 화분원 식물이 존재하여 양봉에 이상적인 환경을 갖추고 있다고 볼 수 있음

④ 조사대상 지역(강원도 인제군 한계리) 주요 밀원수 구획도(그림 50)

- 봉군 설치 지점 인근(그림: 노란색): 피나무, 아까시나무, 벗나무, 야광나무, 옹나무류 등 다양한 밀원수가 확인됨
- 화분원(그림: 초록색): 화분식물로 이용이 가능한 참나무류 식물이 활엽수의 대다수를 차지함
- 일부 단풍나무류 및 기타 활엽수류 식물이 밀원수로 기능할 수 있으나, 소수 개체가 흩어진 형태로, 본 연구에서 정확한 수종은 확인되지 않음
- 마을, 작물 재배지(그림: 주황색): 아까시나무, 밤나무 등 일부 주 밀원식물이 확인됨
- 민가 도로변(그림: 붉은색): 철쭉, 꽃잔디 등의 조경식물 및 산돌배나무 등 밀원식물이 확인됨. 늦여름~가을에는 참깨, 들깨, 옥수수 등의 밀원 작물의 재배가 관찰되었음



그림 50. 조사 결과를 바탕으로 한 강원도 인제군 한계리 주요 밀원수 분포 구획도

⑤ 조사대상 지역(강원도 인제군 한계리) 주요 밀원수 분포도(그림 51~52)

- 강원도 인제군 한계리에서 조사된 주요 밀원식물의 분포는 그림 52와 같음
- 1차년도 연구는 밀원 또는 화분원으로 이용가능한 5종의 주요 식물과 침엽수림에 대한 분포를 나타냄
- 2차년도 연구는 12종의 식물종에 대한 분포 자료를 제공하며, 기존 조사된 밀원식물에 대한 해상력을 높이고, 초본성 밀원에 대한 추가조사로 더 자세한 밀원 정보를 담음
- 최종적으로, 14종의 식물종에 대한 분포 자료를 제공하고, 기존 조사된 밀원식물의 분포 양상을 재확인했으며, 밀원으로 기능할 수 있는 작물이 재배되는 지역을 추가적으로 기록하여 좀 더 폭넓은 환경 요인 고려가 가능하게 함

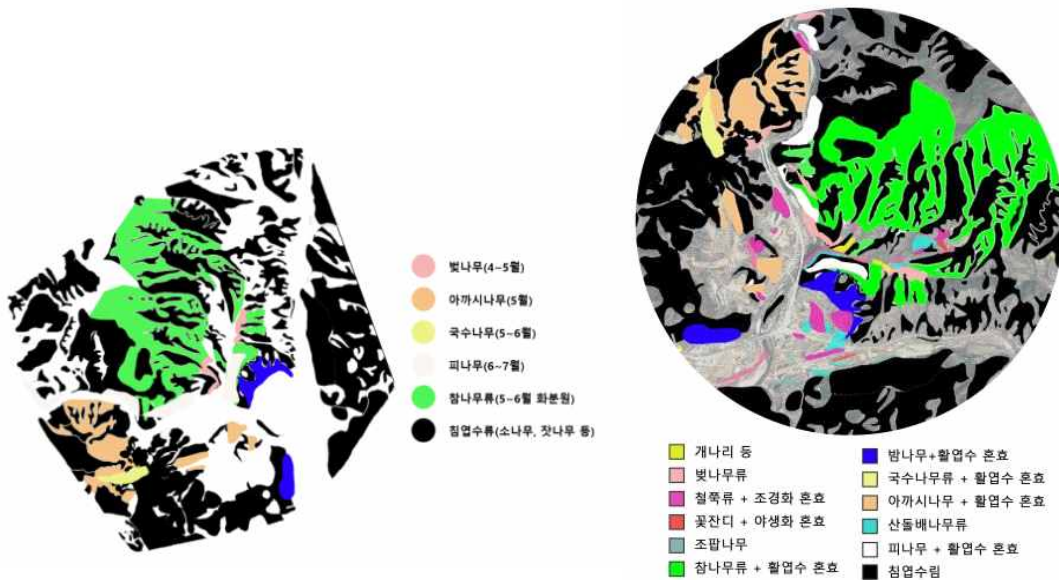


그림 51. 1~2년차 결과를 바탕으로 한 강원도 인제군 한계리 주요 밀원수 분포도 (상: 1년차 결과(1~5차 조사); 하: 2년차 결과(1~7차 조사))

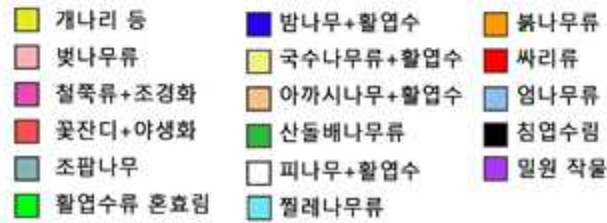
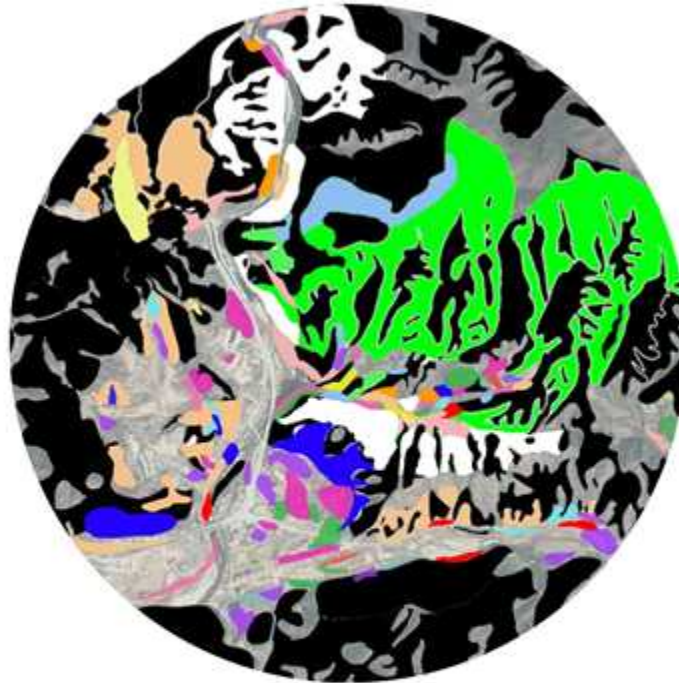


그림 52. 3년차 결과를 반영한 강원도 인제군 한계리 주요 밀원수 분포도

(나) 연구대상지 2. 경기도 가평군 목동리

① 조사대상 지역(경기도 가평군 목동리) 주요 밀원식물 개화기

- 본 연구에서는 연구조사 대상지에서 나타나는 주요 밀원식물의 개화기를 파악하기 위해 2020년 4월~10월까지 현장조사를 실시함
- 총 32종(목본: 23종, 초본: 9종)의 밀원식물을 확인하였으며, 그 개화시기를 표 21에 나타냄
- 시기별 주요 밀원식물로는 벃나무(4/21~5/10), 아까시나무(5/21~6/10), 밤나무(6/11~6/30), 모감주나무(7/1~7/20), 배초향(10/1~10/20), 산국(10/1~10/30)가 나타남



표 21. 경기도 가평군 목동리 주요 밀원식물 개화기

- ② 조사대상 지역(경기도 가평군 목동리) 주요 밀원식물 분포조사(그림 53)
- 총 6회의 조사가 이루어졌으며, 주요 도로를 중심으로 한 차량 조사와 함께, 4회에 걸쳐 2,000여장의 사진을 촬영 및 합성하여 정사영상을 제작함
 - (1차: 20년 5/8; 2차: 5/28, 3차: 6/22, 4차: 7/9, 5차: 9/15, 6차: 10/23)
 - 기준점을 중심으로 정사영상을 획득함
 - 일부 지역은 차량 등을 이용, 현지 조사를 수행함

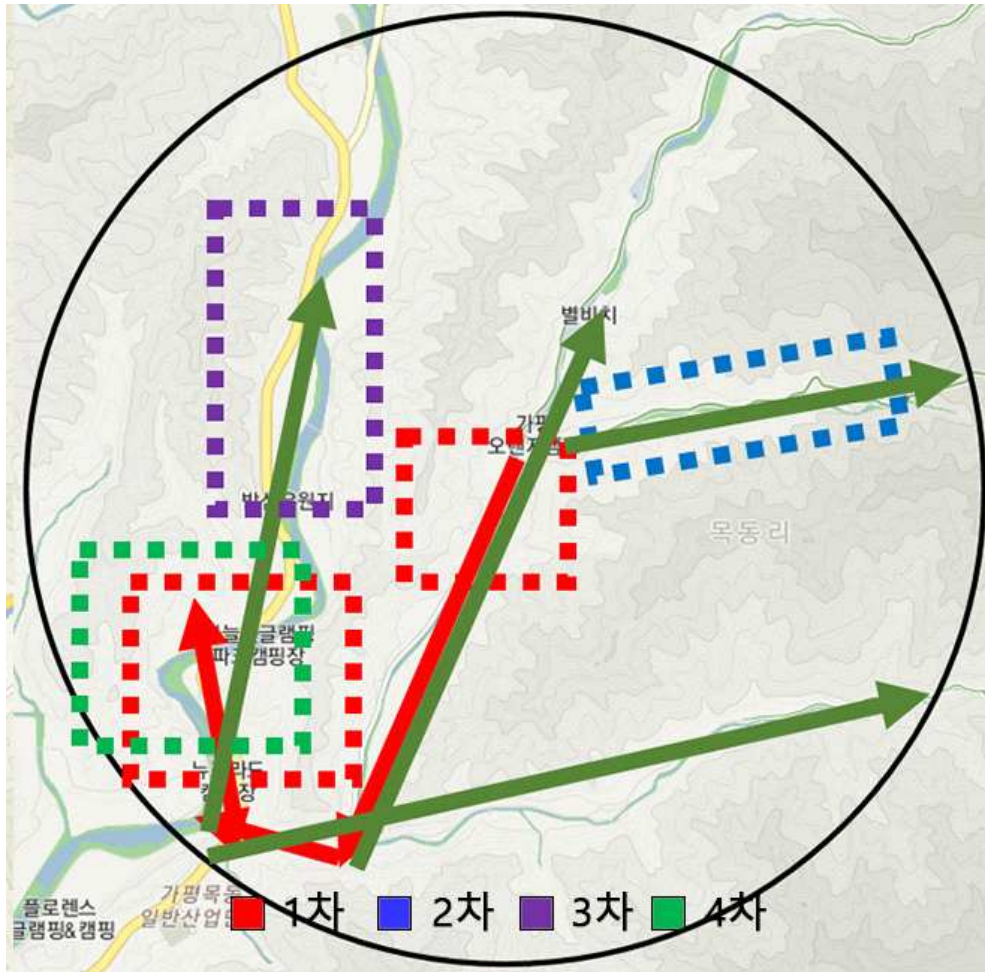


그림 53. 연구 대상지(경기도 가평군 목동리) 차수별 주요 항공 및 차량조사구역 (봉장 중심점 기준 반경2km내. 점선(사각형): 차수별 항공촬영 장소. 화살표: 주요 차량조사)

1차: 2020/5/08 (지형 파악, 봄철 개화 확인)(그림 54)

- 벚나무류 식물은 개화기가 끝난 상태로, 촬영 시 인식 잘 안됨
- 철쭉, 꽃잔디 등의 조경식물과, 고추나무류 식물이 주로 확인됨
- 드론으로 확인이 어려운 애기똥풀 등의 초본류 식물 확인
- 조사지 중심지에서 개화가 되지 않은 엄나무, 매실 등의 식재 확인

- 고추나무
- 철쭉
- 애기똥풀
- 매실나무
- 엄나무
- 꽃잔디



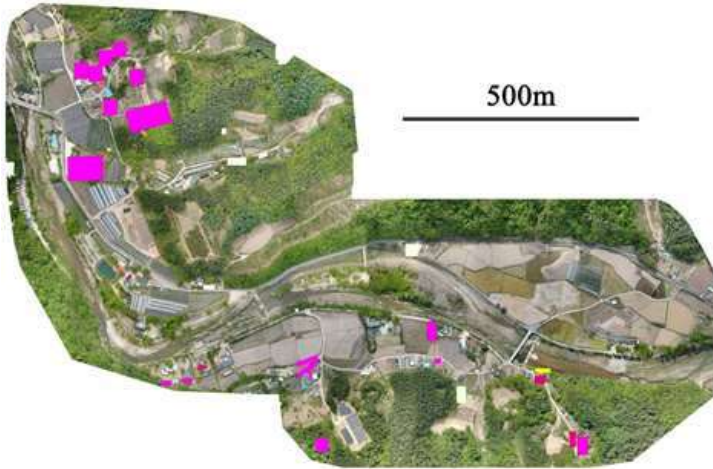


그림 54. 1차 조사로 얻어진 정사영상 내의 밀원식물 분포 현황

2차: 2020/5/28 (늦봄 밀원식물 개화 확인)(그림 55)

- 짚레, 산딸기, 국수나무 등의 식물 개화 확인
- 회양목, 불두화 등의 조경식물과, 밤나무, 대추나무 등이 주로 확인됨
- 계곡을 따라 다래가 분포하고 있는 것을 확인
- 아까시나무의 경우 강원도 대상지에 비해 분포 면적이 다소 적었으며, 밤나무의 면적이 두드러짐
- 차량 조사를 통해 초본류 식물을 비롯한 13여종의 밀원식물에 대한 분포 확인

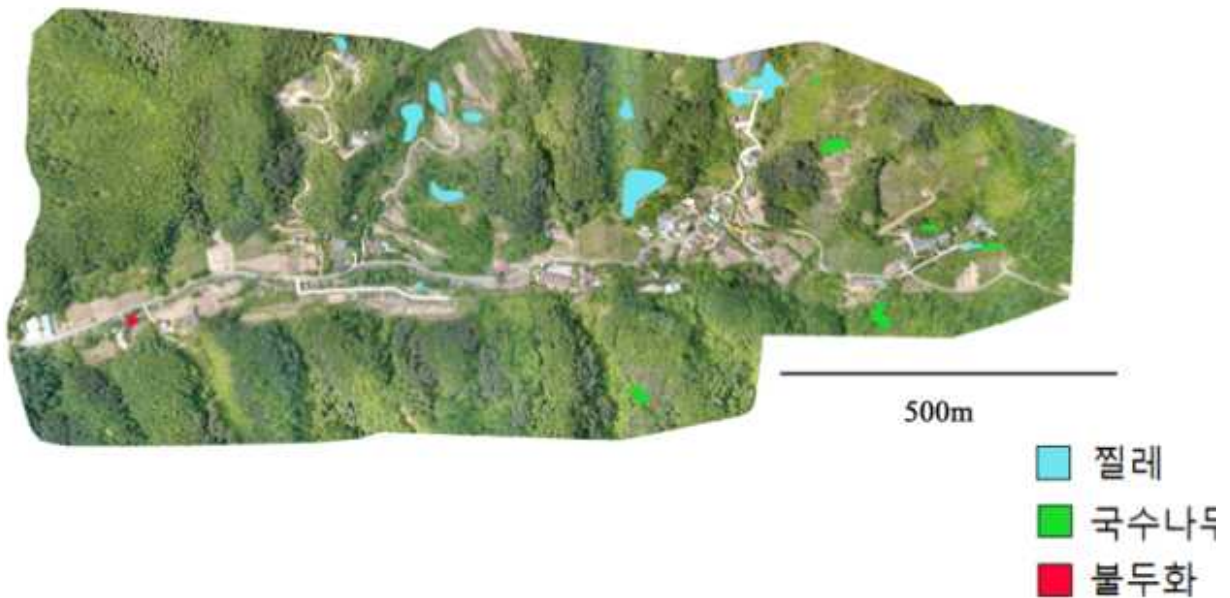


그림 55. 2차 조사로 얻어진 정사영상 내의 밀원식물 분포 현황

3차: 2020/6/22 (밤나무, 대추나무 및 기타 초본성 밀원 확인)(그림 56~57)

- 대상지 전역에 걸쳐 다수의 밤나무 군락 확인
- 대추나무류는 조사지 남쪽의 도로변을 중심으로 다수가 확인됨
- 그 외 초본류로 클로버, 망초 등의 식물이 조사됨
- 드론을 이용하여 차량 조사 및 육안으로 밤나무, 대추나무류가 판독되지 않은 일부 지역에 대해 교차 조사를 수행했으나, 위의 수종 중에는 유의한 군집이 발견되지 않음

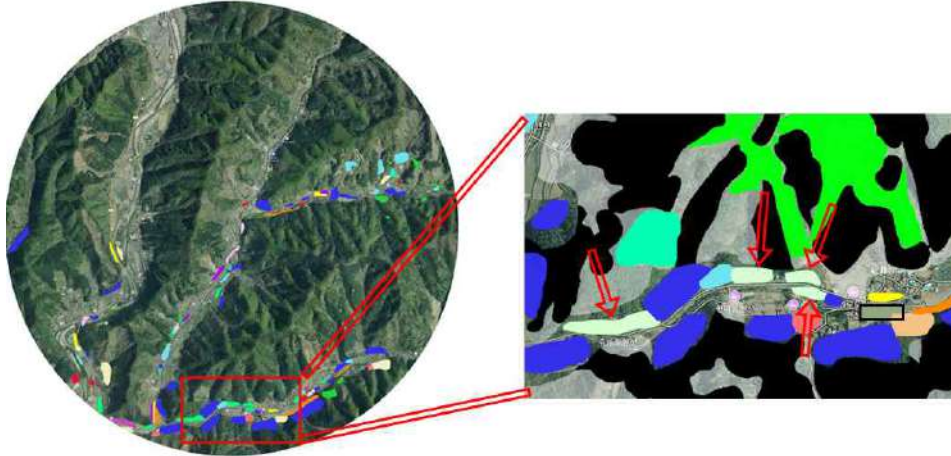


그림 56. 대추나무(화살표 표시)가 주로 발견된 조사 대상지 도로변의 임상도

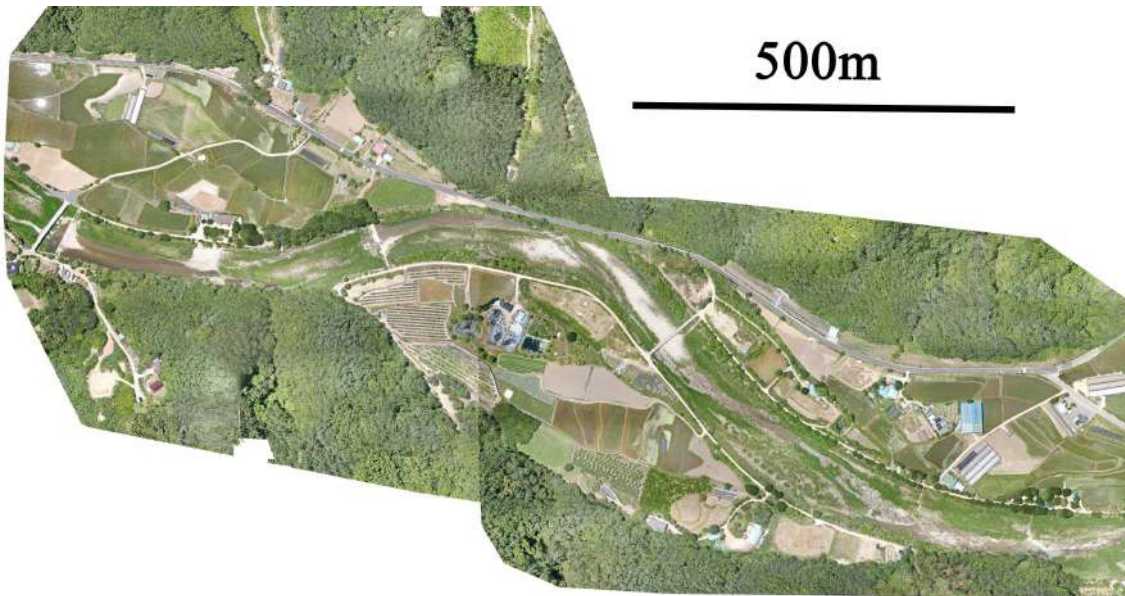


그림 57. 교차 조사를 수행한 조사 대상지 서부의 정사영상

4차: 2020/7/9 (피나무류, 모감주나무 및 기타 초본성 밀원 확인)(그림 58~59)

- 피나무류, 모감주나무류 및 기타 초본성 밀원에 대한 조사 수행
- 인제군과 비교 시 피나무류 식물의 군집이 상대적으로 적었음
- 모감주나무는 꿀벌류 곤충이 높은 밀도로 발견되었으나, 군집은 거의 관찰되지 않음
- 개망초 등의 망초류와 클로버를 비롯한 초본류 개화 확인
- 조사 대상지 남부의 삼거리 주변으로 모감주나무, 대추나무, 밤나무, 무궁화 등 다양한 밀원 수종들이 확인됨

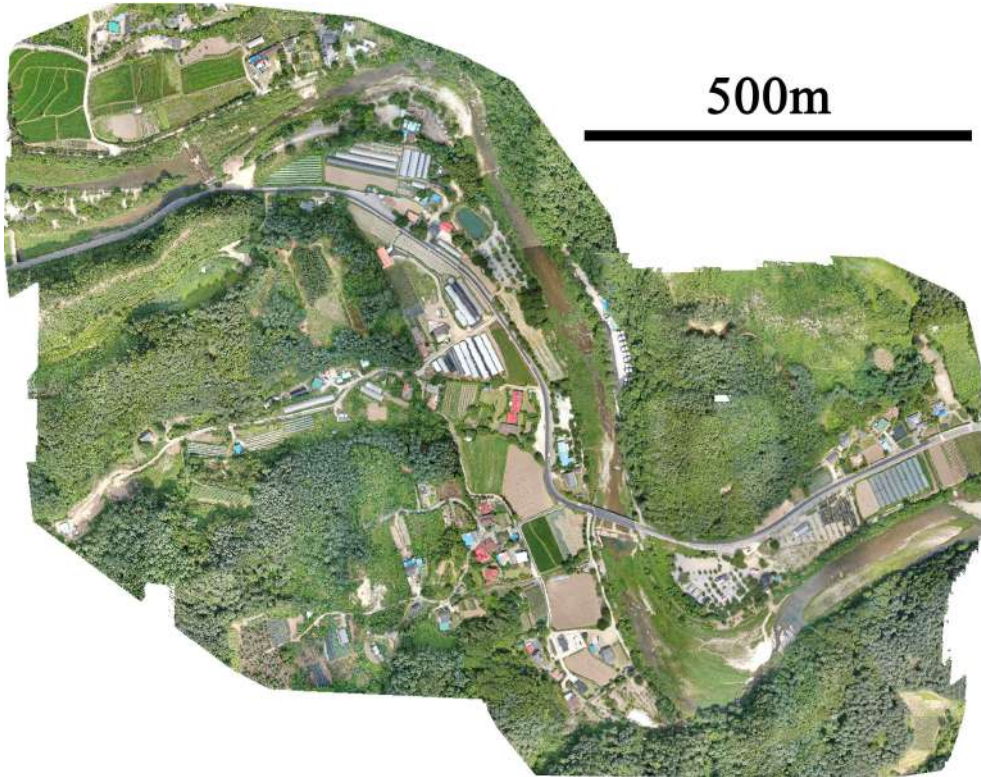


그림 59. 드론을 이용하여 조사한 조사 대상지 남서부의 정사영상



그림 58. 조사지에서 발견된 개화 상태의 모감주나무(좌) 및 망초와 기타 초본류(우)

5차: 2020/9/15 (메밀, 들깨, 물봉선, 환삼덩굴, 참취 등 초본성 밀원 확인)(그림 60)

- 메밀, 들깨 등의 밀원 작물을 재배하는 농지가 산재되어 있음
- 환삼덩굴, 물봉선 등의 풀은 도로변의 사면이나 경작지 주변에서 발견됨
- 조사 중심지 주변에 물봉선, 두릅, 엄나무류 식물이 식재됨. 개화를 확인



그림 60. 조사지의 농지에서 발견된 메밀(좌)과 도로 사면의 물봉선과 환삼덩굴(우)

6차: 2020/10/23 (산국, 쑥부쟁이, 배초향 등 초본성 밀원 확인)(그림 61)

- 산국, 쑥부쟁이, 배초향, 개미취 등의 초본성 밀원이 발견됨
- 산국, 개미취, 쑥부쟁이 등은 인공적으로 식재된 지역이 일부 있었음
- 목본류 밀원의 개화는 거의 발견하지 못했으며, 꿀벌과 곤충도 초본류를 중심으로 확인됨



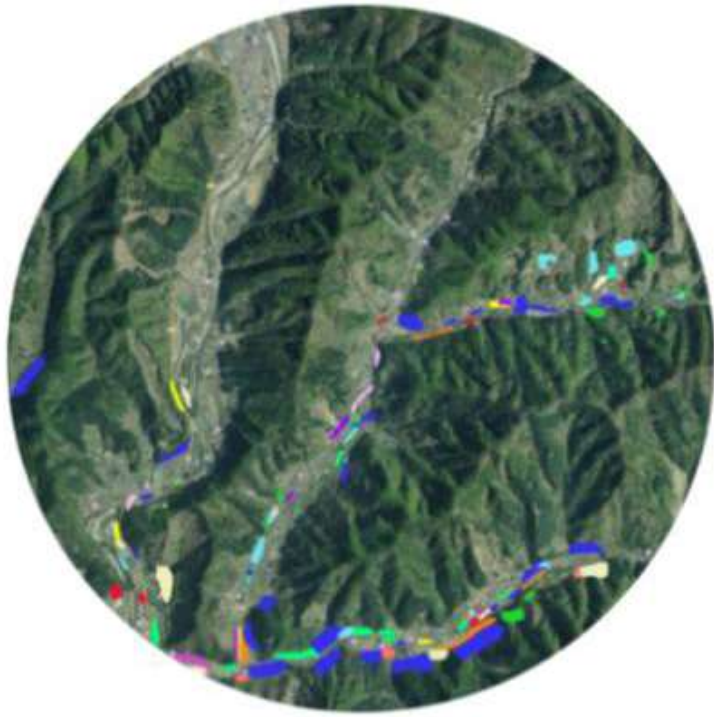
그림 61. 조사지에서 자생하는 배초향(좌) 및 식재된 쑥부쟁이(우)

③ 주요 토종꿀 생산지에 식재된 주요 밀원식물 및 개화기에 대한 논의 및 종합결론

- 연구 대상지인 가평군 목동리는 사전 연구지인 서울대학교 관악캠퍼스보다 약 10~15일정도 늦은 개화기를 보임
- 대상지의 기준점 부근으로 다양한 밀원식물과 화분원 식물이 분포하고 있으며, 인제군 한계리와 비교할 때 밤나무류 식물의 분포가 두드러졌고, 아까시나무의 경우 다소 적은 분포를 보였음
- 아까시나무, 찔레, 밤나무 등은 현지 조사 결과 균락으로 보이는 부분이 관찰됨
- 철쭉류 식물이 민가를 중심으로 식재되어 있는 것이 자주 관찰되었음
- 벚나무류 식물은 가로수 등의 목적으로 식재된 것이 발견되었으나, 밤나무, 대추나무 등의 밀원에 비해 다소 적게 발견됨
- 산의 사면에서는 초본류 식물이나 어린 나무가 자라는 넓은 간벌지가 다수 발견됨
- 다양한 목본류 및 초본류 식물이 자생하거나 식재되어 있어, 인제군 한계리 못지않게 다양한 밀원 식물과 화분원 식물이 존재하여 양봉에 이상적인 환경을 갖추고 있다고 볼 수 있음

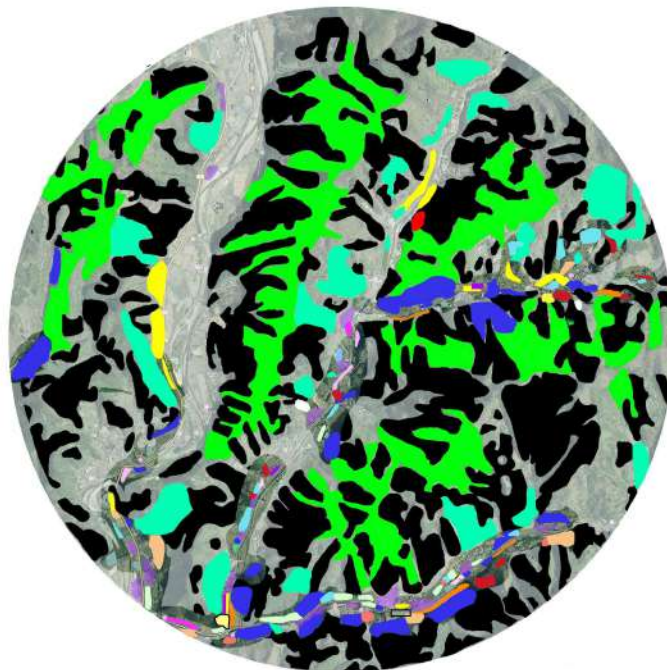
④ 조사대상 지역(경기도 가평군 목동리) 주요 밀원수 분포도(그림 62~63)

- 경기도 가평군 목동리에서 조사된 주요 밀원식물의 분포는 그림 62~63과 같음
- 2차년도에서는 밀원 또는 화분원으로 이용가능한 13종의 식물에 대한 분포를 확인하였음
- 3차년도 추가연구에서는 식물종을 총 21개 유형으로 나누어 각 수종의 분포를 표시하였으며, 기타 밀원의 기능을 할 수 있는 작물에 대한 정보도 추가함
- 인제군과 비교 시, 밤나무, 대추나무, 산딸기 등의 수종은 더 넓은 면적에서 나타났으나 피나무, 벚나무, 아까시나무 등의 주요 수종은 상대적으로 적게 발견됨



- 회양목
- 벚나무류
- 아까시나무
- 밤나무
- 짚레
- 산딸기
- 철쭉
- 다래
- 대추나무
- 헛개나무
- 엄나무
- 층층나무
- 애기똥풀 등 들풀
- 무궁화

그림 62. 2년차 조사를 바탕으로 한 조사대상 지역(경기도 가평 목동리)의 밀원수 분포도



- | | | |
|-------------------|----------|---------|
| ■ 모감주나무 | ■ 밤나무류 | ■ 다래 |
| ■ 벚나무류 | ■ 불두화 | ■ 싸리류 |
| ■ 철쭉류+조경화 | ■ 아까시나무류 | ■ 엄나무류 |
| ■ 무궁화 | ■ 대추나무류 | ■ 회양목 |
| ■ 초본(애기똥풀, 지칭개 등) | ■ 피나무류 | ■ 산딸기 |
| ■ 활엽수류 혼효림 | ■ 짚레나무류 | ■ 층층나무 |
| ■ 초본류 | ■ 침엽수림 | ■ 밀원 작물 |

그림 63. 3년차 조사를 바탕으로 한 조사대상 지역(경기도 가평 목동리)의 밀원수 분포도

바) 한봉업자를 대상으로 한 선호 밀원 설문조사

(1) 연구방법

(가) 구두조사를 통한 한봉 농가 선호 밀원 확인

- 일반인(비전문가)을 대상으로 밀원식물에 대한 비대면 서면 설문 조사를 실시할 경우, 대상자의 식물에 대한 잘못된 종 인식으로, 설문을 통해 얻은 정보에 대한 신뢰도가 떨어질 수 있는 단점이 있음
- 반면 구두 설문조사는 현장에서 사진자료 비교 등을 통한 종 확인 및 직접 주변 밀원을 육안으로 확인할 수 있어 설문 응답자를 통해 얻은 정보에 대한 정확도를 높일 수 있는 장점이 있음
- 따라서, 본 연구에서는 구두 설문조사를 통해 한봉 농가 선호 밀원을 조사함
- 농가 선정은 서울 구로 개왕산과 경기도 가평 목동리에 위치한 한봉농가를 대상으로 시기별 재래꿀벌의 주밀원, 보조밀원, 화분원에 대한 설문 조사를 실시함 (그림 64)
- 설문은 한봉장 주변에서 이용되고 있는 시기별 밀원식물(주밀원, 보조밀원, 화분원)을 주로 다루었으며, 기타 연간 벌꿀 생산량, 봉군 관리방식 등에 대한 보조정보를 설문을 통해 추가로 확보함



그림 64. 한봉 농가 선호 밀원조사를 위한 설문지

(2) 연구결과

(가) 서울 구로(개왕산) 한봉농가 선호 밀원 설문조사(그림 65, 66)

- 해당 한봉농가는 재래꿀벌을 11봉군을 운영하고 사각벌통과 개량벌통 모두 이용하며 고정식 및 이동식 양봉을 통해 연중 15~20kg의 벌꿀생산량을 낸다고 함
- 구두조사에 따르면 시기별 주밀원은 총 3종으로 4월 중순에 뽕나무류, 5월 상순에 야카시나무, 6월 상순에 밤나무가 이용됨
- 보조밀원은 총 9종으로 3월 상순에 생강나무, 하순에 회양목, 4월 하순에 산딸기, 5월 상순에 팔배나무와 쪽동백이 선호되며, 이후 5월 중순에는 짚레가 이용된다고 함
- 이어 5월 하순에는 쥐똥나무가 선호되며 6월 상순에는 음나무와 족제비싸리, 중순에 때죽나무가 보조밀원으로 사용되고 있다고 함
- 화분원은 총 2종으로 4월 상순에는 참나무류가 이용되고 5월 상순에는 침엽수가 화분원으로 선호된다고 함
- 해당농가는 7월 이후 주요 밀원의 부재로 경기도 양평, 가평으로 봉군을 이동하여 채밀을 이어간다고 함



그림 65. 서울 구로 개음산에 위치한 한봉농가

	시기	주밀원(3종)	보조밀원(10종)	화분원(2종)
3월	초		생강나무	
	중			
	말		회양목	
4월	초			참나무류
	중	밤나무류		
	말		산딸기	밀원수
5월	초	아까시나무	말매나무, 곡물떡나무	
	중		들레	
	말		귀룽나무	
6월	초	밤나무	음나무, 죽제비싸리	
	중		해죽나무	
	말			

그림 66. 서울 구로 개음산에 위치한 한봉농가 선호 밀원

(나) 가평 목동리 한봉농가 선호 밀원 설문조사(그림 67~70)

- 해당 한봉농가는 10봉군을 운영하고 사각벌통만을 이용하며 고정식 양봉을 통해 연중 사각벌통 3개를 기준 5kg의 벌꿀생산량을 낸다고 함
- 구두조사에 따르면 주밀원은 총 6종으로 시기별로 4월 하순부터 5월 상순까지 벗나무류, 하순에는 아까시나무가 선호되고 6월 중순에는 밤나무, 7월 상순에는 (찰)피나무를 이용한다고 함
- 이 후 10월 중순에는 주밀원으로 배초향을 이용한다고 함
- 보조밀원은 총 11종으로 5월 상순에는 괴불나무, 하순에 짚레와 층층나무가 이용되며 6월 상순은 헛개나무와 산사나무를 선호한다고 함
- 6월 중순에는 다래나무와 백합나무가 이용되고 하순에는 대추나무가 선호되는 것으로 나타남. 더불어 7월 하순에 음나무, 두릅나무가 이용되며 9월 중순에 들깨를 선호한다고 함
- 추가적으로 화분원은 총 4종으로 4월 말에 참나무류, 5월 말에 층층나무, 6월 중순에 다래나무가 선호되며 7월 말에는 두릅나무를 이용한다고 함



그림 67. 경기도 가평 목동리 한봉농가



그림 68. 경기도 가평 목동리 한봉농가 전경



그림 69. 경기도 가평 목동리 한봉농가에서 운영중인 사각벌통 관리 시연

시기	주밀원(6종)	보조밀원(11종)	화분원(4종)
3월	초		
	중		
4월	말	벗나무류(가로수)	참나무류
	초	신갈나무	괴불나무
5월	중	아까시나무	떡갈나무, 졸참나무
	말		졸참나무
6월	초		햇개나무, 산사나무
	중	밤나무	다래나무, 떡갈나무
7월	말		대추나무
	초	(갈)피나무	
8월	중		음나무, 두릅나무
	말		두릅나무
9월	초		
	중		
10월	말		
	초		
11월	중	매고향	
	말		

그림 70. 경기도 가평 목동리에 위치한 한봉농가 선호 밀원

(라) 강원도 인제군 북면 월학리 한봉농가 선호 밀원 설문조사(그림 71, 72)

- 2021년도 설문조사 결과 해당 한봉농가는 5봉군을 운영하고 있고 전통식 벌통만을 이용하며 고정식 양봉으로 자가 분봉을 이용해서 봉군을 유지하고 있다고 함(연중 벌꿀생산량 정보 확보 불가)
- 인제 월학리 한봉농가의 주밀원은 총 6종으로 4월 하순에 벗나무류, 5월 하순에 아까시나무, 6월 상순에 밤나무, 7월 상순에 피나무가 이용되며 8월 중순에는 음나무와 붉나무를 선호 한다고 함
- 보조밀원은 총 15종으로 4월 하순에 산돌배나무, 5월 상순에 조팝나무, 팔배나무, 고추나무, 산사나무, 쪽동백나무, 마가목이 선호되며 6월 상순에 다래나무, 중순에 머루, 조록싸리, 광대싸리, 7월 상순에 대추나무, 8월 상순에 싸리류, 중순에 쉬나무, 9월 상순에 산국을 선호한다고 함
- 화분원은 총 3종으로 상수리나무, 신갈나무, 다래나무가 이용되며 상수리나무는 5월 상순, 신갈나무와 다래나무는 6월 상순에 선호하는 것으로 나타남



그림 71. 강원도 인제군 일학리 한봉농가

시기	주밀원	보조밀원	화분원
3월	초		
	중		
4월	말		
	초		
4월	중		
	말	벗나무류	산들배나무
5월	초	조팝나무, 팔배나무, 고추나무, 산사나무, 죽동백, 마가목	삼수리나무
	중		
5월	말	아까시나무	
	초	밤나무	다래나무
6월	중		신갈나무, 다래나무
	말		
6월	초	다래나무	
	중		
6월	말	머루, 조록싸리, 광대싸리	
	초	피나무	대추나무
7월	중		
	말		
8월	초		싸리류
	중	음나무, 뽕나무	쉬나무
8월	말		
	초		산국
9월	중		
	말		
10월	초		
	중		
10월	말		

그림 72. 강원도 인제군 일학리에 위치한 한봉농가 선호 밀원

- (마) 서울, 경기도, 강원도권의 한봉농가 대상 구두설문조사에 대한 고찰
- 주밀원은 서울 구로에서 3종, 경기 가평에서 6종, 강원 인제에서 5~6종이 이용되는 것으로 나타남
 - 세 지역에서 공통되는 주밀원은 벗나무류, 아까시나무, 밤나무로 나타났으며, 지역 간 개화시기의 차이로 선호 밀원의 시기에 차이를 보임
 - 벗나무류는 서울권인 구로에서 4월 중순에 선호되었으나 가평과 인제에서는 4월 하순에 선호되는 것으로 확인됨
 - 마찬가지로 아까시나무 역시 구로는 4월 상순에 선호되나 가평과 인제는 4월 하순에 이용되는 것으로 나타남
 - 보조밀원은 구로에서 10종, 경기 가평에서 11종, 강원 인제에서 15~22종이 이용되는 것으로 나타났으며 이중에 두 지역 이상 공통되는 밀원은 팔배나무, 짚레, 다래나무, 두릅나무로 확인됨
 - 화분원은 서울 구로에서 2종, 경기 가평에서 4종, 강원 인제에서 4종이 이용되는 것으로 나타났으며 이중에 두 지역 이상 공통되는 밀원은 참나무류와 다래나무로 나타났고, 그 이외에 화분원은 칠엽수, 층층나무, 두릅나무, 상수리나무, 광대싸리로 확인됨
 - 유망보조밀원의 경우 3~4월에 회양목, 생강나무, 산수유나무, 4~5월에 산들배

나무, 돌배나무, 보리수나무, 골담초, 9~10월은 산국, 배초향, 향유, 삽주, 연백
국화로 나타났고 화분원은 6~7월 다래나무, 광대싸리, 환삼덩굴로 확인됨

사) 주요 밀원식물의 방화곤충상 분석을 통한 밀원별 재래꿀벌 구성 비율분석

(1) 연구방법(그림 73)

(가) 조사지역 및 조사대상 밀원식물 선정

- 본 연구는 봄철, 여름철, 가을철에 개화하는 주요 밀원식물을 대상으로 하여 가능한 각 조사시기별 개화한 3종 이상의 밀원식물에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
- 조사지역은 3지역(경기도 가평군 목동리, 강원도 인제군 한계리, 서울시 구로구 개웅산)에 위치한 한봉농가(5~10봉군 보유)를 중심으로 반경 2km이내 지역을 조사함
- 결과의 활용성을 고려하여 3지역 중 2지역은 본 연구에서 밀원식물 분포상 조사대상 지역인 경기도 가평군 목동리와 강원도 인제군 한계리로 선정함
- 또한, 비교를 위해 산악지역인 2지역(경기도 가평군 목동리, 강원도 인제군 한계리)과 달리 도심지 주변(개웅산, 해발고도 125m)에 위치한 한봉농가를 추가로 선정하여 방화곤충상 조사를 수행함

(나) 밀원식물별 방화곤충 채집 및 분류

- 방화곤충 채집은 포충망을 이용한 쓸어잡기 방법으로 밀원식물에서 채밀 및 방화 활동을 하고 있는 곤충(벌목)을 채집함
- 방화곤충 채집은 주로 꿀벌의 채밀활동이 상대적으로 활발하게 나타나는 10-16시 사이에 수행함(1차년도 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 채밀활동차이 조사결과 참고)
- 결과의 신뢰성을 높이기 위해 조건에 따라 밀원식물별 1~10주에 대해 반복채집을 실시함
- 채집된 방화곤충은 연구실에서 표본제작 및 분류동정을 통해 각 종별 개체수가 집계됨

(다) 밀원식물별 재래꿀벌 구성 비율분석 및 선호성 평가

- 밀원식물별 집계된 방화곤충 종별 개체수를 바탕으로 재래꿀벌 및 타방화곤충의 구성 비율을 분석하여 파이그래프로 나타냄
- 밀원식물별 방화곤충의 개체수 및 구성 비율을 참고로 하여 재래꿀벌의 밀원식물 선호성을 평가함
- 또한, 밀원식물별 재래꿀벌 및 양봉꿀벌의 개체수 및 구성 비율을 참고로 하여 두 종의 밀원식물 선호성을 비교함



조사지역



방화곤충 채집(쓸어잡기)



방화곤충채집물 정리



방화곤충 표본제작 및 분류

표 2. 방화곤충 채집물 명세표

번	과명(Family)	속명(Genus)	종명(Species)	발견지	발견일	발견자
1	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
2	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
3	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
4	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
5	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
6	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
7	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
8	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
9	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
10	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
11	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
12	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
13	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
14	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
15	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
16	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
17	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
18	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
19	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
20	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
21	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
22	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
23	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
24	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
25	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
26	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
27	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
28	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
29	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
30	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
31	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
32	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
33	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
34	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
35	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
36	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준
37	Pyralidae	Agrotis	Agrotis ypsilon	경기도 가평군	2020. 5. 7	김민준

방화곤충 목록화



방화곤충 구성 비율분석

그림 73. 주요 밀원식물의 방화곤충상 조사방법

(2) 연구결과

(가) 조사지역 및 조사대상 밀원식물

- 2020년도는 2020년 5월7일부터 10월23일까지 13회에 걸쳐 3지역(경기도 가평군 목동리, 강원도 인제군 한계리, 서울시 구로구 개왕산)에 개화한 총 37종(목본 15종, 초본 22종)의 밀원식물에 대한 방화곤충상 조사를 실시함(표 22)
- 2021년도는 2021년 4월 20일부터 7월 9일까지 4회에 걸쳐 2지역(경기도 가평군 목동리, 강원도 인제군 한계리)에 개화한 총 (7종)의 밀원식물에 대한 방화곤충상 조사를 실시함(표 3)
- 조사는 아까시나무 개화 전후 주요 밀원에 대해 수행되었으며, 비교를 위해 동일한 시기에 개화한 일반 꽃에 대해서도 함께 방화곤충상 조사가 수행됨

표 22. 방화곤충상 조사정보 및 조사된 밀원식물

시행차수	조사날짜	조사장소	조사밀원식물
1차	2020년 05월 07일	서울 구로구 개웅산	산딸기, 노린재나무, 산괴불주머니 (3종)
2차	2020년 05월 08일	경기도 가평군 목동리 597	철쭉, 고추나무, 보리수나무, 모과나무, 미나리냉이, 애기똥풀 (6종)
3차	2020년 05월 20일	서울 구로구 개웅산	아까시나무, 찔레, 국수나무 (3종)
4차	2020년 05월 28일	경기도 가평군 목동리 597	아까시나무, 산딸기, 찔레, 국수나무, 미나리냉이 (5종)
5차	2020년 05월 29일	강원도 인제군 한계리 854	아까시나무, 찔레, 구절초, 국수나무, 클로버, 엉겅퀴 (6종)
6차	2020년 06월 15일	서울 구로구 개웅산	밤나무, 일본조팝나무 (2종)
7차	2020년 06월 23일	경기도 가평군 목동리 597	대추나무, 미국낙상홍, 망초류 (3종)
8차	2020년 06월 23일	강원도 인제군 한계리 854	밤나무, 대추나무 (2종)
9차	2020년 07월 08일	강원도 인제군 한계리 854	달피나무 (1종)
10차	2020년 07월 09일	경기도 가평군 목동리 597	모감주나무 (1종)
11차	2020년 09월 15일	경기도 가평군 목동리 597	메밀, 물봉선, 들깨, 참취 (4종)
12차	2020년 09월 16일	강원도 인제군 한계리 854	물봉선, 들깨, 환삼덩굴, 개썩부쟁이, 미국썩부쟁이, 고마리, 이고들빼기 (7종)
13차	2020년 10월 23일	경기도 가평군 목동리 597	산국, 구절초, 꽃향유 (3종)
14차	2021년 4월 20일	강원도 인제군 한계리 854	산돌배나무, 돌배나무, 벗나무류(3종)
15차	2021년 6월 23일	경기도 가평군 목동리 597	밤나무 (1종)
16차	2021년 6월 24일	강원도 인제군 한계리 854	밤나무, 왜당귀 (2종)
17차	2021년 7월 9일	경기도 가평군 목동리 597	모감주나무 (1종)

(나) 조사지역 및 밀원식물별 재래꿀벌 및 타 방화곤충 구성 비율

- ① 서울 구로구 개웅산 밀원식물별 방화곤충상 조사(2020/5/7) (그림 74~78)
 - 아까시나무 개화 전 산딸기(*Rubus* spp.), 노린재나무(*Symplocos chinensis*) 산괴불주머니(*Corydalis speciosa*) 3종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
 - 산딸기는 봉장으로 부터 약 322m, 약 407m 떨어진 2개 군락에서 조사를 실시
 - 노린재나무와 산괴불주머니는 각 봉장으로 부터 약 144m, 약 104m 떨어진 군락에서 조사를 실시함



그림 74. 서울 구로구 개웅산 방화곤충상 조사(5/7) 대상밀원식물 및 위치

- 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 산딸기에서 13.2%로 나타난 반면 산괴불주머니와 노린재나무에서는 나타나지 않음
- 양봉꿀벌 역시 산딸기에서 56%로 나타난 반면 산괴불주머니와 노린재나무에선 나타나지 않음
- 대상 식물별 벌목 방화곤충의 전체 구성으로는 산딸기에서 3과 6~7속 11종으로 가장 다양하게 나타났으며, 산괴불주머니에서는 1과 3속 4종, 노린재나무에서는 3과 2속 5종으로 나타남
- 5월초 서울 구로구 개웅산에서는 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 산딸기에 높은 선호성을 보이는 것으로 판단됨
- 산딸기 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌이 양봉꿀벌에 비해 낮은 비율을 나타낸 것은 각 종의 서식 밀도에 따른 결과로 사료됨
- 산딸기는 야카시나무 개화 전 관목성 밀원식물 중 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 선호성이 높은 식물로 확인됨

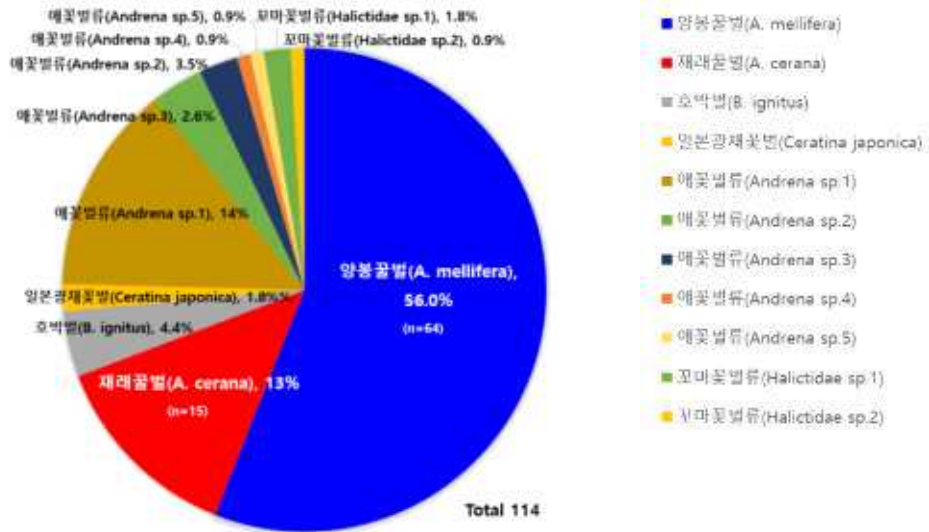


그림 75. 산딸기에서의 벌목 방화곤충 구성비

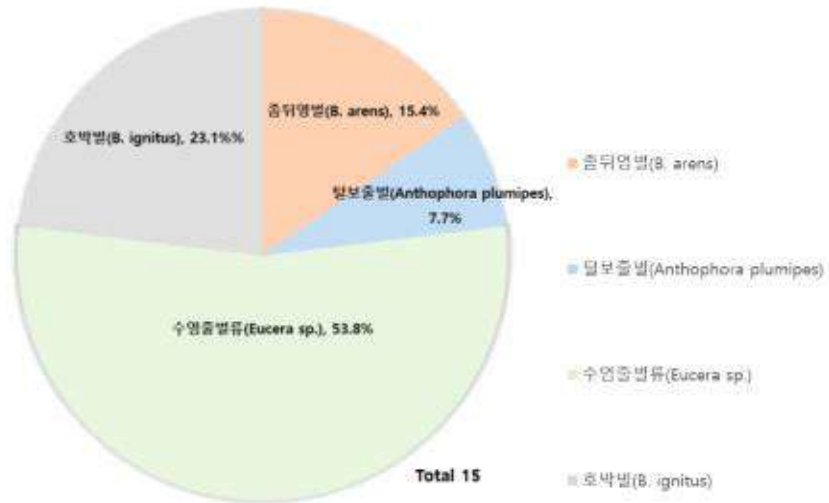


그림 76. 산괴불주머니에서의 벌목 방화곤충 구성비

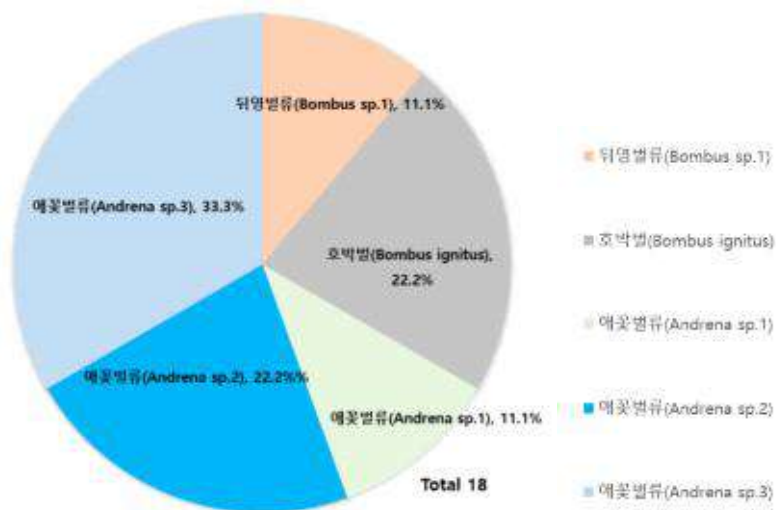


그림 77. 노린재나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 23. 산딸기에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	15	13.2
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	64	56
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus ignitus</i>	호박벌	5	4.4
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	2	1.8
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp.1	애꽃벌류	16	14.0
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp.2	애꽃벌류	4	3.5
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp.3	애꽃벌류	3	2.6
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp.4	애꽃벌류	1	0.9
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp.5	애꽃벌류	1	0.9
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.1	꼬마꽃벌류	2	1.8
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.2	꼬마꽃벌류	1	0.9
계		3과 6~7속 11종		114	100

표 24. 산괴불주머니에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Anthophora plumipes</i>	털보줄벌	1	7.7
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus arens</i>	좀뒤영벌	2	15.4
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus ignitus</i>	호박벌	3	23.1
Hymenoptera	Apidae	<i>Eucera</i> sp.	수염줄벌	7	53.8
계		1과 3속 4종		13	100

표 25. 노린재나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp.1	애꽃벌류	2	11.2
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp.2	애꽃벌류	4	22.2
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp.3	애꽃벌류	6	33.3
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus ignitus</i>	호박벌	4	22.2
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus</i> sp.	뒤영벌류	2	11.1
계		3과 2속 5종		18	100



재래꿀벌



양봉꿀벌

그림 78. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 산딸기꽃에서의 채밀활동모습

- ② 서울 구로구 개웅산 밀원식물별 방화곤충상 조사(2020/5/20) (그림 79~82)
- 아까시나무 개화 후 아까시나무(*Robinia pseudoacacia*), 찔레(*Rosa multiflora*), 국수나무(*Stephanandra incisa*) 3종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
 - 아까시나무는 봉장으로부터 약 30m내외, 약 167m 떨어진 3개 군락에서 조사를 실시함
 - 찔레와 국수나무는 각 봉장으로부터 약 30m내외, 약 116m 떨어진 군락에서 조사를 실시함

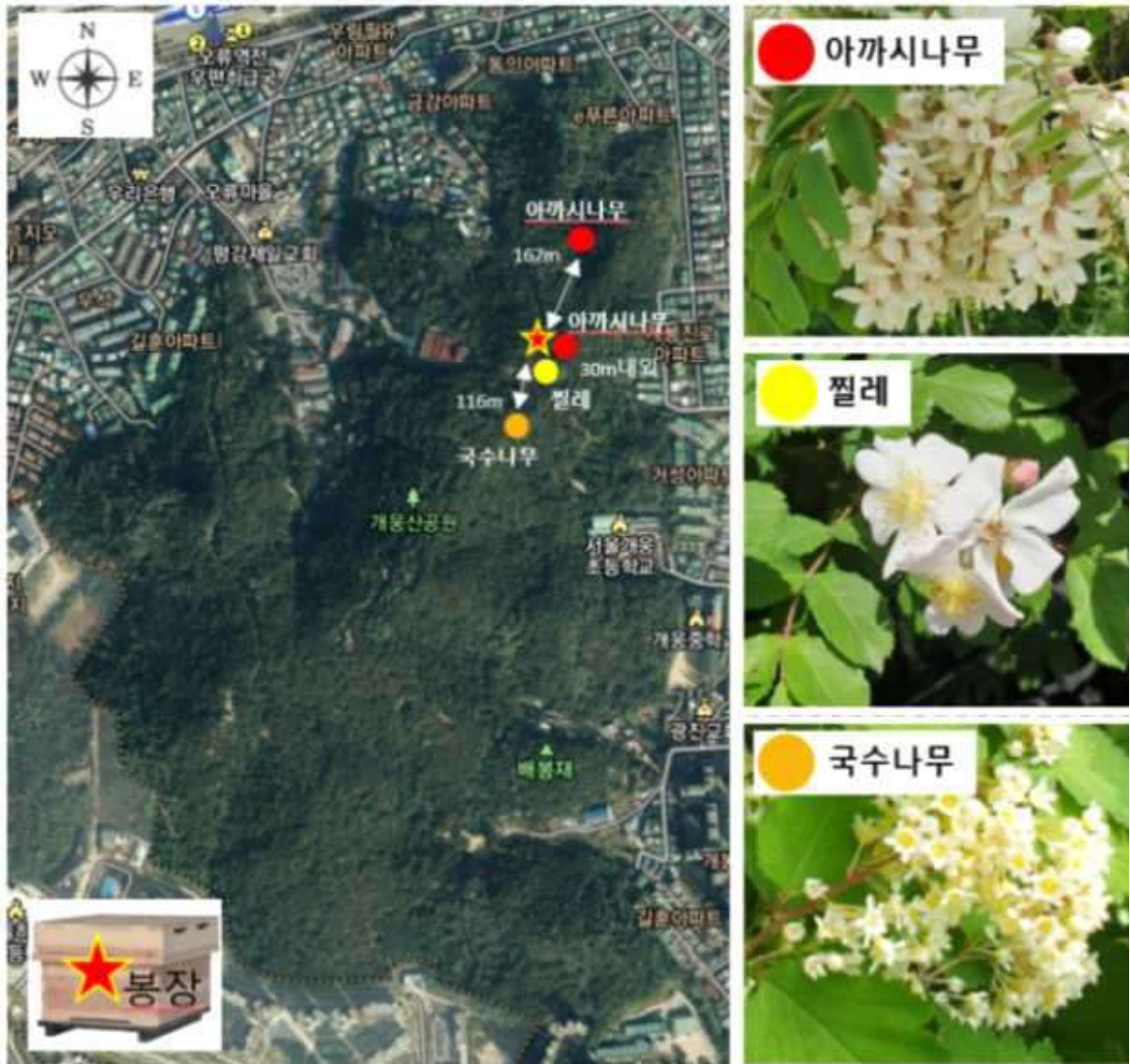


그림 79. 서울 구로구 개웅산 방화곤충상 조사(5/20) 대상밀원식물 및 위치

- 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 짚레에서 21.4%, 아까시나무에서 6.0%로 나타난 반면 국수나무에서는 나타나지 않음
- 양봉꿀벌 아까시나무에서 89.7%, 짚레에서 57.2%로 나타난 반면 국수나무에서는 나타나지 않음
- 대상 식물별 별목 방화곤충의 전체 구성으로는 국수나무에서 4과 4속 5종, 아까시나무에서 3과 3~4속 5종으로 다양하게 나타났으며, 짚레에서 2과 2~3속 4종으로 나타남
- 5월중순/말 서울 구로구 개웅산에서는 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 아까시나무와 짚레에 높은 선호성을 보이는 것으로 판단됨
- 아까시나무는 봉장과 근거리에서 조사되었지만 재래꿀벌은 양봉꿀벌에 비해 현저히 낮은 비율을 나타냄
- 이는 각 종의 서식 밀도에 따른 결과 또는 아까시나무에 대한 각 종의 선호도 차이에서 기인된 것으로 사료됨
- 짚레의 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌이 양봉꿀벌에 비해 낮은 비율을 나타낸 것은 각 종의 서식 밀도에 따른 결과로 사료됨
- 짚레는 아까시나무 개화 후 관목성 밀원식물 중 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 선호성이 높은 식물로 확인됨

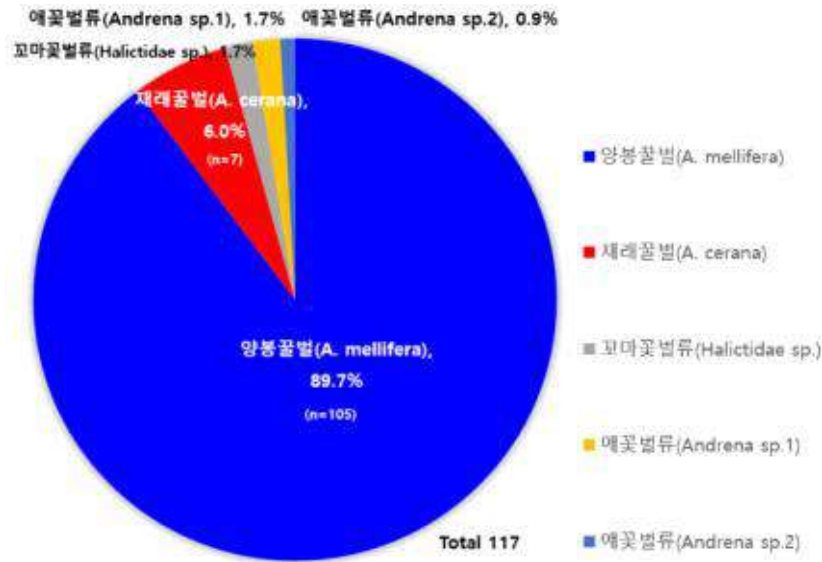


그림 80. 아까시나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

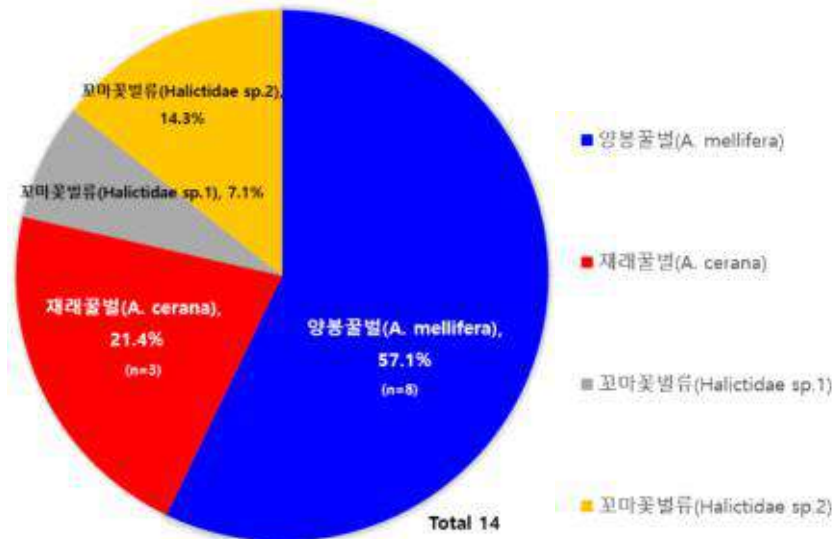


그림 81. 짚레에서의 벌목 방화곤충 구성비

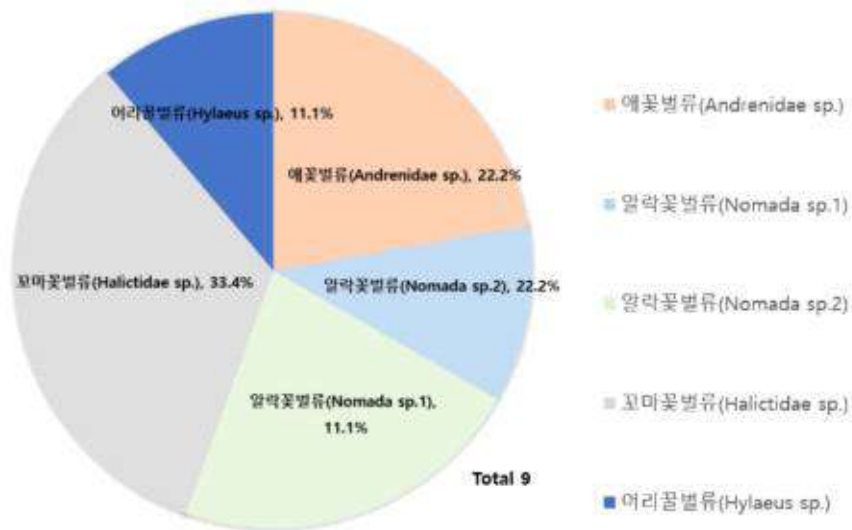


그림 82. 국수나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 26. 아까시나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	7	6.0
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	105	89.7
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp.1	애꽃벌류	2	1.7
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp.2	애꽃벌류	1	0.9
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.	꼬마꽃벌류	2	1.7
계		3과 3~4속 5종		117	100

표 27. 짚레에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	3	21.4
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	8	57.2
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.1	꼬마꽃벌류	1	7.1
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.2	꼬마꽃벌류	2	14.3
계		2과 2~3속 4종		14	100

표 28. 국수나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Andrenidae	Andrenidae sp.	애꽃벌류	2	22.2
Hymenoptera	Apidae	<i>Nomada</i> sp.1	알락꽃벌류	1	11.1
Hymenoptera	Apidae	<i>Nomada</i> sp.2	알락꽃벌류	2	22.2
Hymenoptera	Colletidae	<i>Hylaeus</i> sp.	어리꿀벌류	1	11.1
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.	꼬마꽃벌류	3	33.4
계		4과 4속 5종		9	100



재래꿀벌
그림 83. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 아까시나무꽃에서의 채밀활동모습



재래꿀벌

양봉꿀벌

그림 84. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 짙레꽃에서의 채밀활동모습

③ 경기도 가평군 목동리 597 밀원식물별 방화곤충상 조사(2020/5/8) (그림 85~93)

- 야카시나무 개화 전 철쭉(*Rhododendron spp.*), 고추나무(*Staphylea bumalda*), 보리수나무(*Elaeagnus umbellata*), 모과나무(*Chaenomeles sinensis*), 미나리냉이(*Cardamine leucantha*), 애기똥풀(*Chelidonium majus*) 6종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
- 고추나무는 봉장으로 부터 약 248m 떨어진 군락에서 조사를 실시함
- 애기똥풀과 미나리냉이는 봉장으로 부터 약 30m내외, 철쭉과 모과나무는 봉장으로 부터 약 40m내외, 보리수나무는 봉장으로 부터 60m내외로 떨어진 군락에서 조사를 실시함



그림 85. 경기도 가평군 목동리 597 방화곤충상 조사(2020/5/8) 대상밀원식물 및 위치

-
- 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 고추나무에서 20.8%, 철쭉에서 13.9%, 애기똥풀에서 12.5%로 나타난 반면 보리수나무, 모과나무, 미나리냉이에서는 나타나지 않음
 - 양봉꿀벌은 고추나무에서 70.8%, 철쭉에서 27.8%, 미나리냉이에서 15.4%, 보리수나무에서 15.0%, 애기똥풀에서 12.5%로 나타난 반면 모과나무에서는 나타나지 않음
 - 대상 식물별 벌목 방화곤충의 전체 구성으로는 철쭉에서 5과 10~20속 27종으로 가장 다양하게 나타났으며, 미나리냉이에서 3과 4~9속 9종, 보리수나무에서 1과 7~9속 9종, 모과나무에서 3과 4~8속 8종, 애기똥풀에서 3과 4~5속 6종, 고추나무에서 2과 4속 4종으로 나타남
 - 5월초 경기도 가평군 목동리 597에서는 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 고추나무에서 가장 높은 선호성을 보였으며, 그 외 철쭉, 애기똥풀에서도 비교적 높은 선호성을 보이는 것으로 판단됨
 - 철쭉에서 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 고추나무에서보다 낮게 나타났지만 많은 개체수가 확인되어 활발한 채밀활동을 보이는 것으로 나타남 (봉장으로부터 약 40m내외로 가까운 곳에 위치한 군락에서 조사를 실시함)
 - 고추나무, 철쭉, 애기똥풀 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌이 양봉꿀벌에 비해 낮은 비율을 나타낸 것은 각 종의 서식 밀도에 따른 결과로 사료됨
 - 고추나무는 아까시나무 개화 전 관목성 밀원식물 중 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 선호성이 높은 식물로 확인됨
 - 철쭉, 애기똥풀 역시 아까시나무 개화 전 관목성, 초본성 밀원식물로서의 가치를 나타냄
-



그림 86. 고추나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

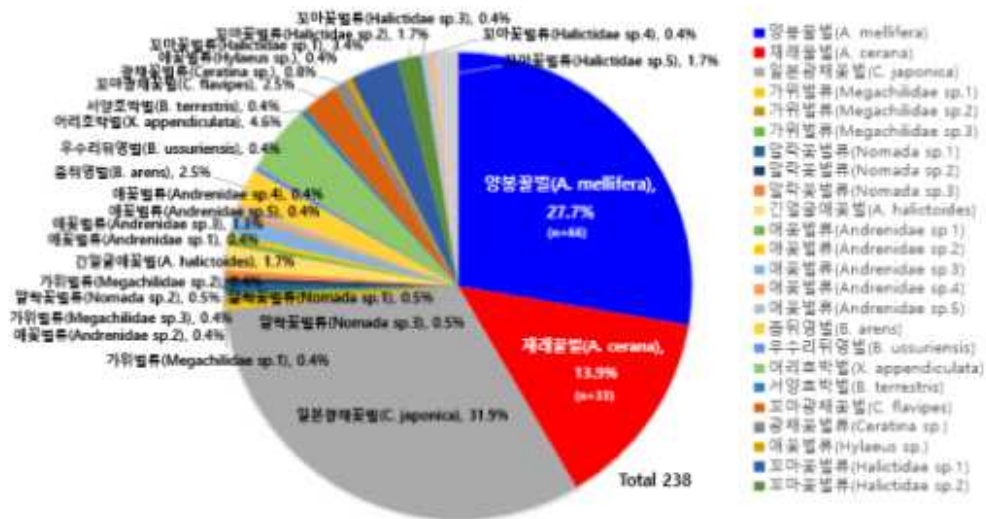


그림 87. 철쭉에서의 벌목 방화곤충 구성비

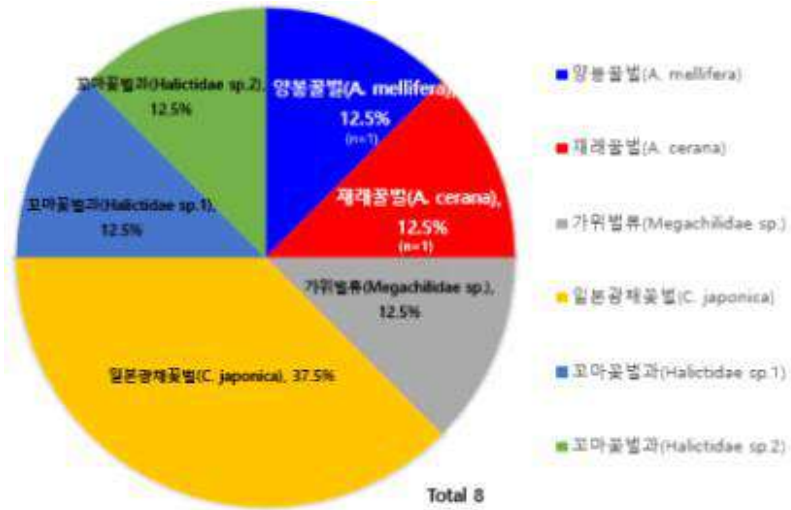


그림 88. 애기똥풀에서의 벌목 방화곤충 구성비



그림 89. 보리수나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

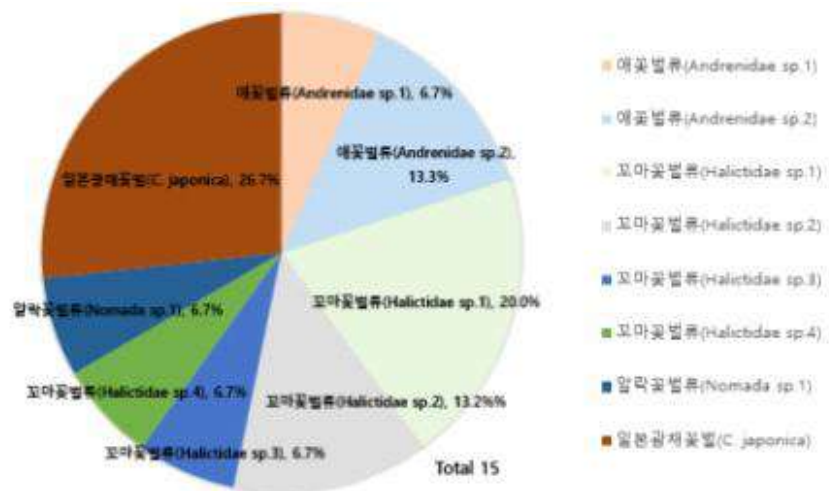


그림 90. 모과나무에서의 벌목 방화곤충 구성비



그림 91. 미나리냉이에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 29. 철쭉에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체 수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	33	13.9
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	66	27.7
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus arens arens</i>	좀뒤영벌	6	2.5
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus terrestris</i>	서양호박벌	1	0.4
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus ussuriensis</i>	우수리뒤영벌	1	0.4
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina flavipes</i>	꼬마광채꽃벌	6	2.5
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	76	31.9
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina</i> sp.	광채꽃벌류	2	0.8
Hymenoptera	Apidae	<i>Nomada</i> sp.1	알락꽃벌류	1	0.5
Hymenoptera	Apidae	<i>Nomada</i> sp.2	알락꽃벌류	1	0.5
Hymenoptera	Apidae	<i>Nomada</i> sp.3	알락꽃벌류	1	0.5
Hymenoptera	Apidae	<i>Xylocopa appendiculata</i>	어리호박벌	11	4.6
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena halictoides</i>	긴얼굴애꽃벌	4	1.7
Hymenoptera	Andrenidae	Andrenidae sp.1	애꽃벌류	1	0.4
Hymenoptera	Andrenidae	Andrenidae sp.2	애꽃벌류	1	0.4
Hymenoptera	Andrenidae	Andrenidae sp.3	애꽃벌류	3	1.3
Hymenoptera	Andrenidae	Andrenidae sp.4	애꽃벌류	1	0.4
Hymenoptera	Andrenidae	Andrenidae sp.5	애꽃벌류	1	0.4
Hymenoptera	Colletidae	<i>Hylaeus</i> sp.	어리꿀벌류	1	0.4
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.1	꼬마꽃벌류	8	3.4
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.2	꼬마꽃벌류	4	1.7
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.3	꼬마꽃벌류	1	0.4
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.4	꼬마꽃벌류	1	0.4
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.5	꼬마꽃벌류	4	1.7
Hymenoptera	Megachilidae	Megachilidae sp.1	가위벌류	1	0.4
Hymenoptera	Megachilidae	Megachilidae sp.2	가위벌류	1	0.4
Hymenoptera	Megachilidae	Megachilidae sp.3	가위벌류	1	0.4
계		5과 10~2속 27종		238	100

표 30. 미나리냉이에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	4	15.4%
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	3	11.5%
Hymenoptera	Andrenida e	Andrenidae sp.1	애꽃벌류	1	4%
Hymenoptera	Andrenida e	Andrenidae sp.2	애꽃벌류	2	7.7%
Hymenoptera	Andrenida e	Andrenidae sp.3	애꽃벌류	4	15.4%
Hymenoptera	Andrenida e	Andrenidae sp.4	애꽃벌류	7	26.9%
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.1	꼬마꽃벌류	3	11.5%
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.2	꼬마꽃벌류	1	3.8%
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.3	꼬마꽃벌류	1	3.8%
계		3과 4~9속 9종		26	100

표 31. 고추나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	5	20.8
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	17	70.8
Hymenoptera	Apidae	<i>Eucera</i> sp.	수염줄벌류	1	4.2
Hymenoptera	Megachilidae	Megachilidae sp.	가위벌류	1	4.2
계		2과 4속 4종		24	100

표 32. 보리수나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	3	15.0
Hymenoptera	Apidae	<i>Amegilla quadrifasciata</i>	네줄벌	2	10.0
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus ignitus</i>	호박벌	4	20.0
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus</i> sp.1	뒤영벌류	2	10.0
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus</i> sp.2	뒤영벌류	1	5.0
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	3	15.0
Hymenoptera	Apidae	<i>Xylocopa appendiculata</i>	어리호박벌	2	10.0
Hymenoptera	Apidae	Apidae sp.1	꿀벌류	2	10.0
Hymenoptera	Apidae	Apidae sp.2	꿀벌류	1	5.0
계		1과 7~9속 9종		20	100

표 33. 애기똥풀에서 조사된 벌목 방화근충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	1	12.5%
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	1	12.5%
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	3	37.5%
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.1	꼬마꽃벌류	1	12.5%
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.2	꼬마꽃벌류	1	12.5%
Hymenoptera	Megachilidae	Megachilidae sp.	가위벌류	1	12.5%
계		3과 4~5속 6종		8	100

표 34. 모과나무에서 조사된 벌목 방화근충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Andrenidae	Andrenidae sp.1	애꽃벌류	1	6.7
Hymenoptera	Andrenidae	Andrenidae sp.2	애꽃벌류	2	13.3
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	4	26.7
Hymenoptera	Apidae	<i>Nomada</i> sp.	알락꽃벌류	1	6.7
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.1	꼬마꽃벌류	3	20.0
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.2	꼬마꽃벌류	2	13.2
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.3	꼬마꽃벌류	1	6.7
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.4	꼬마꽃벌류	1	6.7
계		3과 4~8속 8종		15	100



재래꿀벌 양봉꿀벌
그림 92. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 철쭉 꽃에서의 채밀활동모습



재래꿀벌



양봉꿀벌

그림 93. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 고추나무 꽃에서의 채밀활동모습

- ④ 경기도 가평군 목동리 597 밀원식물별 방화곤충상 조사(5/28)(그림 94~100)
- 아까시나무, 산딸기, 찔레, 국수나무, 미나리냉이에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
 - 아까시나무는 해당지역에서 제한적인 분포를 나타내 봉장으로부터 약 1.74km, 1.78km 떨어진 군락에서 조사를 실시함
 - 산딸기는 봉장으로부터 약 279m, 645m, 955m 떨어진 3개 군락에서 조사를 실시
 - 찔레와 국수나무는 각 봉장으로부터 약 645m, 약 279m 떨어진 군락에서 조사를 실시함
 - 미나리냉이는 봉장으로부터 약 30m 내외로 떨어진 군락에서 조사를 실시함



그림 94. 경기도 가평군 목동리 597 방화곤충상 조사(2020/5/28) 대상밀원식물 및 위치

- 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 산딸기에서 17.8%, 국수나무에서 14.3%로 나타난 반면 아까시나무, 국수나무, 미나리냉이에서는 나타나지 않음

-
- 양봉꿀벌은 아까시나무에서 62.5%, 산딸기에서 55.9%, 짚레에서 25%, 국수나무에서 14.3%로 나타난 반면 미나리냉이에서는 나타나지 않음
 - 대상 식물별 벌목 방화곤충의 전체 구성으로는 산딸기에서 2과 4~6속 7종으로 가장 다양하게 나타났으며, 아까시나무에서 2과 2~4속 4종, 짚레에서 2과 2~4속 4종, 국수나무 2과 2~3속 4종, 미나리냉이에서 1과 1~2속 2종으로 나타남
 - 산딸기에서 재래꿀벌과 양봉꿀벌 외 벌목 방화곤충은 꿀벌과(Apidae) 2종, 꼬마꽃벌과(Halictidae) 3종으로 확인됨(그림 95)
 - 5월중순/말 경기도 가평군 목동리 597에서는 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 산딸기에서 가장 높은 선호성을 보였으며, 그 외 국수나무에서도 비교적 높은 선호성을 보이는 것으로 판단됨
 - 아까시나무에서는 양봉꿀벌만 확인되었으며, 재래꿀벌의 채밀활동은 확인하지 못함
 - 이는 각 종의 서식 밀도에 따른 결과 또는 아까시나무에 대한 각 종의 선호도 차이에서 기인된 것으로 사료됨(해당지역에서 아까시나무는 봉장으로부터 1.7km 이상 떨어진 곳에서 조사됨)
 - 산딸기, 국수나무 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌이 양봉꿀벌에 비해 낮은 비율을 나타낸 것은 각 종의 서식 밀도에 따른 결과로 사료됨
 - 산딸기는 아까시나무 개화 후 관목성 밀원식물 중 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 선호성이 높은 식물로 확인됨
 - 국수나무 역시 아까시나무 개화 후 관목성 밀원식물로서의 가치를 나타냄
-

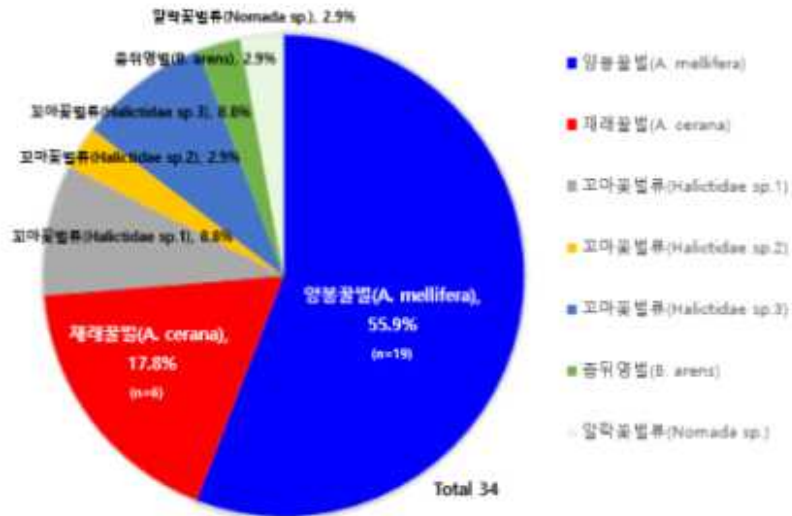


그림 95. 산딸기에서의 벌목 방화곤충 구성비

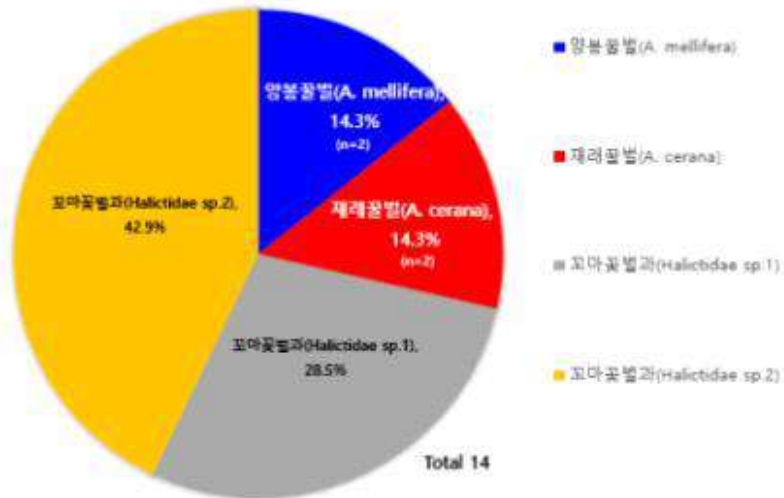


그림 96. 국수나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

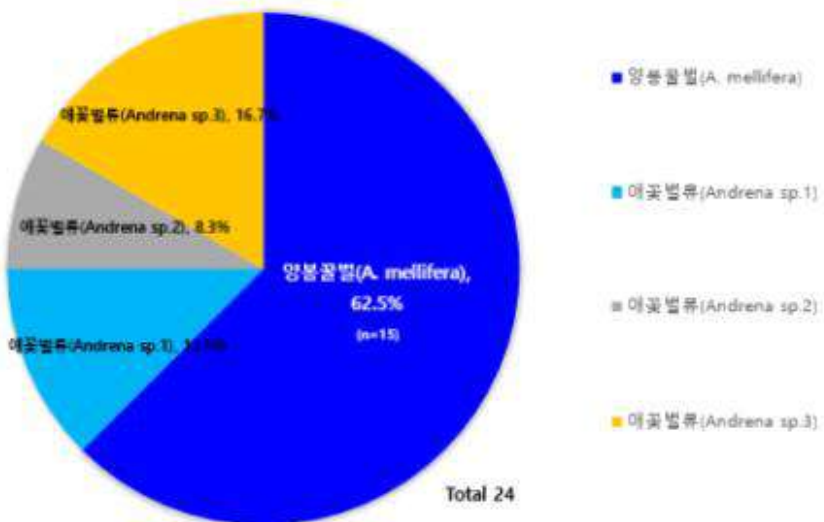


그림 97. 아까시나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

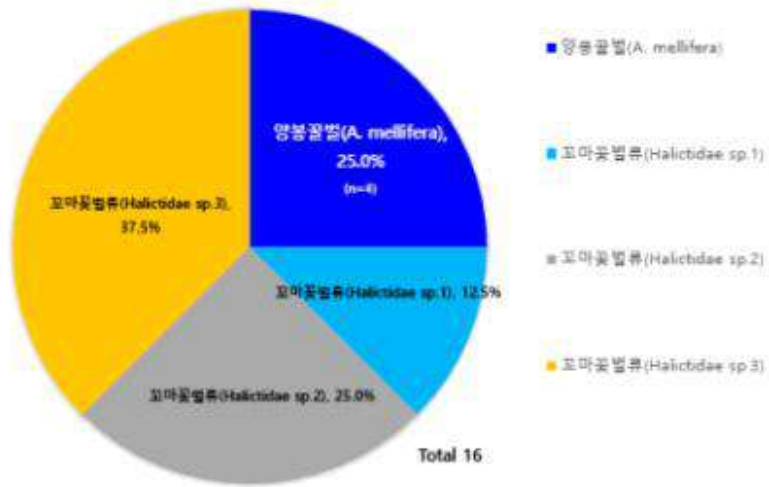


그림 98. 짙레에서의 벌목 방화곤충 구성비

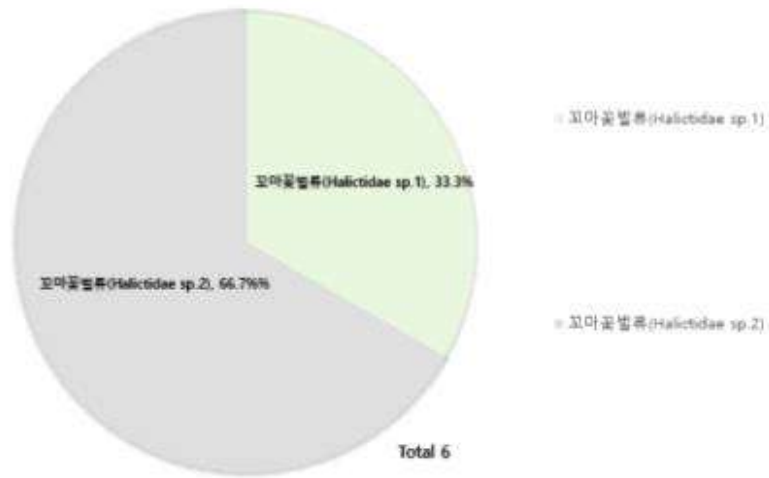


그림 99. 미나리냉이에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 35. 산딸기에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	6	17.8
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	19	55.9
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus arens</i>	좀뒤영벌	1	2.9
Hymenoptera	Apidae	<i>Nomada</i> sp.	알락꽃벌류	1	2.9
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae</i> sp.1	꼬마꽃벌류	3	8.8
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae</i> sp.2	꼬마꽃벌류	1	2.9
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae</i> sp.3	꼬마꽃벌류	3	8.8
계		2과 4~6속 7종		34	100

표 36. 국수나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	2	14.3
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	2	14.3
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.1	꼬마꽃벌류	4	28.5
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.2	꼬마꽃벌류	6	42.9
계		2과 2~3속 4종		14	100

표 37. 아카시나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉	15	62.5
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp. 1	애꽃벌류 1	3	12.5
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp. 2	애꽃벌류 2	2	8.3
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena</i> sp. 3	애꽃벌류 3	4	16.7
계		2과 2~4속 4종		24	100

표 38. 찔레에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	4	25.0
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.1	꼬마꽃벌류	2	12.5
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.2	꼬마꽃벌류	4	25.0
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.3	꼬마꽃벌류	6	37.5
계		2과 2~4속 4종		16	100

표 39. 미나리냉이에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.1	꼬마꽃벌류	2	33.3%
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.2	꼬마꽃벌류	4	66.7%
계		1과 1~2속 2종		6	100



산딸기 - 재래꿀벌
 그림 100. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 산딸기, 국수나무 꽃에서의 채밀활동모습

⑤ 강원도 인제군 한계리 854 밀원식물별 방화곤충상 조사(2020/5/29)(그림 101~109)

- 아까시나무, 짚레, 국수나무, 클로버, 영경귀, 구절초 6종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
- 아까시나무는 봉장으로부터 약 140m, 약 586m, 약 787m 떨어진 3개 군락에서 조사를 실시함
- 짚레, 국수나무는 봉장으로부터 약 30m내외로 떨어진 군락에서 조사를 실시함
- 클로버, 영경귀는 봉장으로부터 약 721m, 약 1.03km 떨어진 군락에서 조사를 실시
- 구절초는 봉장으로부터 644m 떨어진 군락에서 조사를 실시함

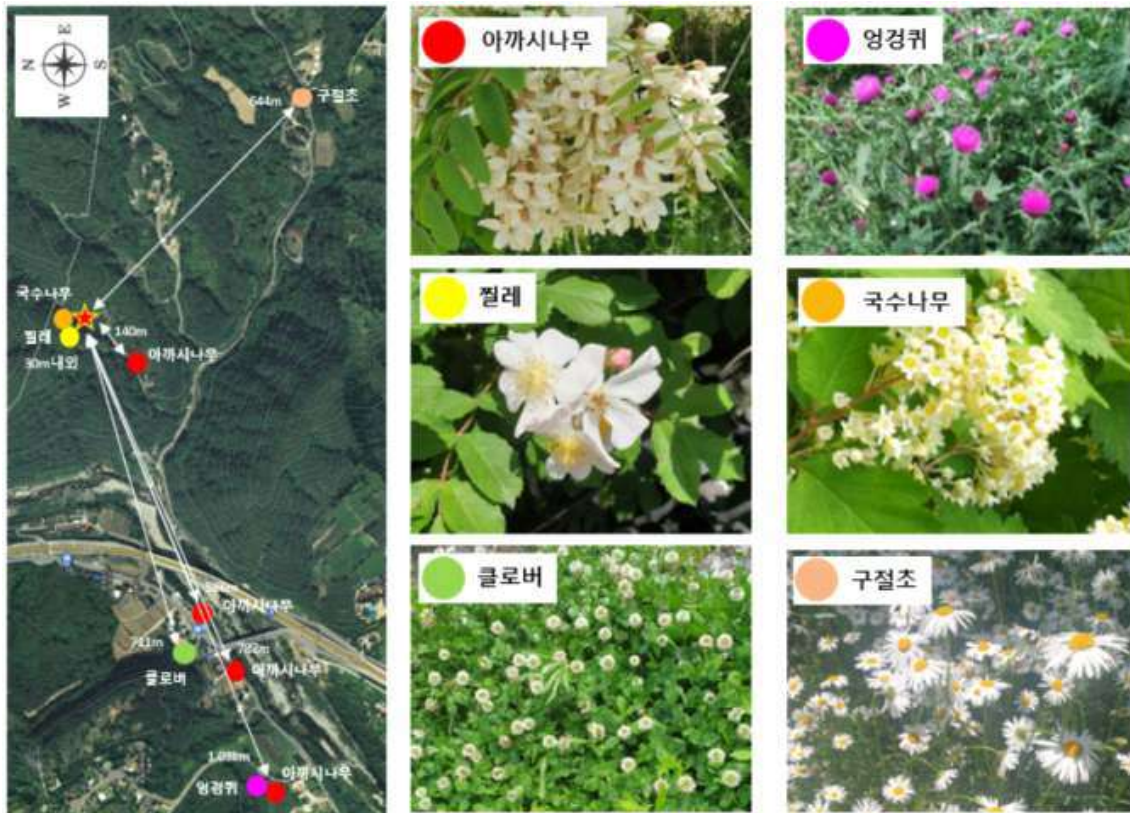


그림 101. 강원도 인제군 한계리 방화곤충상 조사(2020/5/29) 대상밀원식물 및 위치

-
- 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 아까시나무(근거리)에서 16.7%, 짚레에서 9.9%로 나타난 반면 아까시나무(원거리), 클로버, 영경귀, 구절초, 국수나무에서는 나타나지 않음.
 - 양봉꿀벌은 클로버에서 97.2%, 아까시나무(원거리)에서 96.1%, 아까시나무(근거리)에서 75%, 영경귀에서 75%로 비교적 높은 비율을 보였으며, 그 외 짚레에서 35.1%, 구절초에서 20%, 국수나무에서 14.3%를 나타냄
 - 대상 식물별 벌목 방화곤충의 전체 구성으로는 짚레에서 3과 6~10속 11종으로 가장 다양하게 나타났으며, 국수나무에서 3과 4~5속 5종, 구절초에서 2과 4속 4종, 영경귀에서 2과 3속 3종, 아까시나무(근거리)에서 2과 3속 3종, 아까시나무(원거리)에서 1과 2속 3종, 클로버에서 2과 2속 2종으로 나타남
 - 5월중순/말 강원도 인제군 한계리에서는 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 아까시나무와 산딸기에서 비교적 높은 선호성을 보이는 것으로 판단됨
 - 아까시나무(원거리)에서는 양봉꿀벌만 확인되었으며, 재래꿀벌의 채밀활동은 확인하지 못함
 - 이는 각 종의 서식 밀도에 따른 결과 또는 아까시나무에 대한 각 종의 선호도 차이에서 기인된 것으로 사료됨(해당지역에서 아까시나무는 봉장으로부터 약 580m 이상 떨어진 곳에서 조사됨)
 - 아까시나무와 짚레는 목본성, 관목성 밀원식물 중 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 선호성이 높은 식물로 확인됨
 - 클로버, 영경귀에는 재래꿀벌의 채밀활동이 관찰되지 않았지만(봉장으로부터 약 720m 이상 떨어진 곳에서 조사됨) 양봉의 높은 선호성으로 보아 재래꿀벌 역시 아까시나무 개화 후 초본성 밀원식물로서의 가치를 나타냄
-

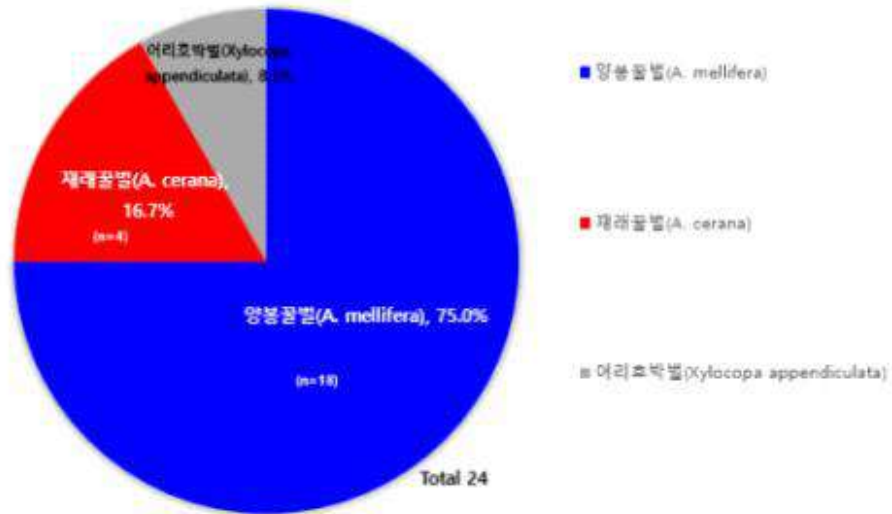


그림 102. 아까시나무(봉장으로 부터 140m인근)에서의 벌목 방화곤충 구성비

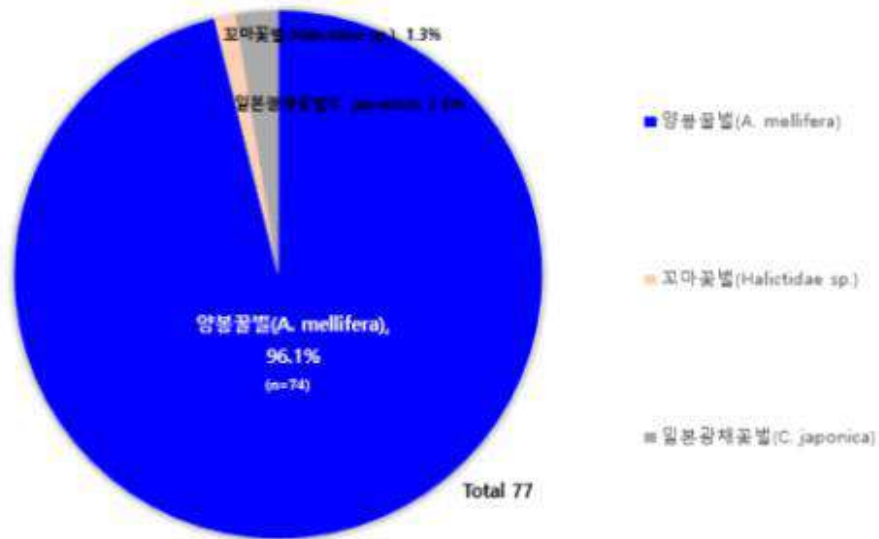


그림 103. 아까시나무(봉장으로 부터 500m이상 떨어진 곳)에서의 벌목 방화곤충 구성비



그림 104. 짚레에서의 벌목 방화곤충 구성비

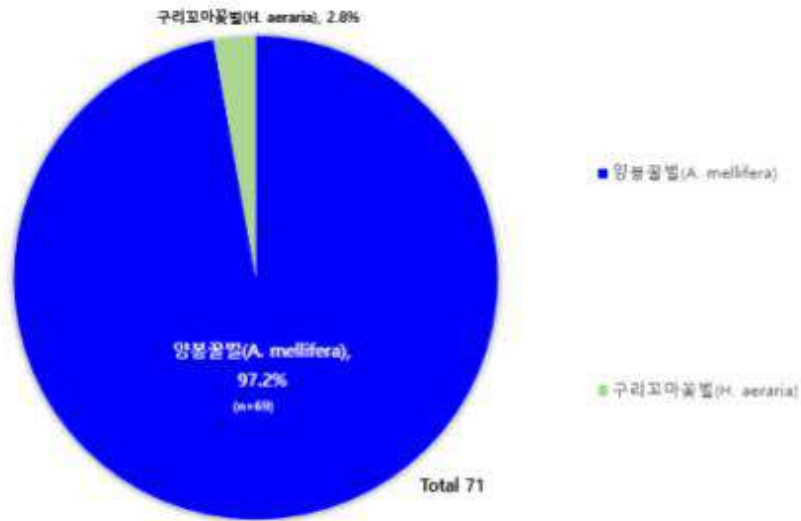


그림 105. 클로버에서의 벌목 방화곤충 구성비

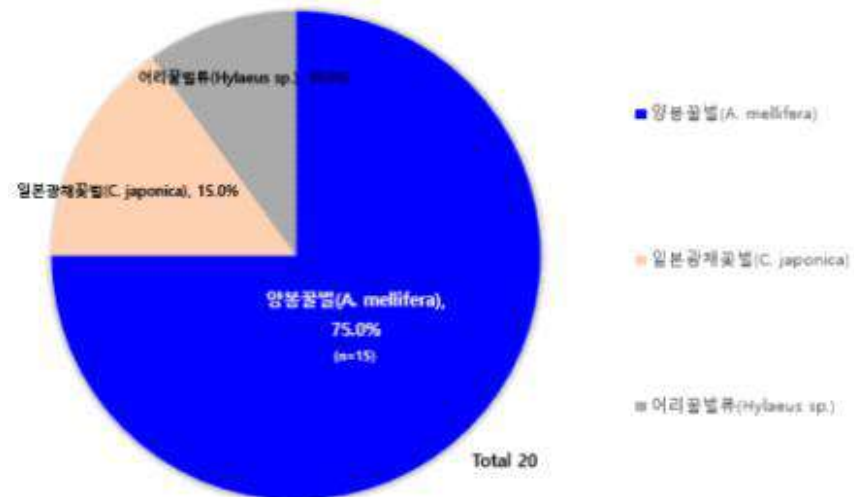


그림 106. 영경귀에서의 벌목 방화곤충 구성비

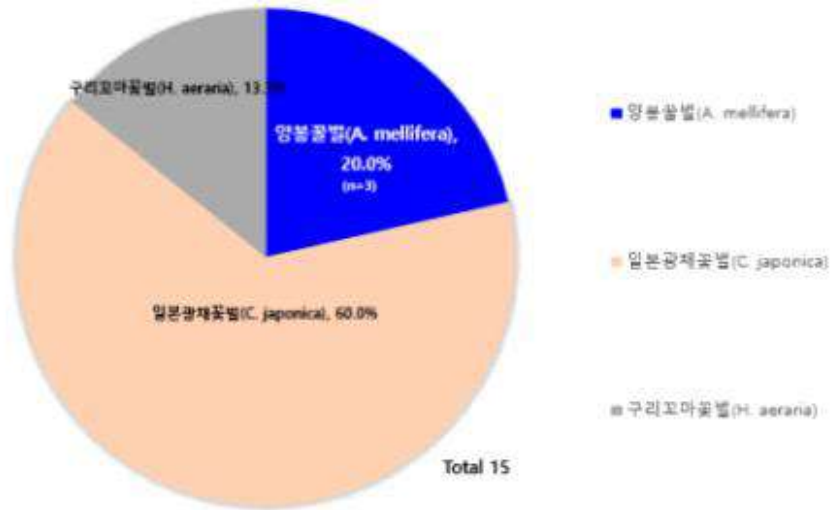


그림 107. 구절초에서의 벌목 방화곤충 구성비

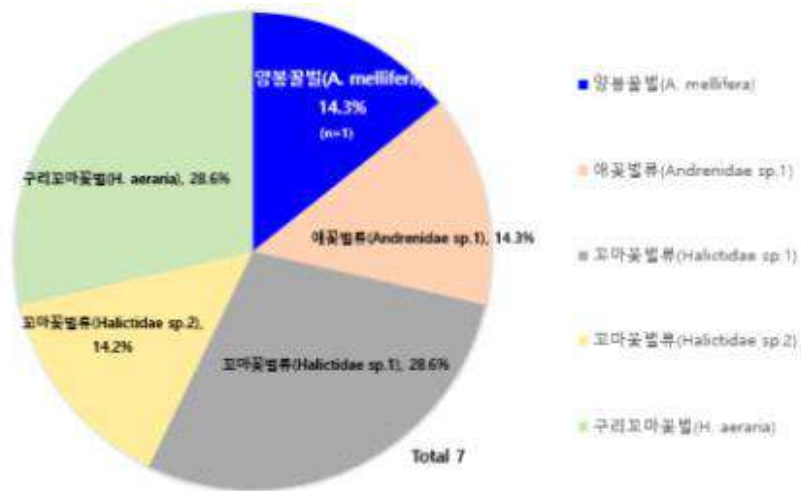


그림 108. 국수나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 40. 아까시나무(원거리, 봉장으로 부터 약 500m 이상)에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	4	16.7%
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	18	75.0%
Hymenoptera	Apidae	<i>Xylocopa appendiculata</i>	어리호박벌	2	8.3%
계		1과 2속 3종		24	100

표 41. 아까시나무(근거리, 봉장으로부터 약 140m)에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	74	96.1
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	2	2.6
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.	꼬마꽃벌류	1	1.3
계		2과 3속 3종		77	100

표 42. 짚레에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	11	9.9
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	39	35.1
Hymenoptera	Apidae	<i>Xylocopa appendiculata</i>	어리호박벌	4	3.6
Hymenoptera	Andrenidae	Andrenidae sp.1	애꽃벌류	8	7.2
Hymenoptera	Andrenidae	Andrenidae sp.2	애꽃벌류	10	9.0
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictus aeraria</i>	구리꼬마꽃벌	14	12.7
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.1	꼬마꽃벌류	5	4.5
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.2	꼬마꽃벌류	7	6.3
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.3	꼬마꽃벌류	8	7.2
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.4	꼬마꽃벌류	4	3.6
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.5	꼬마꽃벌류	1	0.9
계		3과 6~10속 11종		111	100

표 43. 클로버에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	69	97.2
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictus aeraria</i>	구리꼬마꽃벌	2	2.8
계		2과 2속 2종		71	100

표 44. 엉겅퀴에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	15	75.0
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	3	15.0
Hymenoptera	Colletidae	<i>Hylaeus</i> sp.	어리꿀벌류	2	10.0
계		2과 3속 3종		20	100

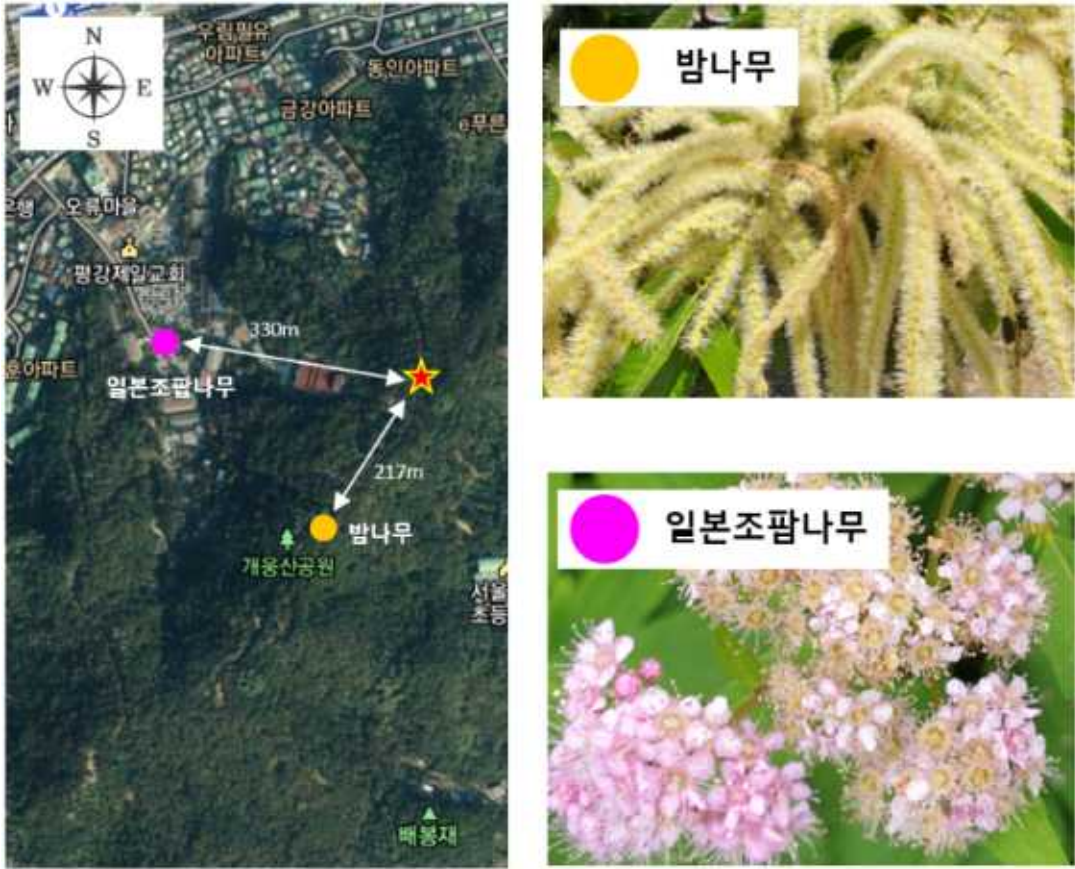


그림 110. 서울 구로구 개웅산 방화곤충상 조사(2020/6/15) 대상밀원식물 및 위치

- 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 밤나무에서 12.50%, 일본조팝나무에서 46.2%로 나타났으며 양봉꿀벌은 밤나무에서 18.80%, 30.8%로 나타남
- 대상 식물별 별목 방화곤충의 전체 구성으로는 밤나무에서 2과 3속 4종으로 확인되었으며 일본조팝나무에서는 1과 2속 3종으로 나타남
- 6월 초/중순 서울 구로구 개웅산에서는 재래꿀벌 및 양봉꿀벌 모두 밤나무와 일본조팝나무에 대한 선호성을 보이는 것으로 확인됨

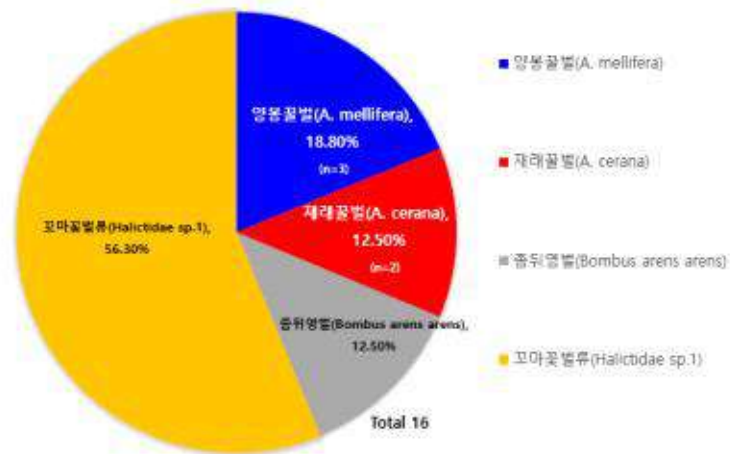


그림 111. 밤나무에서의 별목 방화곤충 구성비

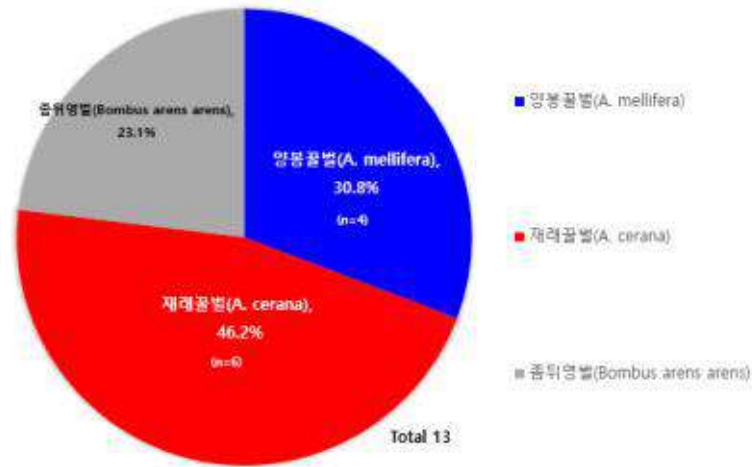


그림 112. 일본조팝나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 47. 밤나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	2	12.5
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	3	18.8
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus arans arens</i>	좀뒤영벌	2	12.5
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.	꼬마꽃벌류	9	56.3
계		2과 3속 4종		16	100

표 48. 일본조팝나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	6	46.2
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	4	30.8
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus arans arens</i>	좀뒤영벌	3	23.1
계		1과 2속 3종		13	100



재래꿀벌

양봉꿀벌

그림 113. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 일본조팝나무꽃에서의 채밀활동모습

⑦ 경기도 가평군 목동리 597 밀원식물별 방화곤충상 조사(2020/6/23) (그림 114~120)

- 대추나무, 미국낙산홍, 옥매, 망초류 4종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
- 대추나무, 망초류, 옥매는 봉장으로부터 약 808m, 약 815m 떨어진 군락에서 조사를 실시함
- 미국낙산홍은 봉장으로부터 약 40m내외로 떨어진 군락에서 조사를 실시함

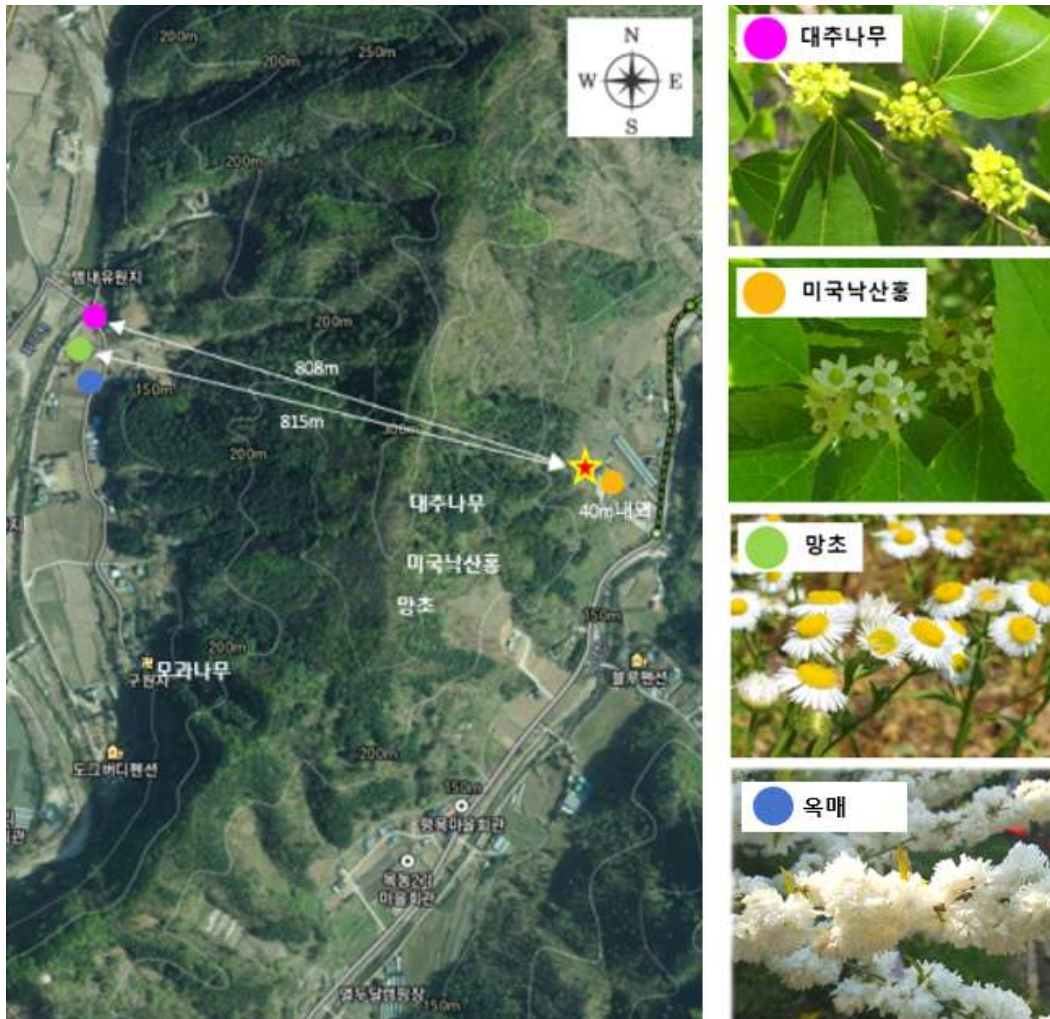


그림 114. 경기도 가평군 목동리 597 방화곤충상 조사(2020/6/23) 대상밀원식물 및 위치

- 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 대추나무에서 39.7%, 미국낙상홍에서 26.8%, 옥매에서 27.1%로 나타난 반면, 망초류에서는 나타나지 않음
- 양봉꿀벌은 대추나무에서 58.8%, 미국낙상홍에서 70.1%, 옥매에서 67%, 망초류에서는 26.7%로 나타남
- 대상 식물별 벌목 방화곤충의 전체 구성으로는 대추나무에서 3과 3~4속 5종으로, 미국낙상홍에서는 2과 2속 3종, 망초류에서 2과 3~5속 6종, 옥매에서 2과 2속 3종으로 나타남
- 6월 말 경기도 가평군 목동리 597에서 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 대추나무에서 가장 높은 높은 선호성을 보였으며, 미국낙상홍에서도 높은 선호성을 보이는 것으로 확인됨
- 망초류에서는 양봉꿀벌만 확인되었으며, 재래꿀벌의 채밀활동은 확인하지 못함
- 이는 망초류에 대한 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 선호도 차이에서 기인한 것으로 사료됨
- 대추나무는 여름철 목본성 밀원식물로서의 가치를 나타냄

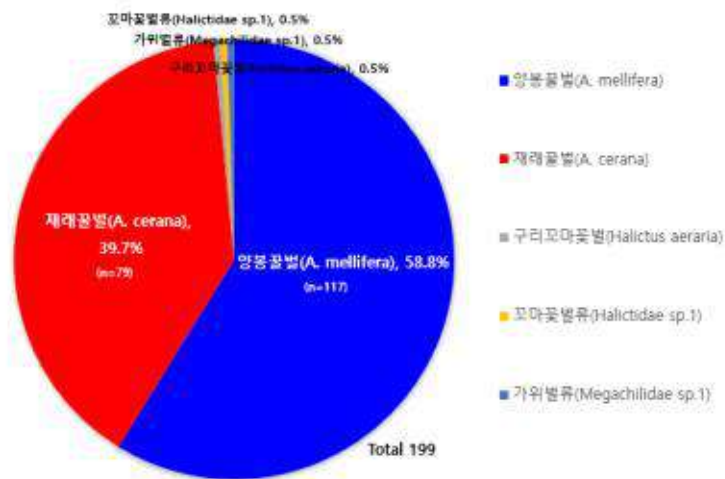


그림 115. 대추나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

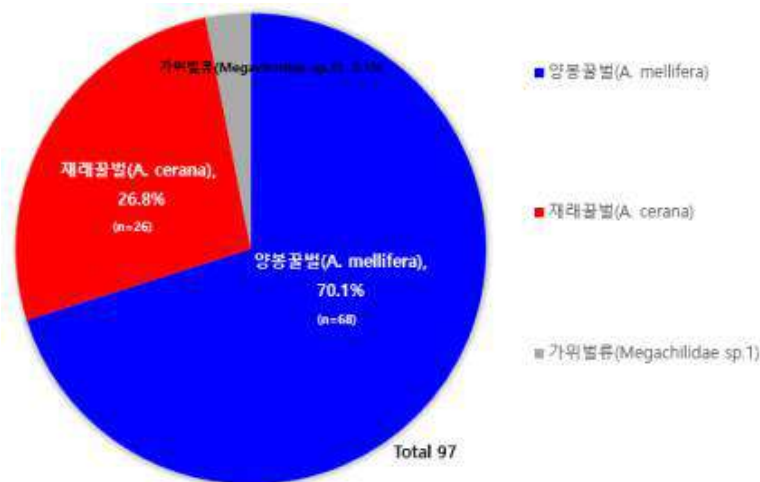


그림 116. 미국낙상홍에서의 벌목 방화곤충 구성비

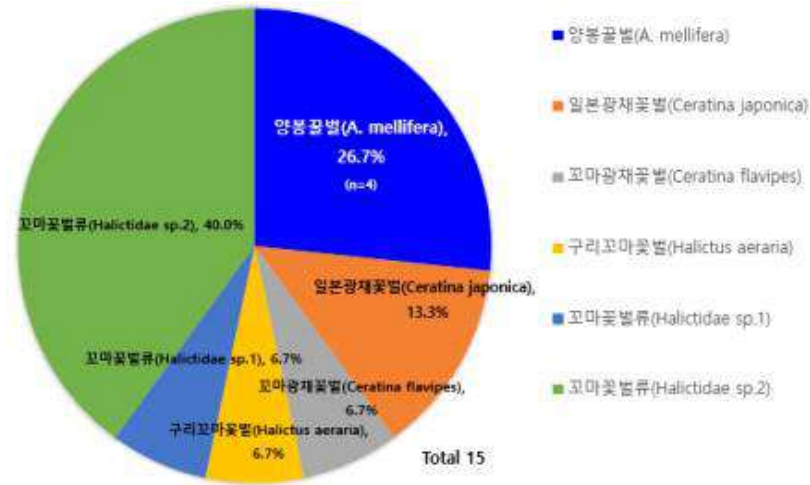


그림 117. 망초류에서의 벌목 방화곤충 구성비



그림 118. 옥매에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 49. 대추나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	79	39.7
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	117	58.8
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictus aeraria</i>	구리꼬마꽃벌	1	0.5
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp.	꼬마꽃벌류	1	0.5
Hymenoptera	Megachilidae	Megachilidae sp.	가위벌류	1	0.5
계		3과 3~4속 5종		199	100

표 50. 미국낙상홍에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	26	26.8
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	68	70.1
Hymenoptera	Megachilidae	Megachilidae sp.	가위벌류	3	3.1
계		2과 2속 3종		97	100

표 51. 망초류에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	4	26.7
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	2	13.3
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina flavipes</i>	꼬마광채꽃벌	1	6.7
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictus aeraria</i>	구리꼬마꽃벌	1	6.7
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp. 1	꼬마꽃벌류	1	6.7
Hymenoptera	Halictidae	Halictidae sp. 2	꼬마꽃벌류	6	40.0
계		2과 3~5속 6종		15	100

표 52. 옥매에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	26	27.1%
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	67	69.8%
Hymenoptera	Megachilidae	Megachilidae sp. 1	가위벌류	3	3.1%
계		2과 3속 3종		96	100



재래꿀벌



양봉꿀벌

그림 119. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 대추나무꽃에서의 채밀활동모습



재래꿀벌

양봉꿀벌

그림 120. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 미국낙상홍(왼쪽), 망초류(오른쪽) 꽃에서의 채밀활동모습

⑧ 강원도 인제군 한계리 854 밀원식물별 방화곤충상 조사(2020/6/23)
(그림 121~124)

- 밤나무, 대추나무 2종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
- 밤나무, 대추나무는 봉장으로 부터 약 780m, 약 699m 떨어진 군락에서 조사를 실시함

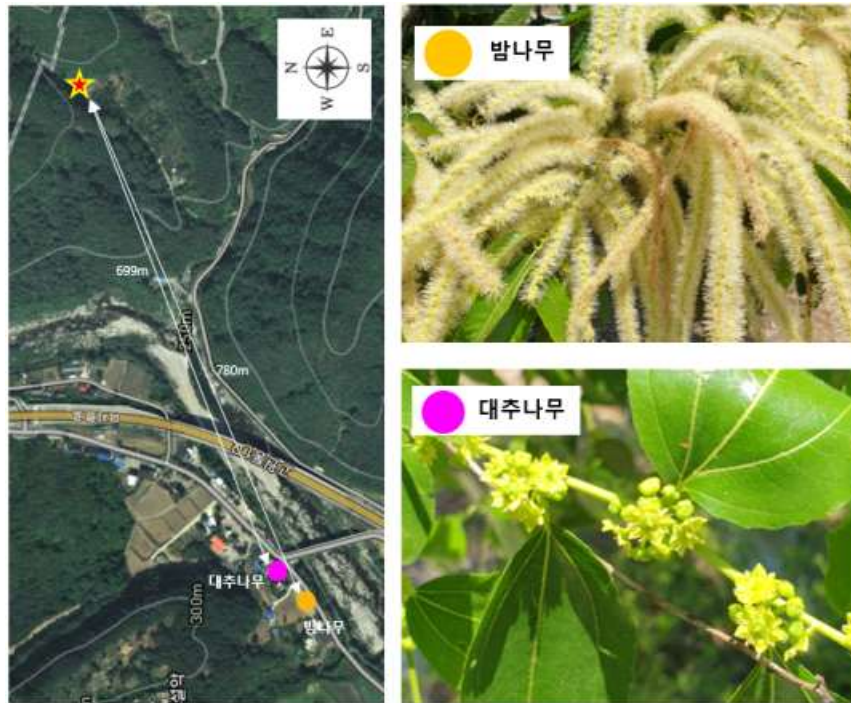


그림 121. 강원도 인제군 한계리 방화곤충상 조사(2020/6/23) 대상밀원식물 및 위치

- 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 밤나무에서 7.7%, 대추나무에서는 62.5%로 나타났으며 양봉꿀벌은 밤나무에서 92.3%, 대추나무에서 37.5%로 나타남. (그림 122~123)
- 밤나무와 대추나무에서 재래꿀벌과 양봉꿀벌 외 벌목 방화곤충의 채밀활동은 확인하지 못함
- 6월 말 강원도 인제군 한계리에서 재래꿀벌이 대추나무에서 양봉꿀벌보다 높은 선호성을 보임을 확인하였으며, 밤나무에서도 선호성을 보이는 것으로 사료됨
- 대추나무는 여름철 목본성 밀원식물로서의 가치를 나타냄
- 밤나무에서도 재래꿀벌의 채밀활동이 관찰되었으나, 확인된 개체수가 적어 이는 3차년도에 보완하고자 하였음

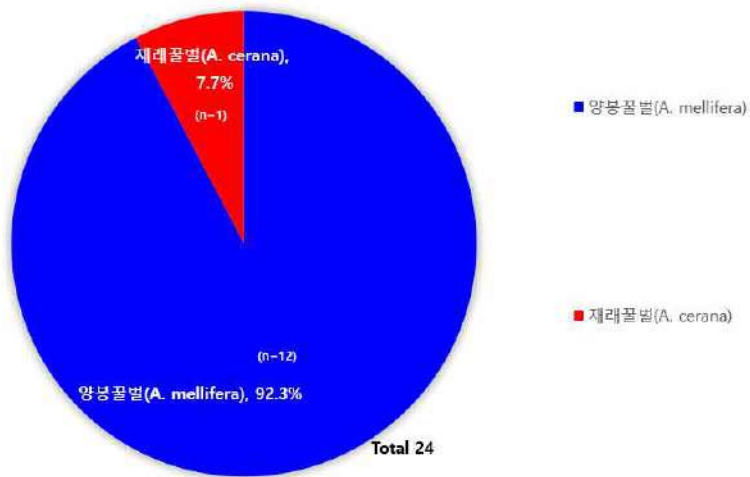


그림 122. 밤나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

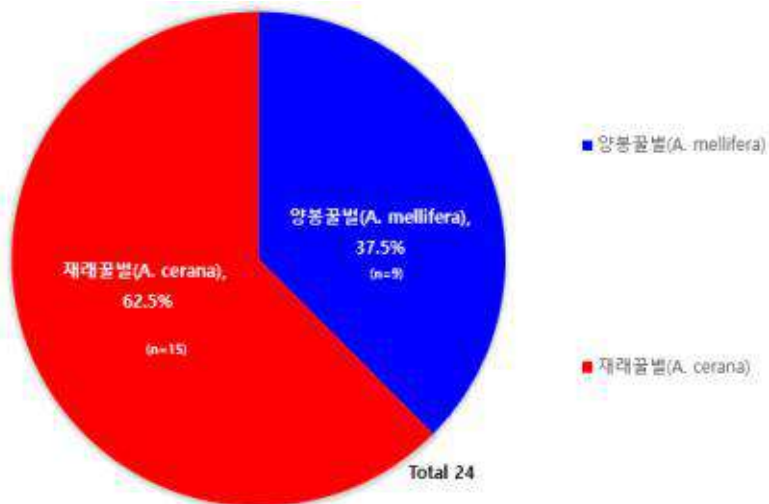


그림 123. 대추나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 53. 밤나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	1	7.7
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	12	92.3
계		1과 1속 2종		13	100

표 54. 대추나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	15	62.5
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	9	37.5
계		1과 1속 2종		24	100



그림 124. 양봉꿀벌의 밤나무꽃에서의 채밀활동모습



그림 125. 강원도 인제군 한계리 방화곤충상 조사(2020/7/8) 대상밀원식물 및 위치

⑨ 강원도 인제군 한계리 854 밀원식물별 방화곤충상 조사(2020/7/8) (그림 125~126)

- 달피나무 1종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
- 달피나무는 봉장으로부터 382m 떨어진 군락에서 조사를 실시함
- 달피나무에 대한 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 비율은 재래꿀벌은 8.5%로, 양봉꿀벌의 경우 72.3%로 나타남
- 해당 수종에서 재래꿀벌과 양봉꿀벌 외 벌목 방화곤충은 꿀벌과 1종, 꼬마꽃벌과 4종, 애꽃벌과 2종으로 나타남
- 7월 초 강원도 인제군 한계리에서 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 달피나무에 대한 선호성을 보이는 것으로 판단됨
- 달피나무의 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌이 양봉꿀벌에 비해 낮은 비율을 나타낸 것은 각 종의 서식 밀도 혹은 종의 선호도 차이에서 기인된 것으로 사료됨



그림 126. 달피나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 55. 달피나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	4	8.5
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	34	72.3
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	1	2.1
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae</i> sp. 1	꼬마꽃벌류	1	2.1
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae</i> sp. 2	꼬마꽃벌류	1	2.1
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae</i> sp. 3	꼬마꽃벌류	2	4.3
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae</i> sp. 4	꼬마꽃벌류	2	4.3
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrenidae</i> sp. 1	애꽃벌류	1	2.1
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrenidae</i> sp. 2	애꽃벌류	1	2.1
계		3과 3~4속 5종		47	100

⑩ 경기도 가평군 목동리 597 밀원식물별 방화곤충상 조사(2020/7/9) (그림 127~129)

- 모감주나무 1종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
- 모감주나무는 봉장으로 부터 약 1.85km 떨어진 곳에서 조사를 실시함



그림 127. 경기도 가평군 목동리 597 방화곤충상 조사(2020/7/9) 대상밀원식물 및 위치

- 모감주나무에서의 재래꿀벌의 비율은 40.1%로, 양봉꿀벌은 27.0%로 나타남
- 모감주나무에서 벌목 방화곤충의 전체 구성으로는 꿀벌과 3종, 어리꿀벌과 3종, 꼬마꽃벌과 8종, 가위벌과 4종으로 다양한 종류의 방화곤충이 모감주나무를 선호하는 것으로 판단됨
- 7월 초 경기도 가평군 목동리 597에서 모감주나무에 대하여 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 높은 선호성을 보이며, 재래꿀벌의 선호성이 양봉꿀벌보다 현저히 높은 것으로 나타남
- 모감주나무는 여름철 목본성 밀원식물 중 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 선호성이 높은 식물로 확인됨
- 재래꿀벌과 양봉꿀벌을 제외한 다양한 벌목 방화곤충이 모감주나무를 선호하는 것으로 나타나, 꿀벌과 야생벌을 위한 여름철 밀원식물로서의 가치를 나타냄

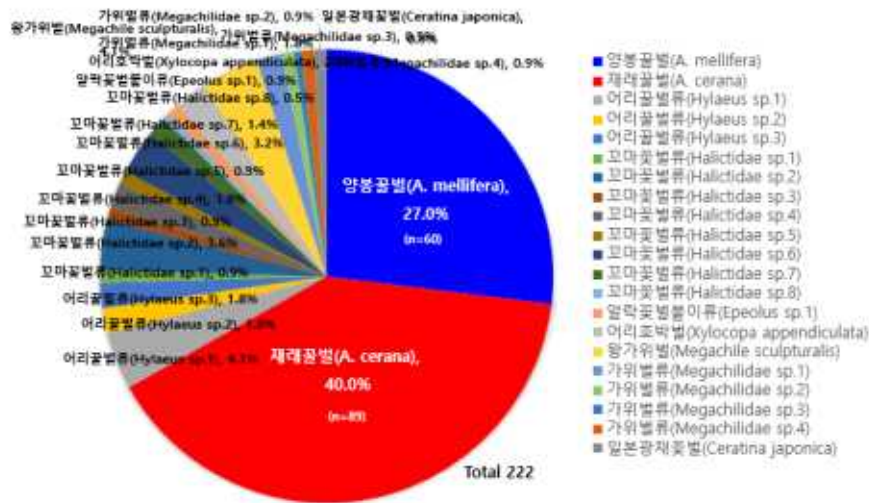


그림 128. 모감주나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 56. 모감주나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	89	40.1
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	60	27.0
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	2	0.9
Hymenoptera	Apidae	<i>Epeolus sp.1</i>	알락꽃벌붙이류	2	0.9
Hymenoptera	Apidae	<i>Xylocopa appendiculata circumvolans</i>	어리호박벌	5	2.3
Hymenoptera	Colletidae	<i>Hylaeus sp. 1</i>	어리꿀벌류	9	4.1
Hymenoptera	Colletidae	<i>Hylaeus sp. 2</i>	어리꿀벌류	4	1.8
Hymenoptera	Colletidae	<i>Hylaeus sp. 3</i>	어리꿀벌류	4	1.8
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae sp. 1</i>	꼬마꽃벌류	2	0.9
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae sp. 2</i>	꼬마꽃벌류	8	3.6
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae sp. 3</i>	꼬마꽃벌류	2	0.9
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae sp. 4</i>	꼬마꽃벌류	4	1.8
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae sp. 5</i>	꼬마꽃벌류	2	0.9
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae sp. 6</i>	꼬마꽃벌류	7	3.2
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae sp. 7</i>	꼬마꽃벌류	3	1.4
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae sp. 8</i>	꼬마꽃벌류	1	0.5
Hymenoptera	Megachilidae	<i>Megachile culpturalis</i>	왕가위벌	9	4.1
Hymenoptera	Megachilidae	<i>Megachilidae sp. 1</i>	가위벌류	4	1.8
Hymenoptera	Megachilidae	<i>Megachilidae sp. 2</i>	가위벌류	2	0.9
Hymenoptera	Megachilidae	<i>Megachilidae sp. 3</i>	가위벌류	1	0.5
Hymenoptera	Megachilidae	<i>Megachilidae sp. 4</i>	가위벌류	2	0.9
계		4과 7속(이상) 21종		222	100



재래꿀벌 양봉꿀벌
그림 129. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 모감주나무꽃에서의 채밀활동모습



그림 130. 강원도 인제군 한계리 방화근충상 조사(2020/8/20) 대상밀원식물 및 위치

⑩ 강원도 인제군 한계리 밀원식물별 방화곤충상 조사(2020/8/20) (그림 130~131)

- 가죽나무 1종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
- 가죽나무는 봉장으로부터 약 289km 떨어진 곳에서 조사를 실시함
- 가죽나무에서의 양봉꿀벌은 37개체, 100%로 나타났으며 재래꿀벌의 채밀활동은 관찰되지 않았음
- 8월 중순 강원도 인제군 한계리에서 가죽나무에 대하여 양봉꿀벌만이 높은 선호성을 보였으며, 가까운 거리임에도 불구하고 재래꿀벌의 선호도는 나타나지 않은 것으로 보아 해당 밀원은 여름철 목본성 밀원식물 중 양봉꿀벌의 선호성이 높은 식물로 판단됨

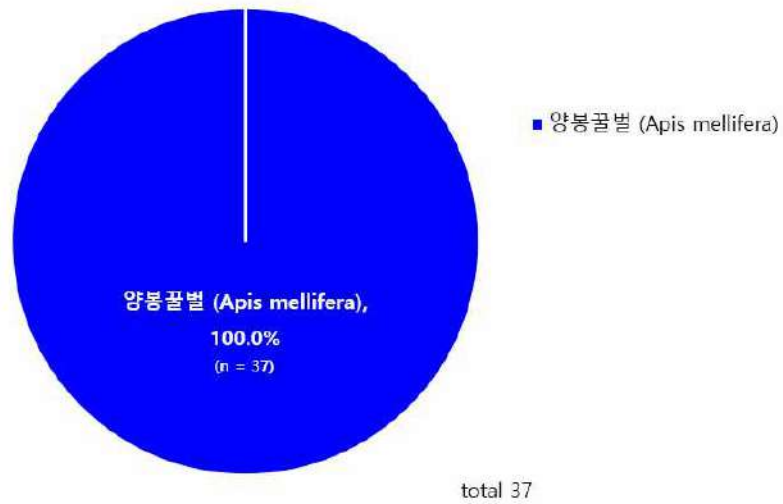


그림 131. 가죽나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 57. 가죽나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	37	100%
계		1과 1속 1종		37	100%

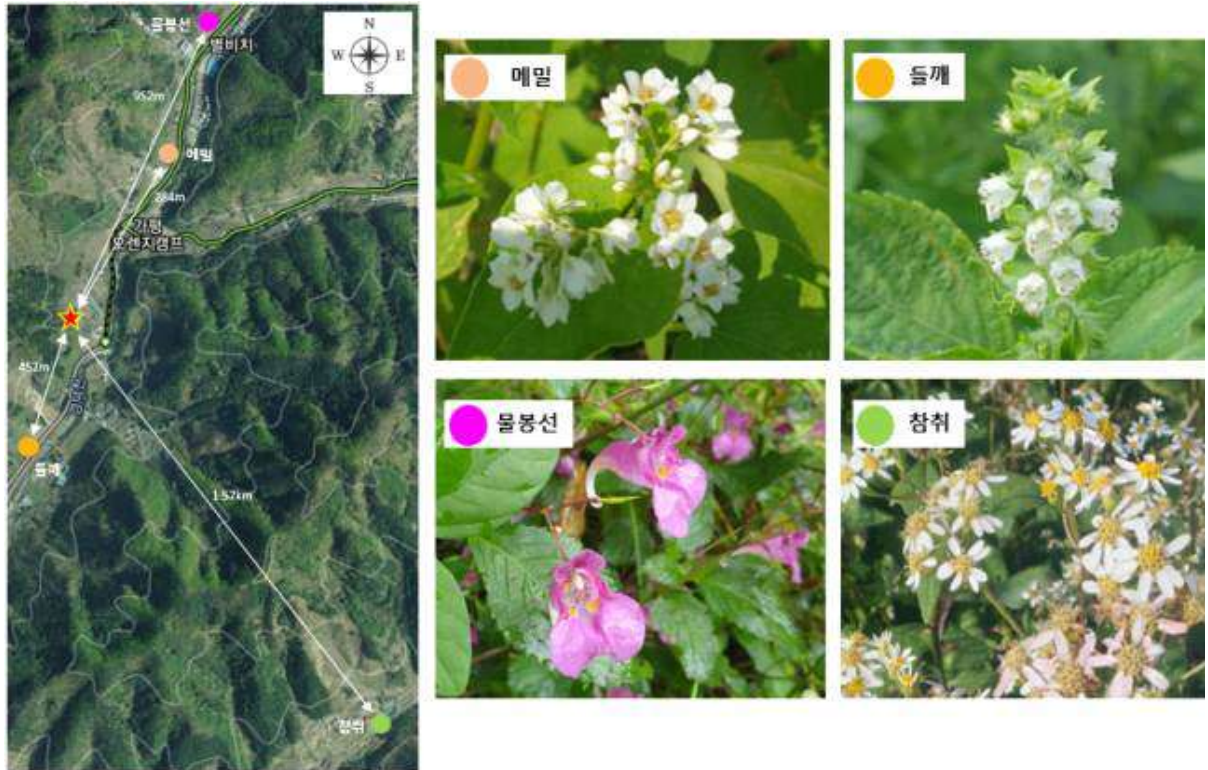


그림 132. 경기도 가평군 목동리 597 방화곤충상 조사(2020/9/15) 대상밀원식물 및 위치

㉔ 경기도 가평군 목동리 597 밀원식물별 방화곤충상 조사(2020/9/15) (그림 132~139)

- 메밀, 물봉선, 들깨, 참취 4종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
- 메밀은 봉장으로부터 약 952m, 약 284m 떨어진 군락에서 조사를 실시함
- 들깨는 봉장으로부터 약 452m 떨어진 군락에서 조사를 실시함
- 참취는 봉장으로부터 1.57km 떨어진 군락에서 조사를 실시함
- 9월 중순 경기도 가평군 목동리 597에서는 양봉꿀벌이 메밀, 들깨, 물봉선, 참취 모두 선호하는 것을 나타냄
- 재래꿀벌은 메밀과 들깨에서 높은 선호성을 보였으며 해당 밀원 수종들에 대한 선호도가 재래꿀벌이 양봉꿀벌에 비해 높은 것으로 사료됨
- 메밀과 들깨는 가을철 밀원식물 중 재래꿀벌의 선호성이 높은 식물로 확인됨
- 물봉선에 대한 재래꿀벌의 낮은 선호도와 참취에서 발견되지 않은 재래꿀벌의 방화활동은 종의 선호도 차이에서 기인한 것으로 사료됨



그림 133. 메밀에서의 벌목 방화곤충 구성비

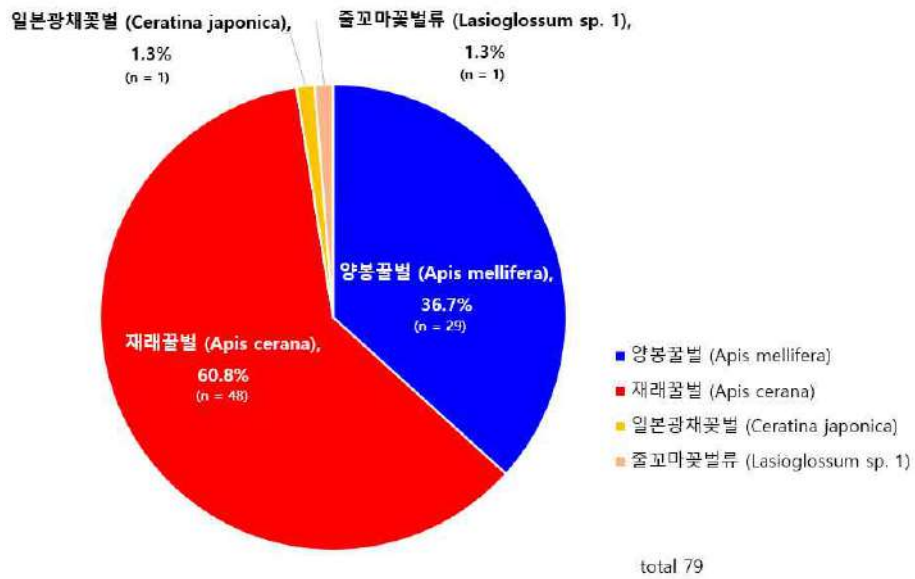


그림 134. 들개에서의 벌목 방화곤충 구성비

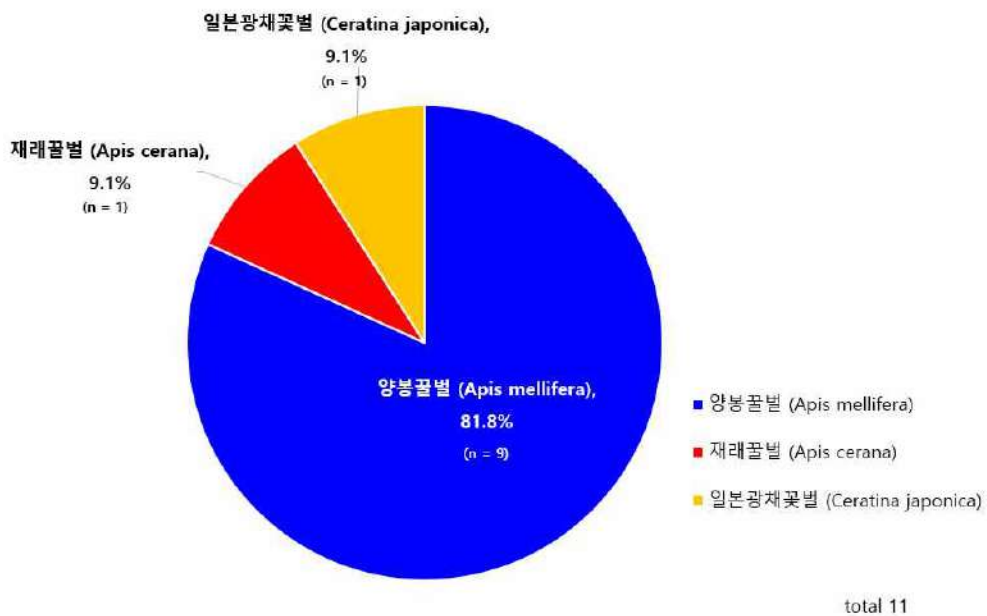


그림 135. 물봉선에서의 벌목 방화곤충 구성비

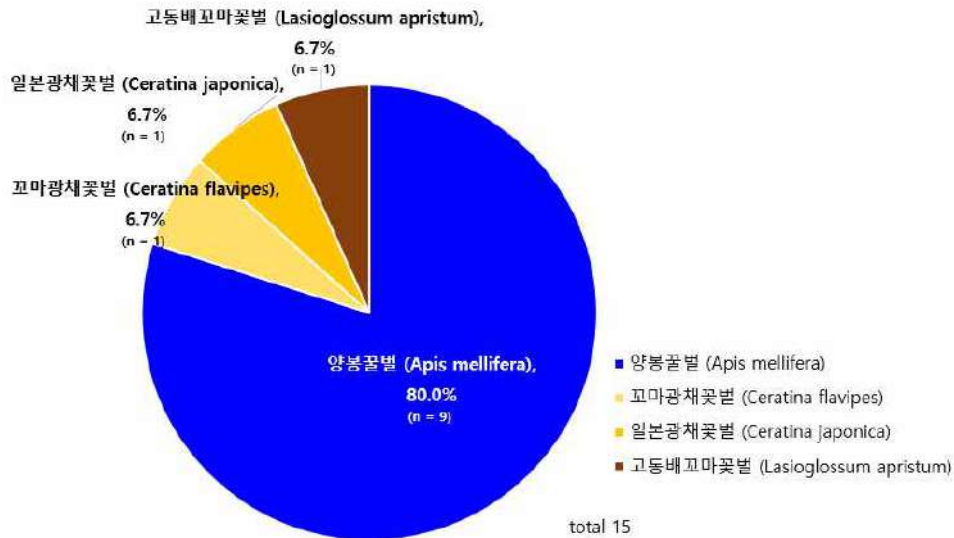


그림 136. 참취에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 58. 메밀에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	70	78.7
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	17	19.1
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	1	1.1
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp. 1</i>	줄꼬마꽃벌류	1	1.1
계		2과 3속 4종		89	100

표 59. 들깨에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	48	61
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	29	37
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	1	1
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp. 1</i>	줄꼬마꽃벌류	1	1
계		2과 3속 4종		79	100

표 60. 물봉선에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	1	9.1
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	9	81.8
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	1	9.1
계		1과 2속 3종		11	100

표 61. 참취에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	12	80
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina flavipes</i>	꼬마광채꽃벌	1	6.67
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	1	6.67
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum apristum</i>	고동배꼬마꽃벌	1	6.67
계		1과 3속 4종		15	100



재래꿀벌



양봉꿀벌

그림 137. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 메밀(왼쪽), 참취(오른쪽) 꽃에서의 채밀활동모습



재래꿀벌 양봉꿀벌
그림 138. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 들깨꽃에서의 채밀활동모습



재래꿀벌 양봉꿀벌
그림 139. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 물봉선꽃에서의 채밀활동모습



그림 140. 강원도 인제군 한계리 방화근충상 조사(2020/9/16) 대상밀원식물 및 위치

- ⑬ 강원도 인제군 한계리 854 밀원식물별 방화곤충상 조사(2020/9/16) (그림 140~149)
- 들깨, 물봉선, 개썩부쟁이, 미국썩부쟁이, 고마리, 환삼덩굴, 개여뀌 6종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
 - 물봉선, 고마리는 봉장으로부터 약 915m 떨어진 군락에서 조사를 실시함
 - 들깨, 환삼덩굴, 개썩부쟁이, 미국썩부쟁이, 개여뀌는 봉장으로부터 약 200m 이내 떨어진 군락에서 조사를 실시함
 - 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 들깨에서 17.1%, 물봉선에서 11.1%, 고마리에서 30%, 환삼덩굴에서 4%, 개여뀌에서 5.9%로 나타난 반면 개썩부쟁이와 미국썩부쟁이에서는 나타나지 않음
 - 양봉꿀벌은 들깨에서 77.1%, 물봉선에서 33.3%, 개썩부쟁이에서 25%, 미국썩부쟁이에서 15.4%, 고마리에서 70%, 환삼덩굴에서 92%, 개여뀌에서 29.4%로 나타남
 - 대상식물별 벌목 방화곤충의 전체 구성으로는 물봉선에서 2과 4속 6종으로 가장 다양하게 나타났으며 들깨에서 3과 3속 4종, 개썩부쟁이에서 2과 3속 4종, 미국썩부쟁이에서 2과 3속 5종, 고마리에서 1과 1속 2종, 환삼덩굴에서 2과 2속 3종, 개여뀌에서는 2과 6속 11종 으로 나타남
 - 들깨에서 재래꿀벌과 양봉꿀벌 외 벌목 방화곤충은 꼬마꽃벌과(Halictidae) 1종과 어리꿀벌과(Colletidae) 1종으로 확인됨(그림 141)
 - 물봉선에서 재래꿀벌과 양봉꿀벌 외 벌목 방화곤충은 꿀벌과(Apidae) 3종과 애꽃벌과(Andrenidae) 1종으로 확인됨(그림 142)
 - 개썩부쟁이에서 양봉꿀벌 외 벌목 방화곤충은 꿀벌과(Apidae) 1종과 꼬마꽃벌과(Halictidae) 2종으로 확인됨(그림 143)
 - 미국썩부쟁이에서 양봉꿀벌 외 벌목 방화곤충은 꿀벌과(Apidae) 1종과 꼬마꽃벌과(Halictidae) 3종으로 확인됨(그림 144)
 - 고마리에서는 재래꿀벌과 양봉꿀벌을 제외한 벌목 방화곤충의 방화활동은 관찰되지 않았음(그림 145)
 - 개여뀌에서 재래꿀벌과 양봉꿀벌 외 벌목 방화곤충은 꿀벌과(Apidae) 4종과 꼬마꽃벌과(Halictidae) 5종으로 확인됨(그림 146)
 - 환삼덩굴에서 재래꿀벌과 양봉꿀벌 외 벌목 방화곤충은 꼬마꽃벌과(Halictidae) 1종으로 확인됨(그림 147)
 - 9월 중순 강원도 인제군 한계리에서는 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 들깨에서 가장 높은 선호성을 보였으며, 그 외 물봉선과 고마리, 환삼덩굴에서도 일부 선호성을 확인함
 - 개썩부쟁이와 미국썩부쟁이에서는 양봉꿀벌만 확인되었으며, 재래꿀벌의 채밀활동은 확인하지 못함
 - 이는 각 종의 선호도 차이에서 기인된 것으로 사료됨(해당 지역에서 개썩부쟁이, 미국썩부쟁이는 봉장으로부터 약 200m이내 떨어진 군락에서 조사를 실시함)
 - 들깨는 가을철 밀원식물 중 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 선호성이 높은 식물로 확인됨
 - 물봉선과 고마리, 환삼덩굴, 개여뀌에서 재래꿀벌의 활발한 채밀활동이 관찰되지는 않았으나, 해당 초본류도 일부 선호하여 가을철 초본성 밀원식물로서의 가치를 나타냄

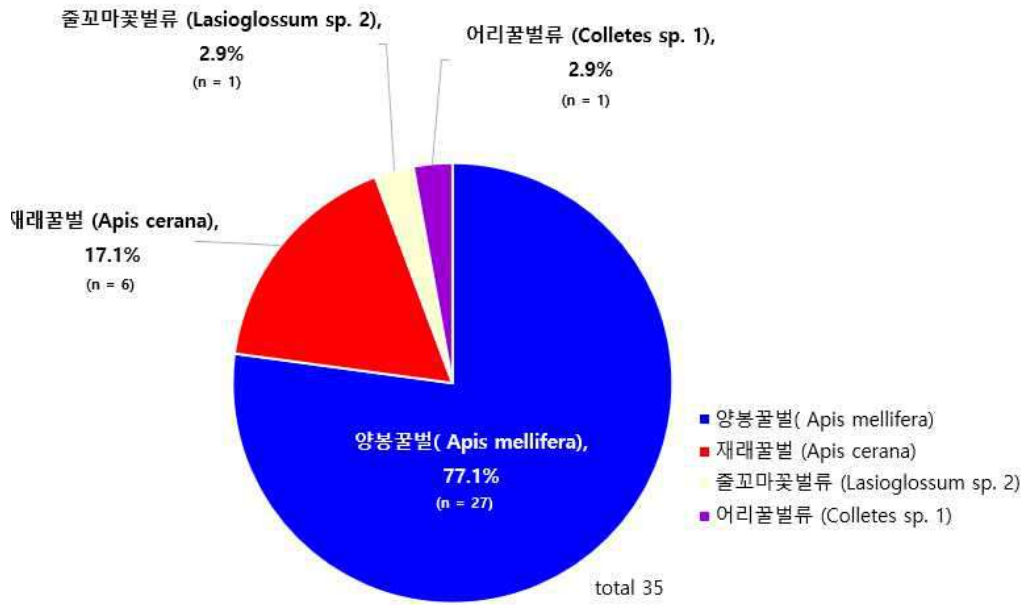


그림 141. 들깨에서의 벌목 방화곤충 구성비

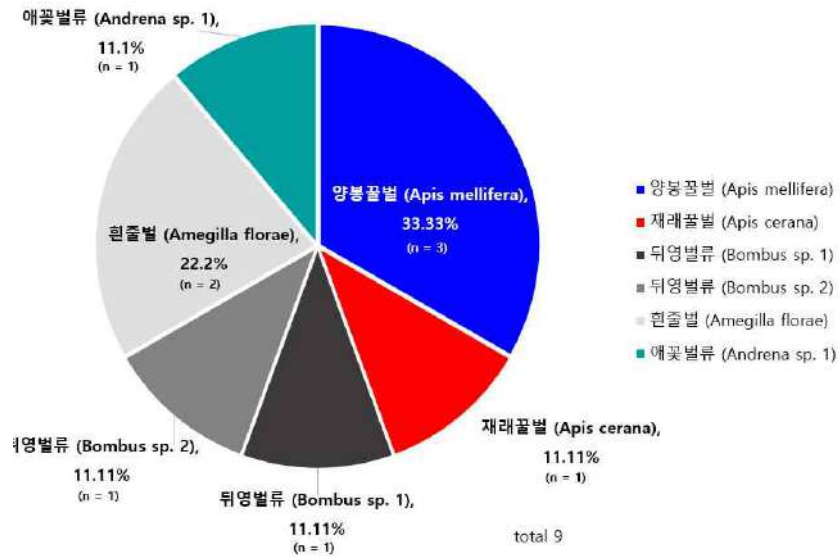


그림 142. 물봉선에서의 벌목 방화곤충 구성비

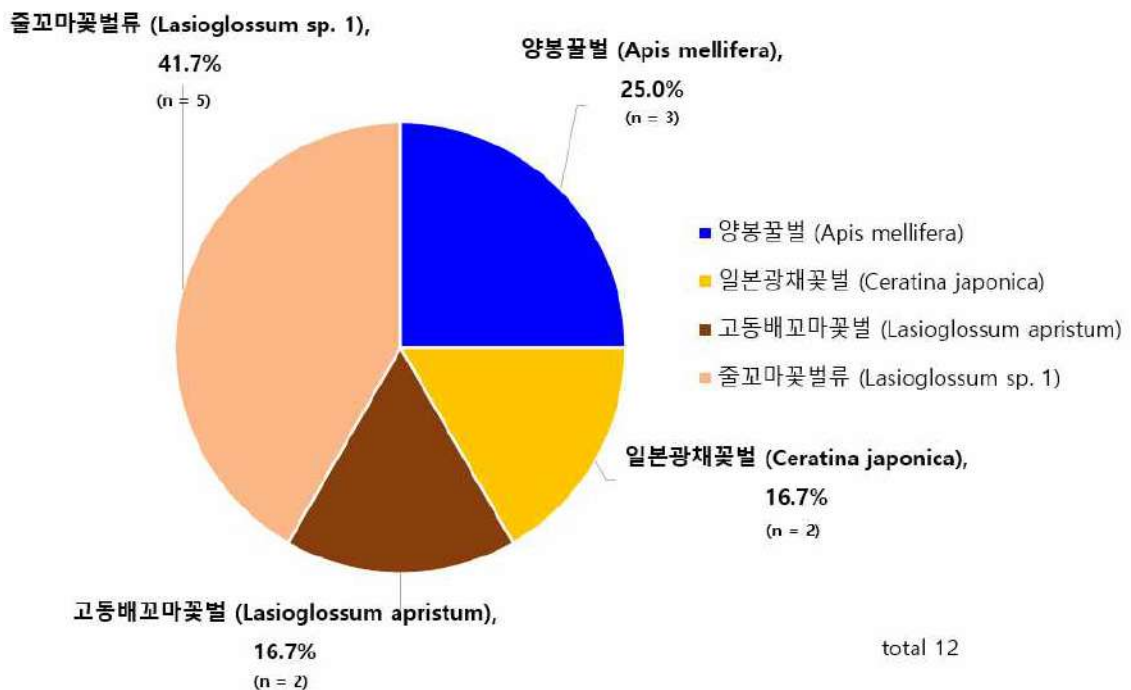


그림 143. 개쑥부쟁이에서의 벌목 방화곤충 구성비



그림 144. 미국쑥부쟁이에서의 벌목 방화곤충 구성비

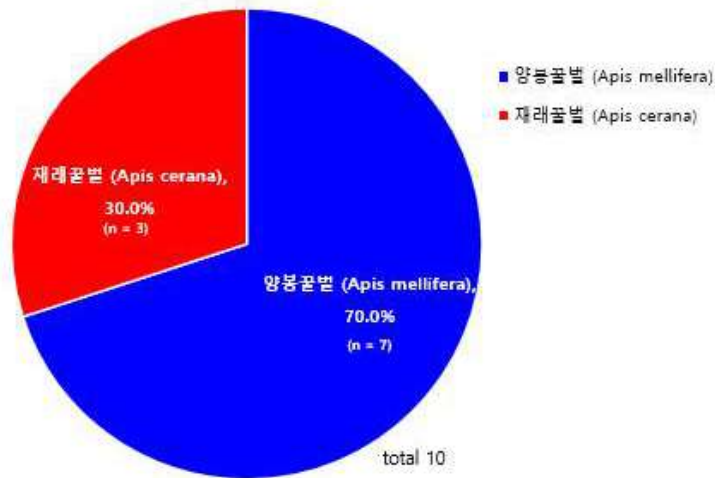


그림 145. 고마리에서의 벌목 방화곤충 구성비

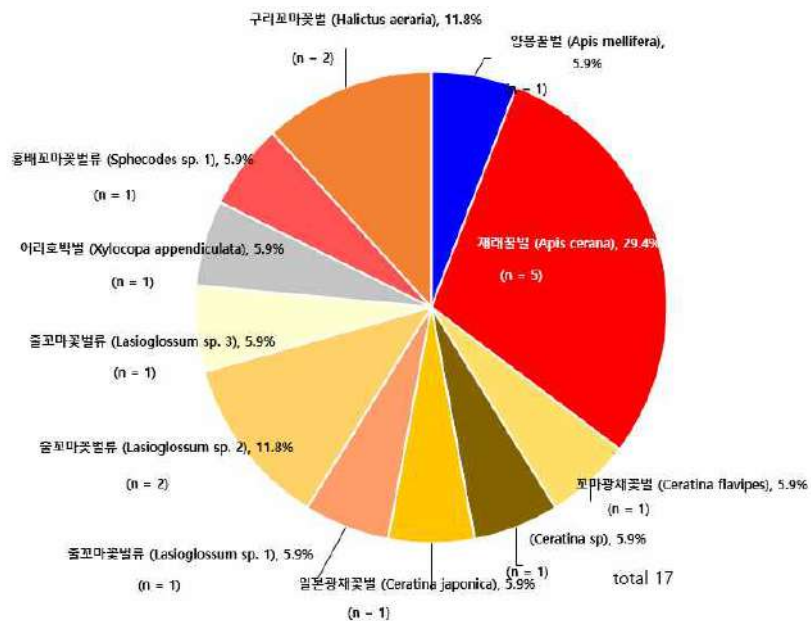


그림 146. 개여뀌에서의 벌목 방화곤충 구성비



그림 147. 환삼덩굴에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 62. 들깨에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	6	17.1
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	27	77.1
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp.1</i>	줄꼬마꿀벌류	1	2.9
Hymenoptera	Colletidae	<i>Colletes sp.1</i>	어리꿀벌류	1	2.9
계			3과 3속 4종	35	100

표 63. 물봉선에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	1	11.1
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	3	33.3
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus ignitus</i>	호박벌	1	11.1
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus ussuriensis</i>	우수리뒤영벌	1	11.1
Hymenoptera	Apidae	<i>Amegilla florum</i>	흰줄벌	2	22.2
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena sp. 1</i>	애꽃벌류	1	11.1
계			2과 4속 6종	9	100

표 64. 개썩부쟁이에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	3	25
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	2	16.7
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum aprisum</i>	고동배꼬마꽃벌	2	16.7
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp.1</i>	줄꼬마꽃벌류	5	41.7
계		2과 3속 4종		12	100

표 65. 미국썩부쟁이에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	2	15.4
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	3	23.1
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp.1</i>	줄꼬마꽃벌류	2	15.4
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp.2</i>	줄꼬마꽃벌류	5	38.5
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp.3</i>	줄꼬마꽃벌류	1	7.7
계		2과 3속 5종		13	100

표 66. 고마리에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	3	30
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	7	70
계		1과 1속 2종		10	100

표 67. 환삼덩굴에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	1	4
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	23	92
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp.1</i>	줄꼬마꽃벌류	1	4
계		2과 2속 3종		25	100

표 68. 개여뀌에서 조사된 벌목 방화근충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체 수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	1	5.9%
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	5	29.4%
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina flavipes</i>	꼬마광채꽃벌	1	5.9%
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina japonica</i>	일본광채꽃벌	1	5.9%
Hymenoptera	Apidae	<i>Ceratina sp.</i>	광채꽃벌류	1	5.9%
Hymenoptera	Apidae	<i>Xylocopa appendiculata</i>	어리호박벌	1	5.9%
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp.1</i>	줄꼬마꽃벌류	1	5.9%
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp.2</i>	줄꼬마꽃벌류	2	11.8%
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp.3</i>	줄꼬마꽃벌류	1	5.9%
Hymenoptera	Halictidae	<i>Sphecodes sp.1</i>	홍배꼬마꽃벌류	1	5.9%
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictus aeraria</i>	구리꼬마꽃벌	2	11.8%
계		2과 6속 11종		17	100



그림 148. 양봉꿀벌의 환삼덩굴(왼쪽), 고마리(오른쪽) 꽃에서의 채밀활동모습



재래꿀벌
그림 149. 양봉꿀벌의 이고들빼기(왼쪽), 개쑥부쟁이(오른쪽) 꽃에서의 채밀활동모습

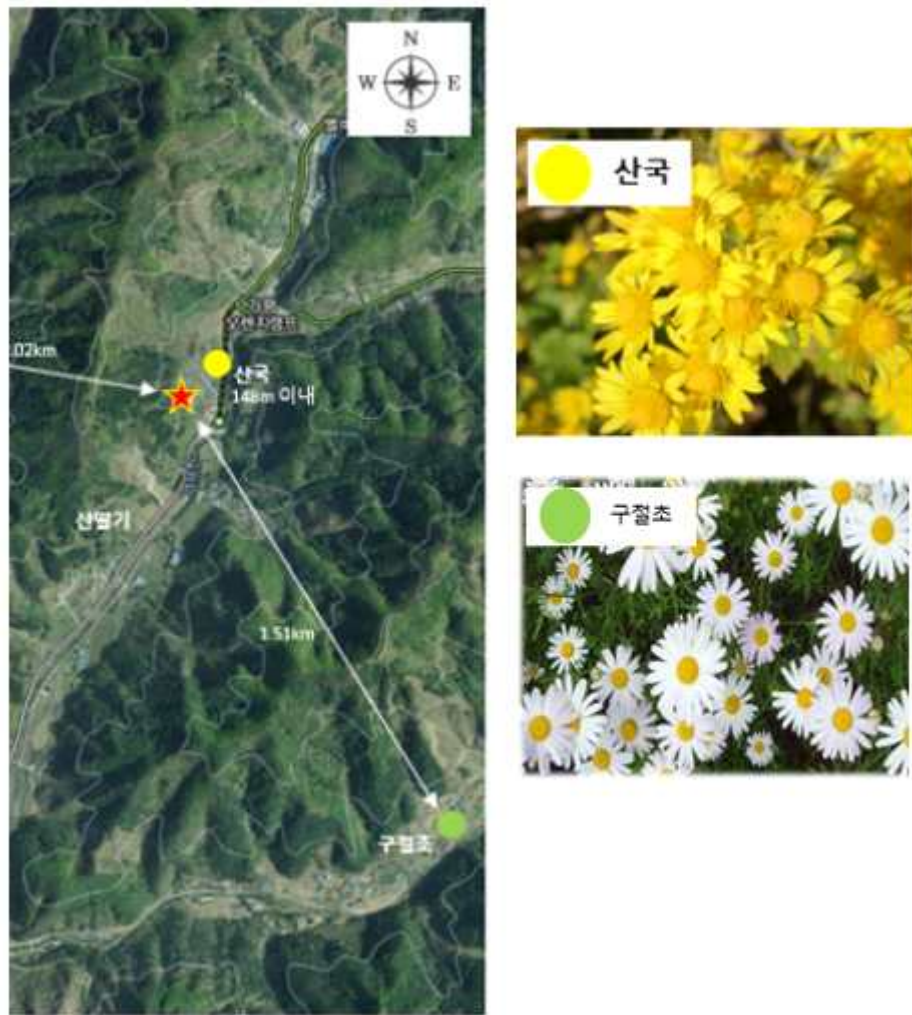


그림 150. 경기도 가평군 목동리 597 방화곤충상 조사(2020/10/23) 대상밀원식물 및 위치

⑭ 경기도 가평군 목동리 597 밀원식물별 방화곤충상 조사(2020/10/23) (그림 150~154)

- 산국, 구절초 2종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
- 산국은 봉장으로부터 약 148m이내 떨어진 군락에서 조사를 실시함
- 구절초는 봉장으로부터 약 1.02km이내 떨어진 군락에서 조사를 실시함
- 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 산국에서 100%로, 구절초에서 10.53%로 나타남(그림 151, 152)
- 양봉꿀벌의 비율은 구절초에서 89.47%로 나타났으며, 산국에서 양봉꿀벌의 채밀활동은 확인되지 않았음
- 산국과 구절초에서 재래꿀벌과 양봉꿀벌을 제외한 벌목 방화곤충의 채밀활동은 관찰되지 않았음
- 10월 말 경기도 가평군 목동리 597에서는 재래꿀벌이 산국과 구절초 모두 선호도를 보이는 것으로 판단됨
- 산국에서의 양봉꿀벌의 채밀활동은 관찰되지 않았으나, 재래꿀벌의 높은 선호성으로 보아 양봉꿀벌 역시 산국에 대한 선호성을 보일 것으로 예상됨
- 산국과 구절초는 가을철 초본성 밀원식물로써의 가치를 나타냄



그림 151. 산국에서의 벌목 방화곤충 구성비

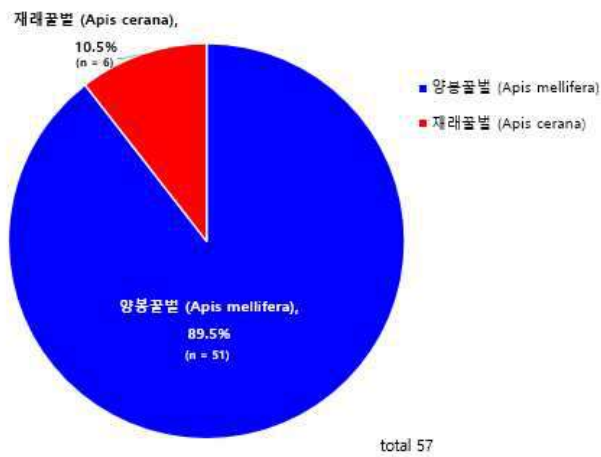


그림 152. 구절초에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 69. 산국에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	13	100
계		1과 1속 1종		13	100

표 70. 구절초에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	6	10.53
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	51	89.47
계		1과 1속 2종		57	100



그림 153. 재래꿀벌의 산국꽃에서의 채밀활동모습



재래꿀벌
그림 154. 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 향유(왼쪽), 구절초(오른쪽) 꽃에서의 채밀활동모습

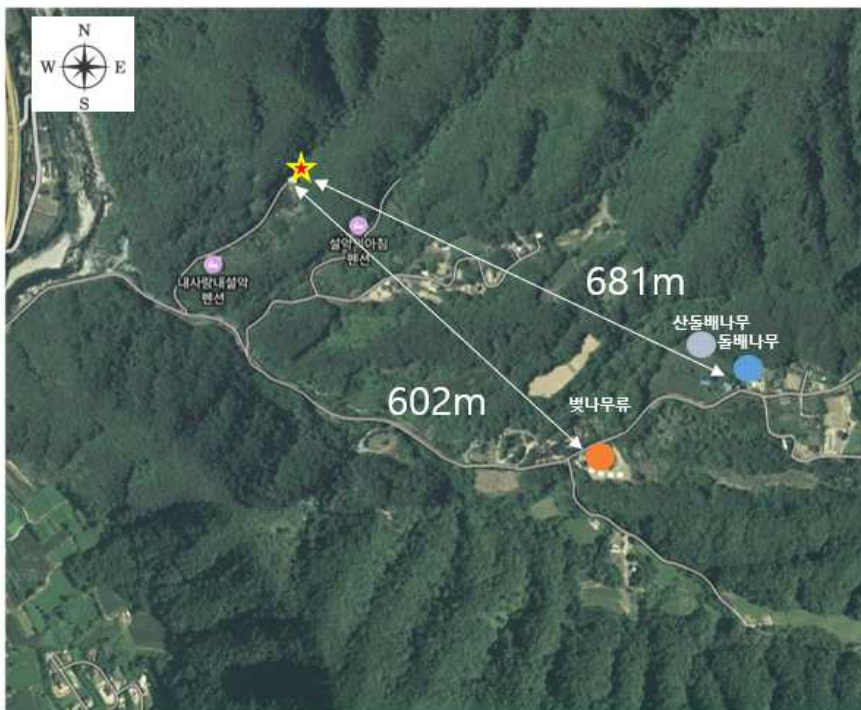


그림 155. 강원도 인제군 한계리 854 방화곤충상 조사(2021/04/20) 대상밀원식물 및 위치

-
- ⑮ 강원도 인제군 한계리 854 밀원식물별 방화곤충상 조사(2021/04/20) (그림 155~158)
- 산돌배나무와 돌배나무, 벗나무류 3종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
 - 산돌배나무와 돌배나무는 봉장으로부터 약 681m이내 떨어진 군락에서 조사를 실시함
 - 벗나무류는 봉장으로부터 약 602m이내 떨어진 군락에서 조사를 실시함
 - 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 돌배나무에서 16.7%로, 벗나무류에서 23.8%로 나타났으며 산돌배나무에서는 나타나지 않았음
 - 양봉꿀벌의 비율은 산돌배나무에서 7.1%, 돌배나무에서 16.7%, 벗나무류에서 61.9%로 나타남
 - 대상식물별 벌목 방화곤충의 전체 구성으로는 산돌배나무에서 3과 6속 9종으로 가장 다양하게 나타났으며 돌배나무에서는 2과 2속 3종, 벗나무류에서 1과 1속 2종으로 나타남
 - 산돌배나무에서는 양봉꿀벌만 확인되었으며, 재래꿀벌의 채밀활동은 확인하지 못함
 - 산돌배나무에서 재래꿀벌의 채밀활동이 관찰되지 않았지만, 기타 다양한 종류의 야생벌의 채밀활동이 나타남
 - 4월 말 강원도 인제군 한계리에서는 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 돌배나무와 벗나무류를 밀원식물로써 선호하는 것으로 나타나 아까시나무 개화 전 목본성 밀원식물로써의 가치를 나타냄
-

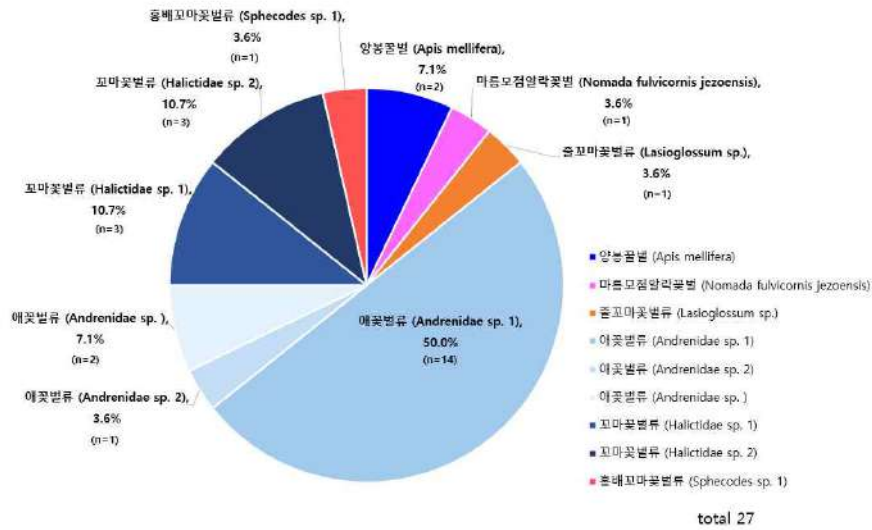


그림 156. 산돌배나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

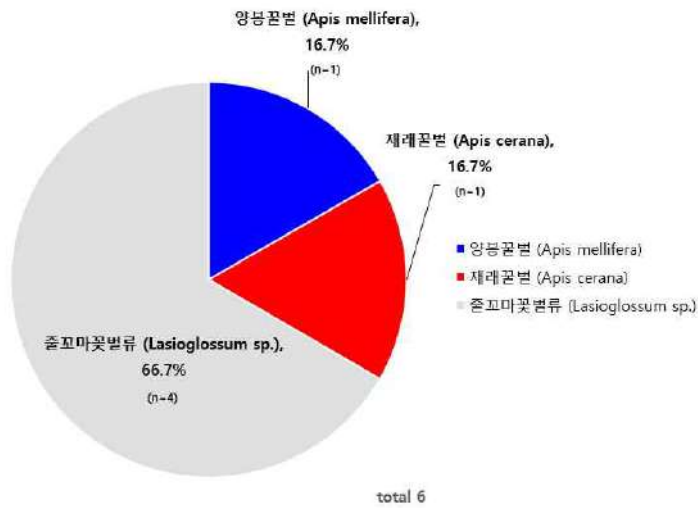


그림 157. 돌배나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

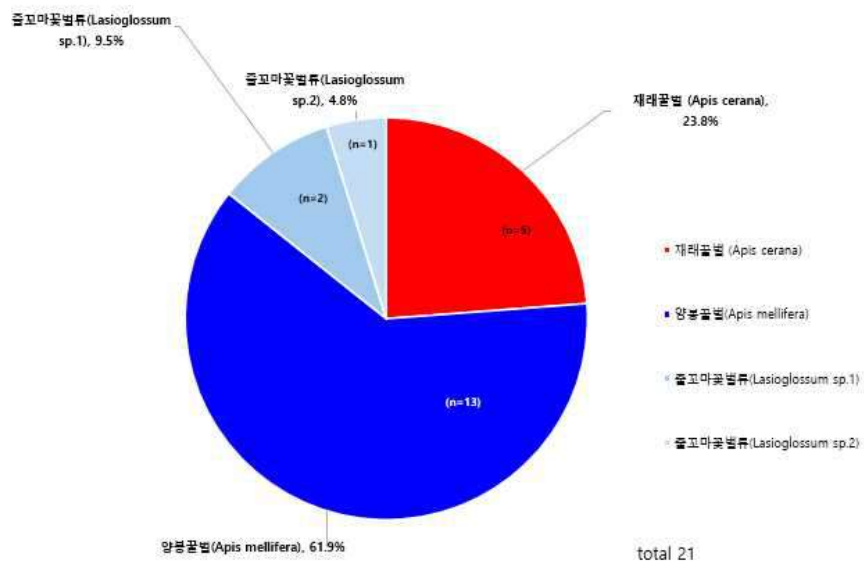


그림 158. 빛나무류에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 71. 산돌배나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체 수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	2	7.1
Hymenoptera	Apidae	<i>Nomada fulvicornis jezoensis</i>	마름모점알락꽃벌	1	3.6
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp. 1</i>	줄꼬마꽃벌류	1	3.6
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae sp. 1</i>	꼬마꽃벌류	3	10.7
Hymenoptera	Halictidae	<i>Halictidae sp. 2</i>	꼬마꽃벌류	3	10.7
Hymenoptera	Halictidae	<i>Sphecodes sp. 1</i>	홍배꼬마꽃벌류	1	3.6
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrenidae sp. 1</i>	애꽃벌류	14	50
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrenidae sp. 2</i>	애꽃벌류	1	3.6
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrenidae sp. 3</i>	애꽃벌류	2	7.1
계		3과 6속 9종		28	100

표 72. 들배나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	1	16.7
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	1	16.7
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp.1</i>	줄꼬마꽃벌류	4	66.7
계		2과 2속 3종		6	100

표 73. 뽕나무류에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	5	23.8
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	13	61.9
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp.1</i>	줄꼬마꽃벌류	2	9.5
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum sp.2</i>	줄꼬마꽃벌류	1	4.8
계		1과 1속 2종		21	100

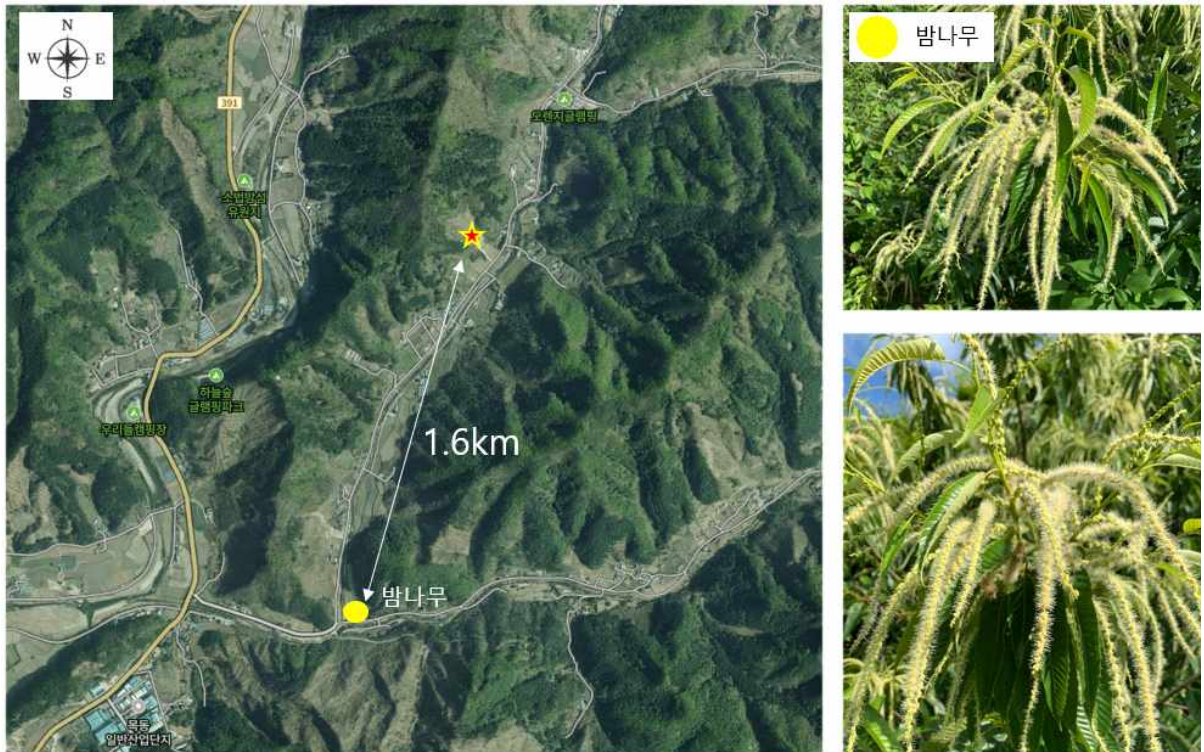


그림 159. 경기도 가평군 목동리 597 방화곤충상 조사(2021/06/23) 대상밀원식물 및 위치

⑩ 경기도 가평군 목동리 597 밀원식물별 방화곤충상 조사(2021/06/23) (그림 159)

- 밤나무 1종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
- 밤나무는 봉장으로 부터 약 681m 이내 떨어진 근락에서 조사를 실시함
- 밤나무의 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 8.3%로, 양봉꿀벌의 비율은 29.2%로 나타남
- 밤나무의 벌목 방화곤충의 전체 구성으로는 3과 5속 10종으로 나타났으며, 재래꿀벌과 양봉꿀벌 외 벌목 방화곤충은 꿀벌과(Apidae) 4종, 꼬마꽃벌과(Halictidae) 1종, 애꽃벌과 (Andrenidae) 3종으로 확인됨(그림 160)
- 6월 말 경기도 가평군 목동리 597에서 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 밤나무를 밀원식물로서 선호하는 것으로 나타나 아까시나무 개화 후 목본성 밀원식물로서 가치를 확인함
- 양봉꿀벌보다 낮은 재래꿀벌의 채집 개체수는 각 종의 서식 밀도에서 비롯된 것으로 판단됨

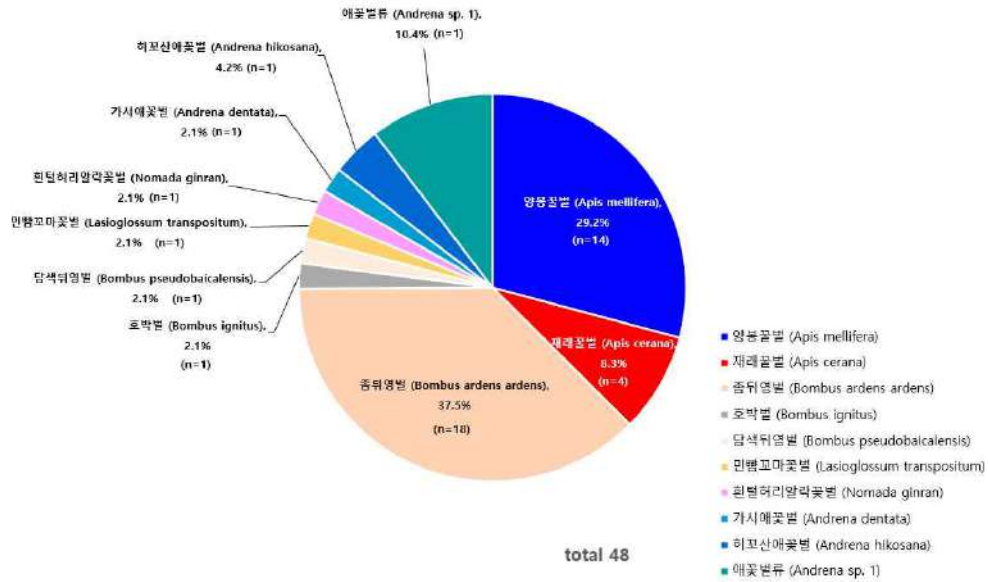


그림 160. 밤나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 74. 밤나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체 수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	4	29.2%
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	14	8.3%
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus ardens ardens</i>	좀뒤영벌	18	37.5%
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus ignitus</i>	호박벌	1	2.1%
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus pseudobaicalensis</i>	담색뒤영벌	1	2.1%
Hymenoptera	Apidae	<i>Nomada ginran</i>	흰털허리알락꽃벌	1	2.1%
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum transpositum</i>	민뺨꼬마꽃벌	1	2.1%
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena dentata</i>	가시애꽃벌	1	2.1%
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena hikosana</i>	히꼬산애꽃벌	2	4.2%
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena sp. 1</i>	애꽃벌류	5	10.4%
계		3과 5속 10종		48	100



그림 161. 밤나무에서의 벌목 방화곤충 조사 사진

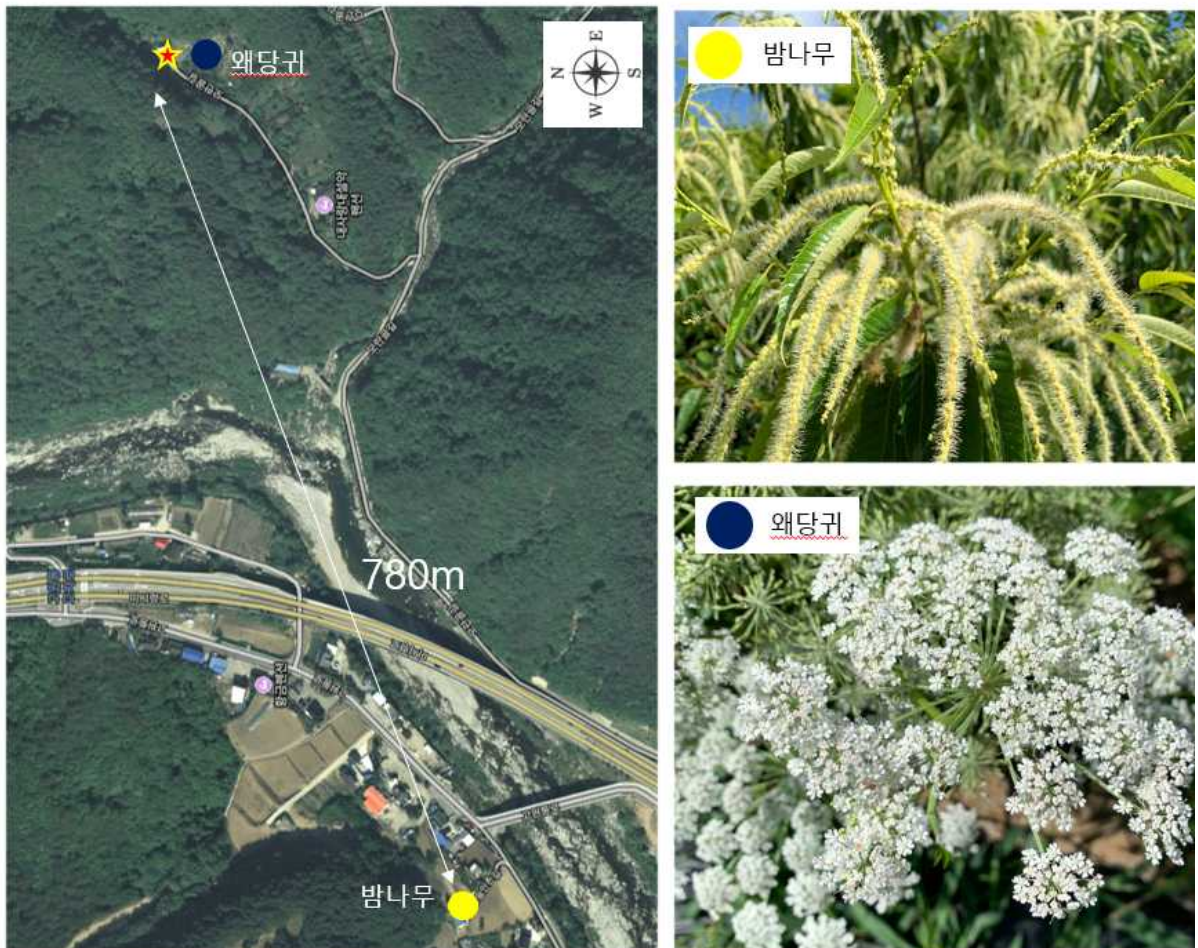


그림 162. 강원도 인제군 한계리 854 방화곤충상 조사(2021/06/23) 대상밀원식물 및 위치

⑰ 강원도 인제군 한계리 854 밀원식물별 방화곤충상 조사(2021/06/24) (그림 162)

- 밤나무, 왜당귀 2종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
 - 밤나무는 봉장으로부터 약 780m 이내 떨어진 군락에서 조사를 실시함
 - 왜당귀는 봉장으로부터 약 10m 이내 떨어진 군락에서 조사를 실시함
 - 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 밤나무와 왜당귀에서 모두 나타나지 않았음
 - 양봉꿀벌의 비율은 밤나무에서 95.3%, 왜당귀에서 33.1%로 나타남
 - 대상식물별 벌목 방화곤충의 전체 구성으로는 왜당귀에서 4과 6속 11종으로 가장 다양하게 나타났으며 밤나무에서는 2과 3속 3종으로 나타남
 - 밤나무와 왜당귀에서 양봉꿀벌의 채밀활동만 확인되었으며, 재래꿀벌의 채밀활동은 확인하지 못함
 - 왜당귀에서는 기타 다양한 종류의 야생벌의 채밀활동이 나타남
 - 밤나무와 왜당귀에서 재래꿀벌의 채밀활동이 관찰되지 않은 것은 해당 밀원들에 대한 각 종의 선호도 차이에서 기인된 것으로 사료됨
 - 특히 왜당귀는 봉장에서 상당히 가까이 위치했는데도 활발한 양봉꿀벌의 채밀활동(n=39)에 비해 재래꿀벌의 채밀활동이 관찰되지 않은 것은 재래꿀벌이 왜당귀에 대한 선호도가 양봉꿀벌보다 확연히 낮은 것으로 사료됨
 - 밤나무 또한 활발한 양봉꿀벌의 채밀활동(n=82)에 비하여 재래꿀벌의 채밀활동이 전혀 관찰되지 않은 것은 재래꿀벌이 밤나무에 대한 선호도가 양봉꿀벌보다 확연히 낮은 것으로 사료됨
 - 6월 말 강원도 인제군 한계리에서는 양봉꿀벌이 밤나무와 왜당귀를 밀원식물로써 선호하는 것으로 나타나 양봉꿀벌을 위한 아까시나무 개화 후 목본성 밀원식물로서의 가치를 나타냄
-



그림 163. 밤나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

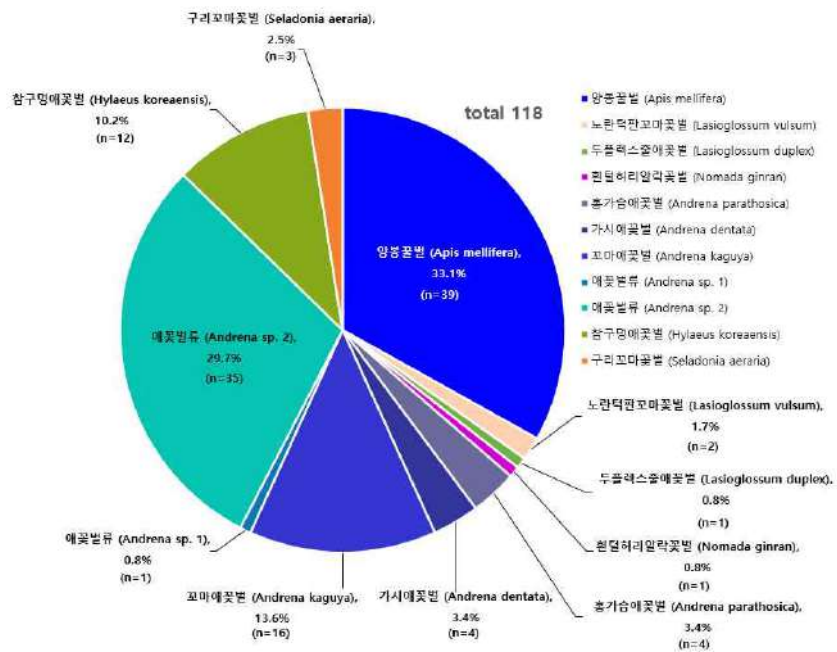


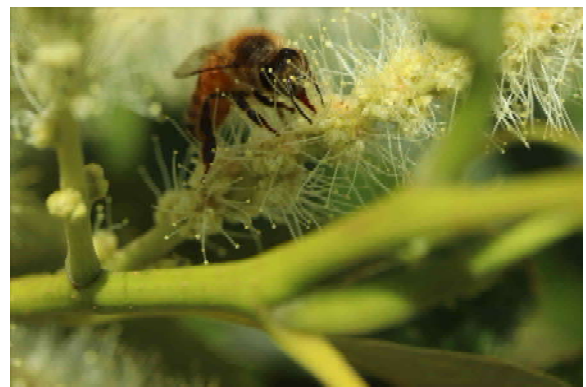
그림 164. 왜당귀에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 75. 밤나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체 수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	82	95.3 %
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus ardens ardens</i>	좀뒤영벌	2	2.3%
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum hoffmanni</i>	구멍가슴꼬마꽃벌	2	2.3%
계		2과 3속 3종		86	100

표 76. 왜당귀에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	39	33.1%
Hymenoptera	Apidae	<i>Nomada ginran</i>	흰털허리알락꽃벌	1	0.8%
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena parathorassica</i>	홍가슴애꽃벌	4	3.4%
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena dentata</i>	가시애꽃벌	4	3.4%
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena kaguya</i>	꼬마애꽃벌	16	13.6%
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena sp. 1</i>	애꽃벌류	1	0.8%
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena sp. 2</i>	애꽃벌류	35	29.7%
Hymenoptera	Colletidae	<i>Hylaeus koreaensis</i>	참구멍애꽃벌	12	10.2%
Hymenoptera	Halictidae	<i>Seladonia aeraria</i>	구리꼬마꽃벌	3	2.5%
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum vulsum</i>	노란턱판꼬마꽃벌	2	1.7%
Hymenoptera	Halictidae	<i>Lasioglossum duplex</i>	두플렉스줄애꽃벌	1	0.8%
계		4과 6속 11종		118	100



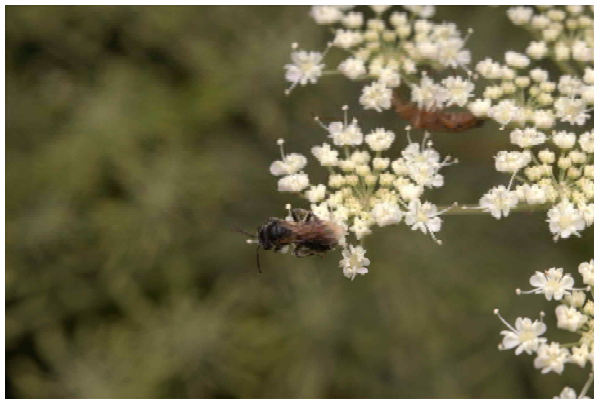
밤나무 방화곤충 조사사진
그림 165. 밤나무에서의 방화곤충 조사사진(왼쪽), 밤나무(오른쪽) 꽃에서의 채밀활동모습



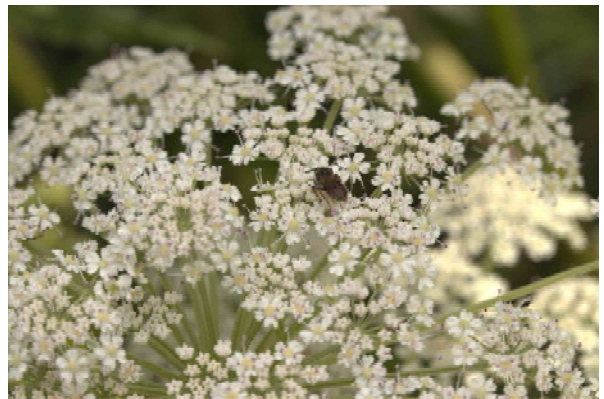
양봉꿀벌



구리꼬마꿀벌



애꽃벌류 sp.



애꽃벌류 sp.

그림 166. 왜당귀에서의 양봉꿀벌 및 기타 벌목 방화곤충 채밀활동모습



그림 167. 경기도 가평군 목동리 597 방화곤충상 조사(2021/07/09) 대상밀원식물 및 위치

⑩ 경기도 가평군 목동리 597 밀원식물별 방화곤충상 조사(2021/7/9) (그림 168)

- 모감주나무 1종에 대한 방화곤충상 조사를 실시함
- 모감주나무는 봉장으로부터 약 1.85km 떨어진 곳에서 조사를 실시함
- 모감주나무에서 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 32.7%로, 양봉꿀벌의 비율은 59.2%로 나타남
- 모감주나무에서 벌목 방화곤충의 전체 구성으로는 2과 3속 6종이 확인되었으며 이 중 재래꿀벌과 양봉꿀벌 외 벌목 방화곤충은 꿀벌과(Apidae) 2종, 가위벌과(Megachilidae) 2종으로 나타남
- 7월 초 경기도 가평군 목동리에서는 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 모감주나무에 대해 높은 선호성을 보이는 것으로 판단
- 모감주나무는 아까시나무 개화 후 관목성 밀원식물 중 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 선호성이 높은 식물로 확인됨

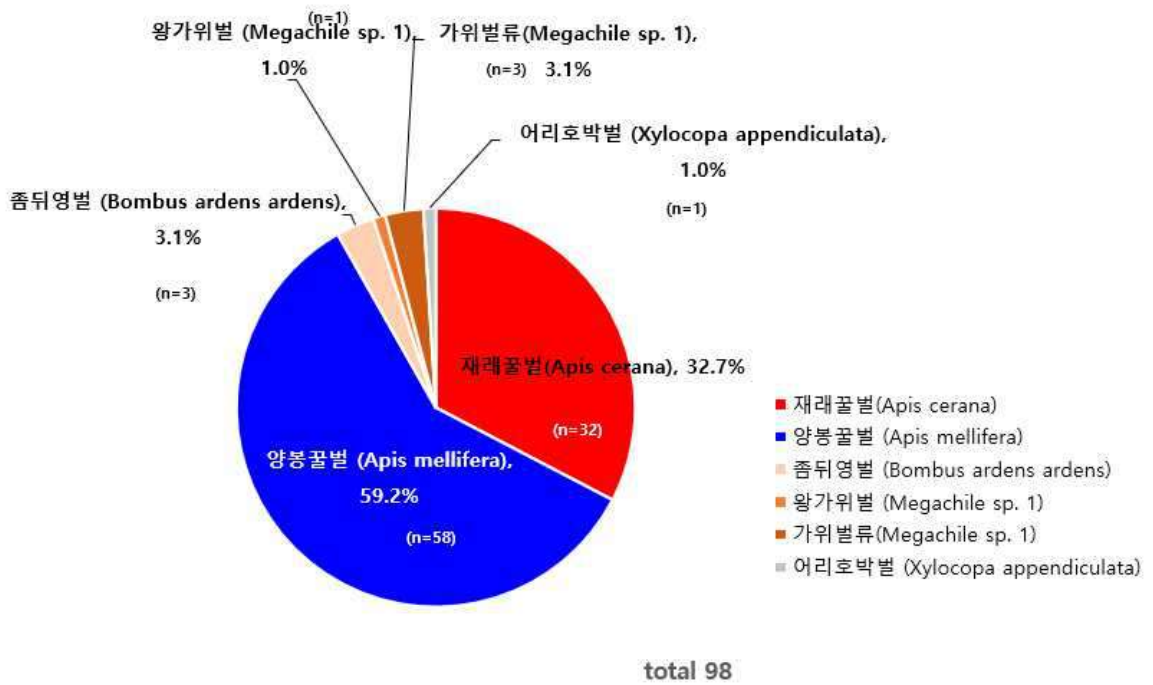


그림 168. 모감주나무에서의 벌목 방화곤충 구성비

표 77. 모감주나무에서 조사된 벌목 방화곤충 종류

목(Order)	과(Family)	학명 (Scientific name)	국명 (Korean name)	개체수	비율(%)
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis cerana</i>	재래꿀벌	32	32.7%
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i>	양봉꿀벌	58	59.2%
Hymenoptera	Apidae	<i>Bombus ardens ardens</i>	좀뒤영벌	3	3.1%
Hymenoptera	Apidae	<i>Xylocopa appendiculata</i>	어리호박벌	1	1%
Hymenoptera	Megachilidae	<i>Megachile sculpturalis</i>	왕가위벌	1	3.1%
Hymenoptera	Megachilidae	<i>Megachile sp.1</i>	가위벌류	3	1.0%
계		2과 4속 6종		98	100

(다) 밀원식물별 재래꿀벌 및 양봉꿀벌의 선호성 평가

- 2020년 5월7일부터 2021년 4월 20일까지 17회에 걸쳐 3지역(경기도 가평군 목동리, 강원도 인제군 한계리, 서울시 구로구 개웅산)에 개화한 총 89종(목본 56종, 초본 33종)의 밀원식물에 대한 방화곤충상 조사를 실시한 결과 24종의 밀원식물에서 재래꿀벌의 채밀활동을 확인함
- 총 32종의 방화곤충이 종 수준에서 동정되었으며 이중에 가평에서는 총 19종, 인제에서는 22종이상의 서식이 확인되어 이번 연구 결과는 생물다양성 측면에서도 큰 의미를 가지는 것으로 사료됨
- 3지역에서 실시한 방화곤충상 구성을 전체 취합하여 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 비율에 한하여 표 78에 제시하였음
- 취합된 밀원식물별 방화곤충상 구성 중 재래꿀벌의 비율은 벚나무류에서 24%, 산돌배나무에서 3%, 철쭉에서 14%, 고추나무에서 21%, 산딸기나무에서 18%, 아까시나무에서 3%, 국수나무에서 14%, 애기똥풀에서 13%, 옥매에서 27%, 찔레에서 9%, 미국낙산홍에서 27%, 일본조팝나무에서 46%, 밤나무에서 3%, 대추나무에서 42%, 달피나무에서 9%, 모감주나무에서 38%, 고마리에서 30%, 들깨에서 47%, 환삼덩굴에서 4%, 메밀에서 19%, 물봉선에서 10%, 산국에서 100%, 구절초에서 8%로 나타나 해당 밀원식물에 대한 선호 가능성을 보임
- 이 중 채집된 개체수가 적어 (n<30) 재래꿀벌의 선호성을 객관적으로 증명하기 어려운 경우를 제외하면, 재래꿀벌이 선호하는 밀원(비율 15%이상)은 산딸기, 대추나무, 모감주나무, 들깨, 옥매, 메밀, 미국낙산홍으로 평가됨
- 아까시나무 개화 후(5월중순/말)에 재래꿀벌은 대추나무, 모감주나무, 들깨, 옥매, 메밀, 미국낙산홍을 주요 밀원 또는 화분원으로 이용하는 것으로 평가됨
- 양봉꿀벌의 경우 조사한 총 89종의 밀원식물 중 32종의 밀원식물에서 채밀활동을 확인함
- 양봉꿀벌의 비율은 벚나무류에서 62%, 산돌배나무에서 9%, 철쭉에서 28%, 고추나무에서 71%, 미나리냉이에서 15%, 보리수에서 15%, 산딸기나무에서 56%, 아까시나무에서 86%, 국수나무에서 14%, 애기똥풀에서 13%, 영경귀에서 75%, 옥매에서 70%, 찔레에서 34%, 클로버에서 97%, 가죽나무에서 37%, 개여뀌에서 29%, 미국낙산홍에서 65%, 일본조팝나무에서 31%, 밤나무에서 73%, 대추나무에서 57%, 망초류에서 27%, 왜당귀에서 33%, 달피나무에서 72%, 모감주나무에서 37%, 고마리에서 70%, 들깨에서 49%, 참취에서 80%, 메밀에서 79%, 물봉선에서 60%, 쑥부쟁이류에서 20%, 구절초에서 75%로 나타나 해당 밀원식물에 대한 선호 가능성을 보임.

- 이 중 채집된 개체수가 적어 ($n < 30$) 양봉꿀벌의 선호성을 객관적으로 증명하기 어려운 경우를 제외하면, 양봉꿀벌이 선호하는 밀원(비율 15%이상)은 아까시나무, 찔레, 클로버, 구절초, 밤나무, 대추나무, 달피나무, 가죽나무, 들깨, 왜당귀, 철쭉, 산딸기, 미국낙상홍, 옥매, 모감주나무, 메밀로 평가됨
- 아까시나무 개화 후(5월중순/말)에 양봉꿀벌은 찔레, 클로버, 구절초, 밤나무, 대추나무, 달피나무, 가죽나무, 들깨, 왜당귀, 미국낙상홍, 옥매, 모감주나무, 메밀을 주요 밀원 또는 화분원으로 이용하는 것으로 평가됨
- 재래꿀벌과 양봉꿀벌 모두 산딸기, 대추나무, 들깨, 옥매, 모감주나무, 메밀, 미국낙상홍에 대한 활발한 채밀활동(확인된 개체수 비율 $\geq 15\%$)이 관찰되었지만, 양봉꿀벌이 높은 선호도를 보인 아까시나무, 찔레, 구절초, 밤나무, 달피나무, 철쭉은 재래꿀벌이 상대적으로 낮은 선호도(확인된 개체수 비율 $\leq 15\%$)를 보였고, 클로버와 달피나무, 왜당귀에서는 재래꿀벌의 채밀활동이 확인되지 않았음
- '2017 고정식 양봉을 위한 복합밀원단지 조성 기술 개발'에서 수행되었던 밀원 식물별 방화곤충상 조사에 따르면 양봉꿀벌은 봄철(4~6월)에 왕벚나무, 아까시나무, 회양목, 돌배나무, 산딸기, 칠엽수, 영경귀, 팽팡나무, 갈퀴나물, 모감주나무, 여름철(7~8월)에 피나무, 개망초, 가을철(9~10월)에 산국, 향유, 배초향, 삼주, 환삼덩굴과 물봉선을 선호하는 것으로 나타남
- 본 연구에서는 위 밀원식물 중 아까시나무, 산딸기, 영경귀, 모감주나무에서 재래꿀벌 또는 양봉꿀벌이 선호성을 나타내 동일한 결과를 보여주었음

아) 1, 2차년도 연구결과를 바탕으로 주요 토종꿀 생산지에 식재된 재래꿀벌이 선호하는 밀원식물 목록화

(1) 연구방법

- 1, 2차년 주요 토종꿀 생산지(경기 가평, 강원 인제)에서 수행된 밀원식물관련 조사(조사대상 지역별 주요 밀원식물 개화기 조사, 주요 밀원식물 분포조사, 한봉업자를 대상으로 한 선호 밀원 설문조사, 주요 밀원식물의 방화곤충상조사)를 통해 확인된 밀원식물을 종합하여 목록화함
- 목록화된 밀원식물별 개화시기, 대상지역 분포여부, 한봉업자 선호여부, 재래꿀벌 선호여부에 대한 정보를 제시함

(2) 연구결과

- 본 연구를 통하여 주요 토종꿀 생산지에 식재된 밀원식물 89종(목본: 56종, 초본: 33종)을 목록화하여 표 78에 제시함
- 시기별 주요밀원식물로는 4-5월 벚나무류, 5-6월 아까시나무, 6-7월 밤나무, 찔레나무, 7월 달피나무, 9-10월 배초향, 10월 산국으로 나타남
- 시기별 보조밀원식물로는 3-4월 회양목, 4월 개살구, 매실나무, 산벚나무, 생강나무, 앵두나무, 울벚나무, 참나무류, 4-5월 산돌배나무, 모과나무, 분꽃나무, 조팝나무, 철쭉, 5월 고추나무, 괴불나무, 마가목, 미나리냉이, 보리수, 산딸기나무, 산마늘, 산사나무, 신나무, 야광나무, 으름덩굴, 쥐똥나무, 팔배나무, 칠엽수, 고광나무, 국수나무, 다래나무, 백합나무, 사위질빵, 신갈나무, 애기똥풀, 영경귀, 옥매, 찔레, 층층나무, 클로버, 5-8월 가죽나무, 5-9월 개여뀌, 6월 때죽나무, 머루, 미국낙상홍, 일본조팝나무, 쪽동백나무, 헛개나무, 6-7월 대추나무, 망초류, 6-9월 옥수수, 왜당귀, 7월 모감주나무, 음나무, 7-8월 쉬나무와 싸리류, 7-9월 붉나무, 해바라기, 8월 두릅나무, 음나무, 9월 갈퀴나물, 고마리, 들깨, 연백국화, 이고

-
- 들빼기, 참취, 환삼덩굴, 9-10월 꽃향유, 메밀, 물봉선, 썩부쟁이류, 10월 구절초로 나타남
- 보조밀원식물 중 화분원으로는 4월 참나무류, 5월 철엽수, 국수나무, 다래나무, 신갈나무, 애기똥풀, 찔레, 층층나무, 6-9월 옥수수, 7-8월 싸리류, 8월 두릅나무가 주요한 것으로 나타남
 - 제1연구대상지인 인제군 한계리에서 식생이 확인된 수종은 생강나무, 매실나무, 개살구, 올벚나무, 산벚나무, 앵두나무, 산돌배나무, 조팝나무, 벗나무류, 분꽃나무, 야광나무, 고추나무, 애기똥풀, 신갈나무, 참나무류, 신나무, 아까시나무, 사위질빵, 고평나무, 찔레, 국수나무, 영경귀, 클로버, 다래나무, 밤나무, 개망초, 옥수수, 가죽나무, 개여뀌, 찔피나무, 왜당귀, 달피나무, 대추나무, 싸리류, 불나무, 해바라기, 두릅나무, 쉬나무, 음나무, 향유, 물봉선, 배초향, 들깨, 고마리, 갈퀴나무, 환삼덩굴, 이고들빼기, 썩부쟁이, 구절초, 산국으로 나타남
 - 제2연구대상지인 가평군 목동리에서 식생이 확인된 수종은 벗나무류, 참나무류, 철쭉, 모과나무, 으름덩굴, 고추나무, 보리수, 괴불나무, 미나리냉이, 애기똥풀, 산딸기나무, 옥매, 아까시나무, 찔레, 층층나무, 국수나무, 다래나무, 백합나무, 쪽동백나무, 헛개나무, 밤나무, 미국낙상홍, 대추나무, 달피나무, 음나무, 모감주나무, 옥수수, 망초류, 두릅나무, 메밀, 물봉선, 들깨, 참취, 환삼덩굴, 산국, 구절초, 배초향, 꽃향유로 나타남
 - 한농농가 밀원설문조사에서는 공통적인 주밀원으로 벗나무류, 아까시나무, 밤나무가 확인되었으며 공통되는 보조밀원은 팔배나무, 찔레, 다래나무, 두릅나무로 확인되었음
 - 공통되는 화분원은 참나무류와 다래나무로 나타났고 그 이외에 화분원은 철엽수, 층층나무, 두릅나무, 상수리나무, 광대싸리로 확인되었음
 - 전체 89종의 밀원에 대해 방화근충상 조사가 수행되었음
 - 그 중 재래꿀벌은 5월 산딸기, 5-6월 옥매, 6월 미국낙상홍, 6-7월 대추나무, 7월 모감주나무, 9월 들깨, 9-10월 메밀에서 15% 이상의 높은 비율을 보이며 해당 밀원식물에 대한 선호성이 높은 것으로 판단됨
 - 그 외에도 재래꿀벌은 확인되지 않았지만 아까시나무, 찔레, 클로버, 구절초, 밤나무, 대추나무, 달피나무, 가죽나무, 들깨, 왜당귀, 철쭉, 산딸기, 미국낙상홍, 옥매, 모감주나무, 메밀에서 양봉꿀벌이 높은 비율로 나타나는 것으로 보아 재래꿀벌 역시 해당 밀원식물에 대해 높은 선호성을 보일 가능성을 보여줌
 - 밀원 식물 목록에 대한 조사 결과는 2세부에 전달하여 연구 수행을 지원함
-



그림 171. 인제 한계리의 시기별 재래꿀벌이 선호하는 밀원 연계도
(빨간색: 양봉꿀벌, 파란색: 재래꿀벌)

표 78. 한봉 유망 밀원식물 목록

개화기	주요 밀원	보조 밀원	화분원	식생여부		한봉농가 선호여부			방화곤충상		
				제1연구 대상지	제2연구 대상지	인제군 한계리	가평군 목동리	서울 구로구	꿀벌 비율(%)		꿀벌 선호성
				인제군 한계리	가평군 목동리				재래꿀벌	양봉꿀벌	
3-4월		회양목						0			
4월		개살구		0							
4월		매실나무		0			0				
4월		산벚나무		0							
4월		생강나무		0				0			
4월		앵두나무		0							
4월		올벚나무		0							
4월		참나무류	0	0	0	0	0	0			
4-5월	(기타) 벚나무류			0	0	0	0	0	24	62	상
4-5월		(산)들배 나무		0		0			3	9	
4-5월		모과나무		0	0				0	0	
4-5월		분꽃나무		0							
4-5월		조팝나무		0							
4-5월		철쭉			0				14	28	
5월		고추나무		0	0	0			21	71	상
5월		괴불나무			0		0				
5월		마가목				0					
5월		미나리냉이			0				-	15	
5월		보리수			0				-	15	
5월		산딸기나무			0			0	18	56	상
5월		산마늘				0					
5월		산사나무				0	0				
5월		신나무		0							
5월		야광나무		0		0					

5월		으름덩굴			0						
5월		쥐똥나무						0			
5월		팔배나무				0		0			
5월		철엽수	0					0			
5-6월	아까시 나무			0	0	0	0	0	3	86	(상)
5-6월		고광나무		0		0					
5-6월		국수나무	0	0	0				10	14	
5-6월		다래나무	0	0		0	0				
5-6월		백합나무			0						
5-6월		사위질빵		0							
5-6월		신갈나무	0	0							
5-6월		애기똥풀	0	0	0				13	13	
5-6월		영경귀		0					-	75	
5-6월		옥매			0				27	70	상
5-6월		찔레	0	0	0		0	0	9	34	
5-6월		층층나무	0		0	0	0				
5-6월		클로버		0					-	97	
5-8월		가족나무		0					0	37	
5-9월		개여뀌		0					6	29	
6월		때죽나무						0			
6월		머루				0					
6월		미국낙상홍			0				27	65	상
6월		일본 조팝나무							46	31	상
6월		쪽동백나무			0	0		0			
6월		헛개나무			0		0				
6-7월	밤나무			0	0	0	0	0	3	73	(상)
6-7월	찰피나무			0			0				
6-7월		대추나무		0	0		0		42	57	상
6-7월		망초류		0	0				0	27	
6-9월		옥수수	0	0	0						
6-9월		왜당귀		0					0	33	
7월	달피나무			0	0		0		9	72	(상)
7월		모감주나무			0				38	37	상
7월		읍나무			0		0	0			
7-8월		쉬나무		0							
7-8월		싸리류	0	0		0		0			
7-9월		붉나무				0					
7-9월		해바라기		0							
8월		두릅나무	0	0	0	0	0				
8월		읍나무		0							
9월		갈퀴나물		0							
9월		고마리		0					30	70	상
9월		들깨		0	0		0		47	49	상
9월		연백국화				0					
9월		이고들빼기		0							0
9월		참취			0				0	80	0
9월		환삼덩굴		0	0				4	92	0
9-10 월	배초향			0	0		0				
9-10 월		꽃향유		0	0	0					0
9-10 월		메밀			0				19	79	상
9-10 월		물봉선		0	0	0			10	60	0
9-10 월		개쑥부쟁이		0					0	12	
9-10 월		미국쑥부쟁 이		0					0	8	
10월	산국			0	0	0			100	0	상
10월		구절초		0	0				8	75	

*방화근충상 중 꿀벌비율: 2회이상 조사시 가장 높은 비율 제시
*재래꿀벌의 선호성은 방화근충상에서 15%이상의 비율을 보일 경우 상으로 표시함

자) 목록화된 밀원식물의 계절 연계도 작성 및 평가

(1) 연구방법

(가) 조사지역별 밀원식물 계절 연계도 작성

- 조사대상 지역별(인제군 한계리, 가평군 목동리) 식생이 확인된 밀원식물에 대한 계절 연계도를 작성함
- 개화시기는 지역별 주요 밀원식물 개화기 조사를 통해 확보한 자료를 바탕으로 하였으며, 그 외 개화기가 파악되지 않은 수종에 대해서는 문헌자료(이경준, 1998)를 참고함
- 도출된 조사지역별 밀원식물 계절 연계도를 바탕으로 시기별 밀원식물 구성 및 개화기를 비교 논의함

(나) 조사지역별 밀원식물 계절 분포도 작성

- 조사대상 지역별(인제군 한계리, 가평군 목동리) 분포가 확인된 밀원식물에 대한 계절별 분포도를 작성함
- 계절별 분포도는 본 연구를 통해 작성된 최종 조사대상 지역별 주요 밀원수 분포도를 바탕으로 작성되었으며, 이를 바탕으로 계절별 재래꿀벌의 채밀형태를 파악함
- 계절은 봄철(4-6월), 여름철(7-8월), 가을철(9-10월)로 구분함
- 도출된 시기별 주요 밀원수 분포도를 바탕으로 조사대상 지역별 재래꿀벌의 채밀활동에 대해 비교 논의함

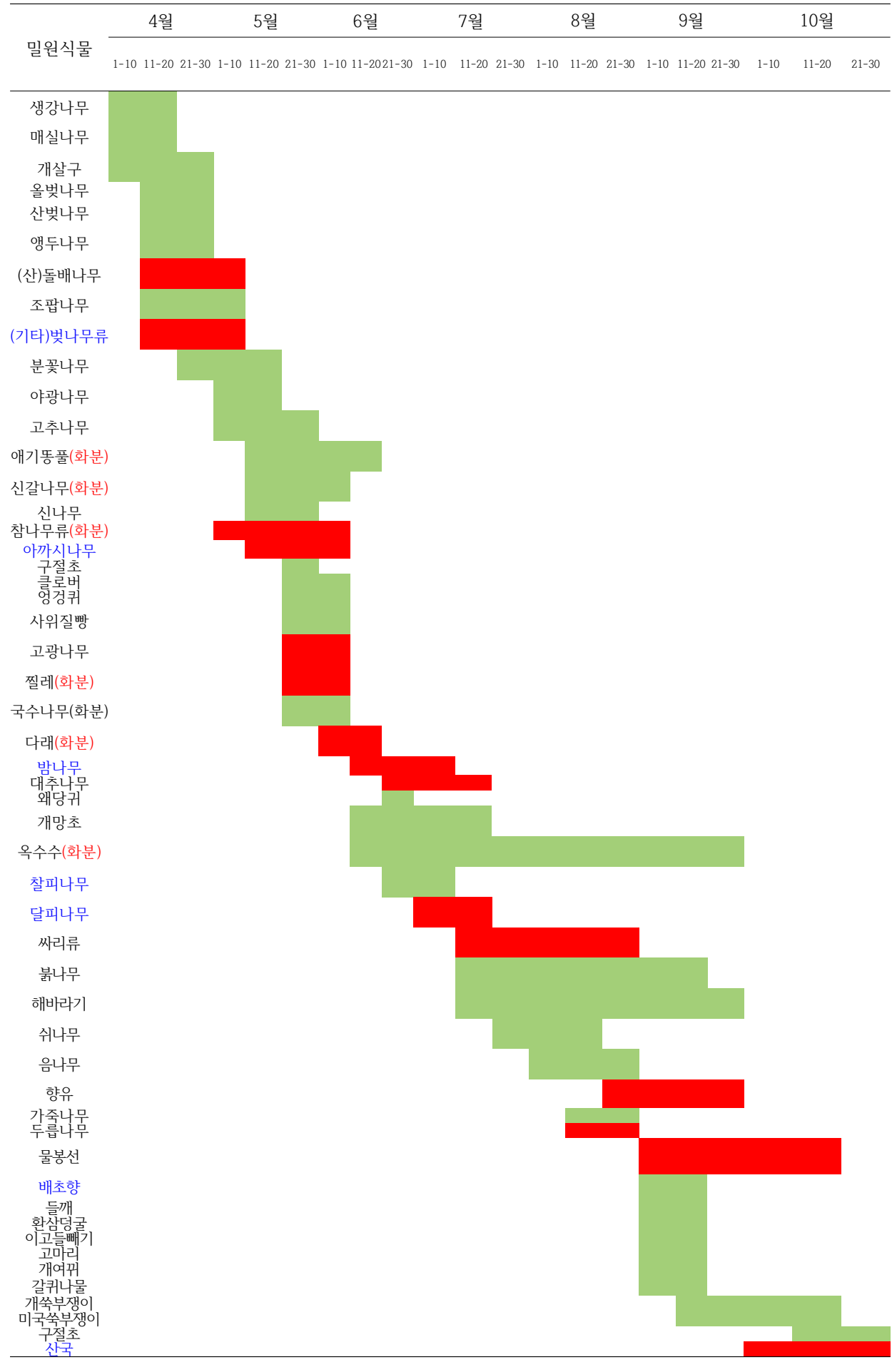
(2) 연구결과

(가) 연구대상지 1. 강원도 인제군 한계리

① 조사지역별 밀원식물 계절 연계도

- 한봉 유망 밀원식물 목록(표 78) 중 강원도 인제군 한계리에서 식생이 확인된 52종(목본: 30종, 초본: 22종)의 밀원식물에 대한 계절 연계도를 작성함(표 79, 그림 172)
- 본 연구를 통해 한봉농가 밀원설문조사 추천 종, 꿀벌선호성이 높게 나타난 주요 종은 빨간색으로 나타냈으며, 그 외 보조밀원 및 화분원으로써 가치가 있는 종은 녹색으로 표시해 구분함

표 79. 강원도 인제군 한계리 주변 식생이 확인된 밀원식물(52종)의 계절 연계도



(나) 조사지역별 밀원식물 계절 분포도

① 봄철(4~6월) 개화하는 밀원식물의 분포도

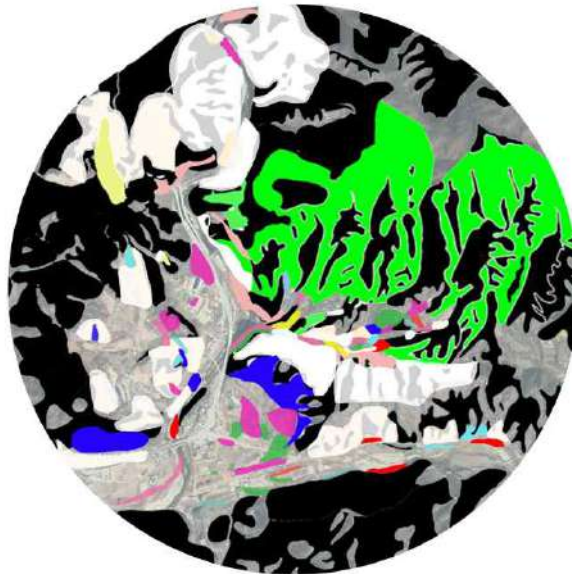
- 개나리 등의 꽃이 이른 봄에 개화하는 것이 확인됨
- 4월에 벚나무와 산돌배나무가 개화하며, 벚나무는 가로수 또는 산지에 자생의 형태로, 산돌배나무류는 농지에 식재 또는 자생하는 형태로 주로 발견됨
- 철쭉류, 조팝나무류가 다수 관찰되었으며, 철쭉류는 꽃잔디와 함께 조경수로 식재된 형태로도 발견됨. 주택가를 중심으로 봄철 조경수의 개화가 관찰됨
- 초봄 이후 화분원으로 쓰이는 참나무류가 산지의 넓은 면적에서 개화함
- 늦봄에 접어들면서 찔레나무, 밤나무, 싸리 등의 봉오리가 올라오거나, 양지의 경우 개화가 진행되며, 그 외 다양한 초본 식물들의 개화가 시작됨

② 여름철(7~8월) 개화하는 밀원식물의 분포도

- 찔레나무, 밤나무, 싸리류 식물들이 만개하며, 찔레나무는 임도 또는 낮은 풀로 이루어진 산지에, 밤나무는 조경수나 산 사면에 자생, 싸리류는 도로 주변, 임도, 강변 등 다양한 환경에서 발견됨
- 국수나무류가 임도를 중심으로 다수 발견되었음
- 아까시나무는 조사대상지 남부와 서부에서 폭넓게 발견되었으며, 피나무는 주로 강변, 산 사면에 분포함.
- 늦여름부터 붉나무류의 개화가 확인되며, 이후 두릅나무류가 발견됨. 두릅나무, 엄나무류는 발견된 군집 중 상당수가 약용 등의 이유로 식재된 것이었음
- 초본류는 칩, 환삼덩굴, 애기똥풀, 사위질빵 등이 개화함

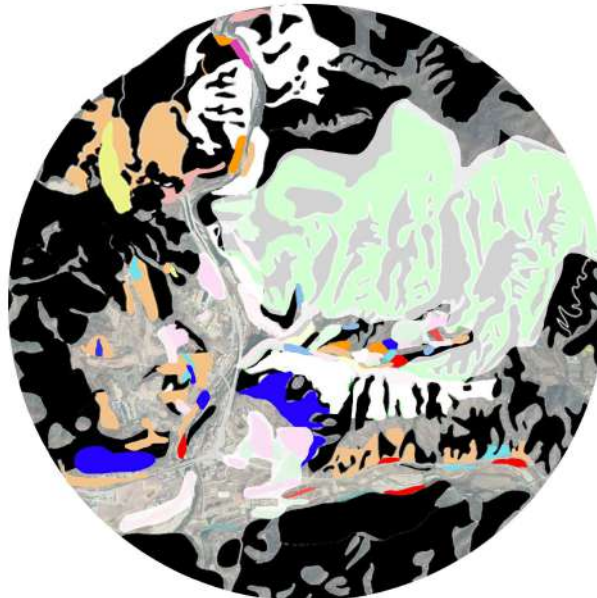
③ 가을철(9~10월) 개화하는 밀원식물의 분포도

- 목본류는 전체적으로 개화하는 수종이 적고, 그 면적도 넓지 않았음. 조사대상지에서는 두릅나무, 붉나무류가 발견됨. 붉나무는 가을이 깊어지면 꽃으로 발견되지 않음.
- 초본류는 코스모스와 감국, 산국, 망초류 등 국화과가 다수 발견됨
- 옥수수, 참깨, 들깨 등의 작물이 여러 지역에서 재배되고 있으며, 밀원으로 기능함



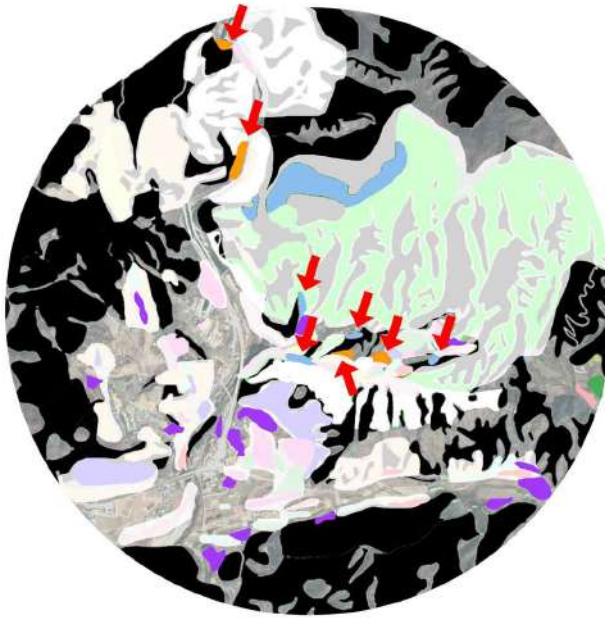
봄	■ 개나리 등	■ 벚나무류	■ 산돌배나무류
	■ 조팝나무	■ 철쭉류+조경화	■ 참나무+활엽수
봄+	■ 꽃잔디+야생화	■ 짙레나무류	■ 밤나무+활엽수
여름	■ 싸리류	■ 국수나무류+활엽수	

그림 172. 봄철 (4~6월)



봄+	■ 꽃잔디+야생화	■ 짙레나무류	■ 밤나무+활엽수
	■ 싸리류	■ 국수나무류+활엽수	
여름	■ 아까시나무+활엽수	□ 피나무+활엽수	
여름+	■ 붉나무류	■ 두릅나무류	
가을			

그림 173. 여름철 (7~8월)

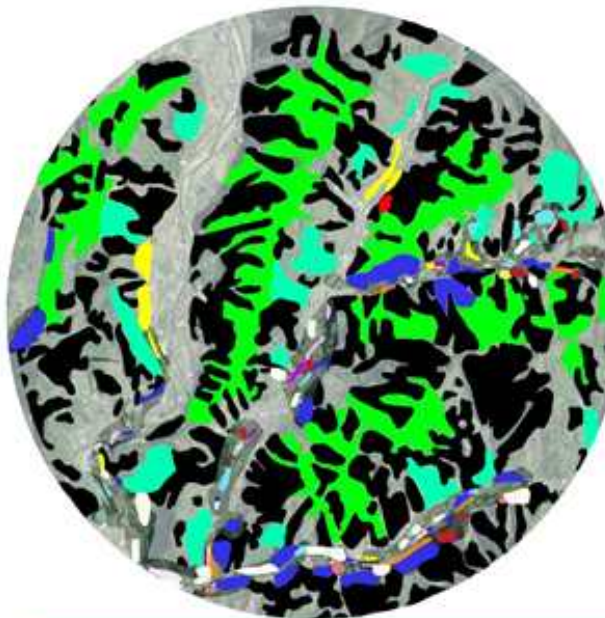


여름+가을

■ 붉나무류	■ 엄나무류
■ 밀원 작물(참깨, 들깨, 옥수수 등)	

그림 174. 가을철 (9~10월)

그림 172~174. 강원도 인제군 한계리 주변 밀원식물 분포



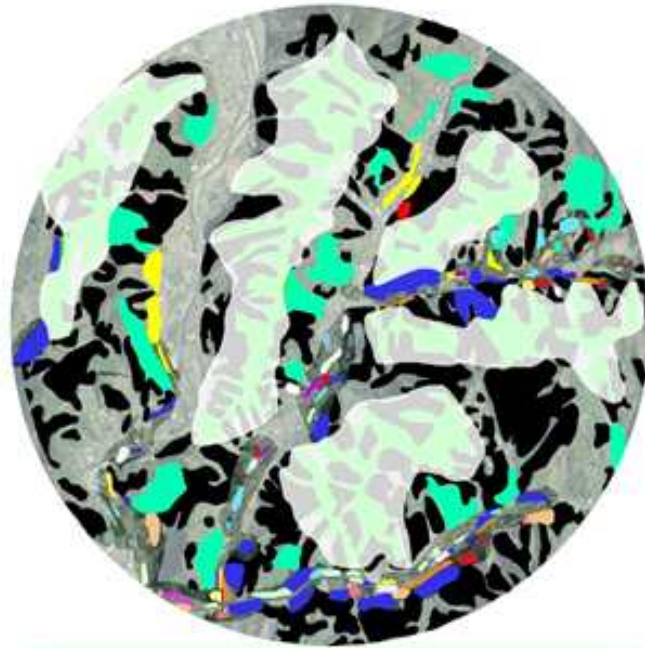
봄

■ 빗나무류	■ 회양목	■ 철쭉류+조경화
■ 참나무+활엽수		

봄+여름

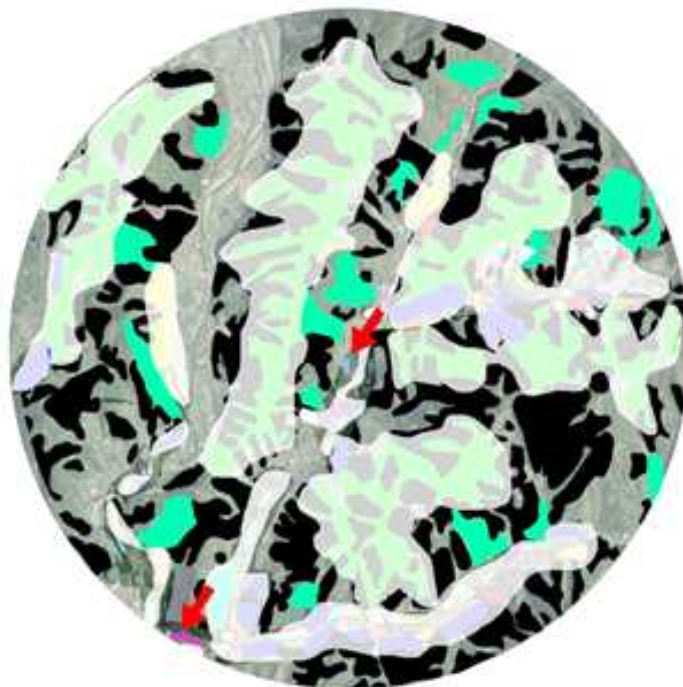
■ 찔레나무류	■ 신말기	■ 다래
■ 싸리류	■ 밤나무류	■ 층층나무
■ 봉두화	■ 초본(양초 등)	■ 초본(대기종류, 지렁이 등)

그림 175. 봄철 (3~5월)



봄+여름	▶ 짙은 파란색	▶ 짙은 빨간색	▶ 노란색
	▶ 짙은 빨간색	▶ 짙은 보라색	▶ 짙은 분홍색
	▶ 짙은 회색	▶ 짙은 초록색	▶ 짙은 보라색
여름	▶ 노란색	▶ 연한 초록색	▶ 연한 노란색
	▶ 연한 회색		
여름+가을	▶ 연한 보라색	▶ 연한 파란색	

그림 176. 여름철(5~8월)



여름+가을	▶ 연한 보라색	▶ 연한 파란색	▶ 연한 초록색
-------	----------	----------	----------

그림 177. 가을철(8~10월)
그림 175~177. 경기도 가평군 목동리 주변 밀원식물 분포

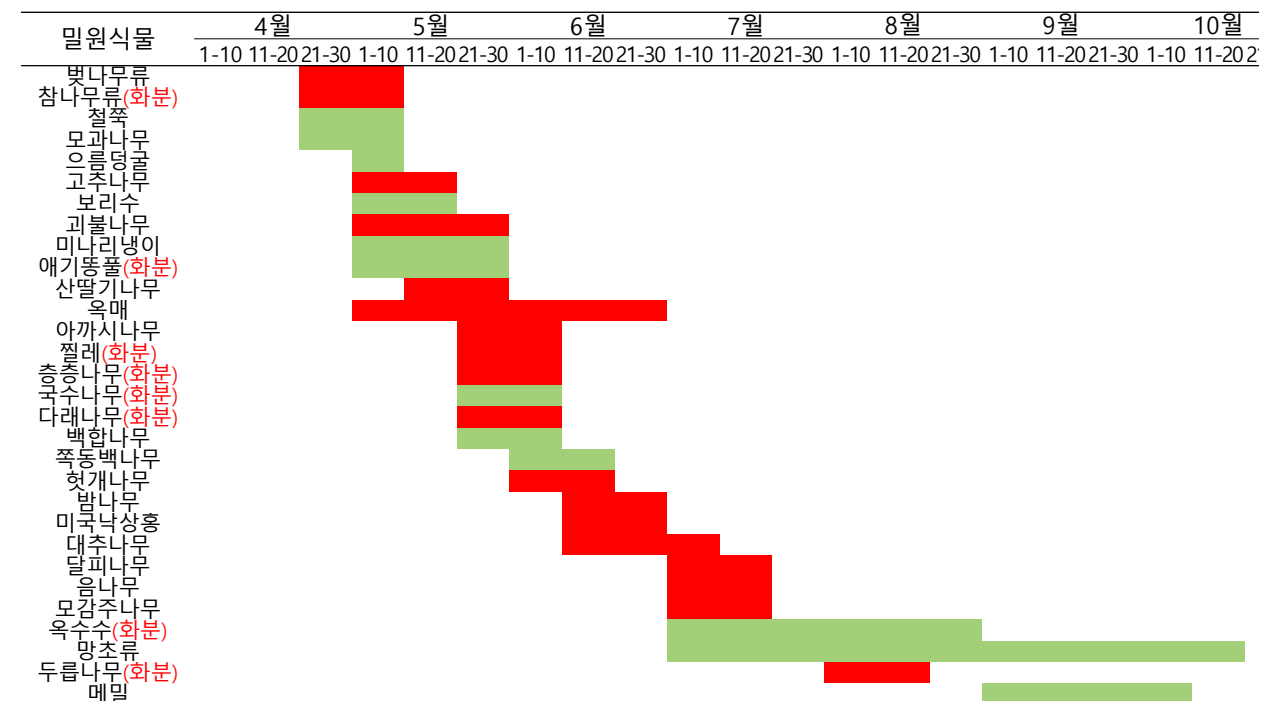
- (다) 조사지역별 밀원식물 계절 연계도 및 계절 분포도에 대한 논의
- 인제군 한계리에서는 봄철에는 참나무류에서 기인한 화분의 수확이 좋을 것으로 보이며, 철쭉, 벚나무, 산돌배나무 등의 식물이 다수 식재되거나 자생하고 있어 주요 밀원으로 기능할 것으로 보임
 - 여름철에는 목본류의 경우 아까시나무, 찔레나무, 싸리, 피나무, 밤나무 등이 주요 밀원으로 기능할 수 있을 것으로 보이며, 환삼덩굴, 망초, 애기똥풀, 사위질빵 등의 초본류가 광범위하게 나타나 채밀에 도움이 될 것으로 생각됨
 - 가을철에는 다른 계절에 비해 목본류의 채밀량은 적을 수 있으나, 칩, 국화류, 코스모스 등의 초본류 식물이 밀원의 역할을 할 것으로 보임. 또한, 폭넓게 재배되는 옥수수, 참깨, 들깨 등이 추가적으로 채밀에 도움을 줄 수 있음
 - 계절별로는 보통 4~5종의 주요 수종이 다른 계절과 중복되어 나타나며, 이와 같은 다양한 밀원이 공존하는 시기의 경우 잡화꿀 등을 얻는 것이 가능할 것으로 생각됨
 - 비교적 다양한 수종이 계절별로 나타나지만, 봄철~여름철이 주요 채밀기로 생각되고, 벚나무꿀, 아까시나무꿀, 밤나무꿀, 피나무꿀 등이 주로 상품화될 수 있을 것으로 예상됨

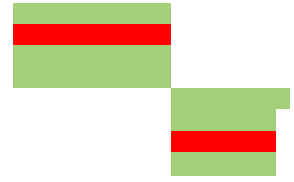
(라) 연구대상지 1. 경기도 가평군 목동리

① 조사지역별 밀원식물 계절 연계도

- 한봉 유망 밀원식물 목록(표 78) 중 경기도 가평군 목동리에서 식생이 확인된 38종(목본: 25종, 초본: 13종)의 밀원식물에 대한 계절 연계도를 작성함(표 80, 그림 171)
- 본 연구를 통해 한봉농가 밀원설문조사 추천 종, 꿀벌선호성이 높게 나타난 주요 종은 빨간색으로 나타냈으며, 그 외 보조밀원 및 화분원으로써 가치가 있는 종은 녹색으로 표시해 구분함

표 80. 경기도 가평군 목동리 주변 식생이 확인된 밀원식물(38종)의 계절 연계도





*한봉농가추천종, 꿀벌선호성 조사에서 상으로 나타난 것 빨간색으로 표시

(마) 조사지역별 밀원식물 계절 분포도

① 봄철 (4~6월) 개화하는 밀원식물의 분포도

- 회양목 등의 꽃이 이른 봄에 개화하는 것이 확인됨
- 4월에 벚나무와 철쭉이 개화하며, 벚나무는 가로수 또는 산지에 자생의 형태로, 철쭉 류는 주택가 주변에 조경수로 식재된 형태로 주로 발견됨
- 초봄 이후 화분원으로 쓰이는 참나무류가 산지의 넓은 면적에서 개화함
- 늦봄에 접어들면서 짙레나무, 밤나무, 싸리 등의 봉오리가 올라오거나, 양지의 경우 개화가 진행되며, 그 외 다양한 초본 식물들의 개화가 시작됨
- 강변을 따라 다래와 산딸기, 싸리 등이 자생하고 있으며, 다수의 꿀벌이 관찰됨

② 여름철(6~8월) 개화하는 밀원식물의 분포도

- 짙레나무, 밤나무, 싸리류 식물들이 만개하며, 짙레나무는 임도 또는 낮은 풀로 이루어진 산지에, 밤나무는 조경수나 산 사면에 자생, 싸리류는 도로 주변, 임도, 강변 등 다양한 환경에서 발견됨
- 밤나무, 대추나무가 다수 발견되었으며, 특히 밤나무의 경우 지역 전체에서 폭넓게 발견됨
- 아까시나무, 피나무는 다소 적게 발견되었으며, 다수의 수목이 모인 군락이 거의 발견되지 않음. 헛개나무도 일부 발견되었으나, 군락을 이루는 경우는 거의 없었음
- 무궁화와 엄나무, 두릅 등이 곳곳에 식재되어 있으며, 7월 말부터 밀원으로 기능함
- 초본류는 칩, 환삼덩굴, 애기똥풀, 망초, 클로버 등이 개화함

③ 가을철(9~10월) 개화하는 밀원식물의 분포도

- 목본류는 전체적으로 개화하는 수종이 적고, 그 면적도 넓지 않았음.
- 조사대상지에서는 무궁화, 엄나무류의 개화를 확인함
- 초본류는 산국, 배초향, 쑥부쟁이, 코스모스 등이 발견되었고, 참깨, 들깨, 메밀 등의 작물이 여러 지역에서 재배되며 밀원으로 기능함

(바) 조사지역별 밀원식물 계절 연계도 및 계절 분포도에 대한 논의

- 가평군 목동리에서는 봄철에는 참나무류에서 기인한 화분의 수확이 다소 있을 것으로 보이며, 철쭉, 회양목, 벚나무, 짙레 등의 식물이 식재되거나 자생하고 있으며, 강을 따라서 다래, 싸리 등이 있어서 이와 같은 수종들도 밀원으로 기능할 수 있을 것임. 또한, 봄~초여름에 걸쳐 초지에 애기똥풀과 지칭개 등의 초본류 식물의 개화가 확인됨
- 여름철에는 목본류의 경우 밤나무, 짙레나무, 대추나무, 아까시나무 등이 주요 밀원으로 기능할 수 있을 것으로 보이며, 도로변 또는 산 사면에 초지가 산재해 있어 자생하는 다양한 초본류가 채밀에 도움이 될 것으로 생각됨. 또한, 민가 주변을 중심으로 식재된 대추나무, 모감주나무, 무궁화, 엄나무류의 꿀벌 선호도가 높아 밀원으로도 도움이 될 것임

-
- 가을철에는 다른 계절에 비해 목본류의 채밀량은 적을 수 있으나, 산국, 쑥부쟁이, 배초향, 코스모스 등의 초본류 식물이 밀원의 역할을 할 것으로 보임. 또한, 폭넓게 재배되는 옥수수, 참깨, 들깨 등이 추가적으로 채밀에 도움을 줄 수 있음
 - 계절별로는 보통 4~5종의 주요 수종이 다른 계절과 중복되어 나타나며, 이와 같은 다양한 밀원이 공존하는 시기의 경우 잡화꿀 등을 얻는 것이 가능할 것으로 생각됨
 - 비교적 다양한 수종이 계절별로 나타나지만, 봄철~여름철이 주요 채밀기로 생각되고, 벚나무꿀, 아까시나무꿀, 밤나무꿀 등이 주로 상품화될 수 있을 것으로 예상됨

2) 제 1협동: 토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정

가) 천연토종꿀 검증을 위한 유전자 검사법의 개발 및 그 적용

(1) 토종꿀과 사탕꿀의 판별을 위한 사탕무우 및 사탕수수 유전자 검출법 개발

(가) 토종꿀에 함유된 잔류 DNA (residual DNA)의 분리법

벌꿀의 잔류 유전자(residual DNA)란 벌꿀에 포함되어 잔류하고 있는 모든 DNA를 말하여, 주로 naked DNA fragment의 형태로 존재한다. 이는 화분유전자(Pollen DNA)와 구분하기 위하여 신설된 용어로, 근래 벌꿀에서 화분유전자의 분석이 성행하는 가운데 그 구분의 필요성이 발생하였다.

설탕(Sugar)은 식물체인 사탕수수(Sugar cane 또는 cane)의 줄기 그리고 사탕무우(Beet)의 뿌리 부위를 분쇄하여 고도의 정제과정을 거쳐 생산된다. 설탕제조사에서 제공하는 성분표는 99.99%이상이 이당류인 Sucrose라 한다.

설탕꿀 또는 사탕꿀은 벌꿀의 생산과정에 과도한 설탕물을 투입하여 꿀벌들이 이를 꽃물(Nectar)과 같이 저장하게 하고, 이를 수집한 인공적인 꿀이다. 이에 반하여 천연벌꿀(Natural honey)은 꿀벌들이 꽃물(Nectar)을 수집하여, 저장하고 숙성시킨 벌꿀로써 천연의 높은 가치를 지니게 된다. 수십 년 전부터 국내에 설탕(사탕)꿀 문제가 대두되었으나, 탄소동위원소분석법이 벌꿀품질 평가의 방법으로 적용된 이래 사탕벌꿀 문제는 정리가 되는 듯하였다. 그러나 사탕무우 설탕(Beet sugar)을 꿀벌에게 공급하여 제조한 Beet 사탕꿀은, 상기의 탄소동위원소 분석법에 의한 평가에서, 천연벌꿀과 동등하게 평가된다는 것이 근래 양봉가들 사이에서 알려지게 되었다.

국내에는 사탕수수는 물론 사탕무우도 재배되지 않는다. 따라서 국내 생산의 벌꿀에 이 식물체 사탕수수 또는 사탕무의 고유 유전자가 검출된다면, 이는 사탕수수 또는 사탕무우 설탕물에 의한 사탕을 한 것으로 해석하는 것이 합리적이라 할 것이다.

본 과제는 사탕무 및 사탕수수 유전자 검출법을 개발하기 위하여 벌꿀에서 이들 잔류 유전자를 분리하여야 하였으며, 이 검출법을 수많은 꿀시료에 적용하기 위하여 PCR이 될 수 있는 수준으로, 보다 간편한 방법을 강구하여야 하였다.

벌꿀의 높은 점도를 극복하고 잔류 유전자(DNA)만을 분리하기 위하여, 기존 보고된 여러 DNA 분리법을 적용하여 보았다. 일례로 고당 환경에 잔류하는 유전자를 추출하는데 유리함을 가질 것으로 기대하고 CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide)를 잔류 DNA 분리법에 적용하였으나 이는 외피 내에 존재하는 화분 DNA의 분리에는 유리하나, 추출시간이 길고 많은 시료가 필요하다는 등의 단점이 있었다. 한편, 시판되고 있는 여러 유전자 추출 키트들(QIAGEN 사, iNtRON 사 kit 등) 도 벌꿀에서 잔류 유전자 분리에 적용하여 보았으나, 높은 점도를 가진 벌꿀에서 잔류 DNA를 분리하기에 회수율의 면에서 많은 어려움을 보여주었다(그림 178).

여러 시행착오를 거쳐 DNA isolation에서 가장 널리 사용되고 있으며, 그 간편성과 신속성으로 많은 키트가 제품화 되어 있는 affinity column을 이용하는 것으로 방향을 잡게 되었고, 벌꿀을 시료로 사용하기 위하여, 벌꿀에서 DNA용액으로 변환시킬 수 있는 제반 조건을 최적화하게 되었다. 이는 바로 “벌꿀에서 잔류 DNA 분리 키트의 개발”과 같은 의미가 되었으며, 그 수행내용은 이하와 같았다.

① 토종꿀에 함유된 잔류 DNA 분리를 위한 최적 binding buffer 개발

벌꿀의 희석과 컬럼에 binding 능력을 제고하기 위한 최적의 binding buffer의 성분을 조합하고 그 성능을 시험하였다(그림 179).

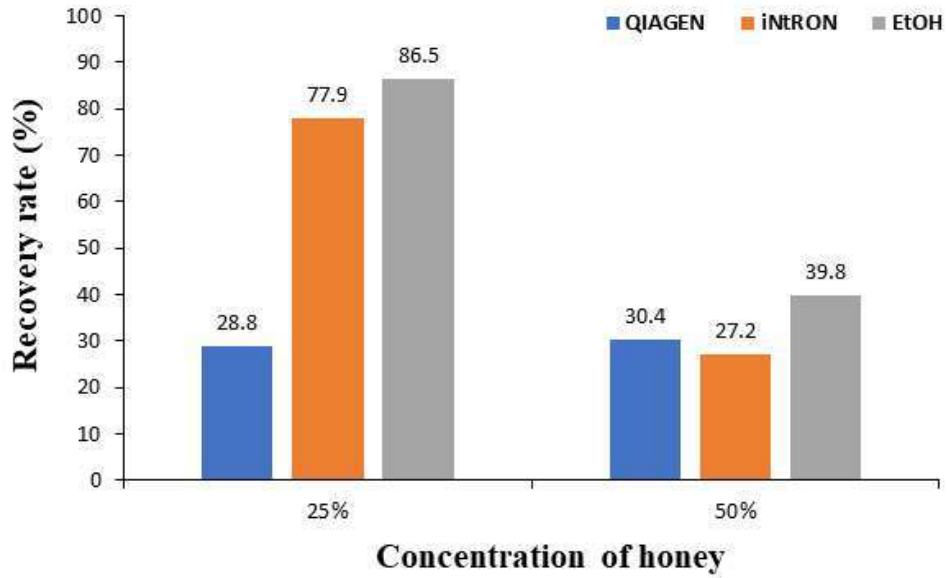


그림 178. 벌꿀에 잔류시킨 표준 DNA의 회수에서 QIAGEN 사, iNtRON 사의 DNA isolation kit들과 Ethanol 침전법의 비교

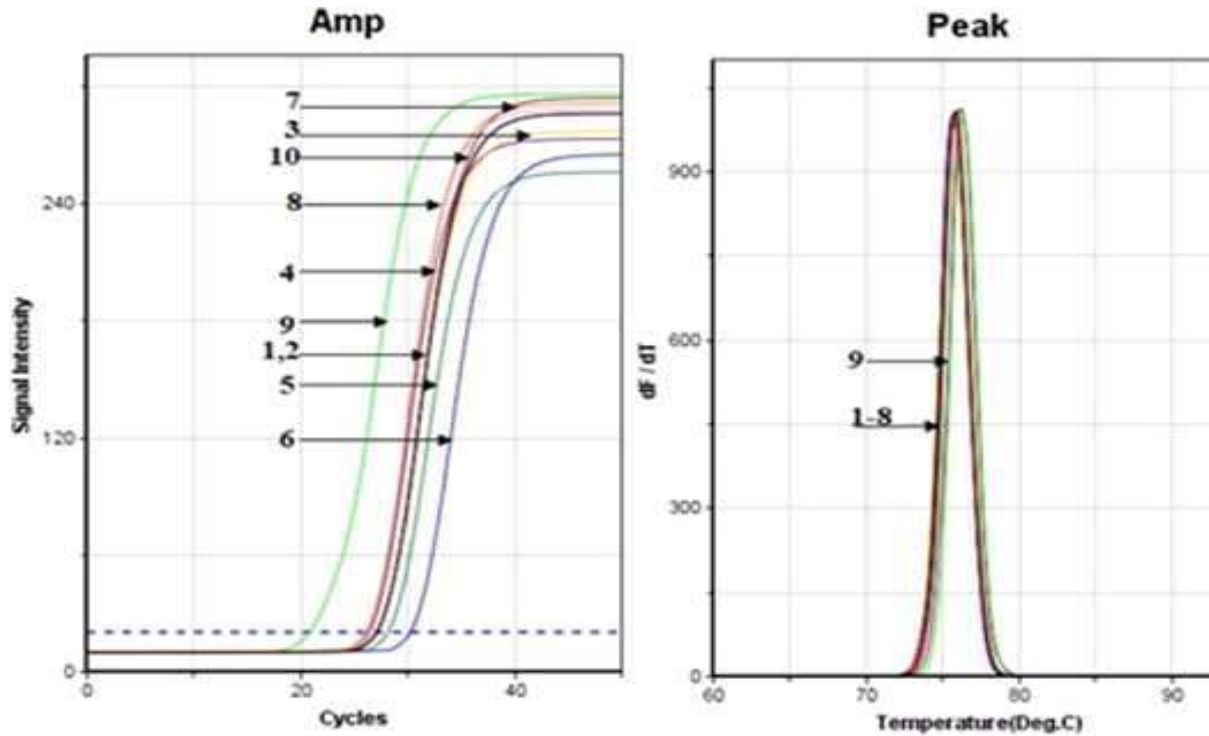
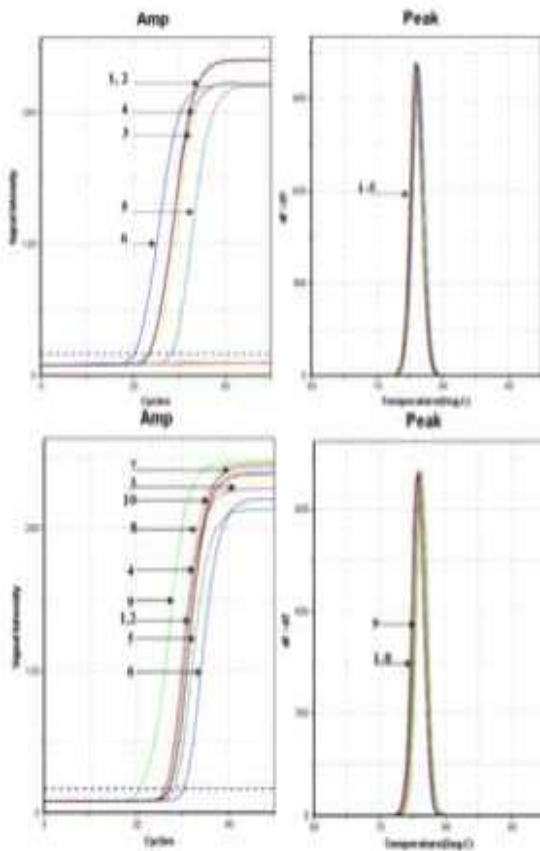


그림 179. DNA binding buffer에 따른 꿀에서 잔류유전자 검출
100ul 꿀에 108의 사탕수수 특이유전자 재조합DNA(pSc)를 넣고 500ul의 각기 다른 농도의 GmHCl binding buffer를 넣고 회수된 pSc에 대한 PCR amplicon의 증폭곡선과 이 amplicon 특이성 확인을 위한 증폭 및 용점분석 그래프

표 81. DNA binding buffer에 따른 벌꿀에서 잔류유전자 분리의 분석

No	Sample	Ct(Cycle)	DNA 분자수	Tm (°C)
1	5M GuSCN 1	27.00		75.70
2	2	26.94		75.70
3	3	26.95		75.70
		26.96±0.03	1.5×10 ⁵	
4	4M GuSCN 1	26.25		75.70
5	2	27.95		75.70
6	3	29.98		75.70
		28.06±1.52	7.3×10 ⁴	
7	5M GI 1	25.95		75.80
8	2	26.01		76.03
		25.98±0.03	2.9×10 ⁵	
9	10 ⁻⁷ pSC	20.90		76.36
10	10 ⁻⁵ pSC	26.92		76.36
				75.86±0.27



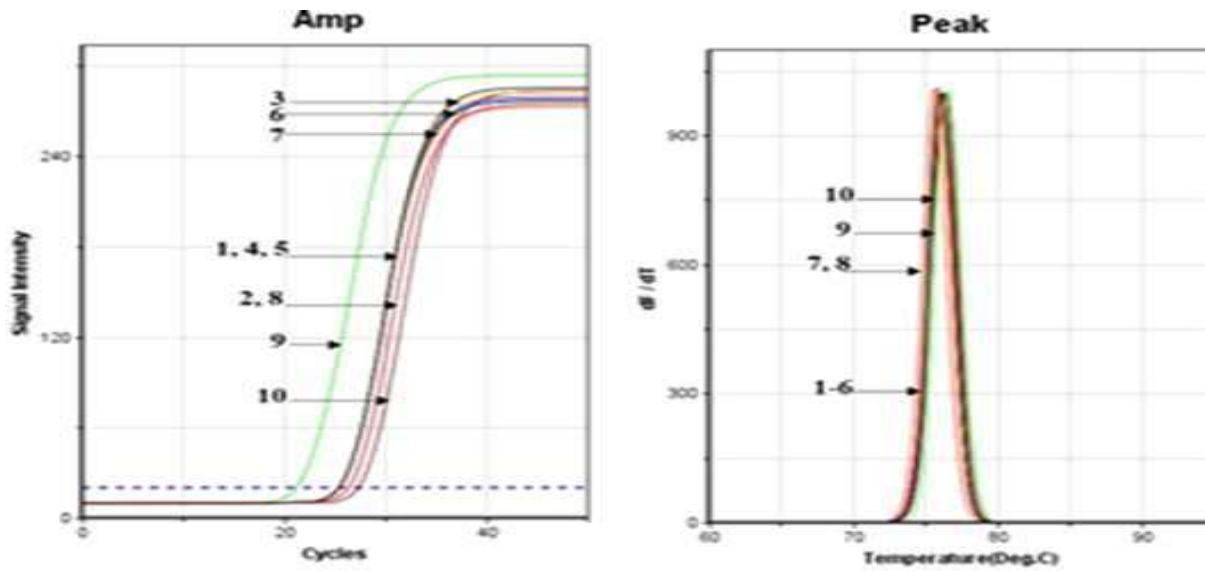
No	Sample	Ct (Cycle)	DNA 분자수	Tm (°C)
1	5M GnHCl ₂	23.37		76.1
2	5M GnHCl ₂	23.34		76.1
		23.36±0.02	1.6×10 ⁵	
3	6M GnHCl ₂	24.30		75.1
4	6M GnHCl ₂	23.38		75.1
		23.4±0.65	1.2×10 ⁶	
5	10 ⁷ PSC	20.36		76.1
6	10 ⁵ PSC	28.08		76.1
				75.98±

No	Sample	Ct(Cycle)	DNA 분자수	Tm (°C)
1	5M GuSCN 1	27.00		75.7
2	2	26.94		75.7
3	3	26.95		75.7
		26.96±0.03	1.5×10 ⁵	
4	4M GuSCN 1	26.25		75.7
5	2	27.95		75.7
6	3	29.98		75.7
		28.06±1.52	7.3×10 ⁴	
7	5M GI 1	25.95		75.8
8	2	26.01		76.0
		25.98±0.03	2.9×10 ⁵	
9	10 ⁻⁷ pSC	20.90		76.3
10	10 ⁻⁵ pSC	26.92		76.3
				75.86±

그림 180. DNA binding buffer에 따른 벌꿀에서 잔류유전자의 회수 및 이의 정량
 100ul 꿀에 108의 사탕수수 특이유전자 재조합DNA(pSC)를 넣고 500ul의 각기 다른 농도의 GnHCl binding buffer를 넣고 회수된 pSC에 대한 PCR amplicon의 증폭곡선과 이 amplicon 특이성 확인을 위한 용점분석그래프 및 분석표

② 토종꿀에 함유된 잔류 DNA (residual DNA) 분리를 위한 최적 washing buffer 개발
 잔류 DNA가 binding된 affinity column을 세척하여 부착된 DNA의 순도를 높이기 위한 washing buffer를, Ethanol의 함량, 10mM, 15mM, 20mM Tris-HCl (pH 7.6) 등을 최적화하

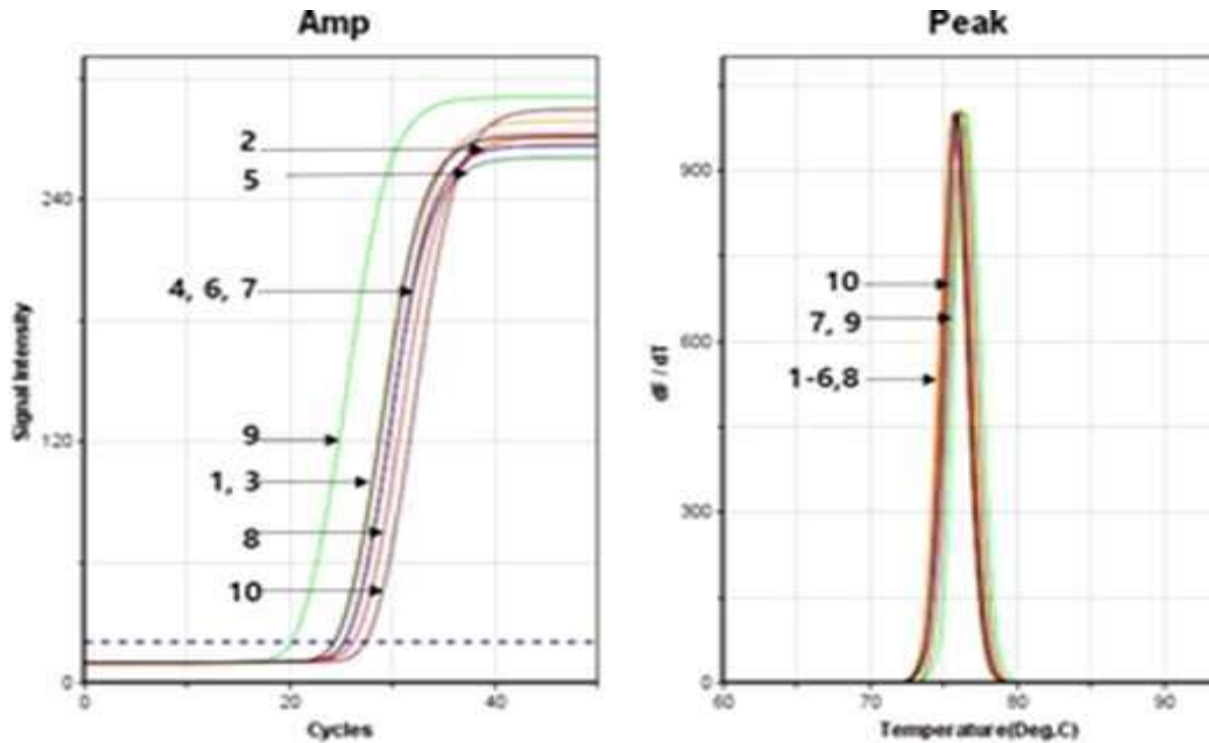
기 위하여 표준DNA를 사용하였고, 이를 initial template로 하여 특이 primer로 증폭시킨 PCR을 수행하였다. 이 결과에 따라 최적의 washing buffer 조건을 선정하였다(그림 181).



		Buffer 조성 (80% EtOH)	Ct cycle	DNA분자수	Tm
1	PE 1	10mM Tris-HCl (pH7.6)	25.25		76.03
2	PE 2		26.16		76.03
			25.71±0.46	3.4x10 ⁵	
3	A 1	15mM Tris-HCl (pH7.6)	25.20		76.03
4	A 2		25.24		76.03
5	A 3		25.25		76.03
			25.23±0.02	4.7x10 ⁵	
6	B 1	20mM Tris-HCl (pH7.6)	25.23		76.03
7	B 2	20mM Tris-HCl (pH7.6)	25.23		75.70
8	B 3		26.16		75.70
			25.54±0.44	3.8x10 ⁵	
9	1x10 ⁻⁷	Positive DNA	21.23		76.36
10	1x10 ⁻⁵	Positive DNA	27.11		76.36
					76.03±0.

그림 181. 80% EtOH의 Washing buffer조성에 따라 회수되는 DNA양의 Ct값 및 Tm값

PCR 증폭 그래프를 통하여 에탄올을 80%로 고정하고 염의 농도를 10mM, 15mM, 20mM Tris-HCl (pH 7.6)로 변화시킨 buffer로 column을 washing 하여 얻은 회수된 DNA시료를 initial template로 하여 사탕수수 특이 유전자를 증폭시켰다. 이의 Ct (Threshold cycles)값으로 회수된 DNA를 정량하였으며, 용점분석 그래프를 통하여 모든 시료에서 증폭된 PCR amplicon이 사탕수수 유전자에 특이적인 산물임을 확인하였다.



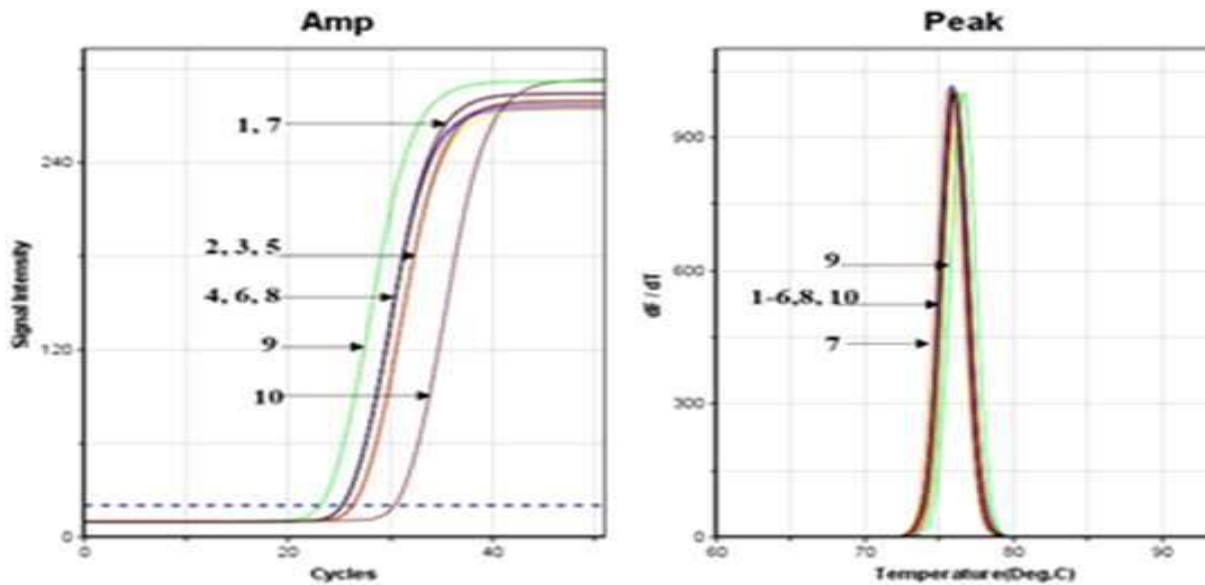
		Buffer 조성 (85% EtOH)	Ct cycle	DNA분자수	Tm
1	PE 1	10mM Tris-HCl (pH7.6)	24.27		75.85
2	PE 2	+80% EtOH	26.07		75.85
				4.9×10^5	
3	A 1	15mM Tris-HCl (pH7.6)	24.26		75.85
4	A 2		25.19		75.85
5	A 3		25.22		75.85
			24.89 ± 0.45	5.9×10^5	
6	B 1	20mM Tris-HCl (pH7.6)	25.20		75.85
7	B 2		25.21		75.52
8	B 3		24.90		75.85
			24.90 ± 0.43	5.9×10^5	
9	1×10^{-7}	Positive DNA	20.26		76.51
10	1×10^{-5}	Positive DNA	27.18		76.18
					75.91 ± 0

그림 182. 85% EtOH의 Washing buffer조성에 따라 회수되는 DNA양의 Ct값 및 Tm값

PCR 증폭 그래프를 통하여 에탄올을 85%로 고정하고 염의 농도를 10mM, 15mM, 20mM Tris-HCl (pH 7.6)로 변화시킨 buffer로 column을 washing 하여 얻은 회수된 DNA시료에서 사탕수수 특이 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었으며 용점분석 그래프를 통하여 모든 시료에서 증폭된 PCR amplicon이 사탕수수 유전자에 특이적인 산물임을 확인하였다

③ 토종꿀에 함유된 잔류 DNA 분리를 위한 최적 Elution buffer 개발

잔류 DNA를 affinity column에서 회수하기 위한 최적 Elution buffer는 각 성분의 최적 함량으로 10mM Tris-HCl (pH 9.0), TE buffer (10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, pH 9.0)와 DW를 사용하였다. 이는 표준DNA를 사용하고, 특이 primer로 증폭시킨 PCR에서 최적 조건을 선정하였다(그림 183).



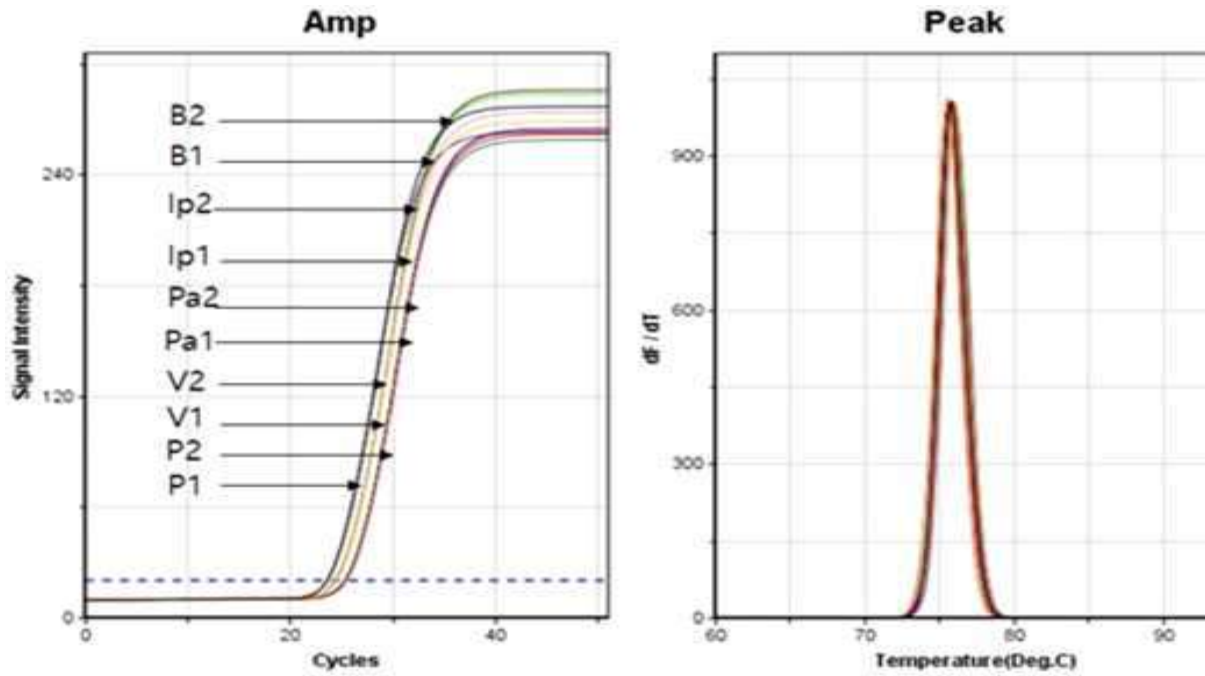
	Elution Buffer 조성		Ct cycle	DNA분자수	Tm
1	D 1	DW	25.16		76.03
2	D 2	DW	26.20		76.03
			25.68±0.5	3.5x10 ⁵	
			2		
3	A 1		26.15		76.03
4	A 2	10mM Tris-HCl (pH9.0)	25.20		76.03
5	A 3		26.13		76.03
			25.83±0.4	3.2x10 ⁵	
			4		
6	B 1		25.20		76.03
7	B2	10mM Tris-HCl (pH9.0)	25.18		75.70
8	B3	+0.5mM EDTA	25.20		76.03
			25.19±0.0	4.8x10 ⁵	
			1		
9	1x10 ⁷	Positive DNA	23.11		76.68
10	1x10 ⁵	Positive DNA	30.11		76.03
					76.06±0.23

그림 183. Elution buffer조성에 따라 회수되는 DNA양의 Ct값 및 Tm값

PCR 증폭 그래프를 통하여 10mM Tris-HCl (pH 9.0), TE buffer (10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, pH 9.0)와 DW로 elution하여 얻은 회수된 DNA시료에서 사탕수수 특이 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었으며 용점분석 그래프를 통하여 모든 시료에서 증폭된 PCR amplicon이 사탕수수 유전자에 특이적인 산물임을 확인하였다

④ 토종꿀에 함유된 잔류 DNA 분리를 위한 최적 affinity column 선발

각 제품간 컬럼의 binding 능력을 파악하기 위하여 시판되는 다종의 binding 컬럼을 수집하여 그 성능을 시험하였다(그림 184~185).



	column	Ct (Cycle)	Aver. Ct	Tm (°C)	DNA분자수
1	probio	23.51		75.70	
2		25.25	24.38±1.23	75.70	8.3x10 ⁵
3	viralGene	24.40		76.03	
4		23.50	23.95±0.64	76.03	1.1x10 ⁶
5	pathogen	25.26		76.03	
6		25.22	25.24±0.03	75.70	4.7x10 ⁵
7	Intron-pla	25.20		75.70	
8		24.34	24.77±0.61	75.70	6.4x10 ⁵
9	biosolution	24.30		75.70	
10		24.27	24.29±0.02	75.70	8.8x10 ⁵
				75.80±0.16	

그림 184. 토종꿀에 함유된 잔류 DNA (residual DNA) 분리를 위한 최적 affinity column 선발
 100ul 꿀에 108의 사탕수수 특이유전자 재조합DNA (pSc)를 넣어 주고 500ul의 5M GnHCl binding buffer를 사용하여 5가지 다른 column을 통해 회수된 pSc에 대한 PCR amplicon의 증폭곡선과 이 amplicon 특이성 확인을 위한 용점분석그래프

	column (probio)	Ct (Cycle)	Tm (°C)	DNA분자수
1	1(0.6ml)	24.07	76.18	1.0×10^6
2	2(0.6ml)	24.10	76.18	9.9×10^5
3	3(0.6ml)	24.10	76.18	9.9×10^5
4	4(0.6ml)	24.83	76.51	6.1×10^5
5	5(0.6ml)	24.08	76.51	1.0×10^6
6	6(0.6ml)	24.83	76.18	6.1×10^5
7	7(0.6ml)	24.06	75.85	1.0×10^6
8	8(0.6ml)	23.14	76.18	1.9×10^6
9	9(0.6ml)	23.14	75.85	1.9×10^6
10	10(6ml)	19.12	75.85	2.6×10^7
76.15±0.24				

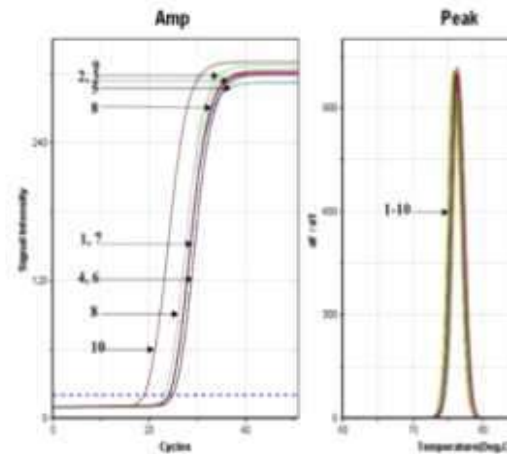


그림 185. 선발된 1종 column, 10개에 의한 잔류 DNA (residual DNA) 분리 및 정량 PCR 100ul 꿀에 108의 사탕수수 특이유전자 재조합DNA(pSc)를 넣고 500ul의 5M GnHCl binding buffer를 사용하여 1종 10개 column을 통해 회수된 pSc에 대한 PCR amplicon의 증폭곡선과 이 amplicon 특이성 확인을 위한 용점분석그래프

⑤ 토종꿀에 함유된 잔류 DNA 분리를 위한 최적 벌꿀 시료의 양
 컬럼에 binding 능력을 제고하기 위하여 최적의 벌꿀의 양을 시험하였다(그림 186).

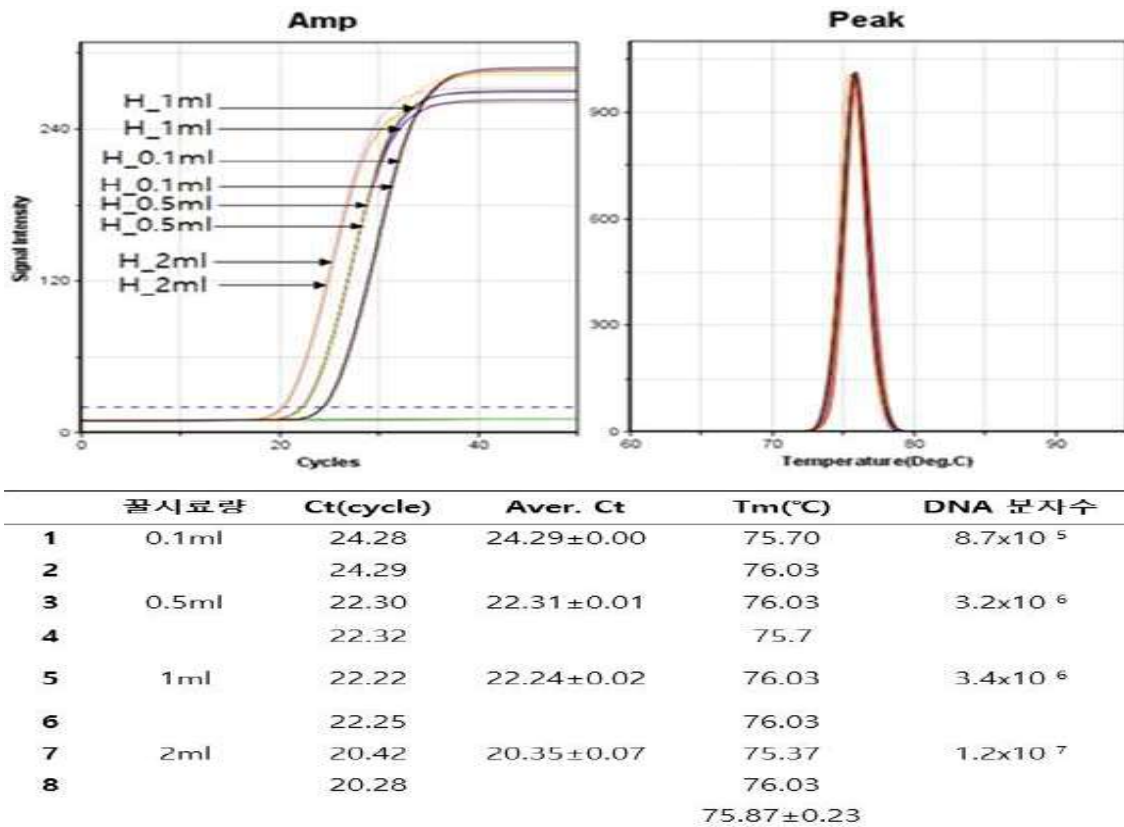
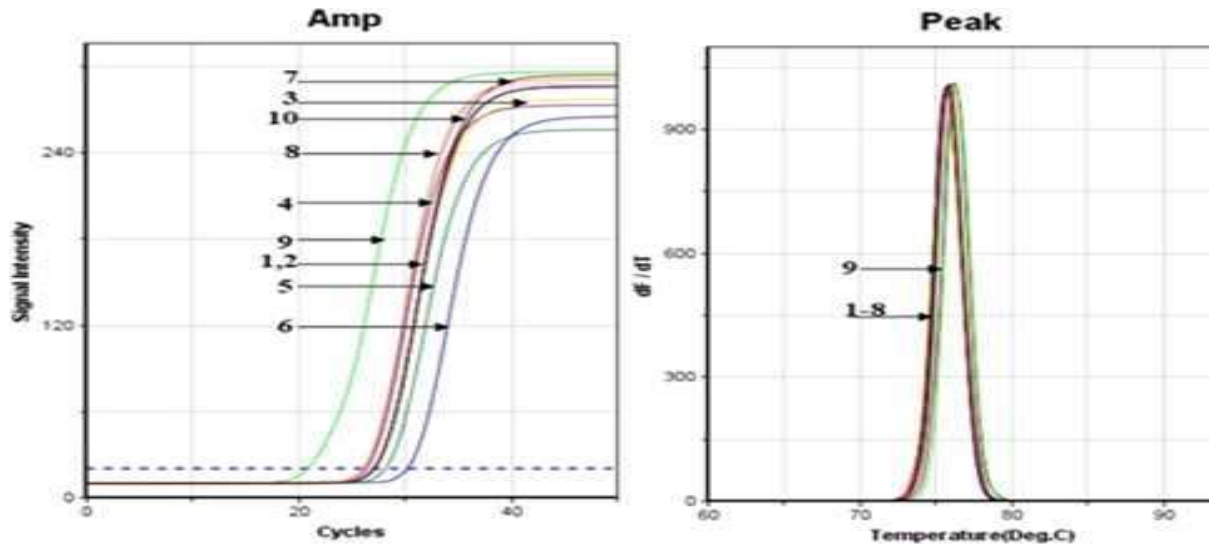


그림 186. 벌꿀 시료량에 따른 회수 DNA 분자수 비교

3.8ml 꿀에 38ul 1×10^8 pSC 를 넣고 3.8ml의 5 volume으로 DNA binding buffer를 넣고 이 혼합액을 0.6ml(0.1ml 꿀시료), 3ml(0.5ml 꿀시료), 6ml(1ml 꿀시료), 12ml(2ml 꿀시료)를 column에 통과시켜 회수한 pSc에 대한 PCR amplicon의 Ct 값의 변화를 증폭 곡선에서 확인하였으며 용점분석그래프를 통하여 amplicon의 특이성 확인을 확인하였다.

⑥ 토종꿀 시료에서 회수/손실된 DNA의 양

기지의 사탕수수 고유 유전자를 별꿀로 희석하고, 이를 걸럼에 binding 하는 과정을 거쳐 그 회수율을 비교하였다(그림 187~188).



시료(ml)	Ct cycle				Ave.±DEV	Tm			DNA/분자-
	1	2	3			1	2	3	
1	0.1	25.16	24.16	24.18	24.50±0.47	76.51	76.18	76.51	7.6 × 1
2	0.5	24.16	22.18	22.21	22.85±0.93	76.84	75.85	76.18	2.3 × 1
3	1	22.25	21.41	22.17	22.28±0.75	76.51	76.18	76.18	3.3 × 1
4	2	22.40	21.12	20.42	21.31±0.82	76.18	76.84	76.18	6.2 × 1
5	0.1'	29.12	29.13	29.19	29.15±0.03	75.85	76.18	76.18	3.6 × 1
6	0.5'	27.12	28.08	27.16	27.45±0.44	75.52	75.85	76.18	1.1 × 1
7	1'	26.11	26.13	26.17	26.14±0.02	75.85	75.85	76.18	2.6 × 1
8	2'	25.14	25.15	24.19	24.83±0.45	75.85	75.85	76.18	6.2 × 1
9	10 ⁻⁷	22.32	21.13	21.20	21.55±0.55	76.18	76.51	76.51	
10	10 ⁻⁵	28.08	28.13	28.18	28.13±0.04	76.18	76.84	76.51	
						76.15±0.37	76.21±0.37	76.28±0.15	

그림 187. 별꿀시료량에 따라 회수된 DNA양과 손실된 DNA에 대한 Ct값 및 Tm값 비교

꿀 시료량에 따른 사탕수수 특이 유전자 검출시료와 1차 column 통과 시료액, 그리고 이에 대한 2차 column통과 후 회수된 DNA시료를 initial template로 하여 정량 PCR을 수행하였다. 증폭 그래프를 통하여 모두 시료에서 사탕수수 특이 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었으며 융점분석 그래프를 통하여 모든 시료에서 증폭된 amplicon이 사탕수수 유전자에 특이적인 산물임을 확인할 수 있었다.

꿀시료량	Ct(cycle)	Aver. Ct	Tm(°C)	DNA 분자수	
1	0.1ml	24.28	24.29±0.00	75.70	8.7x10 ⁵
2		24.29		76.03	
3	0.5ml	22.30	22.31±0.01	76.03	3.2x10 ⁶
4		22.32		75.7	
5	1ml	22.22	22.24±0.02	76.03	3.4x10 ⁶
6		22.25		76.03	
7	2ml	20.42	20.35±0.07	75.37	1.2x10 ⁷
8		20.28		76.03	
				75.87±0.23	

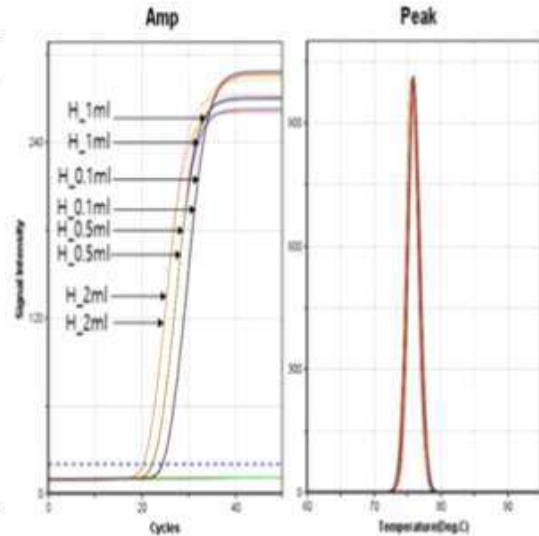
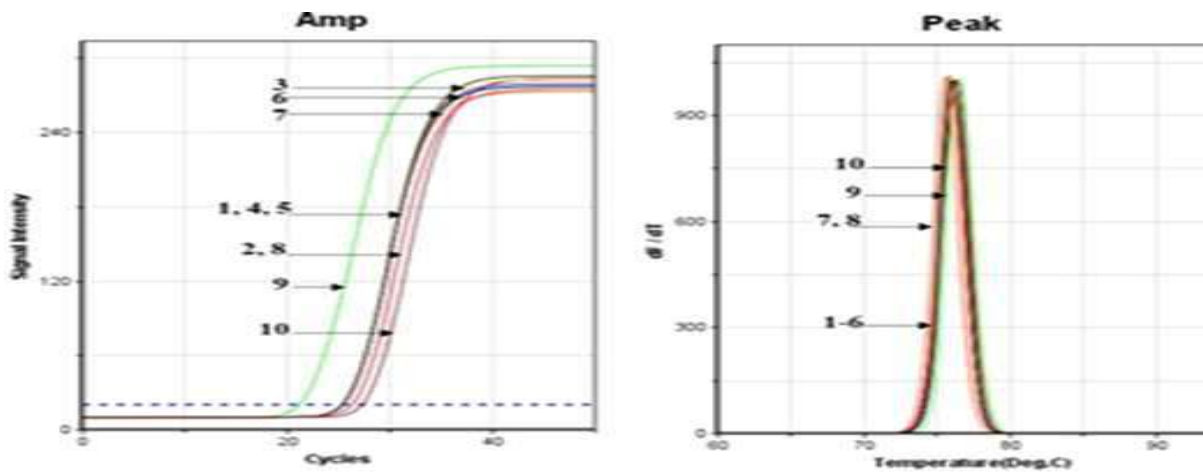


그림 188. 벌꿀 시료량에 따라 회수된 DNA양의 측정을 위한 정량 PCR

꿀의 시료량에 따라 다양하게 희석시킨 벌꿀에 일정량의 표준 DNA를 투여하여, 이를 벌꿀에서 잔류 DNA를 회수하는 방법으로 각기 DNA시료를 회수하였다. 각 DNA시료에서 모두 사탕수수 특이 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었으며 용점분석 그래프를 통하여 모든 시료에서 증폭된 amplicon이 사탕수수 유전자에 특이적인 산물임을 확인할 수 있었다.

(나) CTAB법과 본 과제의 잔류 DNA분리법의 비교

화분유전자의 분리법으로 잘 알려진 CTAB법과 본 과제의 분리법을 비교하였다(그림 189).



방법	No	시료	Ct	DNA 분자수	Tm
OLD	1	O1	24.31		75.70
	2	O2	24.39		76.03
	3	O3	26.04		76.03
New	4	N1	24.91±0.80	5.8x10 ⁵	75.92±0.16
	5	N2	25.23		75.70
	6	N3	25.26		76.03
			26.13		76.03
			25.54±0.42	3.8x10 ⁵	75.92±0.16
			23.41		76.36
		31.11		76.36	
		Negative	40.09		69.49

그림 189. DNA 분리 방법 간 회수된 DNA양 비교.

Old는 CTAB를 사용하는 DNA 분리 방법이며, New는 본 과제에서 개발한 토종꿀 시료에서 잔류 DNA를 분리하는 방법이다. PCR 증폭 그래프를 통해 DNA 분리 방법에 따른 사탕수수 특이 유전자 검출시료가 증폭되었음을 확인할 수 있었으며 용점분석 그래프를 통하여 모든 시료에서 증폭된 PCR amplicon이 사탕수수 유전자에 특이적인 산물임을 확인하였다.

(다) 대량의 토종꿀 시료에 대한 본 과제의 잔류 DNA분리법의 적용

토종꿀의 유전자 검사는 그 적용범위에 따라 시료의 수가 방대해 질 수 있다. 이런 대량시료에서 적합한 유전자 분리법을 강구하였으며, Qiagen사가 개발한 24 channel vacuum manifold를 사용하는 방안이 현시점에서 가장 유용함을 확인하였다.

(2) 사탕수수와 사탕무우 고유 유전자에 의한 사양꿀 판별 유전자 검사법의 개발

(가) 사탕무 및 사탕수수의 고유 유전자에 대한 데이터베이스 구축

Genbank에 보고된 사탕무(*Beta vulgaris*), 사탕수수(*Saccharum officinarum*)의 고유 유전자는 그 정보 각 746,812개, 33,168개에 이르렀으며, 각 식물체의 고유 유전자를 정리하기에 충분한 수에 달한다고 판단하였다(표 82).

표 82. GenBank에 보고된 사탕무 및 사탕수수의 nuclotide 정보의 수

사탕무	사탕수수
Beta vulgaris	Saccharum officinarum
746,812개	33,168개
Genomes	Genomes
Assembly	0
BioCollections	0
BioProject	45
BioSample	573
Genome	0
Nucleotide	33,168
Probe	1,371
SRA	669
Taxonomy	1

(나) 사탕수수, 사탕무우 고유 유전자 증폭을 위한 specific primer의 선별

GenBank의 사탕무(*Beta vulgaris*), 사탕수수(*Saccharum officinarum*)의 유전자 정보에 근거하여 특이적 프라이머 설계 및 제작을 하였으며, 이는 일반PCR 및 초고속 PCR을 사용한 선별 및 평가를 거쳐 실제 토종꿀 시료에 적용 가능함을 확인하였다(표 83~84).

표 83. 사탕무우 특이 검출을 위한 detection primer 및 nested primer

Target gene		Primer name	Sequence (5'→3')	Tm (°C)	Amplicon size, bp
Chloroplast DNA	Outer	Beet-cp-F	CAGGATCAGTCGGGTCTTC	56.95	378
		Beet-cp-R	CTGTCTTCCACCCAATGAATCG	59.32	
	Inner	Beet-cp-NF	TAAACTCTACCGATGATGTAGAC	55.11	200
		Beet-cp-NR	TAGAAAACCTTTGAATTAGCAAGAAA	53.93	
Mitochondria DNA	Outer	Beet-mt-F	CTCGCTTTATCTCTTTCTACCGG	59.07	250
		Beet-mt-R	GAAATCTCCTTCAGGTTTCAGTCG	58.71	
	Inner	Beet-mt-NF	GAATTGCTGCTTGAAAGTTTTC	55.38	196
		Beet-mt-NR	CAATTCTCCTATTCTCCTGC	54.06	

표 84. 사탕무우의 특이 유전자 검출 및 정량을 위한 프라이머(1차)

Target gene		Primer name	Sequence (5'→3')	Tm (°C)	Amplicon size, bp
Chloroplast DNA	Outer	Cane-cp-dF	CACCGCAATTATTTTTATTCTGAG	50.4	378
		Cane-cp-dR	GAACATCTTGAATCCGGTATTC	51.5	
	Inner	Cane-cp-nF	CTAGGGCAACTATCTTGTC	53.2	200
		Cane-cp-nR	GGATAGGGTATTTCTATATGTGATAG	49.8	
Mitochondria DNA	Outer	Cane-mt-dF	GGAGGAAGACTCGGCATGAA	58.2	250
		Cane-mt-dR	CATGTTCCCGAGTTGCAGAG	57.4	
	Inner	Cane-mt-nF	CCGGTGGTGTGGTACGTAGT	60.7	196
		Cane-mt-nR	AGCCTTGCTTCCCATTGTCA	58.1	

제작된 primer들을 사용하고 최적화된 초고속 PCR을 사용한 선별 및 평가에서, 특히 사탕무의 경우, 엽록체(chloroplast)의 DNA는 다른 유전자원에 비하여 매우 낮은 특이 분자수를 보였으며, 이는 사탕무 식물체의 뿌리에 해당되는 부위에 엽록체는 매우 적은 수로 존재하는 것으로 해석되었다. 따라서, 토종꿀에 잔류되어 있는 사탕무 특이 유전자를 증폭하기 위하여 보강적인 primer의 설계 및 제작, 그리고 평가를 수행하였다(표 85).

표 85. 사탕무의 특이 유전자 검출 및 정량을 위한 프라이머(2차)

Primer name	Sequence (5'→3')	Amplicon size	Accession No.
Beet-mt-F	CTCGCTTATCTCTTTCTACCGG	250bp	BA000024
Beet-mt-R	GAAATCTCCTTCAGGTTTCAGTCG		
Beet-mt-nF	GAATTGCTGCTTGAAAGTTTTC	196bp	
Beet-mt-nR	CAATTCTTCCTATTCTCCTGC		
Beet-g-F	ATG TGT AGT GCC CAT ATT TG	315bp	EF101866
Beet-g-R	GCA TTA TGA GGA GTG TTT AGT AC		
Beet-g-nF	AGC GCT TCT TCATTC CAA GA	160bp	
Beet-g-nR	CCT TGG TAG GGAATG GAA GG		

GenBank Accession No. BA000024와 EF101866에서 설계, 제작한 초고속 PCR을 사용한 선별 및 평가로 26개 꿀 시료에서 사탕무 고유 유전자의 증폭을 진행하였으며, 8개 시료로부터 사탕무 특이 유전자의 증폭을 확인하였다.

가장 문제시 되는 토종꿀에서 사탕무 고유 유전자의 효과적인 검출 및 정량을 위하여 다양한 primer들을 표준 물질(표준 DNA)로 사용하여 검출 및 정량법을 최적화 하였으며, 이는 크게 3가지로 요약될 수 있을 것이다.

1) Genomic DNA에 존재하는 사탕무 특이 유전자 검출 및 정량: 사탕무 Genomic DNA에 존재하는 RdDP 재조합DNA를 주형으로 한 PCR 결과를 토대로 정량곡선 제시하여 사탕무 특이유전자 정량에 이용하는 방법.

2) Mitochondria DNA에 존재하는 사탕무 특이 유전자 검출 및 정량: 사탕무 Mt DNA에 존재하는 유전자의 재조합DNA를 주형으로 한 PCR 결과를 토대로 정량선을 설정하여 사탕무 특이유전자 정량에 이용하는 방법.

3) Chloroplast DNA에 존재하는 사탕무 특이유전자 검출 및 정량: 사탕무 Cp DNA에 존재하는 유전자의 재조합DNA를 주형으로 한 PCR 결과를 토대로 정량곡선 제시하여 사탕무 특이유전자 정량에 이용하는 방법.

위의 3개 표준 DNA를 사용하는 실험의 결과는 아래와 같았다.

① G.DNA에 존재하는 사탕무 특이유전자 (pTOP-Beet-RdDP, pBR)

pBR contained E.coli culture한 후 Intron plasmid DNA extraction kit 사용하여 DNA 분리 하였다. Purity 1.8의 71ng/ul의 시료를 40ul (2840ng)를 Hind III(Enzymomic) 로 37°C에서 overnight 반응시키고 80°C에서 inactivation 시켜 최종적으로 선형화 시켰다. 다시 이를 OD값을 체크하였다. 이를 분자수 계산식에 대입하여 2.14×10^{10} 분자수로 계산되었다. 10ul DNA와 11.4ul의 DW를 섞어 1×10^{10} 으로 맞춘 후 10배로 serial dilution하여 PCR를 수행하였다. 이때 0.5ul 10uM primer, 5ul 2xRapi detect masterl, 3ul DW, 1ul DNA의 조성과 pre-denaturation 95°C 30sec, denaturation 95°C 3sec, annealing 53°C, extension 72°C 3 sec 로 50 cycle의 조건으로 실험하였다. 그 결과로 $y = -4.1534x + 38.881$ 의 회귀식을 얻을 수 있었다 ($R^2 = 0.9995$; 표 86, 그림 190~192).

표 86. 사탕무 특이 재조합 Genomic DNA를 이용한 qPCR의 Ct값 및 Tm값

DNA 분자수	1차 Ct (Cycle)	2차 Ct (Cycle)	3차 Ct (Cycle)	Aver.±Stdev	Tm
1×10^3	34.01	35.86	34.79	34.89 ± 0.93	80.03 ± 0.19
1×10^4	29.94	30.99	30.86	30.60 ± 0.57	80.25 ± 0.19
1×10^5	25.94	26.88	25.81	26.21 ± 0.58	80.25 ± 0.19
1×10^6	21.94	22.91	21.83	22.23 ± 0.59	80.25 ± 0.38
1×10^7	17.88	17.98	17.96	17.94 ± 0.05	80.03 ± 0.19
1×10^8	13.98	14.82	13.81	14.20 ± 0.54	80.47 ± 0.57

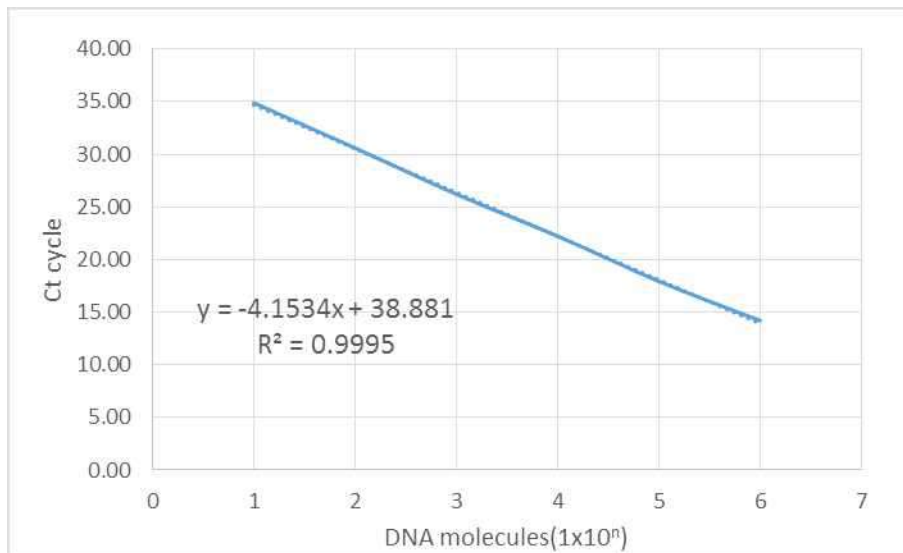


그림 190. 정량된 사탕무 특이 재조합 Genomic DNA를 이용한 qPCR의 Ct값 및 분자수에 대한 회귀분석(Regression analysis)

Unknown	<input checked="" type="checkbox"/>	Un1	<input checked="" type="checkbox"/>	Un2	<input checked="" type="checkbox"/>	Un3	<input checked="" type="checkbox"/>	Un4	<input checked="" type="checkbox"/>	Un5	<input checked="" type="checkbox"/>	Un6	<input checked="" type="checkbox"/>	Un7	<input checked="" type="checkbox"/>	Un8	<input checked="" type="checkbox"/>	Un9	<input checked="" type="checkbox"/>	Un10	<input checked="" type="checkbox"/>
Ct(Cycles)	20	13.93	17.88	21.94	25.94	29.94	34.01	36.97	0.00	42.87	0.00	0.00	68.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Tm(Deg. C)		80.30	80.47	80.47	80.47	80.14	80.14	79.81	0.00	68.92	0.00	0.00	68.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Detection		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

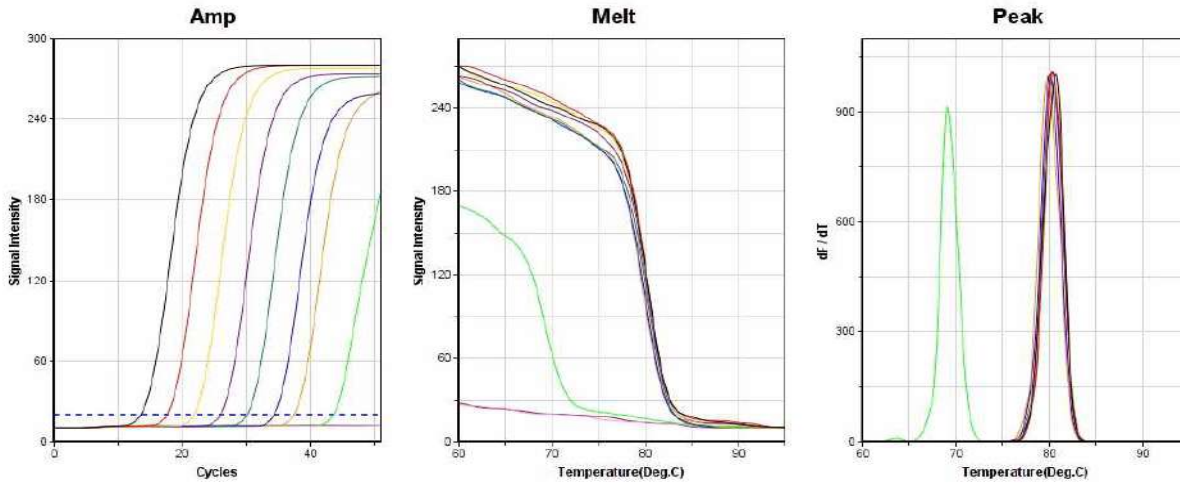


그림 191. 정량된 사탕무 특이 재조합 Genomic DNA를 이용한 qPCR (1차 실험)

Unknown	<input checked="" type="checkbox"/>	Un1	<input checked="" type="checkbox"/>	Un2	<input checked="" type="checkbox"/>	Un3	<input checked="" type="checkbox"/>	Un4	<input checked="" type="checkbox"/>	Un5	<input checked="" type="checkbox"/>	Un6	<input checked="" type="checkbox"/>	Un7	<input checked="" type="checkbox"/>	Un8	<input checked="" type="checkbox"/>	Un9	<input checked="" type="checkbox"/>	Un10	<input checked="" type="checkbox"/>
Ct(Cycles)	20	14.82	17.98	22.91	28.88	30.99	35.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Tm(Deg. C)		79.81	80.14	79.81	80.14	80.14	79.81	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Detection		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

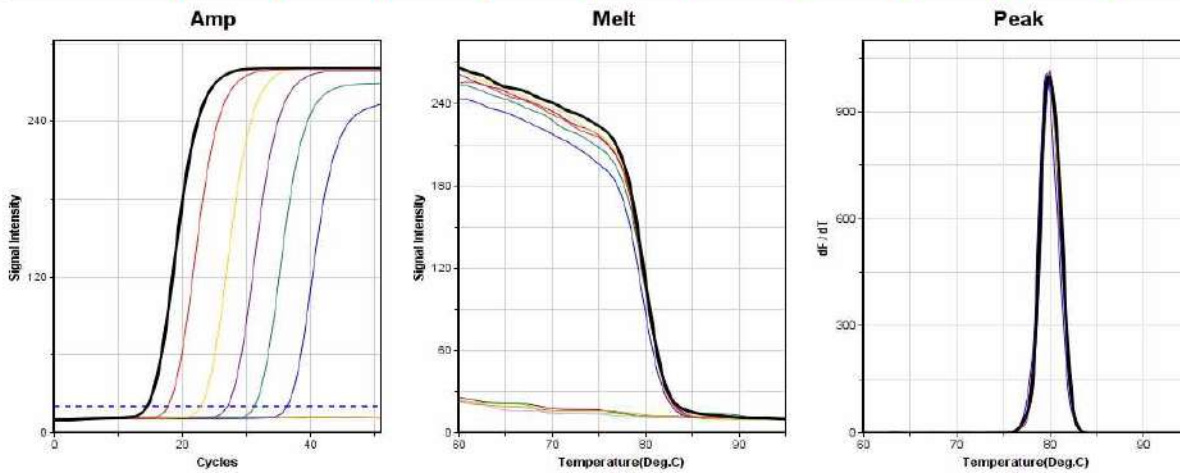


그림 192. 정량된 사탕무 특이 재조합 Genomic DNA를 이용한 qPCR (2차 실험)

② Mt DNA에 존재하는 사탕무 특이유전자 (pTOP-beet-mt, pBM)

pBR contained E.coli culture한 후 Intron plasmid DNA extraction kit 사용하여 DNA 분리하였다. Purity 2.15의 146ng/ul의 시료를 20ul (2920ng)를 Hind III(Enzymic) 로 37°C에서 overnight 반응시키고 80°C에서 inactivation 시켜 최종적으로 선형화 시킨 후, OD값으로 정량하였다. 이는 분자수 계산식에 대입하여 1.32×10^{10} 분자수로 계산되었다. 10ul DNA와 3.2ul의 DW를 섞어 1×10^{10} 으로 맞춘 후 10배로 serial dilution하여 PCR를 수행하였다. 이때 0.5ul 10uM primer, 5ul 2xRapi detect master1, 3ul DW, 1ul DNA의 조성과 pre-denaturation 95°C 30sec, denaturation 95°C 3sec, annealing 53°C, extension 72°C 3 sec 로 50 cycle의 조건으로 실험하였다. 그 결과로 $y = -4.2983x + 40.182$ 회귀식을 얻었다($R^2 = 0.9972$; 표 87; 그림 194~203).

표 87. 사탕무 특이유전자 재조합 Mitochondrial DNA를 이용한 qPCR의 Ct값 및 Tm값

DNA 분자수	1차 Ct (Cycle)	2차 Ct (Cycle)	3차 Ct (Cycle)	Ct의 평균 및 오차	Tm
1×10^3	34.32	34.18	37.96	35.49 ± 2.14	79.79 ± 0.27
1×10^4	30.29	32.11	34.01	32.14 ± 1.87	79.69 ± 0.10
1×10^5	26.30	27.25	29.18	27.58 ± 1.47	79.69 ± 0.10
1×10^6	22.32	22.37	23.21	22.63 ± 0.50	79.69 ± 0.10
1×10^7	18.32	18.33	18.28	18.31 ± 0.03	79.69 ± 0.10
1×10^8	14.28	14.45	15.32	14.68 ± 0.56	79.69 ± 0.10

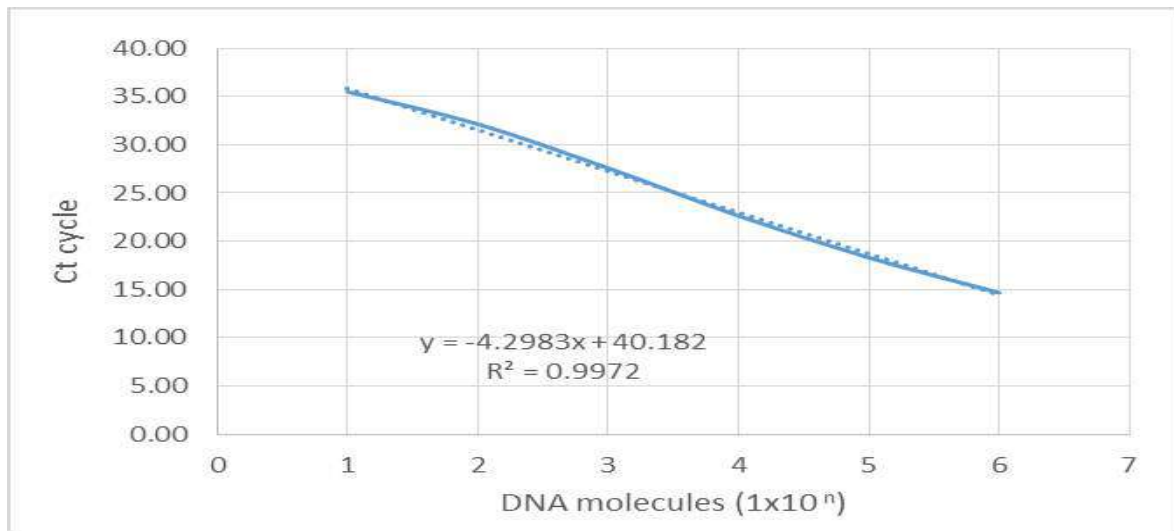


그림 193. 정량된 사탕무 특이 재조합 Mitochondrial DNA를 이용한 qPCR의 Ct값 및 분자수에 대한 회귀분석(Regression analysis)

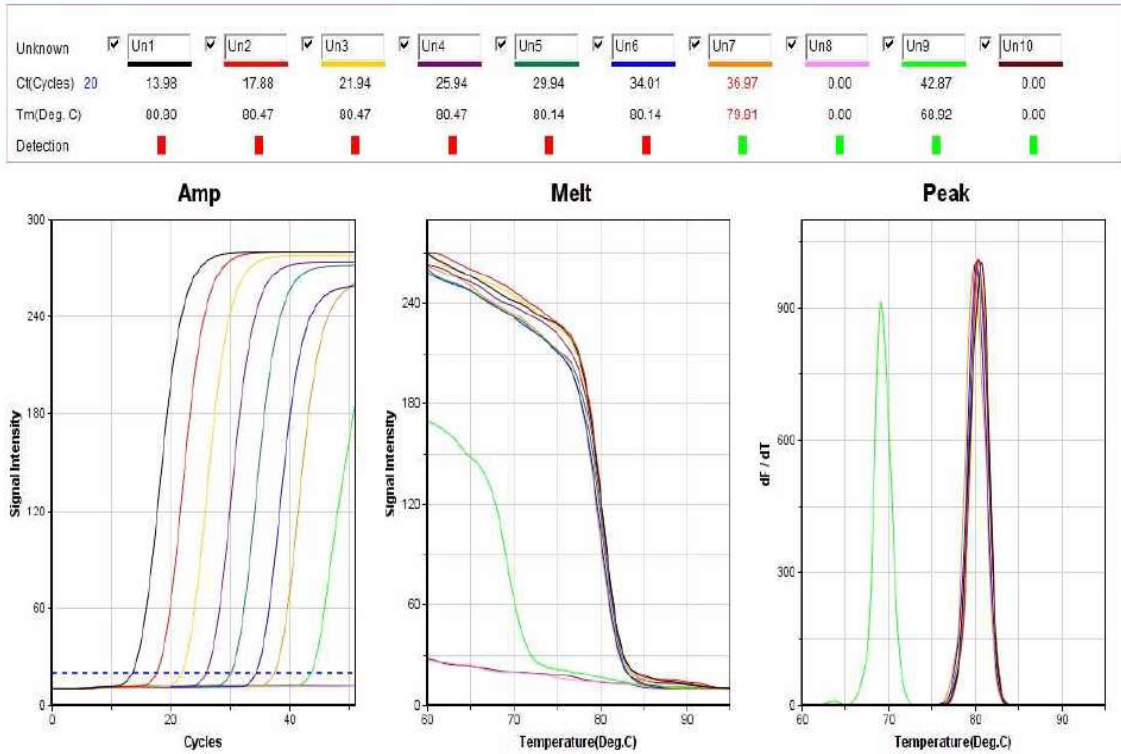


그림 194. 정량된 사탕무 특이 재조합 Mitochondrial DNA를 이용한 qPCR (1차 실험)

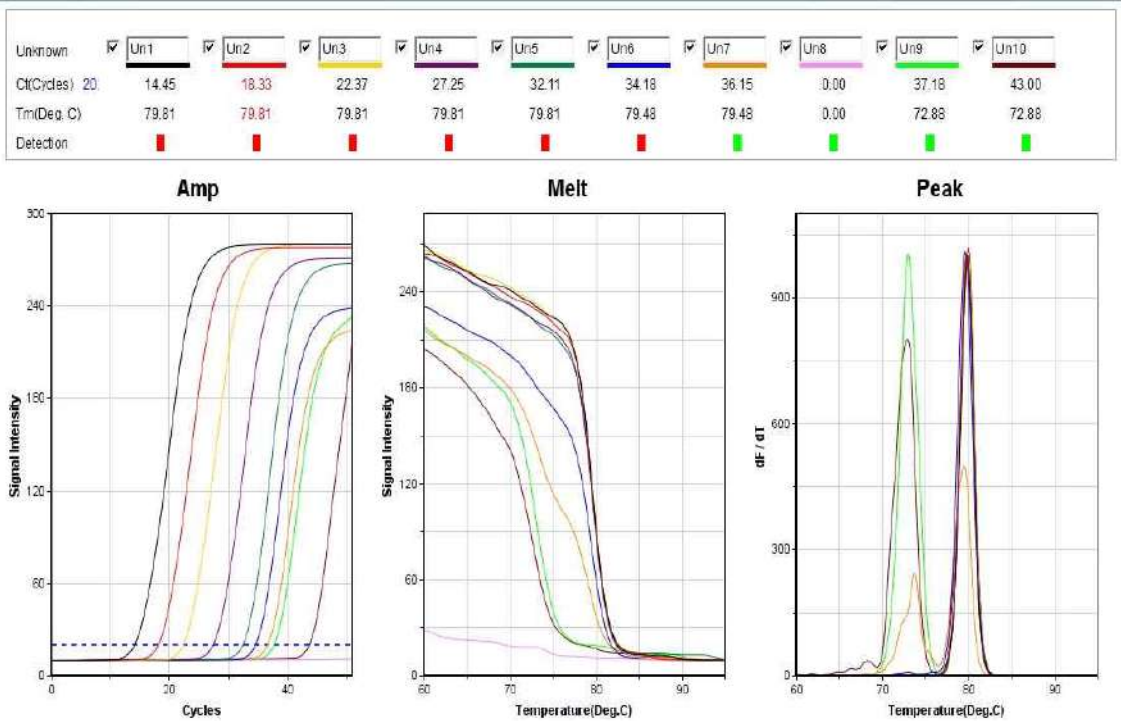


그림 195. 정량된 사탕무 특이 재조합 Mitochondrial DNA를 이용한 qPCR (2차 실험)

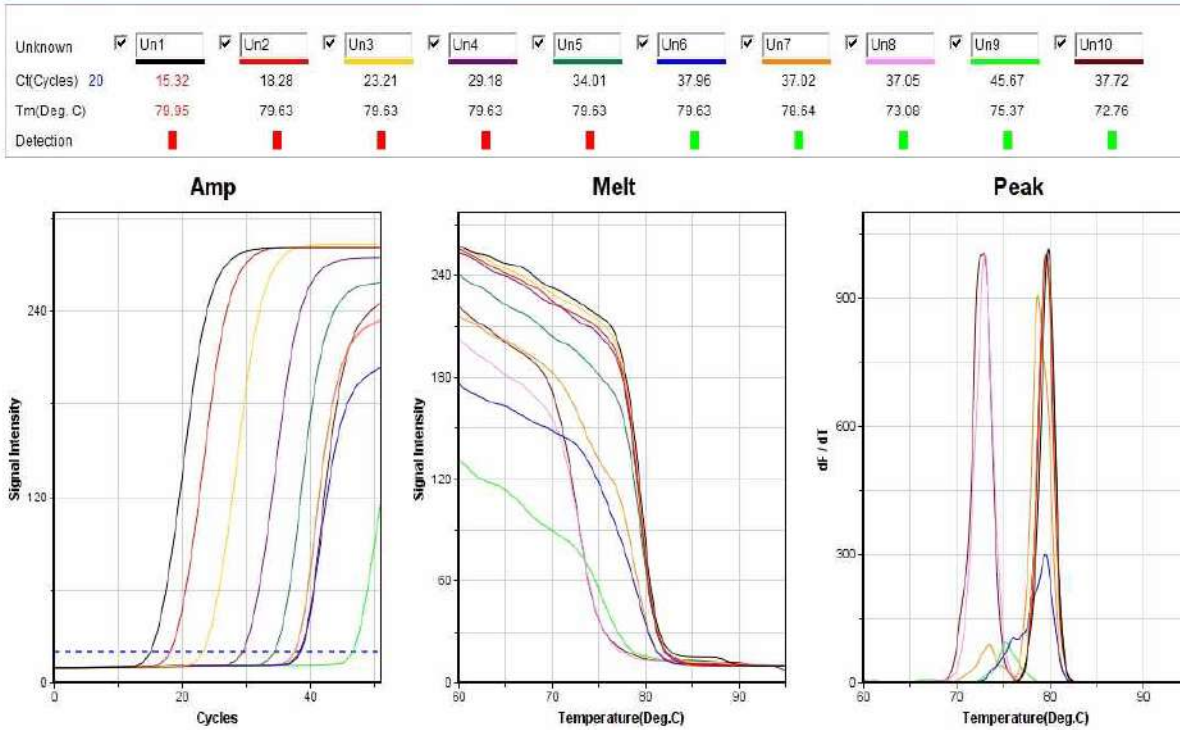


그림 196. 정량된 사탕무 특이 재조합 Mitochondrial DNA를 이용한 qPCR (3차 실험)

③ 특이 primer들에 의한 사탕수수-, 사탕무우-detection PCR 및 nested PCR
 선별된 다양한 사탕수수 특이, 사탕무우 특이 detection primer 쌍 및 nested primer쌍들에
 대한 최적 PCR 조건을 확립하고, 그 민감도, 정확성 등을 검사하였다(그림 197~200).

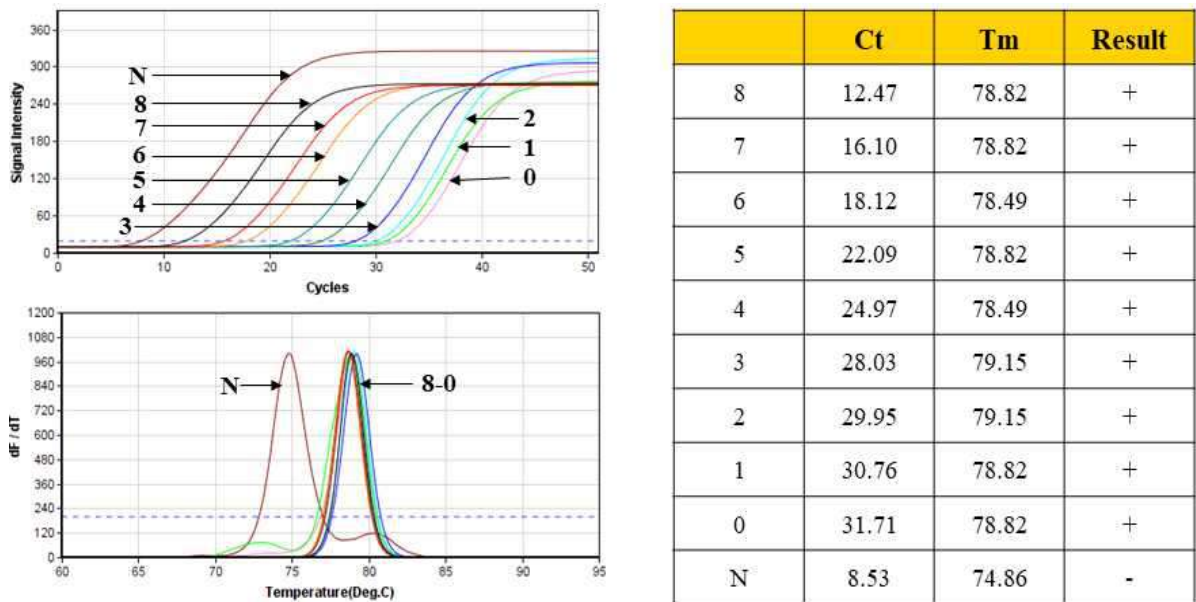
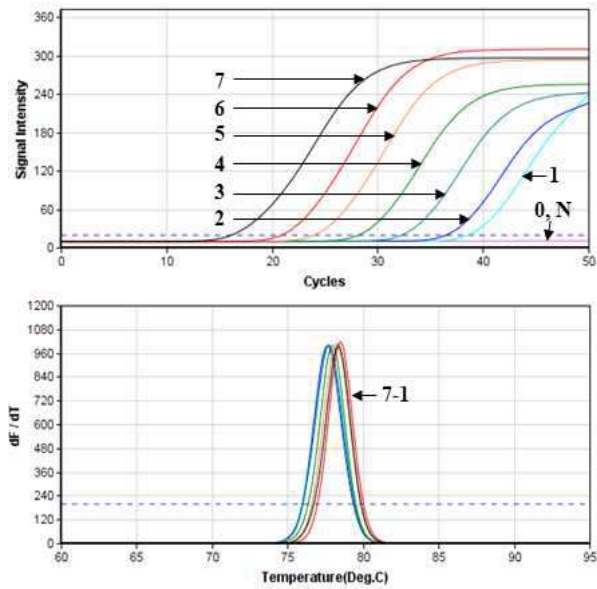


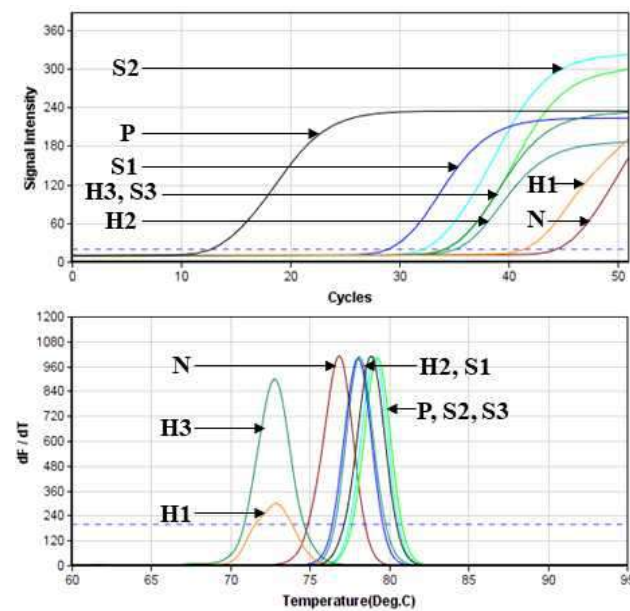
그림 197. 선별된 사탕무 특이 detection primer에 의한 PCR의 정량성 평가

최적온도는 53°C, 2.3 × 100 분자까지 증폭할 수 있어 매우 높은 민감도를 보였다.



	Ct	Tm	Result
7	16.44	78.32	+
6	21.05	78.32	+
5	24.04	78.32	+
4	28.06	78.32	+
3	32.01	77.99	+
2	36.03	77.66	+
1	38.04	77.66	+
0	0.00	0.00	-
N	0.00	0.00	-

그림 198. 선별된 사탕무 특이 detection primer에 의한 PCR의 정량성 평가
 최적온도는 57°C, 2.3 × 10¹ 분자까지 증폭할 수 있어 매우 높은 민감도를 보였다.



	Ct	Tm	Result
Positive	13.16	78.97	+
Honey1	40.70	72.76	-
Honey2	34.68	77.99	+
Honey3	33.72	72.76	-
Sugar1	28.75	77.99	+
Sugar2	31.87	78.97	+
Sugar3	33.83	79.30	+
Negative	43.59	76.68	-

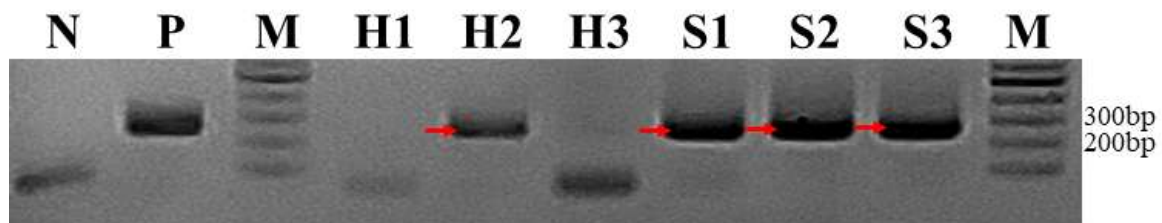
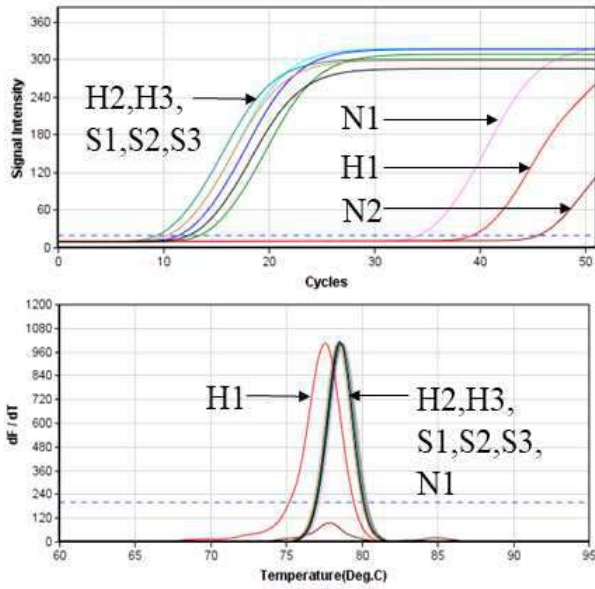


그림 199. 사탕꿀과 사탕무 설탕으로부터 사탕무 고유 유전자검출을 위한 detection PCR
 Honey2, Sugar1, Sugar2, Sugar3에서 positive와 유사한 Tm값이 측정되었으며, 사탕꿀
 과 설탕물에서 추출된 DNA가 사탕무 고유 유전자를 재확인하기 위하여 nested PCR을 적
 용하였다.



	Ct	Tm	Result
Positive	12.92	78.64	+
Honey1	38.75	77.66	-
Honey2	10.97	78.3.2	+
Honey3	13.91	78.64	+
Sugar1	10.04	78.64	+
Sugar2	12.00	78.64	+
Sugar3	11.01	78.64	+
Negative1	33.84	78.64	+
Negative2	44.73	0.00	-

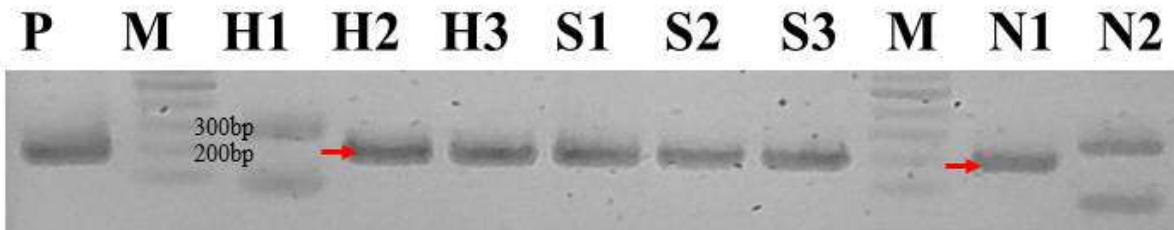
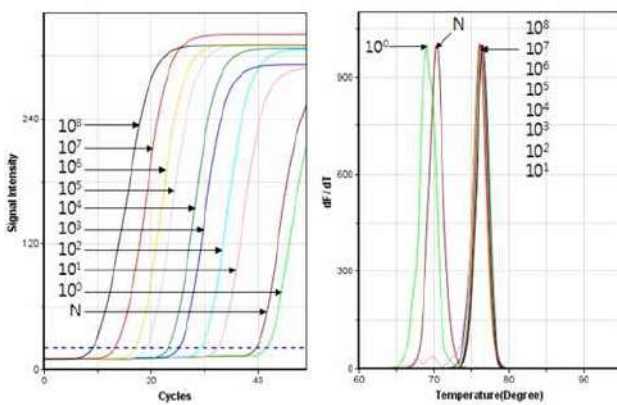


그림 200. 사탕꿀과 사탕무 설탕에서 사탕무 고유 유전자의 검출을 위한 nested PCR

Honey1을 제외한 모든 시료에서 positive와 유사한 Tm값이 측정되었으며, 사탕무 고유 유전자의 재증폭을 통하여 각 시료에서 추출된 DNA가 사탕무 고유 유전자임 재확인하였다.



	Ct	Tm	Result
8	9.47	76.53	+
7	13.46	76.20	+
6	17.13	76.20	+
5	19.14	75.88	+
4	23.08	76.53	+
3	25.05	76.20	+
2	29.03	76.20	+
1	32.02	76.20	+
0	40.79	69.07	+
N	38.91	70.37	-

그림 201. 선별된 사탕수수 특이 detection primer의 정량성 평가

최적 혼성온도는 55°C, 1.0×10^1 분자까지 증폭할 수 있어 매우 높은 민감도를 보였다.

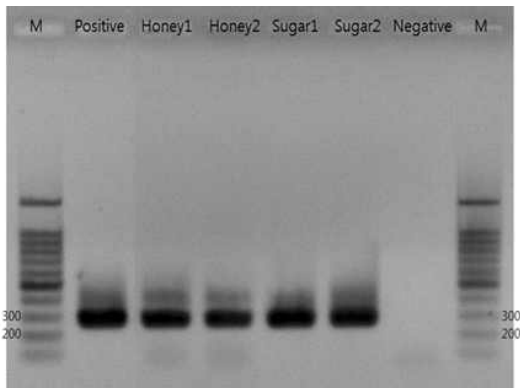
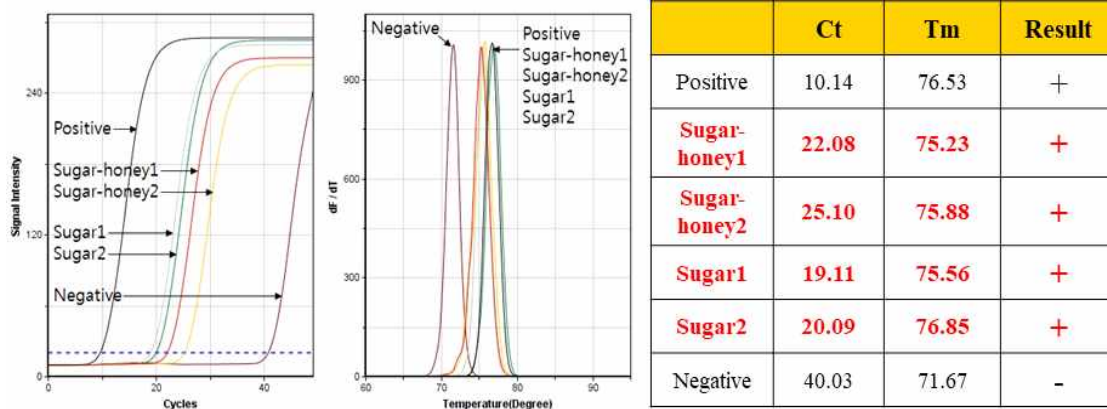


그림 202. 사양꿀과 사탕수수 설탕으로부터 사탕수수 고유 유전자의 검출을 위한 detection PCR

모든 시료에서 positive와 유사한 Tm값이 측정됨. 사양꿀과 설탕물에서 추출된 DNA가 사탕수수 고유 유전자임을 재확인하기 위하여 nested PCR을 진행하였다.

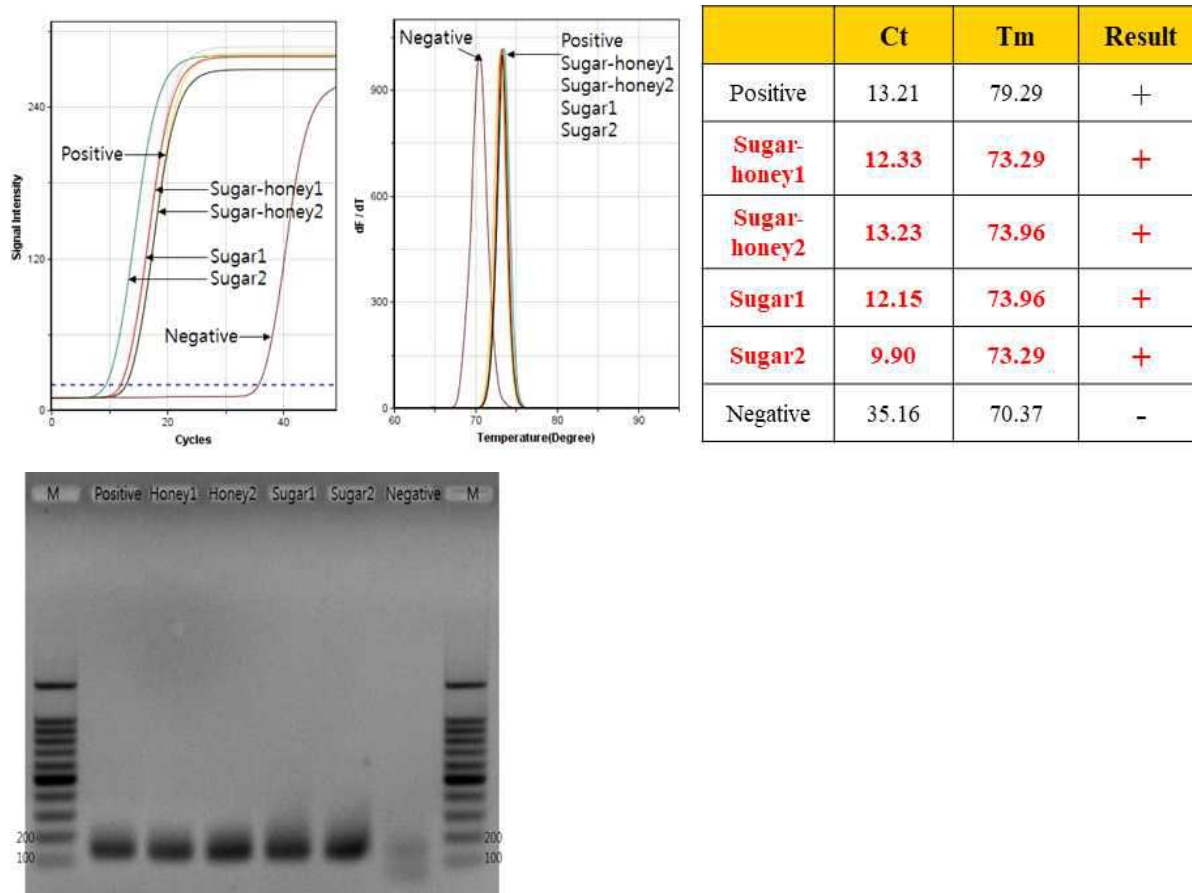


그림 203. 사양꿀과 사탕수수 설탕으로부터 사탕수수 고유 유전자의 검출을 위한 nested PCR

모든 시료에서 positive와 유사한 Tm값이 측정되어 사탕수수 특이 유전자의 증폭으로 판단되었다.

(3) 주밀원의 화분 유전자에 의한 토종꿀의 지역별 특성 규명

(가) 생산에 사용되는 주밀원 유전자에 대한 데이터베이스 구축

Genbank에 보고된 아까시나무(*Robinia pseudoacacia*), 벚나무(*Prunus serrulata*), 밤나무(*Castanea sp.*)의 고유 유전자 정보는 각 5,084개, 504개, 787개에 이르렀다(표 88). 이들 밀원수의 유전자 정보를 기반으로 표준 DNA를 제작하기 위한 molecular cloning을 진행하였으며, 기존에 보고된 유전자 정보와 차이를 보이는 밀원수 특이 유전자 정보를 확보하였고 이들의 서열정보는 Genbank에 등록하였다(그림 204~207).

표 88. GenBank에 보고된 3종 밀원수의 nuclotide 정보의 수

아까시나무 <i>Robinia pseudoacacia</i> 5,084개	벚나무 <i>Prunus serrulata</i> 504개	밤나무 <i>Castanea sp.</i> 787개
Genomes	Genomes	Genomes
Assembly 0	Assembly 0	Assembly 0
BioCollections 0	BioCollections 0	BioCollections 0
BioProject 13	BioProject 0	BioProject 0
BioSample 106	BioSample 261	BioSample 1
Genome 0	Genome 0	Genome 0
Nucleotide 5,084	Nucleotide 504	Nucleotide 787
Probe 23	Probe 0	Probe 0
SRA 83	SRA 263	SRA 1
Taxonomy 1	Taxonomy 1	Taxonomy 1

Robinia pseudoacacia chloroplast, complete genome
Sequence ID: NC_020554.1 Length: 154535 Number of Matches: 1
▶ See 1,000 hits

Range: 1: 2940 to 3648 GenBank: GenBank

Score	Expect	Identifiers	Gap	Strand
1.290 bits(698)	0.0	702/704(99%)	6/704(0%)	Plus/Minus
Query 1	AAATAGATCCGCTTTTGGGAAATATAGCTTATCGAATAAATCTAGCTTACTAAATGTTA	60		
Subject 3658	AAATAGATCCGCTTTTGGGAAATATAGCTTATCGAATAAATCTAGCTTACTAAATGTTA	3600		
Query 61	AAACGCTTAACTACGCGAATTTATGAGGATCATTTGATGATCTCTGCTAAATGCTTC	120		
Subject 3658	AAACGCTTAACTACGCGAATTTATGAGGATCATTTGATGATCTCTGCTAAATGCTTC	3549		
Query 121	AAAAAAAAAATGCACTTGGGTATATAATAGAGATATTTATATTTATCTCAATTAATTC	180		
Subject 3649	AAAAAAAAAATGCACTTGGGTATATAATAGAGATATTTATATTTATCTCAATTAATTC	3499		
Query 181	GAAGCTTTTGGCTGCTTTGAGAAATTCGATTTTCCGTAAGATTAAGCTCTTCTTAGAG	240		
Subject 3488	GAAGCTTTTGGCTGCTTTGAGAAATTCGATTTTCCGTAAGATTAAGCTCTTCTTAGAG	3429		
Query 241	GAAGCGAAATCTCAAAATCTTATATATAATTTGCATGATGATTCGATTTTCCGCTTT	300		
Subject 3429	GAAGCGAAATCTCAAAATCTTATATATAATTTGCATGATGATTCGATTTTCCGCTTT	3368		
Query 301	TTTGGAGATAAATTTACATATTAAATTAATTTGATATATAGGATACCGCTATCCATC	360		
Subject 3358	TTTGGAGATAAATTTACATATTAAATTAATTTGATATATAGGATACCGCTATCCATC	3309		
Query 361	GATCTGGAAATCTTAAATCGAAATCTTCAATCTGGTGAAGAAATTCGCTTCTTCAAT	420		
Subject 3308	GATCTGGAAATCTTAAATCGAAATCTTCAATCTGGTGAAGAAATTCGCTTCTTCAAT	3249		
Query 421	TTATGAGATGGTCTCTTATGATTAATGAAATTCGATAGCTTATTAATCTCTTCAAT	480		
Subject 3249	TTATGAGATGGTCTCTTATGATTAATGAAATTCGATAGCTTATTAATCTCTTCAAT	3189		
Query 481	GGATTTTCACTTTTGGAAAGATTCGAAATTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	540		
Subject 3189	GGATTTTCACTTTTGGAAAGATTCGAAATTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	3129		
Query 541	GTATGAGATATGATCTATCTCTATTTCTAGCTTACGAAATTCGCTTCAATTAAGATTA	600		
Subject 3129	GTATGAGATATGATCTATCTCTATTTCTAGCTTACGAAATTCGCTTCAATTAAGATTA	3069		
Query 601	AAATCTTTTAACTTTTGGGAAATCTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	660		
Subject 3069	AAATCTTTTAACTTTTGGGAAATCTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	3009		
Query 661	GAAGCTTCTTAAAGATTTTCTTCTAGCTTAAATCTTCAAT	720		
Subject 3009	GAAGCTTCTTAAAGATTTTCTTCTAGCTTAAATCTTCAAT	2959		

그림 204. Molecular cloning을 통해 확보한 아까시나무 특이유전자와 GenBank 근사 유전자와 비교

Molecular cloning된 염기서열은 GenBank에 기 등록된 서열과 2개의 염기 차이를 보이고 있으며, 아까시나무의 특이 유전자로써 Genbank에 등록하였다.

Robinia pseudoacacia isolate 1057-JH from USA trnK gene, partial sequence, and maturase-like protein [matK] gene.
Sequence ID: EF142728.1 Length: 2593 Number of Matches: 1

Range: 1: 958 to 1555 GenBank: GenBank

Score	Expect	Identifiers	Gap	Strand
1.295 bits(655)	0.0	688/704(98%)	6/704(0%)	Plus/Minus
Query 1	AAATAGATCCGCTTTTGGGAAATATAGCTTATCGAATAAATCTAGCTTACTAAATGTTA	60		
Subject 856	AAATAGATCCGCTTTTGGGAAATATAGCTTATCGAATAAATCTAGCTTACTAAATGTTA	917		
Query 61	AAACGCTTAACTACGCGAATTTATGAGGATCATTTGATGATCTCTGCTAAATGCTTC	120		
Subject 818	AAACGCTTAACTACGCGAATTTATGAGGATCATTTGATGATCTCTGCTAAATGCTTC	877		
Query 121	AAAAAAAAAATGCACTTGGGTATATAATAGAGATATTTATATTTATCTCAATTAATTC	180		
Subject 818	AAAAAAAAAATGCACTTGGGTATATAATAGAGATATTTATATTTATCTCAATTAATTC	1000		
Query 181	GAAGCTTTTGGCTGCTTTGAGAAATTCGATTTTCCGTAAGATTAAGCTCTTCTTAGAG	240		
Subject 1002	GAAGCTTTTGGCTGCTTTGAGAAATTCGATTTTCCGTAAGATTAAGCTCTTCTTAGAG	1001		
Query 241	GAAGCGAAATCTCAAAATCTTATATATAATTTGCATGATGATTCGATTTTCCGCTTT	300		
Subject 1002	GAAGCGAAATCTCAAAATCTTATATATAATTTGCATGATGATTCGATTTTCCGCTTT	1151		
Query 301	TTTGGAGATAAATTTACATATTAAATTAATTTGATATATAGGATACCGCTATCCATC	360		
Subject 1152	TTTGGAGATAAATTTACATATTAAATTAATTTGATATATAGGATACCGCTATCCATC	1211		
Query 361	GATCTGGAAATCTTAAATCGAAATCTTCAATCTGGTGAAGAAATTCGCTTCTTCAAT	420		
Subject 1172	GATCTGGAAATCTTAAATCGAAATCTTCAATCTGGTGAAGAAATTCGCTTCTTCAAT	1271		
Query 421	TTATGAGATGGTCTCTTATGATTAATGAAATTCGATAGCTTATTAATCTCTTCAAT	480		
Subject 1272	TTATGAGATGGTCTCTTATGATTAATGAAATTCGATAGCTTATTAATCTCTTCAAT	1291		
Query 481	GGATTTTCACTTTTGGAAAGATTCGAAATTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	540		
Subject 1322	GGATTTTCACTTTTGGAAAGATTCGAAATTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	1381		
Query 541	GTATGAGATATGATCTATCTCTATTTCTAGCTTACGAAATTCGCTTCAATTAAGATTA	600		
Subject 1302	GTATGAGATATGATCTATCTCTATTTCTAGCTTACGAAATTCGCTTCAATTAAGATTA	1451		
Query 601	AAATCTTTTAACTTTTGGGAAATCTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	660		
Subject 1452	AAATCTTTTAACTTTTGGGAAATCTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT	1511		
Query 661	GAAGCTTCTTAAAGATTTTCTTCTAGCTTAAATCTTCAAT	720		
Subject 1512	GAAGCTTCTTAAAGATTTTCTTCTAGCTTAAATCTTCAAT	1551		

그림 205. Molecular cloning을 통해 확보한 아까시나무 특이유전자와 GenBank 근사 유전자와 비교

Molecular cloning된 염기서열은 GenBank에 기 등록된 서열과 다수의 염기 차이를 보이고 있으며, 아까시나무의 특이 유전자로써 Genbank에 등록하였다.

Castanopsis crenata QLE1 gene for legumins, partial cds
Sequence ID: AB021836.1 Length: 447 Number of Matches: 1

Range 1: 27 to 428 GenBank Unifast

Name	Expect	Identical	Gaps	Strand	Pos/End
(60) (84/100%)	2e-168	756/888(85%)	2/168(0%)	Plus/Minus	
Query 1		CGGATGGATGCGATTTACGCTGCAACCTGAAACGACATGGACACAGCGCTGATCTATG			58
Subject 77		CGGATGGATGCGATTTACGCTGCAACCTGAAACGACATGGACACAGCGATGGATCTATG			178
Query 60		TACTAAAGAGTGGTGGCCGAGGCTTCAAGTGGCTGGAGGACTTGGTCAAGCTGTGTGATG			159
Subject 134		TACTAAAGAGTGGTGGCCGAGGCTTCAAGTGGCTGGAGGACTTGGTCAAGCTGTGTGATG			148
Query 120		ATGAGCTACAGCAGCGGCGAAGATTTAAACCGTACCCAGAAATCTTCCCGCTGGTCAAGGAC			179
Subject 198		ATGAGCTACAGCAGCGGCGAAGATTTAAACCGTATCCAGAAATCTTCCCGCTGGTCAAGGAC			288
Query 180		CTAGCTACTAGTCAAGCGTGTGAGTTGGTGGCGCTTCAGAGCAAAATGACAAAGCCCGAGATT			239
Subject 264		CTAGCTACTAGTCAAGCGTGTGAGTTGGTGGCGCTTCAGAGCAAAATGACAAAGCCCGAGATT			315
Query 240		CTCCCTCCGCTGCAAAATCTCCGCTCCAGCGCATTTCCAGCGCTTTACTAGCGCT			288
Subject 314		CTCCCTCCGCTGCAAAATCTCCGCTCCAGCGCATTTCCAGCGCTTTACTAGCGCT			378
Query 300		CCCTCCACTAGCGCTGAAAGATGCTTCAGAACTGAATGTATTTGGAAACCGCAAGAA			359
Subject 378		CCCTCCACTAGCGCTGAAAGATGCTTCAGAACTGAATGTATTTGGAAACCGCAAGAA			435
Query 360	TCA	362			
Subject 404	TCA	408			

그림 206. Molecular cloning을 통해 확보한 밤나무 특이유전자와 GenBank근사 유전자와 비교

Castanopsis crenata QLE1 gene for legumins, partial cds
Sequence ID: AB021836.1 Length: 447 Number of Matches: 9

Range 1: 27 to 428 GenBank Unifast

Name	Expect	Identical	Gaps	Strand	Pos/End
(60) (84/100%)	4e-170	352/468(75%)	2/168(0%)	Plus/Minus	
Query 1		TGAACTCTTCTCTCTTCCGAACTTCAAGTTCCTGATGTTGCAACATCTTCTGCTGATCTTCA			40
Subject 438		TGAACTCTTCTCTCTTCCGAACTTCAAGTTCCTGATGTTGCAACATCTTCTGCTGATCTTCA			178
Query 61		AGGCGTGGTGTAGTGAAGTCCCGCTGGAAATGCGCCGAGGACAGAACTTTGCTTCCGAG			120
Subject 378		AGGCGTGGTGTAGTGAAGTCCCGCTGGAAATGCGCCGAGGACAGAACTTTGCTTCCGAG			318
Query 121		GAGAAATCTGGGAGATGTCATTTCTTCTTAAAGCTCAGCCCATTTGAAAGCGTCACTACTAC			140
Subject 314		GAGAAATCTGGGAGATGTCATTTCTTCTTAAAGCTCAGCCCATTTGAAAGCGTCACTACTAC			258
Query 181		TAGTCCGCTTCCAGCAGCGCAAGCTTTTGTGGTACCGTTTCTTTTAAAGCTTCACTTCACT			240
Subject 258		TAGTCCGCTTCCAGCAGCGCAAGCTTTTGTGGTACCGTTTCTTTTAAAGCTTCACTTCACT			138
Query 241		CACTCATGAAACAGACAGCTTCAAGCAAAATGCGCTCAACCACTTGAAGCTGGGCAAGAACCTTTA			300
Subject 198		CACTCATGAAACAGACAGCTTCAAGCAAAATGCGCTCAACCACTTGAAGCTGGGCAAGAACCTTTA			138
Query 301		CTACATGAAATGCACTTGTGTGATCTTCTTCCAGCTTCTGCTTCAAGCTTCACTTCACTTCA			358
Subject 238		CTACATGAAATGCACTTGTGTGATCTTCTTCCAGCTTCTGCTTCAAGCTTCACTTCACTTCA			30
Query 360	AGG	362			
Subject 78	AGG	78			

그림 207. Molecular cloning을 통해 확보한 밤나무 특이유전자와 GenBank근사 유전자와 비교

토종꿀은 소방에 저장된 화분도 상당한 양이 토종꿀에 합입될 수 있기에, 토종꿀에 잔류된 화분의 분석은 토종꿀의 품질검사에 척도로 사용될 수 있다. 벌꿀에 함유된 화분은 현미경으로 그 존재를 확인할 수는 있으나, 화분형태학적으로 각 식물의 화분들을 정량적으로 측정하기는 어려우며, 이는 단위벌꿀에 함유되어 있는 화분을 분자적 방법에 의하여 정량하여야 할 것이다. 벌꿀에 함유된 화분을 순수분리하여, 분리한 화분유전자는, 벌꿀에 함유되어 있는 잔류유전자(residual DNA; 사양 꿀이 함유한 사탕무 또는 사탕수수의 식물체 유전자 등)와 달리, 형태를 지닌 화분을 먼저 분리한 후, DNA 순수분리법을 시행하여 얻어야 할 것이다.

그러나, 현실적으로 벌꿀에서 바로 DNA를 순수분리하는 것이 보다 용이하며, 이 경우, 잔류유전자(residual DNA; 사양꽃이 함유한 사탕무 또는 사탕수수의 식물체 유전자 등)와 함께 화분유래 유전자도 동시에 분리될 수 있기에, 이후 PCR에 의한 증폭을 시행하면, 본 과제에서 확립한 용이한 DNA추출법이 보다 쉽게 적용될 수 있을 것이다. 본 과제는 국내 월별 대표적인 밀원수로 월별(4, 5, 6, 7월)로 나누어 다음의 5개, 즉 벚나무(*Prunus sp.*), 아카시아(*Robinia pseudoacacia*), 밤나무(*Castanea sp.*), 오수유나무(*Tetradium sp.*), 음나무(*Kalopanax sp.*)를 최종 선정하여 개별 분석하였다.

(나) 주밀원 화분 유전자 증폭을 위한 specific primer의 선별

선정된 밀원수의 각 chloroplast DNA (cp DNA)는 NCBI에서 검색하였으며, 각 accession No.: KU985054 (*Prunus sp.*), KJ468102 (*Robinia pseudoacacia*), MH998384 (*Castanea sp.*), MG975304 (*Tetradium sp.*), AY393733 (*Kalopanax sp.*)의 염기서열을 분석하여, PCR정량에 사용할 수 있는 각 밀원식물 고유의 염기서열 부위를 찾아내었다. 연구결과 정량성과 민감성에 우수함을 보인 아카시 나무 특이 유전자 SAMDC특이 프라이머, 밤나무 특이 유전자 legumin 특이 프라이머, 벚나무 특이유전자 ITS1-5.8 rRNA특이 프라이머와 더불어 추가적으로 아카시 나무 특이 유전자 rpoC2특이 프라이머, 밤나무 특이 유전자 atp I 특이 프라이머, 벚나무 특이유전자 ndhF-rpl32 특이 프라이머를 추가적으로 선정하여 그 정량성과 민감성을 평가하였으며, 그 외 쉬나무와 음나무의 tmL-tmF 특이 프라이머를 선정하여 정량성 및 민감성을 평가하였다(표 89~90).

표 89. 아카시나무, 밤나무, 벚나무의 특이 증폭을 위한 Primer의 nuclotide 정보

Target nectar	Target gene	Primer name	Sequence (5'→3')	Tm (°C)	Amplicon size
아카시나무 <i>Robinia pseudoacacia</i>	Chloroplast	Aca-cp-F	AATAGATCCAATTTTGCGGAA	53.8	704bp
		Aca-cp-R	TTGAAGAATGTTAAGGTAGACAA	53.6	
	SAMDC in mRNA	Aca-PCR-F	CAGCAGAGGCAGAGTAGAC	59.0	593bp
		Aca-PCR-R	ATTGAAGTTGGCGGAGGG	57.0	
밤나무 <i>Castanea sp.</i>	Chloroplast	CC-cp-F	GATTTGTTTTGTTAATCTTACG	45.2	362bp
		CC-cp-R	CGCCTTTTATACGGCCTAAT	53.1	
	Legumin in genomic DNA	CC-leg-F	CGTGATGGATGCTATTTACG	51.6	313bp
		CC-leg-R	TGATCTCTTGCTGTTCCAAA	51.9	
벚나무 <i>Prunus serrulata</i>	Chloroplast	Pruchlo-F	GGTGTACTCTTTCTTCGAGT	52.0	205bp
		Pruchlo-R	GAAGTTGATAAAATACAATAC	41.0	
	ITS1-5.8S rRNA	Prugenom-F	CCGTGCGTACAAACGAACA	57.1	225bp
		Prugenom-R	TTCAAAGACTCGATGGTTCAC	53.1	

국내계절별 주밀원 식물을 확대 선정하기 위하여, 국내 대표적인 밀원수를 계절별(4, 5, 6, 7월)로 나누어 5개 계절별 밀원수로 선정하였다. 이는 벚나무(*Prunus sp.*), 아카시아(*Robinia pseudoacacia*), 밤나무(*Castanea sp.*), 오수유나무(*Tetradium sp.*), 음나무(*Kalopanax sp.*)들이었다.

표 90. 계절별 밀원수의 검출과 정량을 위한 정량 PCR법

No.	Name	Sequence (5'-3')	Annealing temp.	Target plant	Amplicon size	Reference
1	Pruchio-F	GGTGTA CTCTTCTTCGAGT	53°C	<i>Prunus</i> sp.	205 bp	This study
	Pruchio-R	GAAGTTGATAAAATACAATAC				
2	Acasia-F	GTGGTGAACAAAATATCTAGA	58°C	<i>Robinia pseudoacacia</i>	299 bp	This study
	Acasia-R	AACGATTGTGTTACCGAGCTT				
3	Castanea-F	CCATGGACCGTATTCTTCG	61°C	<i>Castanea</i> sp.	286 bp	This study
	Castanea-R	AGAGGGCAATATGAAATTATG				
4	Tetradium-F	CGAGAATAAAGATAGAGTCCT	56°C	<i>Tetradium</i> sp.	430 bp	This study
	Tetradium-R	TTAAAGGCTCTGGGAGGGA				
5	Kalopanax-F	ACGAAAGAAATCGAATATCGA	57°C	<i>Kalopanax</i> sp.	435 bp	This study
	Kalopanax-R	GCGAGTTTCAGTATGAATAATT				
6	Pruchio-F	GGTGTA CTCTTCTTCGAGT	53°C	<i>Prunus</i> sp.	176 bp	This study
	Pruchio-R1	AAGAAAAGATTGTGCGTTTA				
7	Acasia-F1	AGTAATCTTGTCATCTTCT	50°C	<i>Robinia pseudoacacia</i>	187 bp	This study
	Acasia-R1	AAGTTTCATATCCGAAGCA				
8	Castanea-F1	AATCTGAGTTTTGCTCACA	51°C	<i>Castanea</i> sp.	235 bp	This study
	Castanea-R1	CACACTAAAAGGCTTATCT				
9	Kalopanax-F1	TTTGAAGAAGCTGATTAAGT	49°C	<i>Kalopanax</i> sp.	200 bp	This study
	Kalopanax-R1	CGAAATTTTAACTGCTACT				

- * 밀원수는 뽕나무(*Prunus* sp.), 아카시아(*Robinia pseudoacacia*), 밤나무(*Castanea* sp.), 오수유나무(*Tetradium* sp.), 음나무(*Kalopanax* sp.)임
- * NCBI accession No.: KU985054 (*Prunus* sp.), KJ468102 (*Robinia pseudoacacia*), MH998384 (*Castanea* sp.), MG975304 (*Tetradium* sp.), AY393733 (*Kalopanax* sp.)의 염기서열에서 선발

(다) 제작된 주밀원 화분유전자 증폭용 primer들의 detection PCR

아까시 나무 특이 유전자 SAMDC 특이 프라이머, 밤나무 특이 유전자 legumin 특이 프라이머, 뽕나무 특이유전자 ITS1-5.8 rRNA 특이 프라이머와 더불어 추가적으로 아까시 나무 특이 유전자 rpoC2 특이 프라이머, 밤나무 특이 유전자 atp I 특이 프라이머, 뽕나무 특이유전자 ndhF-rpl32 특이 프라이머 등을 정량성과 민감성을 기준으로 평가하였으며, 그 외 쉬나무와 음나무의 tmL-tmF 특이 프라이머를 선정하여 정량성 및 민감성을 평가하였다(그림 208~210).

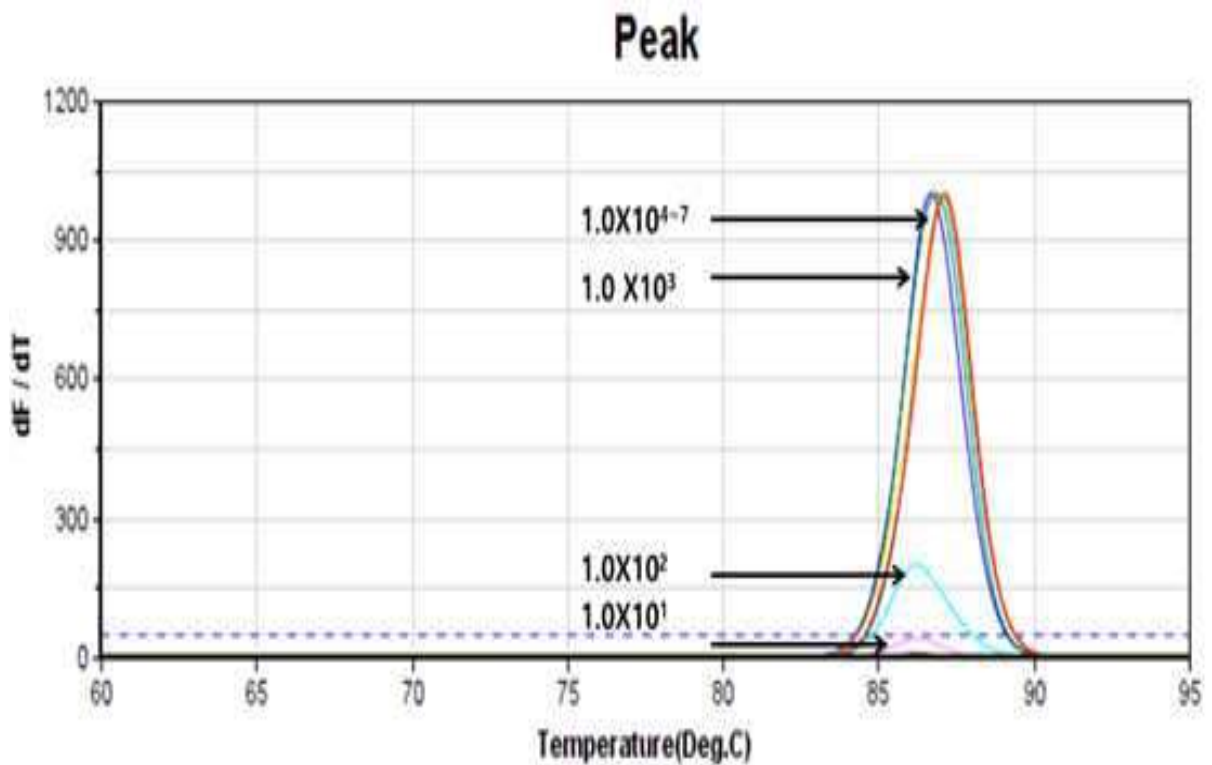
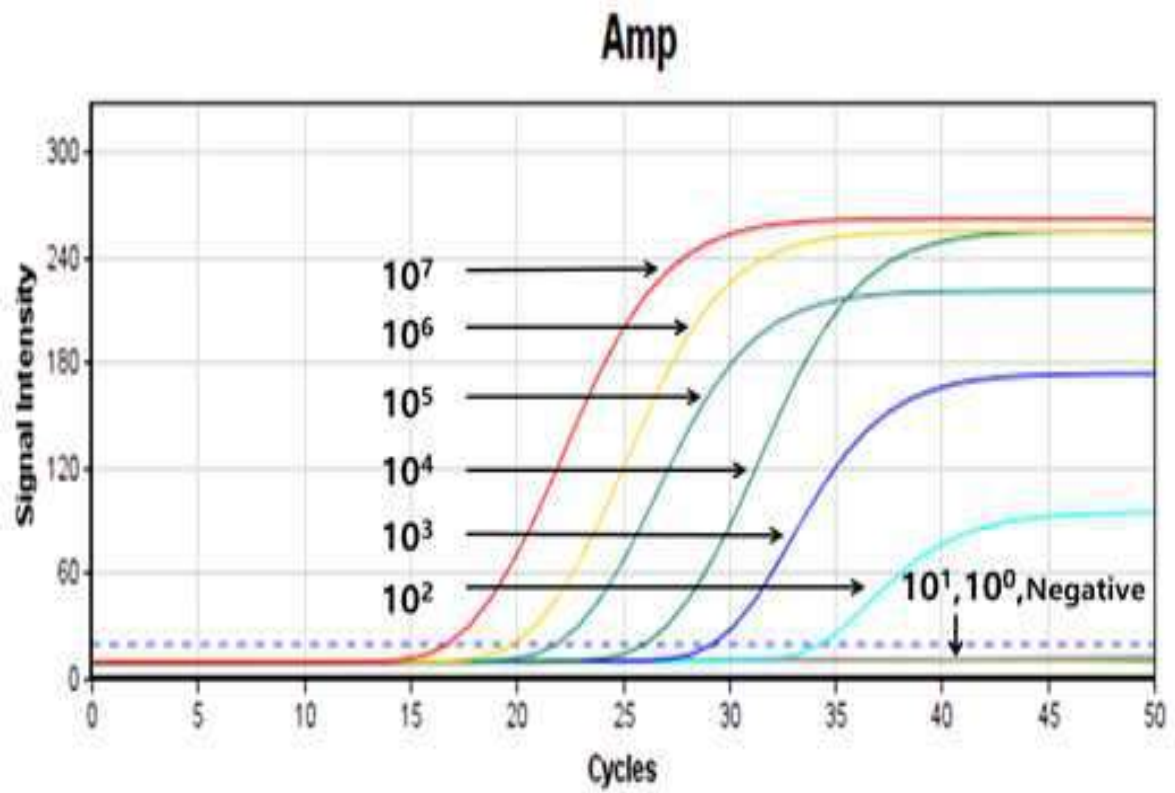


그림 208. 최적 조건 하에서 아카시 나무 특이 프라이머(Aca-PCR-F/R)의 민감도

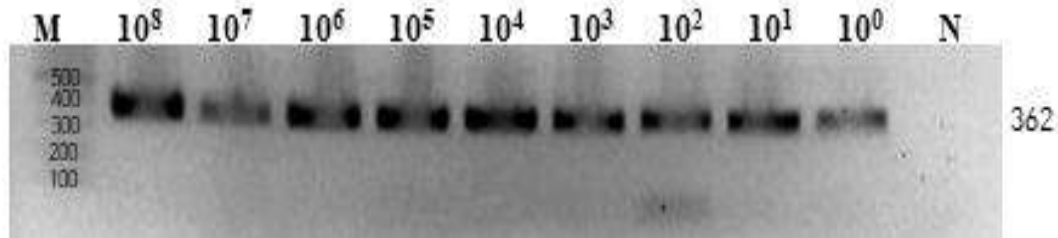
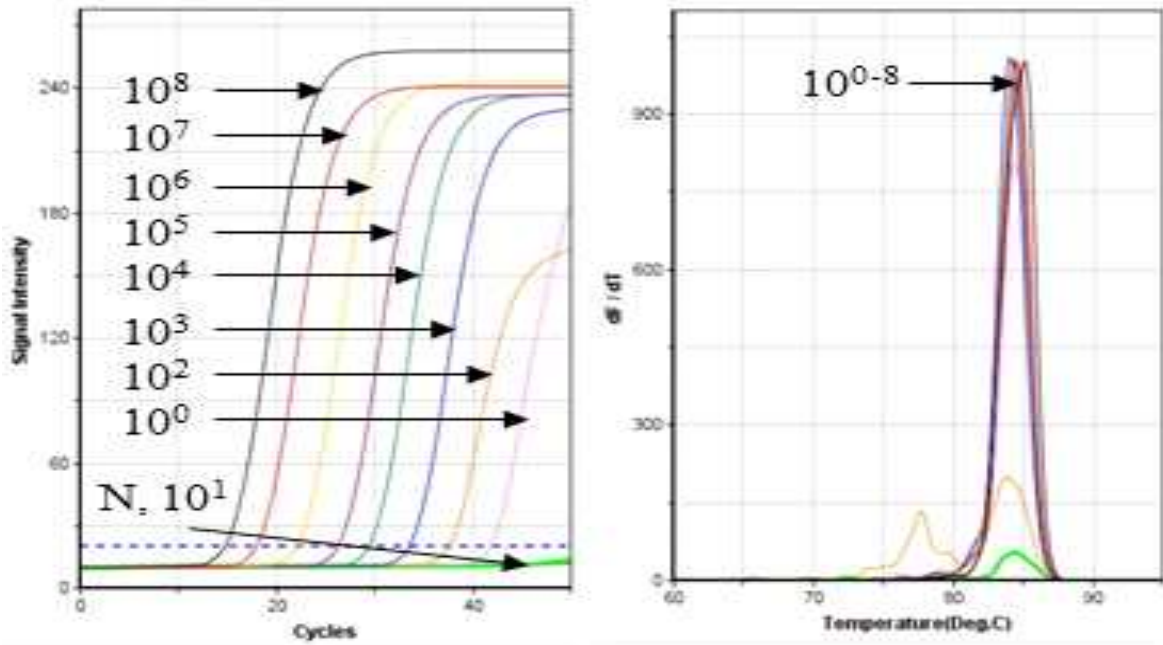


그림 209. 최적 조건 하에서 밤나무 특이 프라이머(CC-leg-F/R)의 민감도 및 정량성

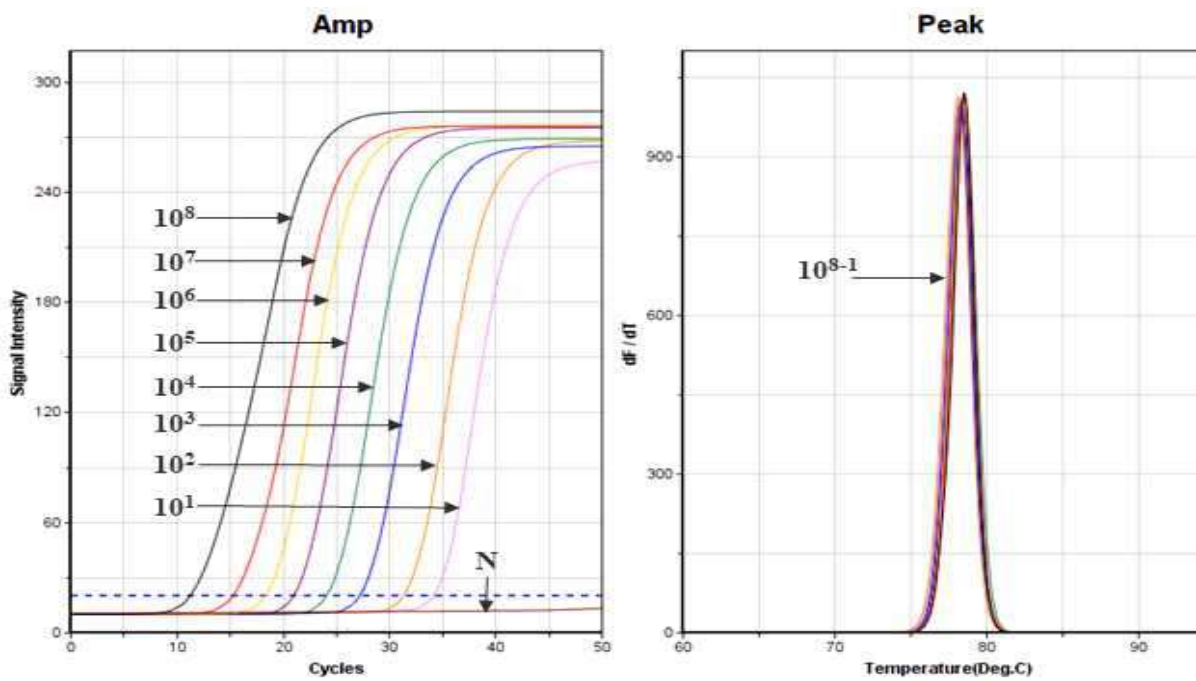


그림 210. 최적 조건 하에서 뱃나무 특이 프라이머(Prugeno-F/R)의 민감도

(4) 토종꿀 주밀원 유전자에 대한 정량법 구축

토종꿀에서 주밀원 화분 유전자에 대한 정량법을 구축하여, 지역별 토종꿀간의 함량 차이를 정량적으로 측정할 수 있는 방법을 제시해 보고자 하였다(그림 211~213).

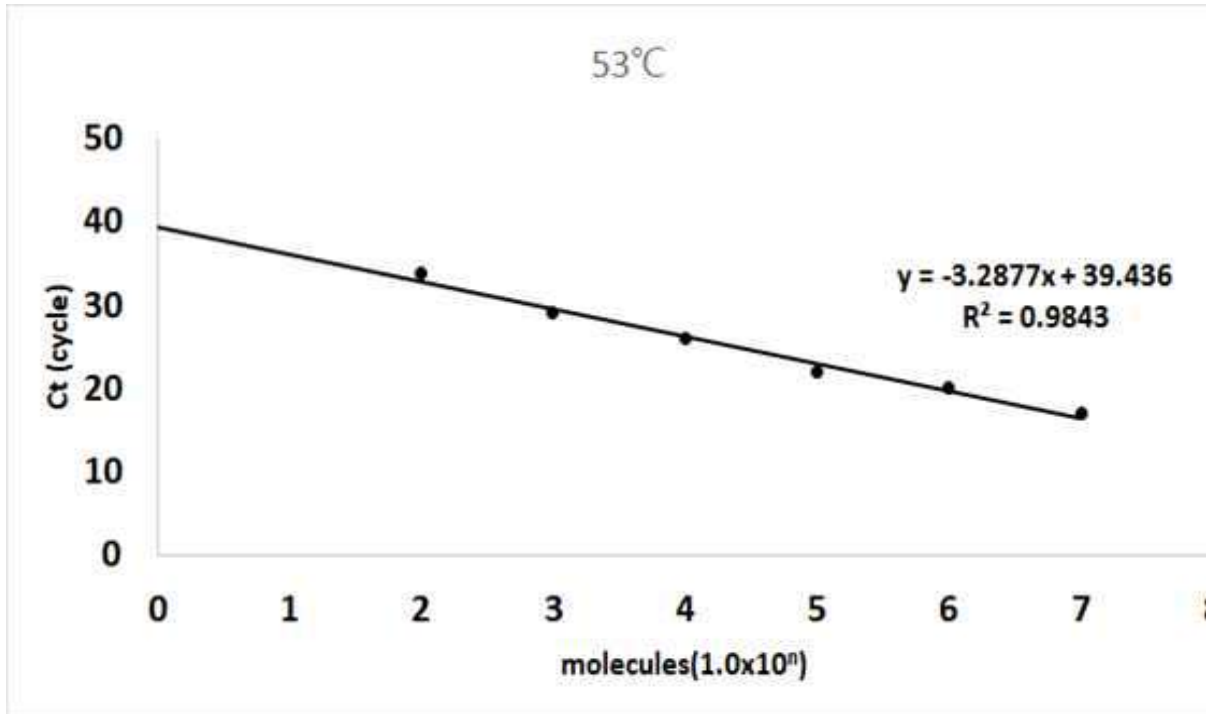


그림 211. 최적 조건 하에서 아까시나무 특이 프라이머(Aca-PCR-F/R)의 정량성

혼성온도 53°C에서 진행한 초고속 PCR에서 102 분자까지 증폭되는 것을 확인할 수 있어 높은 정량성을 가지는 것으로 판단되었다.

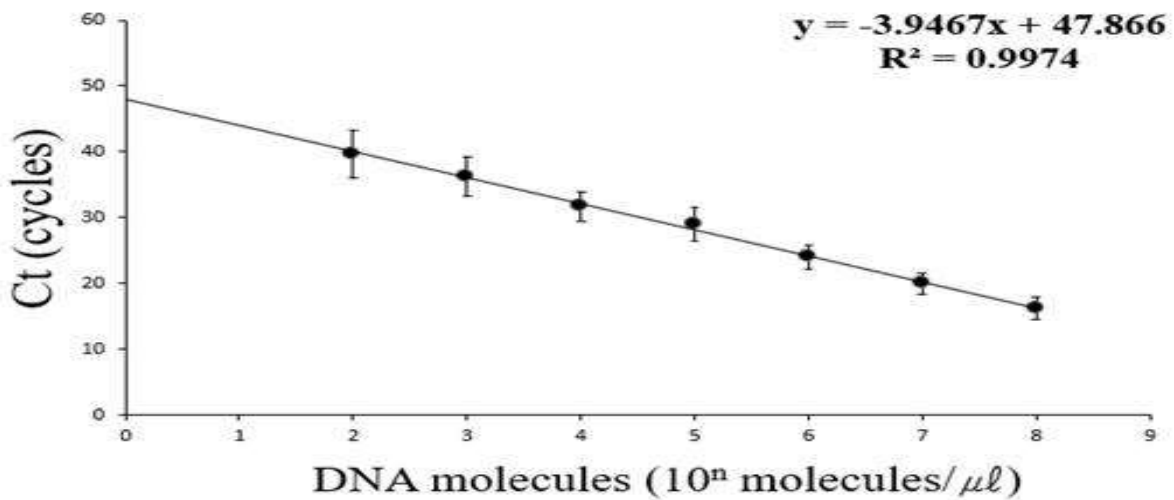


그림 212. 최적 조건 하에서 밤나무 특이 프라이머(CC-leg-F/R)의 정량성

혼성온도 60°C에서 진행한 초고속 PCR에서 100 분자까지 증폭되는 것을 확인할 수 있으며, 102 분자까지 정량적으로 증폭할 수 있어 높은 정량성을 보인다고 판단되었다.

혼성온도 56°C에서 진행한 초고속 PCR에서 101 분자까지 정량적으로 증폭되는 것을 확인할 수 있어 높은 정량성을 보인다고 판단되었다.

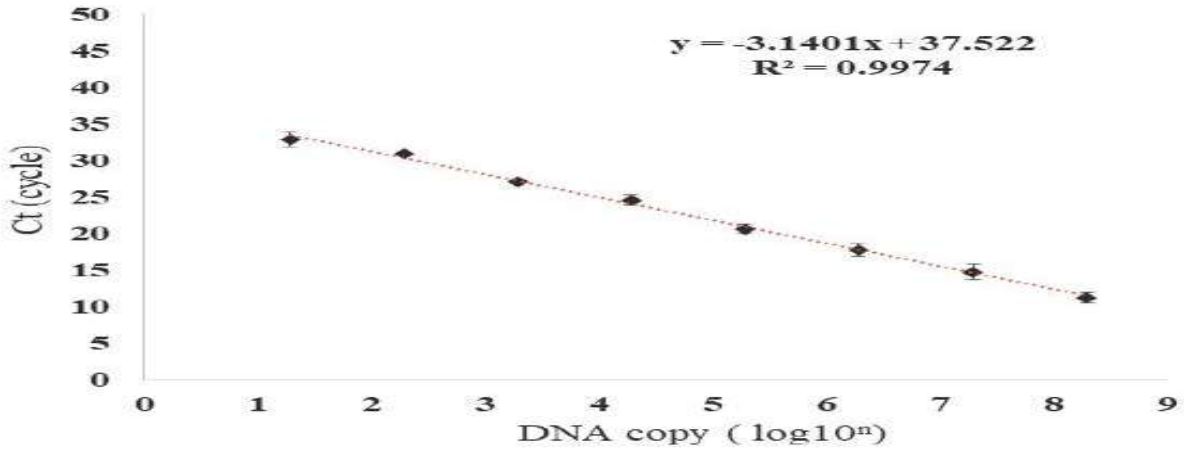


그림 213. 최적 조건 하에서 벚나무 특이 프라이머(Prugeno-F/R)의 정량성

(5) 토종꿀 주밀원 유전자에 대한 정량법 구축

(가) 사탕무 및 사탕수수 유전자에 대한 정량법 구축

사탕무 및 사탕수수 고유 유전자를 선별하고, 이를 클론화하여 확보하고, 이에 대하여 가장 민감한 프라이머쌍들을 선별하여, 각 고유 유전자에 대한 정량법을 구축하였다(그림 214, 표 91~98).

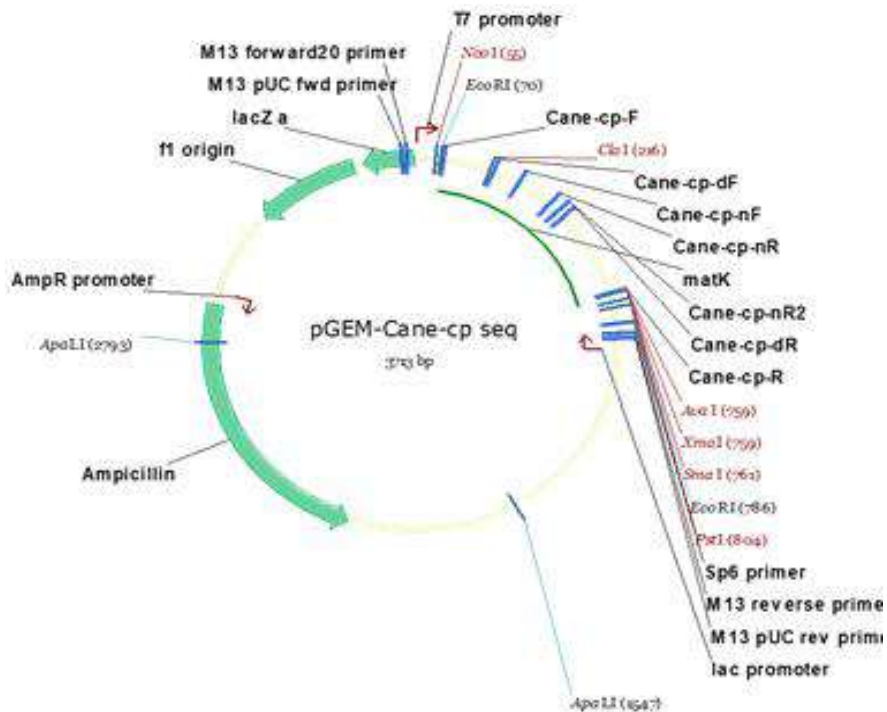


그림 214. 표준물질로써 사탕수수 고유 유전자의 재조합 DNA 클론, pGEM-Cane-cp-seq 및 각 primer들의 위치

표 91. 표준물질 pCaneCp에 대한 표준 PCR 용 primer

Primer name	Sequence (5'→3')	Amplicon size	Accession No.
Cane-cp-F	GGATTAAATGGTTCCGAACCTG	271bp	LN849913 (141,151bp)
Cane-cp-R	TTCCGAAAAAACCCCGGGTA		

표 92. 표준물질 pCaneCp에 대한 Detection PCR 및 Nested PCR의 primer들

Primer name	Sequence (5'→3')	Amplicon size	Accession No.
Cane-cp-F	GGATTAAATGGTTCCGAACCTG	271bp	LN849913 (141,151bp)
Cane-cp-R	TTCCGAAAAAACCCCGGGTA		
Cane-cp-nF	CTAGGGCAACTATCTTGTC	137bp	
Cane-cp-nR	GGATAGGGTATTTCTATATGIGATAG		

표 93. 사탕무우(Beet) 표준물질에 대한 Detection PCR 및 Nested PCR의 primer들(1)

Primer name	Sequence (5'→3')	Amplicon size	Accession No.
Beet-mt-F	CTCGTTTATCTCTTTCTACCGG	250bp	BA000024
Beet-mt-R	GAAATCTCCTTCAGGTTTCAGTCG		
Beet-mt-nF	GAATTGCTGCTTGAAAGTTTTTC	196bp	
Beet-mt-nR	CAATTCTCCTATTCTCCTGC		

표 94. 사탕무우(Beet) 표준물질, pTop beet RdRP315에 대한 Detection PCR 및 Nested PCR의 primer들(2)

Primer name	Sequence (5'→3')	Amplicon size	Accession No.
Beet-g-F	ATG TGT AGT GCC CAI AIT TG	315bp	EF101866
Beet-g-R	GCA TTA TGA GGA GTG TIT AGT AC		
Beet-g-nF	AGC GCT TCT TCA TTC CAA GA	160bp	
Beet-g-nR	CCT TGG TAG GGA ATG GAA GG		

표 95. 사탕수수 표준물질 pCaneCp에 대한 Detection PCR 및 Nested PCR의 반응 조건

PCR condition for detection & nested PCR			
Pre-denaturation	95°C	30sec	
Denaturation	95°C	3sec	50 cycle
Annealing	55°C	3sec	
Polymerization	72°C	3sec	

* Beet-mt primer를 사용하는 사탕무우(Beet) 표준물질에 대한 Detection PCR 및 Nested PCR의 조건도 위 표와 동일함.

표 96. 사탕무우 표준물질, pTop beet RdRP315에 대한 Detection-, Nested PCR의 반응조건(1)

Condition for detection & nested PCR			
Pre-denaturation	95°C	30sec	
Denaturation	95°C	3sec	
Annealing	53°C	3sec	50 cycle
Polymerization	72°C	3sec	

표 97. 사탕무우 표준물질, pTop beet RdRP315에 대한 Detection PCR의 반응조건(2)

PCR condition for detection PCR(1 st PCR)			
Pre-denaturation	95°C	30sec	
Denaturation	95°C	3sec	
Annealing	59°C	3sec	50 cycle
Polymerization	72°C	3sec	

표 98. 사탕무우(Beet) 표준물질, pTop beet RdRP315에 대한 Nested PCR의 반응조건(2)

PCR condition for nested PCR(2 nd PCR)			
Pre-denaturation	95°C	30sec	
Denaturation	95°C	3sec	
Annealing	57°C	3sec	50 cycle
Polymerization	72°C	3sec	

(나) 사탕무 및 사탕수수 유전자에 대한 정량 PCR

클론화된 사탕무 및 사탕수수 고유 유전자를 표준물질(표준 DNA)로 확보하고, 이에 대하여 가장 민감한 프라이머쌍들을 선발하여, 각 고유 유전자에 대한 정량법을 시행하여, 그 민감성, 정확성 등을 평가하였다.

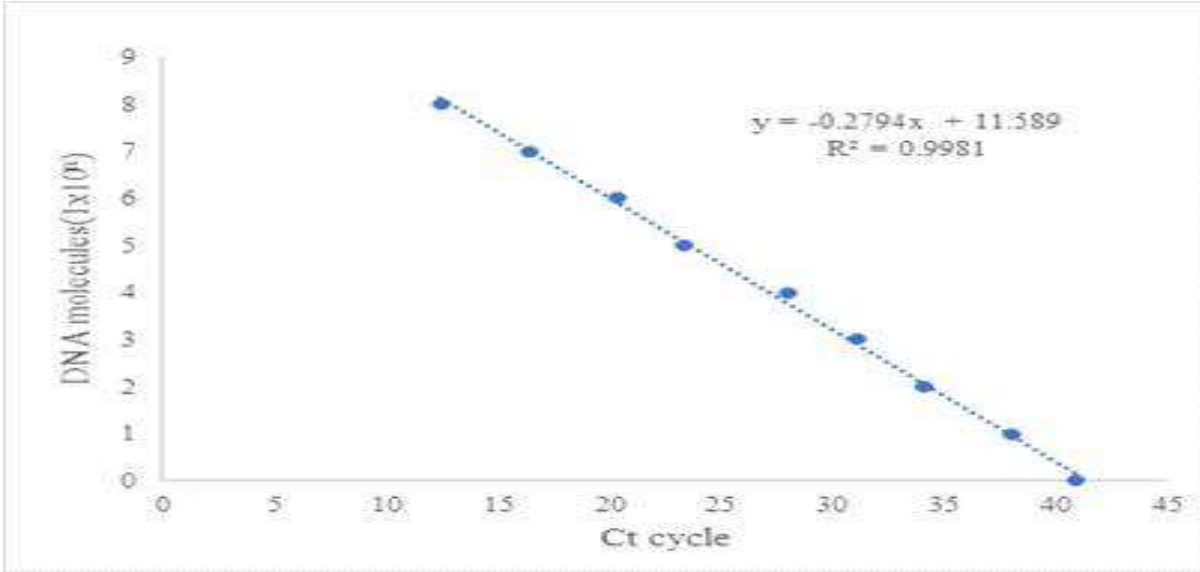
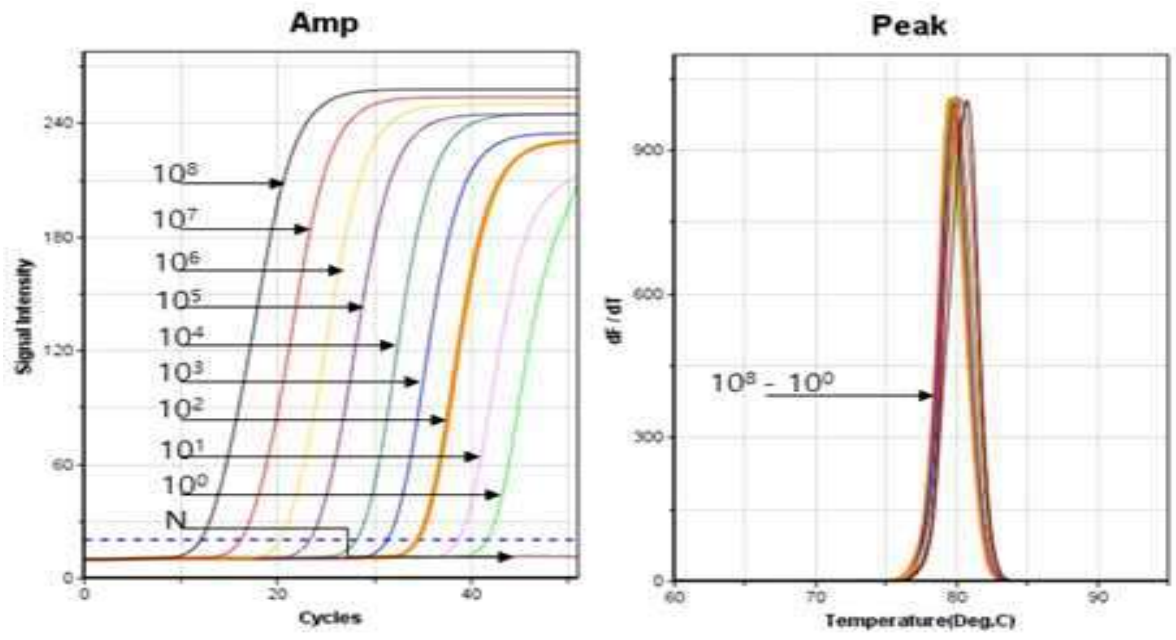


그림 215. 표준물질 pTop-beet-RdRP315와 Beet-g primer에 의한 Beet-specific Detection and Nested PCR의 민감도 및 정량성

(2) 국산 토종꿀의 품질평가법 개발

(가) 국산 토종꿀 일반 성분 분석 및 지표 후보 물질의 분리

① 한봉협회를 통한 국내 토종꿀의 수집

본 과제의 1차년, 2차년 및 3차년 과제의 기간에 접수된 모든 시료를 2021년 7월 1일 현재로 정리하였다. 토종벌 시료는 2018년 11월-12월에 20개 시료가 경기대에 접수되었으며(시료번호 2018-001에서 2018-020까지), 이를 1차년 시료로 통칭하였다. 이후, 2019년 12월에 18개 시료가 경기대에 접수되었으며(시료번호 2019-001부터 2019-018까지), 이 18개 시료는 2차년 시료로 통칭하였다. 따라서, 1, 2차년까지 접수된 시료의 총 수는 38개 이었다. 또한, 2020년 8월부터 현 시점까지 10개의 시료가 추가로 접수되었으나, 본 과제의 2차년 종료시점이 2020년 8월 19일이기에, 이들 10개의 시료(시료번호 2020-001에서 2020-010까지)에 대하여 3차년 연구를 수행할 것이며, 이들 시료들은 우선 3차년 시료로 통칭하였다. 현시점은 본 과제의 종료시점이기에, 이들 시료의 제공자를 밝히는 것은, 개인정보의 무단 공개의 문제 뿐 아니라, 본 과제의 연구결과에 따른, 제공된 꿀의 품질적 우열에 관한 논란이 파생될 것으로 예상되기에, 인적사항은 가급적 익명으로 하고, 연락처, 양봉장 상호 모두를 비공개로 하며, 지역도 군단위가 아닌 도단위만을 기재하였다(결과에 제시함).

② 한봉협회를 통하여 수집된 토종꿀에 대한 벌꿀 일반 성분 분석

한봉협회에서 제공한 토종꿀 시료 38종에 대한 일반검사를 전문기관에 요청하여 수행하였으며, 그 결과를 이에 제시하며, 이 일반검사 결과와 비교하기 위하여 본 과제에서 개발된 유전자 검사의 결과는 연구수행 결과에 제시하였다(결과에 제시함).

③ 한봉협회 제공 토종꿀 시료에 대한 지표 후보 물질의 분리 (HPLC)

벌꿀의 지표후보물질의 발굴은 서양종 꿀벌에 의한 아카시아벌꿀에서 발굴된 아브시스산, 크리신, 피노셈브린 등을 좋은 예라 할 것이다(그림 216).

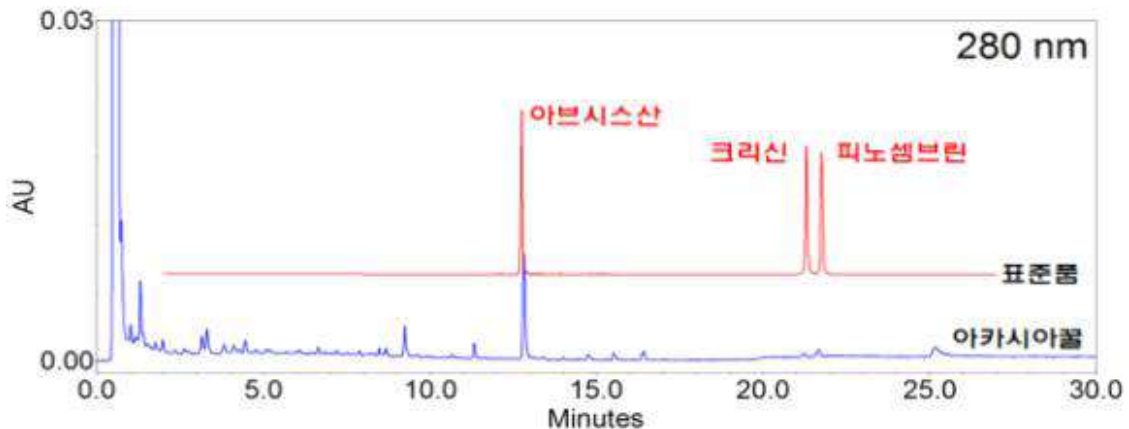


그림 216. HPLC에 의한 아카시아꿀의 분석에서 아브시스산, 크리신, 피노셈브린의 발견(참고로 인용하였음)

HPLC의 분석조건은, Waters I class, HPLC 기기를 사용하였으며, 컬럼은 Halo C18 (2.1*100 mm, 2.0 um)이고, 컬럼온도는 30°C, 흐름속도는 0.4 ml/min, 주입량은 2 µl씩이며, 각 검출파장은 280 nm, 이동상은 (A) Acetonitrile, (B) 0.1%H3PO4를 순서대로 5%, 2 min 및 5-50%, 2-30 min의 조건으로 진행하였다. 위의 적색 피크들은 아브시스산, 크리신, 피노셈브린의 표준물질을 상기 전개 조건과 같이 전개시킨 것으로, 아카시아꿀(청색)의 시료는 각 표준물질에 대하여 아브시스산의 경우 비교적 높은 함유량을, 크리신과 피노셈브린의 경우 낮은 함유량이 존재함을 보여주는 피크를 나타내고 있다(Kim 등, 2019, unpublished에서 단지 설명 및 참고를 위하여 인용함).

본 과제는 토종별꿀의 HPLC분석법을 서양별꿀에 적용하였던 양식과 같은 조건으로 HPLC분석을 진행하였으며, 48개 시료에 대한 HPLC의 분석조건은 다음과 같았다.

HPLC의 분석조건

- 기기: Waters I class (Waters Corporation)
- Column: Halo C18 (2.1*100 mm, 2.0 um)
- Column temp. : 30°C
- Flow speed: 0.4 ml/min
- Injection dose : 2 µl
- wavelength: 254 nm

이동상은 (A) Acetonitrile, (B) 0.1%H₃PO₄를 순서대로 5%, 2 min 및 5-50%, 2-30 min의 조건으로 진행하였다(결과에 제시함).이 실험을 수행하면서, 토종꿀의 지표 후보물질의 발굴이라는 과제에 대한 기본적인 의문이 계속 연구자의 연구의지를 흔든 바 있다. 즉,

- 1) 지표 후보물질이 국내 전역에서 생산되는 토종꿀 중 과연 다수의 토종꿀(상품)에 공통으로 함유되어 있을지 여부: 보편성의 문제.
- 2) 과연 이 후보물질의 함량에 의하여 토종꿀의 품질을 평가할 수 있을지 여부: 꿀품질 평가의 기준으로 객관성과 신뢰성의 문제.
- 3) 꿀에 포함된 극미량의 지표 후보물질이 해당 꿀을 그대로 섭취했을 경우, 과연 해당 생리작용을 나타낼 수 있는지 여부: 극미량 지표 후보물질과 생리 활성의 관련.
- 4) 토종꿀의 다양성을 훼손하고, 획일성을 추구하는 것이 과연 옳은 것인가 여부: 국내 토종꿀을 단일 물질에 의해 평가하여 단일 상품으로 평가하는데 대한 의문 등이 바로 그 근본적 의문이었다.

(나) 국산 토종꿀의 품질평가 분석법의 최적화

국산 토종꿀의 품질평가를 위한 최적의 분석법을 찾기 위하여, 서양종 벌꿀에 대하여 적용되고 있는 일반 벌꿀검사(수분함량, F/G ration, HMF, 탄소동위원소비 등)의 방법을 사용하였으며, 토종꿀에 존재하는 것으로 기대되는 고유의 물질을 찾으려는 시도도 수행하였다(HPLC 등).

또한 토종꿀에 함유되어 있는 화분 유전자의 분석을 통한 토종꿀의 품질 평가방법을 추구하고 있으며, 사양꿀이 아닌 토종꿀을 추구하고 위하여 사탕수수 특이 detection PCR 및 Nested PCR 그리고 사탕무우 특이detection PCR 및 Nested PCR을 적용하였다.

(3) 국산 토종꿀의 등급 기준 설정

(가) 국산 서양종 벌꿀의 등급 기준 설정

토종꿀의 등급기준 설정은 합리적 척도에 의한 품질검사를 통해 판정되어야 하며, 생산자의 다수가 인정하고, 시장에서 소비자의 선택을 받아야 확립될 수 있을 것이다.

기본 성분 분석에 의한 토종꿀의 등급기준 목표는:

- 1) 합리적 척도: 수분함량, Glucose 함량(%), F/G%, 향미, 색도, 탄소동위원소비 등,
- 2) 적용될 신뢰성있는 품질검사법: HPLC에 의한 함량의 정량, 탄소동위원소비 측정법,
- 3) 생산자의 합의: 토종꿀 생산자의 다수가 우수한 꿀이라 인정하는 척도,
- 4) 소비자의 선택: 우수한 등급은 고가이어도 높은 구매의욕이 있음 등이 그것이다.

현시점에서 토종꿀의 등급화를 추구하기 위하여, 국내 유수의 벌꿀인 아카시아꿀의 등급화 결과를 먼저 검토해 볼 필요가 있을 것이다(표 99).

표 99. 벌꿀 등급판정 기준조건(양봉농협)

등급판정 항목	1+ (Premium)	1 (Special)	2 (Standard)
수 분(%)	20% 이하	20%초과 ~ 25%이하 (단, 소분 판매시에는 20%이하로 적용)	25%초과
과당/포도당비	-아카시아, 밤꿀: 1.5 이상 - 잡화: 1.3 이상	-아카시아, 밤꿀: 1.5 이상 - 잡화: 1.1 ~ 1.3 미만	-아카시아, 밤꿀: 1.5 이상 - 잡화: 1.1 미만
HMF (mg/kg)	3 이하	3 초과 ~ 30 이하	30 초과
향 미	밀원의 일반적인 향미를 갖고 있으며 발효, 화학물질 등 다른 원인으로 인한 불쾌한 향이 없는 꿀	밀원의 일반적인 향미를 갖고 있으며 발효, 화학물질 등 다른 원인으로 인한 불쾌한 향이 거의 없는 꿀	1+, 1 등급에 해당되지 않은 꿀 (단, 밤꿀의 경우 색도의 범위에 포함되지 않을 경우 잡화로 밀원을 변경하여 신청할 수 있다.)
색 도	밀원 고유의 색을 가지고 있는 꿀 - 아카시아: No. 1 ~ No. 2 - 밤꿀: No. 9, No. 10 - 잡화: No. 1 ~ No. 10	밀원 색을 가지고 있으나 고유의 색보다 옅거나 짙은 꿀 - 아카시아: No. 3 ~ No. 4 - 밤꿀: No. 8 - 잡화: No. 1 ~ No.10	
결 함	품질에 영향을 줄 수 있는 결함이 전혀 없는 꿀		

(나) 국산 동양종 벌꿀(토종꿀)의 등급 기준 설정

본 과제는 토종꿀의 등급화를 추구하기 위하여, 아카시아꿀의 등급화 결과를 기준으로, 그 유용성과 장단점을 고려하여 그 도입을 검토하였다.

① 기본 성분 분석에 의한 토종꿀의 등급 기준의 설정 등급기준의 설정은

- 1) 합리적 척도: 수분함량, Glucose 함량(%), F/G%, 향미, 색도, 탄소동위원소비 등,
- 2) 적용될 신뢰성있는 품질검사법: HPLC에 의한 함량의 정량, 탄소동위원소비 측정법,
- 3) 생산자의 합의: 토종꿀 생산자의 다수가 우수한 꿀이라 인정하는 척도,
- 4) 소비자의 선택: 우수한 등급은 고가이어도 높은 구매의욕이 있음 등이었으며, 이를 접수된 토종꿀 시료 48개의 분석결과와 함께, 각 항목별로 나누어 분석하면;

수분함량: 벌꿀 기본분석의 결과(표 42; 표 43), 접수된 48개 토종꿀 시료에 대한 수분함량 측정값은 17.4%~ 22.4%로 나타났으며, 그 중 17개 시료는 수분함량이 20%이하로 측정되었다.

HMF(mg/kg): 접수된 시료 중 2개는 HMF(mg/kg)의 측정에서 20-30 mg/kg으로, 1개는 30 mg/kg 이상으로 측정되었다(표 42). 한편, 이 3개 시료의 수분함량은 모두 20% 이하로, 시료로 제공된 벌꿀은 가열 농축하지 않았는가 의심될 수 있다.

과당/포도당% (F/G%): 본 과제의 벌꿀 기본분석의 결과(표 42; 표 43), 접수된 총 48개 토종꿀 시료에 대한 당비(F/G)는 1.4에서 1.6이하로 나타남. 분석된 38개 토종꿀 시료의 과당/포도당% (F/G%)는, 양봉농협의 등급판정기준(표 48) 중 잡화항목(1.3 이상)을 적용하면, 모두 1+(프리미엄)급 수준으로 판정된다. 따라서, 이 항목은 F/G%측정 자체가 천연 토종꿀로 인정받을 수 있는 척도가 될 수 있을 것인가의 의문이 든다.

향미 그리고 색도: 이 척도들은, 토종꿀의 다양함으로 인하여, 척도 설정을 극히 어렵게 하고 있어 보다 객관적인 방법이 적용되어야 할 것으로 판단된다.

탄소동위원소비 (%): 토종꿀 시료에 대한 벌꿀 기본분석의 결과(표 42; 표 43)에서, 모든 시료가 -24.0 (%) 이하로 측정되었다. 이는 양봉농협의 등급판정기준을 적용하면, 모두 1+(프리미엄)급을 받을 수 있는 수준이며, 설탕사양을 명기한 일부 시료 제공사들을 고려할 때 탄소동위원소비 (%)의 측정으로 설탕사양여부를 판정하기는 어려운 것으로 판단된다.

(4) 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

본 과제는 “한봉 산업 육성을 위한 토종꿀의 특성 및 기능 분석연구”를 목표로 하였으며, 특히 본 세부과제에서는 “토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정”을 위하여 아래와 같은 다양한 연구를 추구하여 왔다. 즉,

- * 국산 토종꿀 성분 분석 및 지표 후보 물질의 분리:
 - HPLC를 사용하여 국산 토종꿀 성분 분석
 - 지표성분 함량 분석
- * 지역별 토종꿀 생산에 사용되는 주밀원의 유전자 데이터베이스 구축:
 - 주밀원 중 3종 (아까시나무, 벚나무, 밤나무)의 고유 유전자 검색 및 데이터화
 - 주밀원 3종의 고유 유전자 검출을 위한 특이 프라이머 설계 및 선별
 - 주밀원 특이 프라이머의 최적화 진행
 - Nested PCR 진행을 위한 nested primer 설계 및 선별
 - 주밀원 특이 nested primer의 최적화 진행
- * 설탕 사양액으로 사양된 사양꿀 판별법 개발:
 - 사양꿀 시료의 일반 검사와 유전자 검사의 비교
- * 토종꿀 내 사양꿀 함유량 검사를 위한 사탕무 및 사탕수수 유전자 검출:
 - 꿀 잔류 유전자 추출법 개선
 - 사탕무 및 사탕수수의 고유 유전자에 대한 데이터베이스 구축
 - 사탕무 및 사탕수수의 고유 유전자 검출을 위한 프라이머 선별
 - 토종꿀 시료로부터 사탕무 및 사탕수수 유전자 검출
 - Nested PCR 진행을 위한 nested primer 설계 및 선별
 - 사탕무 및 사탕수수 특이 nested primer의 최적화 진행

연구가 종료된 현 시점에서, 많은 세부 목표가 가능하지 아니한 목표이었던 것으로 판단되었으며 (예; 토종꿀의 지표후보물질의 발굴 및 함량 등), 한편 토종꿀 시료에서 많은 설탕사양의 흔적이 발견되는 등 과제의 진행 중 새로운 사실이 밝혀짐에 따라, 본 연구의 중점이 “천연 토종꿀과 설탕사양된 토종꿀의 판별”로 무게 중심이 옮겨지게 되었으며, 이 주제가 가장 우선시 되는 해결과제가 되게 되었다.

본 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도의 기술은 실패한 연구 방향은 간단히 줄이고, 성공적인 연구 개발의 결과는 발표 또는 발표 과정에 있는 논문들을 대상으로 정리하였다. 이 논문들은 결과적으로 실패하였던 여러 시도들을 모두 제거한, 본 과제의 성공적인 연구결과를 가장 잘 표현하는 것이라 판단되었기 때문이다.

사양꿀에 사용되는 설탕은 식물체인 사탕수수 또는 사탕무의 줄기 또는 뿌리를 분쇄하여 정제 건조과정을 거친 것으로, 99.99%이상의 설탕(이당류, Sucrose)을 가진 것으로 알려져 있다. 이 정제과정에서 사탕수수 또는 사탕무의 고유 유전자(DNA)는 거의 분쇄되고 제거되기에, 설탕에 포함된 DNA의 양은 극미량이라 할 것이다.

사양꿀은 사탕수수 또는 사탕무의 설탕물을 꿀벌에게 인위적으로 공급하여 꿀의 모양으로 생산한 것으로, 이 과정에서 사탕수수 또는 사탕무의 고유 유전자는 거의 분쇄되리라 추정되었으나, 극미량은 존재하게 되며, 이는 PCR에 의한 특이 증폭에서 초기 주형 DNA (Initial template DNA)로 작용될 수 있는 충분한 수준의 양이라 할 것이다.

따라서, 사양꿀 판별을 위한 특이 유전자 증폭(PCR) 검사에서 먼저 중요한 과정은 벌꿀에서 잔류 유전자를 쉽고 빠르게 획득할 수 있는 DNA 순수분리법이라 할 것이다.

벌꿀에서 DNA의 순수분리는 주로 화분유전자의 분리에 목적을 두어, 점도를 낮추기 위한 CTAB의 사용, 화분의 분쇄 그리고 단백질 제거를 위한 페놀처리, 적정량의 DNA를 순수분리하기 위하여 다량의 꿀시료가 필요하였으나(S. Gregorio et al., 2015, S. A. Jain et al., 2013), 본 연구의 목표인 잔류유전자의 순수분리에는 그리 유용하다할 수 없었다.

한편, affinity column에 의한 DNA의 순수분리법은, column 내 membrane filter의 glass-fiber가, 고염농도의 조건에서, negative charge를 띠는 DNA의 phosphate backbone과 쉽게 결합되는 성질을 이용한 것으로, 페놀을 사용하지 않는다는 장점과 용해된 DNA를 가장 쉽게 분리할 수 있다는 장점으로 생물학 연구의 DNA 순수분리법 중 가장 널리 사용되어 왔으며, 대장균, 동물세포, 혈액 또는 조직 등을 대상으로 하는 많은 키트들이 개발, 상품화되어 활용되고 있다.

본 연구는 벌꿀의 천연/사양꿀 판별을 위한 사탕수수 특이 정량 PCR 및 사탕무 특이 정량 PCR에 사용하기 위하여, 벌꿀에서 affinity column을 사용하는 잔류 DNA 분리법을 최적화하였으며, 이를 벌꿀에 대한 표준 DNA 분리법으로 제안하고자 하였다.

재료 및 방법

pGEM-sugarcane-cp (pSc) plasmid DNA희석을 통한 특이유전자 검출한계: 사양꿀에서 DNA isolation 최적조건을 알아보고자 pGEM-sugarcane-cp (pSc) plasmid DNA를 일정 분자를 넣어주고 QIAquick PCR purification kit를 이용하여 DNA를 isolation하여 회수된 DNA copy 수를 넣어 준 양과 비교하여 최적조건을 알아보았다.

이 실험에서 사용하는 pSc는 사탕수수 엽록체에 위치한 maturase K (matK, GenBank accession No. LN 849913) 유전자이며, 이를 특이 검출하기 위한 primer 는 Cane-dF 5'-CACCGCAATTATTTTTATTCTGAG-3', Cane-dR 5'-GAACATCTTGAATCCGGTATTC-3' 를 사용하였다(B. Kim et al., 2018).

PCR 반응액은 1ul 10pmole primer(F, R), 5ul 2x Rapi:Detect Master mix (Genesystem, Korea), 2ul 증류수, 1ul pSc를 혼합, 10ul reaction volume으로 만들었으며, PCR의 조건은 초기변성 95°C 30s, 95°C 3s, 55°C 3s, 72°C 3s를 1cycle로 총 50cycle을 Genechecker (Genesystem, Korea)를 사용하여 수행하였다. 이 후 Ct값의 변화와 Tm 값, dCt10 값을 이용하여 분석하였다.

용해용액(Lysis buffer)의 최적화: 벌꿀은 기본적으로 수용성이며, 약 20% (w/v)의 수분함량을 갖는다. 주성분은 Glucose, Fructose등의 단당류이며, 꿀의 종류에 따라, 화분 등의 고형물과 왁스 등의 난용성 성분을 다소 포함하고 있다. 벌꿀의 잔류 DNA를 분리하기 위하여 벌꿀을 완전히 용해시킬 필요가 있으며, 동시에 이 잔류 DNA가 컬럼의 DNA-binding fiber에 효율적으로 붙을 수 있는 환경을 조성하여야 할 것이다. 이를 위해 2개의 서로 다른 Chaotropic agent를 사용하여 그 효율성을 비교하였다. 본 연구는 일반적 벌꿀을 수용성 환경에 용해시키기 위하여, 벌꿀의 수분함량 측정을 수행하였으며, 이를 기반으로 Guanidine 용액을 최적화 하였다.

Guanidine 용액의 조성에 따른 DNA분리 효과: 꿀 100ul에 1x 108 pSC 1ul 첨가 후 GI buffer (5M GnHCl, 30% IPA)와

GSI buffer (5M GuSCN, 30% IPA)와 QIAGEN Kit 사용하여 DNA 분리하고 그 회수율을 비교하였다. 1x 10⁸ pSC 1ul를 꿀 시료에 100ul에 첨가한 후 각각의 buffer를 500ul 첨가하고, Vortexer를 이용하여 잘 섞어준 후 QIAGEN column에 넣어주고 13000rpm에서 30s 동안 원심분리 하였다. Washing buffer 700ul를 column에 넣고 13000rpm에서 30s 원심분리 하였다. 3' DW 50ul로 Elution 하였고 GI buffer, GSI buffer와 비교하기 위해 QIAGEN kit를 사용한 sample 1개는 kit 내 50ul Elution buffer를 사용하여 DNA를 얻었다. 이 중 1ul를 이용하여 PCR하여 결과를 분석하였다.

DNA binding column의 선발: 적정 affinity column 선정을 위해 5개의 서로 다른 제품의 column을 대상으로 꿀100ul에 1x 10⁸ pSC 1ul를 첨가 후 GI buffer를 500ul 넣고 잘 섞어준 후 5개 다른 column에 넣고 13000rpm에서 원심분리 하였다. 실험은 duplicate로 실시하였으며 washing buffer로 washing 한 후 50ul 3'DW를 이용하여 Elution을 하였다. 이렇게 얻은 50ul에서 1ul를 사용하여 PCR 하여 그 결과를 분석하였다.

Washing buffer의 선발: 적정 washing buffer선정을 위해 washing buffer A와 B를 비교하기 위해 꿀100ul에 1x 10⁸ pSC 1ul를 첨가 후 GI buffer를 500ul 넣고 잘 섞어준 후 P column에 넣고 13000rpm에서 원심분리 하였다. washing buffer A, B로 washing 한 후 50ul 3'DW를 이용하여 Elution을 하였다. 이렇게 얻은 50ul에서 1ul를 사용하여 PCR를 하여 그 결과를 분석하였다.

DNA Elution buffer 선정: 적정 Elution buffer선정을 위해 3'DW, Elution buffer A와 B를 비교하기 위해 꿀100ul에 1x 10⁸ pSC 1ul를 첨가 후 GI buffer를 500ul 넣고 잘 섞어준 후 P column에 넣고 13000rpm에서 원심분리 하였다. washing buffer A로 washing 한 후 50ul 3'DW, Elution buffer A, B를 이용하여 Elution을 하였다. 이렇게 얻은 50ul에서 1ul를 사용하여 PCR를 하여 그 결과를 분석하였다.

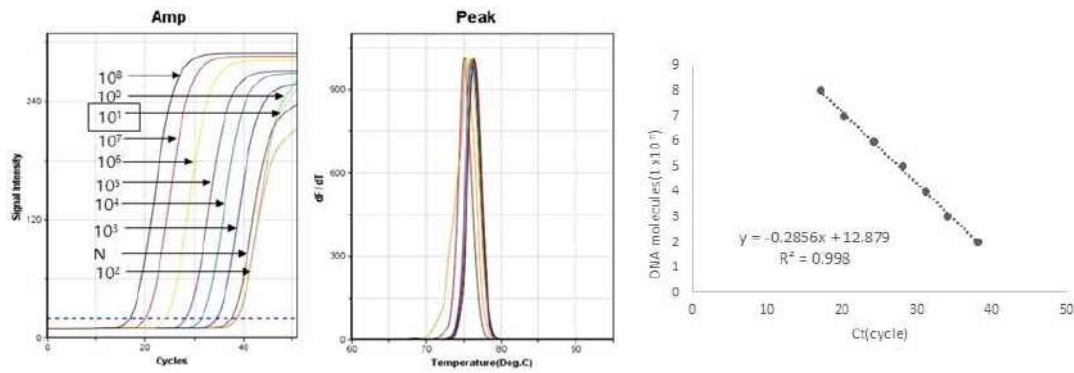
결과 및 고찰

pGEM-sugarcane-cp(pSc) plasmid DNA회석을 통한 특이유전자 검출한계: 1 x 10¹¹ 분자 pGEM-sugarcane-cp(pSc) plasmid DNA를 10' serial dilution하여 09, 108, 107, 106, 105, 104, 103, 102, 101, 100 분자수, 그리고 negative (DW)로 총 10개의 시료로 초고속 PCR을 다음과 같이 수행하였다. 결과는 다음과 같다(표 100, 그림 217).

pSc의 검출한계는 1x10² 으로 나타났으며 융점온도는 평균 76.05°C 였다. 이 결과를 이용하여 검량선을 작성하여 직선성과 기울기를 조사하였다. 그 결과 $y = -0.2856x + 12.879$ 으로 신뢰성 높은 기울기 값 범위인 -0.25~-0.33 안에 들며 높은 상관계수 값(R²=0.998)을 얻었다. 이를 정량실험에 사용하였다.

표 100. pGEM-sugarcane-cp(pSc) copy 수에 따른 Ct값, T_m값, dCt₁₀값

pSC molecules	Ct(Cycle)	T _m (°C)	dCt ₁₀ (cycle)
1x10 ⁸	17.13	76.51	3.07
1x10 ⁷	20.20	76.51	3.97
1x10 ⁶	24.17	76.18	3.99
1x10 ⁵	28.16	76.18	3.00
1x10 ⁴	31.16	76.18	2.99
1x10 ³	34.15	76.18	3.96
1x10 ²	38.11	75.52	
		76.05±0.41	



A

B

그림 217. 사탕수수특이유전자 재조합 DNA (pSc) 주형 copy수에 따른 초고속 PCR

A, pSc 주형 copy 수 10^4 serial dilution에 대한 검출한계와 PCR amplicon의 특이성 확인을 위한 증폭곡선과 용점분석 그래프 B, pSc serial dilution에 대한 Ct 값을 통하여 정량곡선을 작성하여 직선성과 기울기 조사하여 기울기 -0.2856 , $R^2=0.998$ 의 상관계수를 얻어 정량선의 신뢰성 확보하였다.

Guanidine hydrochloride (GnHCl)과 guanidine thiocyanate (GuSCN) 결합력 비교: DNA binding buffer에 사용하는 chaotropic agent의 농도가 높을수록 결합력이 좋다는 보고에 따라 chaotropic agent 중 대표적인 guanidine hydrochloride과 guanidine thiocyanate을 사용하여 결합력의 변화를 알아보았다. 각 농도에 따라 2개의 시료를 시험하였으며 외부에서 넣어준 재조합의 DNA copy수에 따른 Ct값 비교를 위하여 2개의 재조합 DNA 시료와 함께 qPCR를 수행하였다. 결과는 5M과 6M GnHCl 사이에 회수된 유전자 copy수는 1.6×10^6 와 1.2×10^6 으로 유의한 차이를 보이지 않았다(그림 218, 표 101).

표 101. GnHCl의 농도에 따라 분리된 DNA의 Ct값, Tm값, dCt10값

No	Sample	Ct (Cycle)	DNA 분자수	Tm°C
1	5M GnHCl1	23.37		76.03
2	5M GnHCl2	23.34		76.03
		23.36±0.02	1.6×10^6	
3	6M GnHCl1	24.30		75.70
4	6M GnHCl2	23.38		75.70
		23.4±0.65	1.2×10^6	
5	10^7 PSC	20.36		76.36
6	10^5 PSC	28.08		76.03
				75.98±0.25

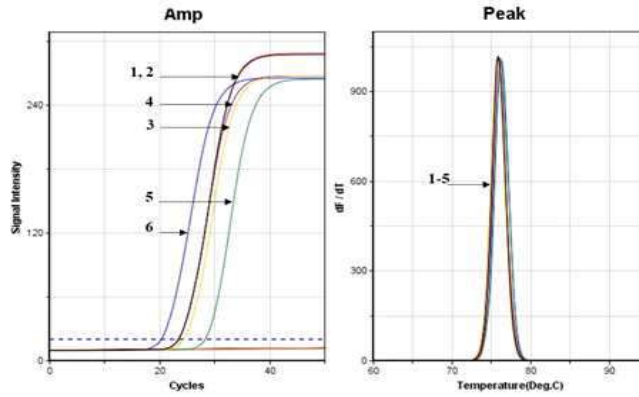


그림 218. DNA binding buffer에 따른 꿀에서 잔류유전자 검출

100ul 꿀에 108의 사탕수수 특이유전자 재조합DNA(pSc)를 넣고 500ul의 각기 다른 농도의 GnHCl binding buffer를 넣고 회수된 pSc에 대한 PCR amplicon의 증폭곡선과 이 amplicon 특이성 확인을 위한 용점분석그래프

GuSCN으로 제조된 binding buffer의 경우 5M의 GuSCN binding buffer로 회수된 유전자의 분자수(1.5×10^5)가 4M의 GuSCN binding buffer로 회수된 유전자의 분자수(7.3×10^4)보다 많았다. 그러나 5M GnHCl binding buffer보다 더 효과적이지 않았다. 이에 column법을 이용한 잔류 유전자 분리법에서는 5M GnHCl binding buffer를 사용을 결정하였다(표 102, 그림 219).

표 102. GuSCN의 농도에 따라 분리된 DNA의 Ct값, Tm값 및 정량값

No	Sample	Ct(Cycle)	DNA 분자수	Tm (°C)
1	5M GuSCN1	27.00		75.70
2	2	26.94		75.70
3	3	26.95		75.70
		26.96±0.03	1.5×10^5	
4	4M GuSCN1	26.25		75.70
5	2	27.95		75.70
6	3	29.98		75.70
		28.06±1.52	7.3×10^4	
7	5M GI 1	25.95		75.80
8	2	26.01		76.03
		25.98±0.03	2.9×10^5	
9	10^7 pSC	20.90		76.36
10	10^5 pSC	26.92		76.36
				75.86±0.27

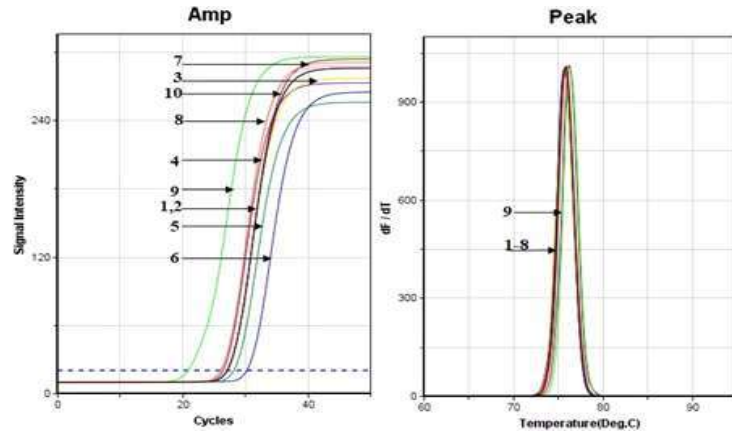


그림 219. DNA binding buffer에 따른 꿀에서 잔류유전자 검출 비교

100ul 꿀에 108의 사탕수수 특이유전자 재조합DNA(pSc)를 넣고 500ul의 각기 다른 농도의 GuSCN binding buffer를 넣고 회수된 pSc에 대한 PCR amplicon의 증폭곡선과 이 amplicon 특이성 확인을 위한 융점분석그래프

DNA binding column 선발: 잔류 DNA 분리에서 column의 DNA 결합능력은 중요하다. 이에 현재 국내에서 시판되는 silica membrane based column 5가지를 이용하여 DNA binding capacity 의 차이를 확인하였다. 5개 회사의 column은 4.7×10^5 에서 1.1×10^6 로 회수되는 분자수가 차이를 보여 column이 꿀에서 미량의 DNA를 분리 시 중요하게 고려되어야 하는 항목임을 확인하였다.

표 103. DNA binding column 제품 간 비교

	column	Ct (Cycle)	Aver. Ct	Tm (°C)	DNA분자수
1	probio	23.51		75.70	
2		25.25	24.38±1.23	75.70	8.3×10^5
3	viralGene	24.40		76.03	
4		23.50	23.95±0.64	76.03	1.1×10^6
5	pathogen	25.26		76.03	
6		25.22	25.24±0.03	75.70	4.7×10^5
7	Intron-pla	25.20		75.70	
8		24.34	24.77±0.61	75.70	6.4×10^5
9	biosolution	24.30		75.70	
10		24.27	24.29±0.02	75.70	8.8×10^5
				75.80±0.16	

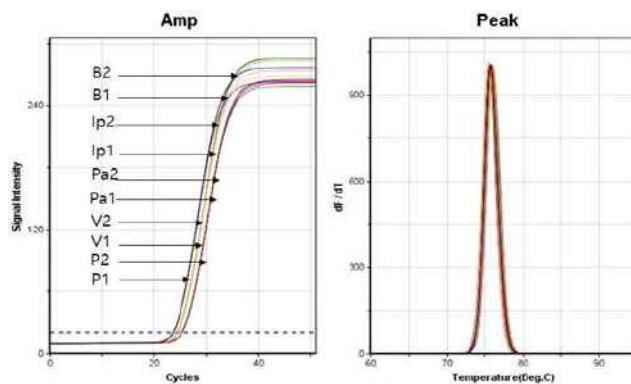


그림 220. 시판되고 있는 DNA binding column제품 간 비교

100ul 꿀에 108의 사탕수수 특이유전자 재조합DNA(pSc)를 넣고 500ul의 5M GnHCl binding buffer를 사용하여 5가지 다른 column을 통해 회수된 pSc에 대한 PCR amplicon의 증폭곡선과 이 amplicon 특이성 확인을 위한 융점 분석그래프

Washing buffer 선정: 회수되는 DNA의 purity를 위하여 column에 DNA를 결합시킨 후 다음과 같이 washing buffer의 조성을 변화시켜 회수되는 DNA양에 변화를 확인하였다. washing buffer는 염과 에탄올로 구성되어 있으며 에탄올을 80%로 고정하고 염의 농도를 변화시켰을 때 에탄올을 85%로 고정하고 염의 농도를 변화시켰을 때 결과는 염의 농도와 에탄올의 농도변화에 따른 PCR정량의 차이를 보이지 않았다(표 104~105, 그림 221~222).

표 104. Washing buffer 조성 변화에 따른 회수되는 DNA양

	Buffer 조성 (80% EtOH)	Ct cycle	DNA분자수	Tm
1	PE 1	10mM Tris-HCl (pH7.6)	25.25	76.03
2	PE 2		26.16	76.03
		25.71±0.46	3.4x10⁵	
3	A 1	15mM Tris-HCl (pH7.6)	25.20	76.03
4	A 2		25.24	76.03
5	A 3		25.25	76.03
		25.23±0.02	4.7x10⁵	
6	B 1	20mM Tris-HCl (pH7.6)	25.23	76.03
7	B 2		25.23	75.70
8	B 3		26.16	75.70
		25.54±0.44	3.8x10⁵	
9	1x10 ⁻⁷	Positive DNA	21.23	76.36
10	1x10 ⁻⁵	Positive DNA	27.11	76.36
				76.03±0.2

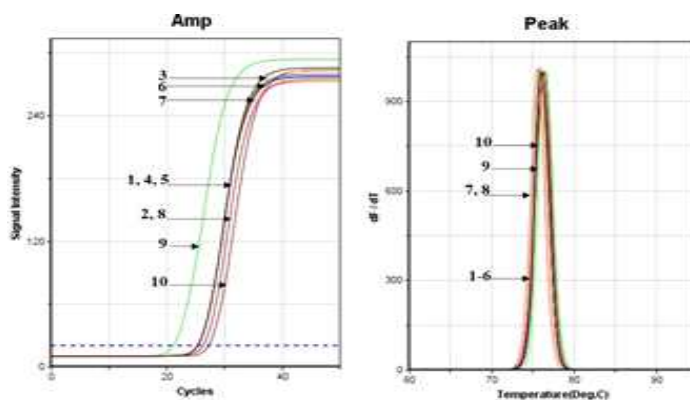


그림 221. Washing buffer조성에 따라 회수되는 DNA양의 Ct값 및 Tm값

PCR 증폭 그래프를 통하여 에탄올을 80%로 고정하고 염의 농도를 10mM, 15mM, 20mM Tris-HCl (pH 7.6)로 변화시킨 buffer로 column을 washing 하여 얻은 회수된 DNA시료에서 사탕수수 특이 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었으며 용점분석 그래프를 통하여 모든 시료에서 증폭된 PCR amplicon이 사탕수수 유전자에 특이적인 산물임을 확인하였다.

표 105. Washing buffer 조성 변화에 따른 회수되는 DNA양

		Buffer 조성 (85% EtOH)	Ct cycle	DNA분자수	Tm
1	PE 1	10mM Tris-HCl (pH7.6)	24.27		75.85
2	PE 2	+80% EtOH	26.07		75.85
			25.17±0.9	4.9x10 ⁵	
3	A 1	15mM Tris-HCl (pH7.6)	24.26		75.85
4	A 2		25.19		75.85
5	A 3		25.22		75.85
			24.89±0.45	5.9x10 ⁵	
6	B 1	20mM Tris-HCl (pH7.6)	25.20		75.85
7	B 2		25.21		75.52
8	B 3		24.90		75.85
			24.90±0.43	5.9x10 ⁵	
9	1x10 ⁻⁷	Positive DNA	20.26		76.51
10	1x10 ⁻⁵	Positive DNA	27.18		76.18
					75.91±0.2

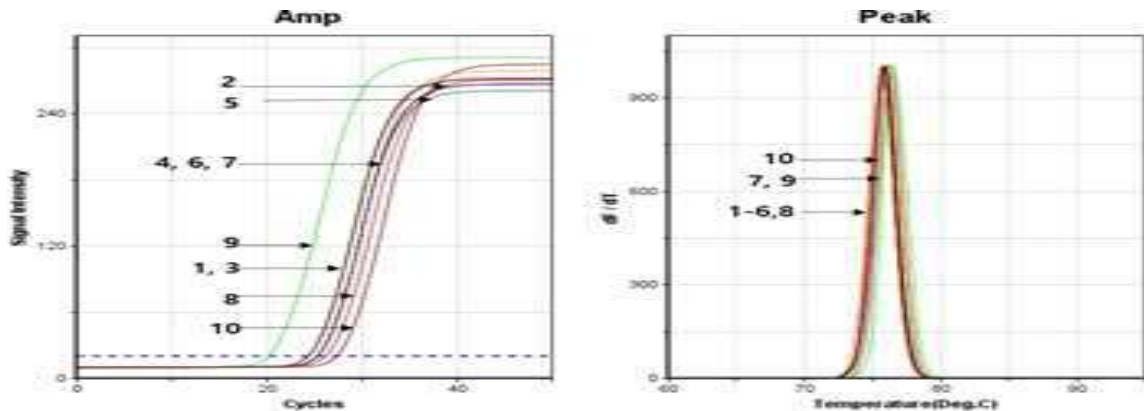


그림 222. Washing buffer조성에 따라 회수되는 DNA양의 Ct값 및 Tm값

PCR 증폭 그래프를 통하여 에탄올을 85%로 고정하고 염의 농도를 10mM, 15mM, 20mM Tris-HCl (pH 7.6)로 변화시킨 buffer로 column을 washing 하여 얻은 회수된 DNA시료에서 사탕수수 특이 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었으며 용점분석 그래프를 통하여 모든 시료에서 증폭된 PCR amplicon이 사탕수수 유전자에 특이적인 산물임을 확인하였다.

DNA Elution buffer 선정: column affinity법의 마지막 단계인 DNA elution buffer 선정을 위하여 10mM Tris-HCl (pH 8.5), TE buffer(10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, pH 8.5)와 DW간의 elution 효과를 비교하였다. 그 결과 3가지 용액 모두에서 PCR에 따른 정량에서 큰 차이를 볼 수 없었다(표7, 그림7). 또한 염의 pH를 염기성에 맞추어 제조된 10mM Tris-HCl (pH 9.0), TE buffer(10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, pH 9.0)와 DW의 비교에서도 PCR 정량 결과 각 용액 간에 차이는 볼 수 없었다(표 106, 그림 223). Elution된 DNA용액을 여러 종의 기기로 광학 정량을 수행하였으나 정확한 정량은 되지 않았다(data not shown).

표 106. Elution buffer 조성 변화에 따른 회수되는 DNA양

		Elution Buffer 조성	Ct cycle	DNA분자수	Tm
1	D1	DW	24.27		76.18
2	D2	DW	24.31		76.18
			24.29±0.02	8.8x10 ⁻⁵	
3	A1		24.31		76.18
4	A2	10mM Tris-HCl (pH8.5)	24.30		76.51
5	A3		25.22		76.18
			24.61±0.43	7.1x10 ⁻⁵	
6	B1	10mM Tris-HCl (pH8.5)	24.28		76.18
7	B2	+0.5mM EDTA	24.20		75.85
8	B3		24.23		76.18
			24.24±0.03	9.1x10 ⁻⁵	
9	1x10 ⁷	Positive DNA	20.75		76.51
10	1x10 ⁵	Positive DNA	28.20		76.51
					76.25±0.2

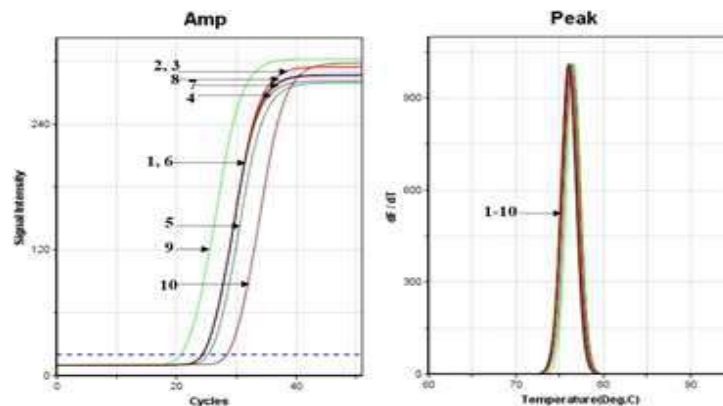


그림 223. Elution buffer조성에 따라 회수되는 DNA양의 Ct값 및 Tm값

PCR 증폭 그래프를 통하여 10mM Tris-HCl (pH 8.5), TE buffer (10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, pH 8.5)와 DW 로 elution하여 얻은 회수된 DNA시료에서 사탕수수 특이 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었으며 용점분석 그래프를 통하여 모든 시료에서 증폭된 PCR amplicon이 사탕수수 유전자에 특이적인 산물임을 확인하였다.

표 107. Elution buffer 조성 변화에 따른 회수되는 DNA양

	Elution Buffer 조성	Ct cycle	DNA분자수	Tm
1	D 1	DW		76.03
2	D 2	DW		76.03
		25.68±0.52	3.5x10⁵	
3	A 1			76.03
4	A 2	10mM Tris-HCl (pH9.0)		76.03
5	A 3			76.03
		25.83±0.44	3.2x10⁵	
6	B 1			76.03
7	B2	10mM Tris-HCl (pH9.0) +0.5mM EDTA		75.70
8	B3			76.03
		25.19±0.01	4.8x10⁵	
9	1x10 ⁷	Positive DNA		76.68
10	1x10 ⁵	Positive DNA		76.03
				76.06±0.23

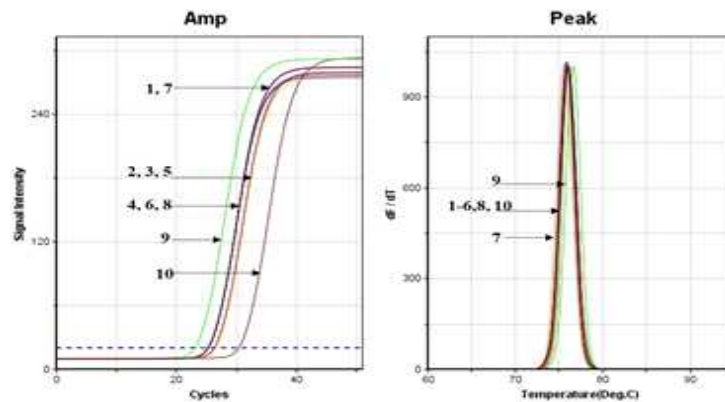


그림 224. Elution buffer조성에 따라 회수되는 DNA양의 Ct값 및 Tm값

PCR 증폭 그래프를 통하여 10mM Tris-HCl (pH 9.0), TE buffer (10mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, pH 9.0)와 DW 로 elution하여 얻은 회수된 DNA시료에서 사탕수수 특이 유전자가 증폭되었음을 확인할 수 있었으며 용점분석 그래프를 통하여 모든 시료에서 증폭된 PCR amplicon이 사탕수수 유전자에 특이적인 산물임을 확인하였다.

결론 또는 적요

결론적으로 꿀에 제작된 재조합 DNA를 넣어주고 인위적으로 혼입한 재조합DNA의 특정 프라이머를 이용하여 유전자분리의 각 단계별 회수율을 검토하는 방법으로 꿀에서 가장 적절하게 잔류하고 있는 유전자 분리법을 정립하였다.

* 벌꿀에서 잔류DNA의 순수분리법

- (1) 꿀 2ml을 50ml tube에 담고 GI buffer를 10ml을 넣고 5분간 Vortexer를 사용하여 섞어준다.
- (2) GI buffer와 꿀을 잘 섞어준 용액 모두를 affinity column에 통과시킨다.

이 때 column extension accessory와 QIAGEN사의 QIAvac manifold를 vacuum에 연결하여 사용하면 좀 더 손쉽게 column을 통과시킬 수 있다.

- (3) 700µl washing buffer를 column에 넣고 13000rpm에서 30sec 원심분리 한다.
- (4) Collection tube에 담긴 washing buffer를 제거한 후 column을 collection tube와 결합시킨 후 1분간 13000rpm으로 원심분리하여 알코올을 날려준다.
- (5) column을 collection tube에서 분리한 후 멸균된 1.5ml microcentrifuge tube에 놓는다.
- (6) 50µl 의 3차 멸균수를 column의 정중앙에 tip이 닿지 않게 하여 떨궈준 후 1분간 정치한다.
- (7) 13000rpm에서 1분간 원심분리하여 넣어준 50µl의 DNA 용액을 회수한다. 이를 확인 후 새 멸균 microcentrifuge tube에 담고 -20°C에 보관하여 PCR에 사용한다.

* 잔류DNA분리에 사용되는 시약 및 그 조성

- (1) DNA binding buffer: 5M guanidine hydrochloride (GnHCl), 30% isopropyl alcohol
- (2) Washing buffer: 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 80% ethanol
- (3) Elution buffer: 3차 멸균 증류수

인용 문헌

AOAC, 1995. Official Method of Analysis of AOAC Intl. 20th ed. Method 998-12. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA

Byounghee Kim, Somim Kim, Moonjung Kim, Jungmin Kim, Truong A Tai, Byoungsu Yoon. COSDEX. 2001. CODEX STANDARD FOR SUGARS. CODEX STAN 212-1999. European Commission .2015. Official controls and enforcement. Honey 2015-16. Brussels, Belgium.

Detection of Sugar Cane (*Saccharum officinarum*)-specific Gene from Sugar and Sugar-honey
Hwa-Jung Sung, Chuleui Jung, Jiyoung Kwon, Ho-Yong Sohn. Evaluation of Commercial Korean Honey Quality and Correlation Analysis of the Quality Parameters. Journal of Life Science 28(12), 2018.12, 1489-1500

Journal of Apiculture 33(3), 2018. 9, 221-226

Journal of Apiculture Vol.33 No.3 2018. 09 213 - 219

MFDS, 2014, Food Standard Code, Ministry of food and Drug Safety, Cheongju, Korea

Sobrinho-Gregorio, L., S. Vilanova, J. Prohens and I. Escriche. 2018, Detection of honey adulteration by conventional and real-time PCR. Food Control 95:57-62

Somim Kim, Byounghee Kim, Moonjung Kim, Jungmin Kim, Truong A Tai, Byoungsu Yoon, Detection of Sugar Beet (*Beta vulgaris*) - Specific Gene from Honey Made by Sugar of Sugar Beet

Sona Arun Jain*: Flávia Thalita de Jesus; Giulia Manso Marchioro; Edilson Divino de Araújo. Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. Food Sci. Technol (Campinas) vol.33 no.4 753-756

Sónia Soaresa, Joana S. Amaral Maria Beatriz P.P. Oliveira, Isabel Mafra Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification Food Control Vol.48, Feb 2015, 130-136

끝////////////////////////////////////

㉠ 대량의 토종꿀 시료에 대한 본 과제외의 잔류 DNA분리법의 적용

본 과제는 한봉협회의 토종꿀 시료 48종과 본 과제에서 수집한 토종꿀 시료 20여종, 대조용 벌꿀 시료 20여종 등 총 80여종의 토종꿀 및 대조 벌꿀 시료를 사용하였다. 이 벌꿀의 시료에서 잔류DNA분리 및 화분유전자의 DNA를 순수 분리하는 것은 쉽지 않은 작업이었으나, 본 과제에서 개발한 “대량의 토종꿀 시료에 대한 본 과제외의 잔류 DNA분리법의 적용”에서 제시한 방법을 적용하여, 다수의 벌꿀 시료들로부터 비교적 빠르고, 쉽게, PCR이 가능한 순도의 DNA를 순수 분리할 수 있었다(그림 225).



그림 225. 대량의 벌꿀 시료에 대한 DNA 분리 방법으로 Vacuum manifold의 활용
Vacuum manifold (Qiagen)는 24 채널의 것을 사용하였으며, DNA분리용 컬럼을 연결하고 5 ml 이상의 DNA용액도 중력과 진공을 이용하여 컬럼을 통과시킬 수 있었다.

본 과제에서 제시한 벌꿀에서 잔류 DNA분리법(잠정적으로 김 등 2021로 칭함)은 일정량의 벌꿀시료를 DNA-binding용액과 희석하여, 이를 affinity column을 통과시키며, 컬럼의 필터에 binding시킨 후, 세척용액으로 세척하고, Elution용액에 binding된 DNA를 녹여내어 수집하는 방식이다.

용액을 컬럼에 통과시키는 방식은 원심분리 또는 진공에 의한 물리적 방법이 많이 사용되며, 본 과제에서는 24 채널의 Vacuum manifold (Qiagen)가 비교적 대량의 용액을 쉽게 컬럼에 통과시킬 수 있기에, DNA-binding용액에 희석시킨 벌꿀시료 및 세척용액을 컬럼에 통과시킬 때 사용하였다. 한편, Elution 용액을 컬럼에 통과시킬 때는 순수도를 유지하기 위하여 원심분리의 방법을 사용하였다.

사용된 Vacuum manifold (Qiagen)는 24 채널이나, 한사람의 숙련된 실험자가 96 channel (또는 24x4)을 사용한다면, 능히 수천개의 시료도 감당할 수 있을 것으로 예상된다.

본 과제의 24채널을 사용한 DNA분리 실험에서 약 30분-1시간이 소요되었으며, 96 channel (또는 24x4)을 사용한다면, 보다 능률을 올릴 수 있을 것으로 사료된다.

② 사탕수수 및 사탕무우 고유 유전자에 의한 사탕꿀 판별 유전자 검사법의 개발

⑦ 사탕무우 설탕으로 제조된 사탕꿀의 초고속 잔류 유전자 검사법

아래의 논문은 본 과제인 “토종꿀의 잔류 유전자를 이용한 사탕무우 고유 유전자의 검출법”이, 널리 활용되기 위하여 제반 조건을 논문화 시킨 것이다. 이는 2021년 봄에 “Food controls”지에 “Ultra-rapid qPCR for the detection of residual DNA in honey adulterated with sugar beet”의 제목으로 투고 되었으며, 영문 초안의 국문 요약 번역본을 본 보고서에 기술한다.

/// 시작//

사탕무우 설탕으로 사탕된 벌꿀의 잔류 DNA 검출을 위한 초고속 qPCR

요약

안정 탄소 동위원소 비율 분석(SCIRA)은 천연꿀과 변형꿀(사탕꿀)을 구별하는 데 사용되었다. 그러나 사탕무우 설탕으로 사탕된 벌꿀을 천연꿀과 식별하기 어렵다. 여기서 우리는 초고속 실시간 중합효소 연쇄반응(PCR)을 이용하여 사탕무우 설탕으로 사탕된 벌꿀에서 사탕무우 유전자를 검출하는 방법을 개발하였다. 표적 유전자인 RdDp (RNA-dependent DNA polymerase)를 PCR로 증폭하고, 생성된 산물을 nested PCR에 적용하였다. 1 x 101 RdDp 특이적 재조합 표준 DNA는 1차 PCR에서 검출되었으며, Nested PCR은 그보다 낮은 수의 분자를 탐색할 수 있었다. PCR 조건은 95°C에서 30초 동안 사전 변성 후 95°C에서 3초 변성, 59°C에서 3초 혼성, 72°C에서 3초 중합의 50회전하였으며, 총 반응 시간은 19분 51초이었다. Nested PCR 조건은 95°C에서 30초 사전 변성 후, 95°C에서 3초 변성, 57°C에서 3초 혼성, 72°C에서 3초 중합의 50회전이었으며, 총 반응 시간은 21분 13초이었다. RdDp-specific PCR에 대한 총 반응 시간은 용점 분석을 포함하여 41분 4초이었다. 이 방법을 현지에서 생산된 꿀 샘플 73개에 적용한 결과 사탕무 관련 유전자가 9개 샘플에서 검출되었다.

또한 73개 샘플 중 10개를 무작위로 선택하여 SCIRA에 적용하였다. SCIRA법은 10개의 샘플을 모두 천연 꿀로 판정하였으나, nested PCR의 결과는 10개 중 두 샘플에서 사탕무우 유전자가 검출되었다. 따라서 우리의 detection 및 nested PCR 시스템은 매우 민감하였으며 사탕무우 사탕으로 생산된 사탕벌꿀에서 식물체인 사탕무우 고유 유전자(RdDp)를 빠르고 정확하게 탐지할 수 있었다. 앞으로 이 방법은 사탕무우 사탕벌꿀을 판별해 낼 수 있는 벌꿀의 품질 관리법으로 사용될 수 있기를 기대한다.

1. Introduction

꿀은 오랫동안 생산되고 소비된 천연의 단맛 물질이다. 꿀은 항균, 프리바이오틱 및 항산화 활성과 같은 다양한 치료 특성으로 인해 주목을 받았다.(6, 3, 4).

꿀에 대한 시장 수요의 증가는 경제적 이익을 위한 불량 행위를 조장한 바 있다. 이러한 현상은 최종 제품의 영양가와 건강상의 이점을 감소시킬 뿐만 아니라 정직한 양봉가에게도 영향을 미친다. 꿀은 식품 사기에 취약하며 사기 위험이 가장 높은 상위 10개 식품 중 6위를 차지한다. 따라서 품질관리가 필수 이슈가 되고 있으며, 부정행위를 억제하기 위한 다양한 방안이 제시되고 있다(3,6).

핵자기공명분광법, 효소활성, 고성능 액체크로마토그래피, 동위원소 질량분석법 등의 일반적인 분석 기술은 식품 불순물을 검출하는 데 사용되어 왔지만 이러한 방법은 고가의 장치가 필요하고 분석 시간이 오래 걸리며, 또한 결과의 정확도가 낮다(2,4).

안정 탄소 동위원소 비율 분석(SCIRA)은 공식 분석 화학 협회(AOAC, 1990)에서 설탕이 섞인 꿀을 검출하기 위한 공식 방법으로 인정한 중요한 기술이나, 이 분석 기술은 매우 낮은 농도의 불순물이 섞인 설탕을 감지할 만큼 민감하지 않으며 특히 사탕무우로 사탕된 벌꿀을 구별하지 못한다.

최근 몇 년 동안 DNA 기반 방법을 사용하여 꿀의 진위성과 고유 품질을 해결하기 위한 여러 노력이 이루어졌다. 중합효소연쇄반응(PCR)은 꿀의 분자식별을 위한 다양한 유형의 분석 데이터를 처리하는 응용 기술로 부상하였다(1,2,4,3,7). PCR은 단순성, 특이성 및 감도로 인해 다양한 응용 분야의 의료 및 임상 실험실 연구에서 널리 사용되며, PCR 플랫폼의 추가 개발은 특정 유전자의 검출을 향상시킬 수 있다.

최근 반응 칩 내부에 고속 온도 균일성을 제공할 수 있는 실시간 마이크로 스케일 칩 기반 PCR 시스템이 개발되었다(10,11,12). 본 연구에서는 실시간 마이크로 칩 기반 PCR 시스템을 통해 불순물의 잔류 DNA 평가에 관여하는 특정 유전자를 신속하게 검출하고 확인하는 방법을 제안한다.

이러한 탐지 시스템에서 신뢰성은 무시할 수 없는 중요한 문제이다. 일반적으로 용점 분석을 통해 특이적 증폭 산물과 비특이적 증폭 산물을 구별할 수 있다. 그러나 유사한 용융 온도를 갖는 비특이적 생성물을 구별하고 40 사이클 후에 특정 표적 유전자의 증폭을 예측하는 것은 어렵다. 신뢰성을 위해 특정 표적 염기서열을 보다 정확하게 결정할 수 있는 기술인 nested PCR을 사용하였으며, 사탕무의 잔류 DNA를 이용하여 사탕무가 혼합된 꿀을 검출하고 확인하는 데 중점을 두었다.

2. Materials and Methods

2.1 Samples

2018년부터 2020년까지 Apis cerana에 의해 생산된 73개의 토종꿀 샘플을 준비하였다. 이 시료들은 국내 5개의 다른 지방에서 수집되었으며, 제출된 문서에는 꿀벌에게 설탕을 사탕시킨 기록은 없었다.

2.2 DNA extraction

친화성 컬럼을 사용하여 꿀에 있는 설탕의 잔류 또는 노출된 DNA를 분리하였다. 간단히, 카오토픽제 구아니딘 염산염 및 이소프로필 알코올을 함유하는 DNA 결합 완충액 10mL를 꿀 샘플 2mL에 첨가하고 잘 혼합하였다. 그런 다음 이 용액을 컬럼에 통과시켰다. 컬럼을 에탄올 및 염을 함유하는 완충액 750 µL로 세척하였고, 컬럼을 원심분리하여 세척 완충액을 완전히 제거한 후 증류수로 용출하였다. 용출액은 PCR의 초기 기질로 사용되었다.

2.3 Recombinant DNA and primers for sugar beet-specific gene

Beet 특이 유전자인 RNA 의존성 DNA 중합효소(RdDp) 315bp를 분자적 클론화하여 재조합 DNA로 제조하였다. pTOP-beet-RdDp_315(12)로 명명된 재조합 DNA는 함유된 대장균을 증식시켜 DNA 정제 키트(Intron)를 사용하여 정제하였다. DNA는 BamHI (NEB, UK)으로 절단하여 선형화시켜 표준DNA로 사용하였으며, RdDp 유전자 검출 프라이머 쌍과 nested PCR 프라이머 쌍을 설계하고 구축하였다.

pTOP-beet-RdDp315를 주형으로 사용하여 검출 시스템과 nested PCR 시스템의 감도를 분석하고 PCR에 대한 양성 대조군으로 사용하였다. 초고속 정량적 PCR (UR-qPCR) 시스템에서 프라이머 3을 사용하여 검출용 프라이머 및 중첩 PCR을 설계하였다(표 108).

Table 108. Information of primers for the detection of sugar beet

Use	Name	Sequence	Amplicon size (bp)	Tm (°C)	Reference
Detection PCR	B_RdDp315 dF	ATGTGTAGTGCCCATATTTG	315	59	[12]
	B_RdDp315 dR	GCATTATGAGGAGTGTTTAGTAC			
Nested PCR	B_RdDp315 nF1	TAGCATTTCTGCTCCCCAAAC	151	57	This study
	B_RdDp315 nR1	CCTAAATGGGTTGAGGGTGA			

2.4 Detection limit of sugar beet-specific detection primers in UR-qPCR

검출 프라이머의 감도를 측정하기 위해 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ 분자의 pTOP-beet-RdDp315 1 μL 를 포함하는 총 반응 부피 10 μL 에서 UR-qPCR을 수행하였다. 반응 혼합물은 2 μL 의 증류수, 5 μL 의 2x Rapi Detect mix(Genesystem Co., Ltd.) 및 1 μL 의 각 검출 프라이머(B_RdDp315 dF/dR, 10pmol/ μL)를 포함하였다.

UR-qPCR은 GENEHECER(Genesystem Co., Ltd., Korea)를 사용하여 95°C, 30 s 의 pre-denaturation 후, denaturation 95°C, 3 s, annealing 59°C, 3 s, polymerization, 72°C, 3 s. 의 50회전을 수행하였다. 각 실험들은 각기 삼반복 되었다.

2.5 Detection limit of sugar beet-specific nested primers by UR-qPCR

Nested PCR 프라이머의 감도를 확인하기 위해 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ 분자의 pTOP-beet-RdDp315 1 μL 를 포함하는 총 반응 부피 10 μL 에서 UR-qPCR을 수행하였다. 반응 혼합물은 2 μL 의 증류수, 5 μL 의 2X Rapi Detect mix(Genesystem Co., Ltd.) 및 1 μL 의 각 nested primer(B_RdDp-315nF1/nR1, 10pmol/ μL)를 포함하였다.

UR-qPCR은 GENEHECER(Genesystem Co., Ltd., Korea)를 사용하여 95°C, 30 s 의 pre-denaturation 후, denaturation 95°C, 3 s, annealing 57°C, 3 s, polymerization, 72°C, 3 s. 의 50회전을 수행하였다. 각 실험들은 각기 삼반복 되었다.

2.6 Detection of sugar beet-specific gene in honey

UR-qPCR은 꿀에서 추출한 1 μL 의 DNA를 포함하는 10 μL 의 총 반응 부피에서 수행되었다. 반응 혼합물은 2 μL 의 증류수, 5 μL 의 2X Rapi Detect mix(Genesystem Co., Ltd.) 및 1 μL 의 각 nested primer(B_RdDp-315nF1/nR1, 10pmol/ μL)를 포함하였다. UR-qPCR은 2 × Rapi Detection Master Mix(Genesystem Co., Ltd.)와 함께 GENEHECER(Genesystem Co., Ltd., Korea)를 사용하여 수행되었으며, PCR 혼합물에 사탕무 특이적 프라이머 쌍인 B_RdDp-315dF/dR을 첨가하고 총 부피를 10 μL 로 조정하였다. PCR은 95°C에서 30초 동안 pre-denaturation한 후 95°C에서 3초 동안 변성, 59°C에서 3초 동안 혼성, 72°C에서 1초 동안 중합의 50주기로 수행되었다. 증폭된 PCR 산물을 100배 희석하였다. 네스트 PCR을 수행하여 비트 특이적 유전자의 증폭을 확인하였다. 중첩 PCR은 100X 희석된 증폭된 PCR 산물의 DNA 1 μL 를 포함하는 총 반응 부피 10 μL 에서 수행되었다. UR-qPCR은 GENEHECER(Genesystem Co., Ltd., Korea)를 사용하여 95°C, 30 s 의 pre-denaturation 후, denaturation 95°C, 3 s, annealing 57°C, 3 s, polymerization, 72°C, 3 s. 의 50회전을 수행하였다. 각 실험들은 각기 삼반복되었다.

2.7 SCIRA

SCIRA와 UR-qPCR을 비교하기 위해 73개의 꿀 샘플 중 10개를 무작위로 선택하고, 전문기관에 해당 시료에 대한 SCIRA 시행을 요청하였다.

3. Results and Discussion

3.1 Sensitivity of sugar beet-specific detection primers by UR-qPCR

UR-qPCR은 pTOP-beet-RdDp_315를 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ 분자로 연속 희석한 후 B_RdDp315 dF/dR 프라이머로 수행되었으며 최대 10개의 분자를 검출할 수 있었다. 이 PCR 시스템은 비트 특이적 유전자인 RdDp의 분자를 최대 10개까지 검출할 수 있을 정도로 매우 민감하였다. DNA 분자의 Ct 값은 13.42, 17.28, 20.24, 23.57, 27.37, 29.76, 33.05, 36.63 이었다. PCR은 반응 특이성의 척도로 용점 분석이 필요한 사이버 그린 시스템이며, 분석 결과 PCR 산물의 Tm 값은 80.20 ± 0.18 이었다. 각 DNA 분자에 대한 Ct 값을 플로팅하면 $y = -3.2575x + 39.823$ 의 회귀식이 산출되어 꿀에 있는 사탕무 관련 유전자의 수를 계산할 수 있었다. 회귀 상수 R2는 0.9985로 계산되었다(그림 226).

pTOP_RdDp315 molecules	Ct(cycle)	Tm(°C)
1×10^8	13.42 ± 0.08	80.41 ± 0.24
1×10^7	17.28 ± 0.84	80.41 ± 0.24
1×10^6	20.24 ± 1.41	80.30 ± 0.17
1×10^5	23.57 ± 0.47	80.19 ± 0.08
1×10^4	27.37 ± 0.35	80.30 ± 0.17
1×10^3	29.76 ± 0.54	80.04 ± 0.17
1×10^2	33.05 ± 0.13	79.97 ± 0.17
1×10^1	36.63 ± 0.41	79.97 ± 0.17
		80.20 ± 0.18

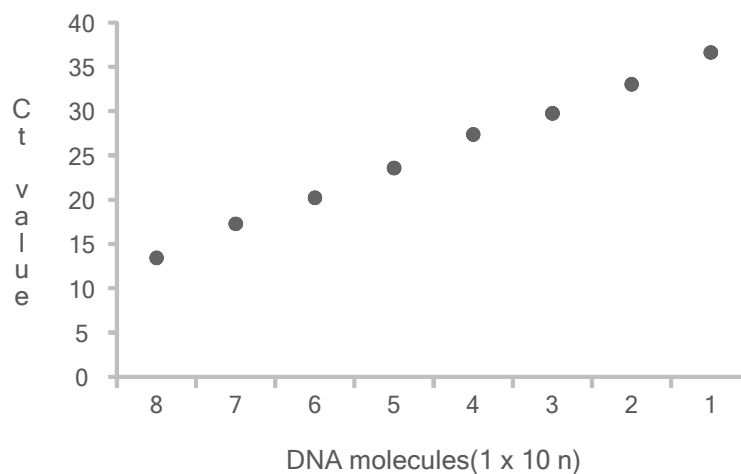


Fig. 226 Sensitivity of sugar beet-specific detection primers (B_RdDp315 dF/dR) in ultra-rapid quantitative PCR

UR-qPCR was performed with the B_RdDp315 dF/dR primers and pTOP_beet_RdDp315. The template was 10 times serially diluted from 108 to 100 molecules. UR-qPCR was performed using GENECHECER (Genesystem Co., Ltd., Korea) under the following conditions: pre-denaturation at 95°C for 30 s, followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 3 s, annealing at 59°C for 3 s, and polymerization at 72°C for 3 s. Plotting of the Ct value for each DNA molecule yielded a regression formula of $y = -3.2575x + 39.823$. The regression constant R2 was calculated to be 0.9985.

UR-qPCR의 실행시간은 19분 51초로 기존의 Real-Time PCR에 비해 현저히 짧았다. 이 결과는 물에 용해된 재조합 DNA를 주형으로 사용하여 얻은 것이다. 그러나 꿀의 당 함량이 분석에 미치는 영향을 고려하여 pGEM-cane-cp를 사용하여 33% 꿀로 1×10^7 에서 1×10^1 분자를 희석하여 UR-qPCR을 수행하였다(11). Ct 값이 약 1 cycle 감소하는 경향을 관찰했지만 증류당과 33% 꿀 모두에서 최대 1×10^2 분자를 감지할 수 있었다(데이터는 미제시). 따라서 우리는 이 유전자 검출 방법을 실제 꿀에 적용할 수 없다고 판단하였다.

3.2 Sensitivity of sugar beet-specific nested primers by UR-qPCR

Nested PCR에 특이적으로 설계된 프라이머 RdDp_315 nF1/nR1의 민감도를 확인하기 위해 PCR을 수행하였다. 최대 10개의 분자가 감지되었다. UR-qPCR 시스템에서 B_RdDp_315 nF1/nR1 프라이머는 민감하며 10분자의 RdDp 유전자도 감지할 수 있었다. 이 nested PCR은 또한 최대 10개 분자의 검출에 대해 높은 감도를 보여주었다. 앰플리콘의 Tm 값은 77.03 ± 0.21 이었다. 회귀식 $y = -3.4046x + 39.467$ 은 각 DNA 분자 수에 대한 Ct 값을 플롯하여 얻었다. 회귀 상수 R2는 0.997로 계산되었다. 이 중첩 PCR은 21분 13초가 소요되었으며 검출 PCR보다 약 1분 22초 느렸다(그림 227).

pTOP_RdDp315 molecules	Ct (Cycle)	Tm (°C)
1×10^8	12.48 ± 0.07	77.28 ± 0.19
1×10^7	15.48 ± 0.08	77.28 ± 0.19
1×10^6	18.47 ± 0.10	77.06 ± 0.19
1×10^5	22.44 ± 0.07	77.06 ± 0.19
1×10^4	26.08 ± 0.40	77.06 ± 0.19
1×10^3	29.61 ± 0.39	76.95 ± 0.19
1×10^2	33.26 ± 0.04	76.62 ± 0.19
1×10^1	35.34 ± 0.04	76.95 ± 0.19
		77.03 ± 0.21

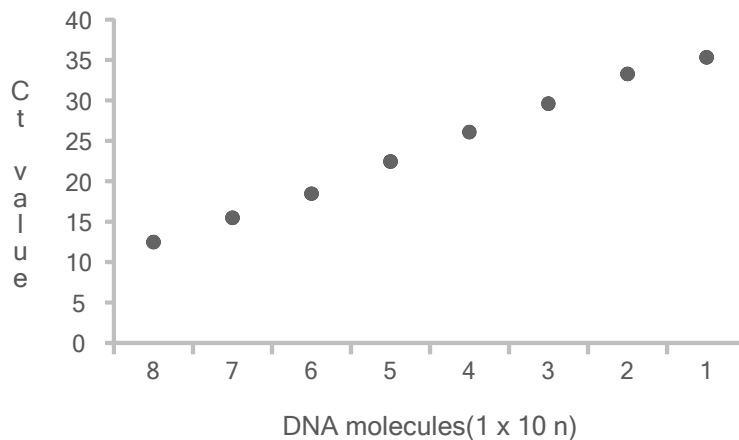
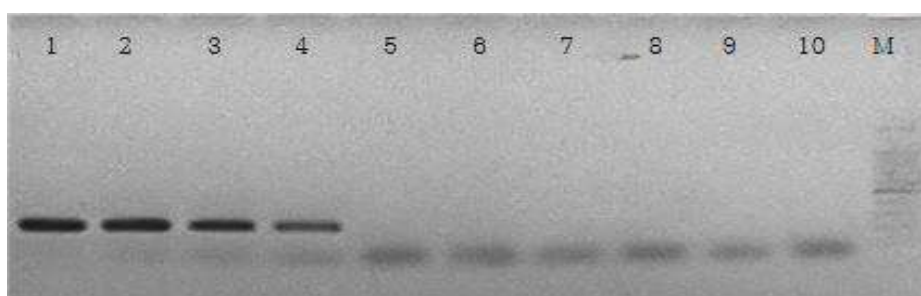
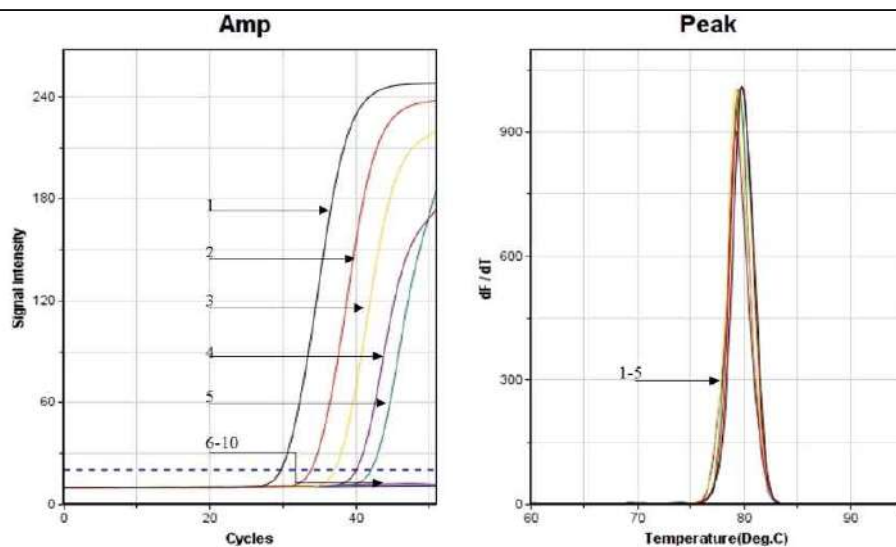


Fig. 227 Sensitivity of sugar beet-specific detection primers (B_RdDp315 nF1/nR1) in ultra-rapid quantitative PCR

UR-qPCR was performed using the B_RdDp315 nF1/nR1 primers and pTOP_beet_RdDp315. The template was 10 times serially diluted from 10⁸ to 10⁰ molecules. UR-qPCR was performed using GENECHECER (Genesystem Co., Ltd., Korea) under the following conditions: pre-denaturation at 95°C for 30 s, followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 3 s, annealing at 57°C for 3 s, and polymerization at 72°C for 3 s. Plotting of the Ct value for each DNA molecule yielded a regression formula of $y = -3.4046x + 39.467$. The regression constant R² was calculated to be 0.997.

3.3 Detection of sugar beet-specific gene in honey by UR-qPCR

생산된 상업용 꿀에 UR-qPCR을 사용하여 사탕무 특이적 유전자 검출 방법을 적용하였다. 꿀에서 분리한 잔류 유전자를 주형으로 사용하여 UR-qPCR을 수행하였다. 분석된 T_m 값의 범위는 66도에서 81도까지이며, 15개의 샘플은 40사이클 이상의 Ct 값을 가졌고 1개의 샘플은 30사이클 이상의 Ct 값을 가졌다(표 2). 일반적으로 Ct 값이 30 이상이면 Real-Time PCR로 정확한 정량을 하기 어렵기에 전체적으로 57개의 샘플은 측정할 수 없었다(그림 228, 표 109).



Lane	Sample	Ct (Cycle)	Tm (°C)
1	1×10^4 of pTOP-RdDp315	29.43	79.95
2	1×10^3 of pTOP-RdDp315	33.40	79.95
3	1×10^2 of pTOP-RdDp315	36.51	79.30
4	1×10^1 of pTOP-RdDp315	39.35	79.30
5	1×10^0 of pTOP-RdDp315	41.31	79.63
6	20-32	0.00	0.00
7	20-33	0.00	0.00
8	20-34	0.00	0.00
9	20-35	0.00	0.00
10	No template	0.00	0.00
			79.63 ± 0.29

Fig. 228 Detection of sugar beet-specific gene in honey sample by ultra-rapid qPCR
 Ultra-rapid qPCR was performed using the B-RdDp315 dF/dR primers. The Tm value of the recombinant standard DNA was 79.63 ± 0.29 , and the Ct and Tm values of all samples were not measured. Lane 1-5: recombinant standard DNA; lane 6: 20-32; lane 7: 20-33; lane 8: 20-34; lane 9: 20-35; lane 10: no template. Electrophoresis was performed to identify PCR products with a size of 315 bp. A: Amplification graph and melting curve analysis graph; B: 1.5% agarose gel electrophoresis of UR-qPCR performed for 40 min at 50 V; M: Marker (100 bp DNA ladder, intron); C: Ct and Tm values of each sample.

따라서 정확한 PCR 결과를 확인하기 위해 Nested PCR을 수행하였다. PCR 산물 내에는 Nested PCR의 정확한 성능을 방해하는 물질들이 존재하기에, 1차 PCR 산물을 적절히 희석하여 2차(nested PCR)의 초기 기질로 사용하였다. 따라서 UR-qPCR을 통해 얻은 앰플리콘을 100배 희석하여 PCR용 템플릿으로 사용하였다. Ct 및 Tm 값은 검출 PCR에 비해 중첩 PCR에서 증가하였다. 그림 3과 4에서 볼 수 있듯이 검출 PCR로 20-34개 샘플에 대한 Ct 및 Tm 값을 검출하지 못하였다. 그러나 Tm 및 Ct 값은 양성 대조군의 경우 각각 77.37 및 29.49였으며, 151 bp로 보이는 밴드를 전기영동하여 겔 상에서 예상되는 PCR 산물의 크기와 비교하여 관찰하였다.

Nested PCR을 수행한 후, 비트 특이적 유전자는 9개의 샘플에서 검출되었다. 이 평가의 근거는 Tm과 Ct였다. 9개의 샘플 중 18-16 및 18-17은 각각 9.51 및 8.73의 유의하게 높은 Ct 값을 나타내었다. 또한 Tm 값에는 비트별 앰플리콘이 더 많았지만 Ct 값은 33주기 이상으로 꿀의 불순물을 결정하기에는 너무 작은 것으로 간주된다(표 109, 그림 229).

Table 109. Detection of sugar beet-specific target gene in honey

No.	Sample	Detection PCR			Nested PCR		Result	Stable isotope ratio (‰)
		Ct (Cycle)	Tm (°C)	Result	Ct (Cycle)	Tm (°C)		
1	18-01	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
2	18-02	0.00	0.00	x	40.48	76.54	x	
3	18-03	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
4	18-04	0.00	0.00	x	44.42	73.08	x	
5	18-05	0.00	0.00	x	43.31	76.15	x	
6	18-06	0.00	0.00	x	38.10	75.38	x	
7	18-07	0.00	0.00	x	33.46	76.54	x	
8	18-08	46.46	81.46	x	28.45	76.54	o	
9	18-09	48.52	0.00	x	0.00	0.00	x	
10	18-10	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
11	18-12	0.00	0.00	x	42.35	0.00	x	
12	18-13	0.00	0.00	x	30.50	77.50	o	
13	18-14	46.10	68.25	x	0.00	0.00	x	
14	18-15	0.00	0.00	x	31.46	77.17	o	
15	18-16	42.76	66.93	x	9.51	77.17	o	
16	18-17	42.12	77.83	x	8.73	77.50	o	
17	18-18	0.00	0.00	x	39.94	73.93	x	
18	18-19	0.00	0.00	x	44.76	0.00	x	
19	18-20	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
20	19-01	46.00	68.18	x	45.37	75.52	x	-26.1
21	19-02	0.00	0.00	x	24.13	77.50	o	-26.4
22	19-03	34.31	78.97	x	10.37	77.50	o	-27.0
23	19-04	0.00	0.00	x	45.22	0.00	x	-26.8
24	19-05	0.00	0.00	x	44.74	75.52	x	
25	19-06	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
26	19-07	0.00	0.00	x	42.39	75.19	x	-26.3
27	19-08	40.15	68.18	x	44.29	0.00	x	

28	19-09	0.00	0.00	x	46.83	0.00	x	
29	19-10	46.05	67.52	x	0.00	0.00	x	
30	19-11	0.00	0.00	x	43.45	0.00	x	
31	19-12	0.00	0.00	x	46.55	0.00	x	
32	19-13	46.11	68.50	x	43.39	0.00	x	
33	19-14	45.12	68.50	x	46.62	0.00	x	
34	19-15	44.11	68.18	x	45.31	0.00	x	
35	19-16	48.46	0.00	x	44.30	0.00	x	
36	19-17	44.40	68.58	x	43.96	0.00	x	
37	19-18	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
38	20-01	0.00	0.00	x	43.06	0.00	x	
39	20-02	0.00	0.00	x	48.29	0.00	x	
40	20-03	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
41	20-04	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
42	20-05	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
43	20-06	44.99	68.18	x	0.00	0.00	x	-26.3
44	20-07	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
45	20-08	0.00	0.00	x	21.08	77.32	o	
46	20-09	48.49	0.00	x	42.94	0.00	x	-27.2
47	20-10	0.00	0.00	x	47.39	83.55	x	
48	20-11	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
49	20-12	0.00	0.00	x	47.40	0.00	x	
50	20-13	0.00	0.00	x	34.52	77.34	x	
51	20-14	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
52	20-15	0.00	0.00	x	38.27	74.07	x	
53	20-16	0.00	0.00	x	38.19	74.72	x	
54	20-17	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	-26.1
55	20-18	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
56	20-19	0.00	0.00	x	47.51	77.01	x	
57	20-20	0.00	0.00	x	44.49	0.00	x	
58	20-21	0.00	0.00	x	41.51	0.00	x	
59	20-22	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
60	20-23	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
61	20-24	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
62	20-25	0.00	0.00	x	38.09	75.37	x	
63	20-26	0.00	0.00	x	41.47	74.72	x	
64	20-27	0.00	0.00	x	0.00	0.00	x	
65	20-28	0.00	0.00	x	41.01	74.39	x	
66	20-29	0.00	0.00	x	41.58	75.37	x	
67	20-30	0.00	0.00	x	39.29	77.34	x	-22.8
68	20-31	0.00	0.00	x	44.51	74.72	x	
69	20-32	0.00	0.00	x	38.31	74.39	x	
70	20-33	0.00	0.00	x	43.56	0.00	x	
71	20-34	0.00	0.00	x	29.49	77.34	o	
72	20-35	0.00	0.00	x	44.12	0.00	x	

73	20-36	0.00	0.00	x	38.31	77.01	x	-26.9
----	-------	------	------	---	-------	-------	---	-------

벌꿀이 *Apis mellifera*로 생산된 경우에도 유사한 결과가 얻어졌다(자료 미제시). 우리의 결과는 벌꿀 샘플에 nested PCR의 적용을 확장하여 벌꿀에서 미량의 사탕무 유전자를 검출하는 어려움을 극복하였다. 그러나 Nested PCR에 대한 정량화 방법이 없으므로 향후 정량화 연구가 필요할 것이다.

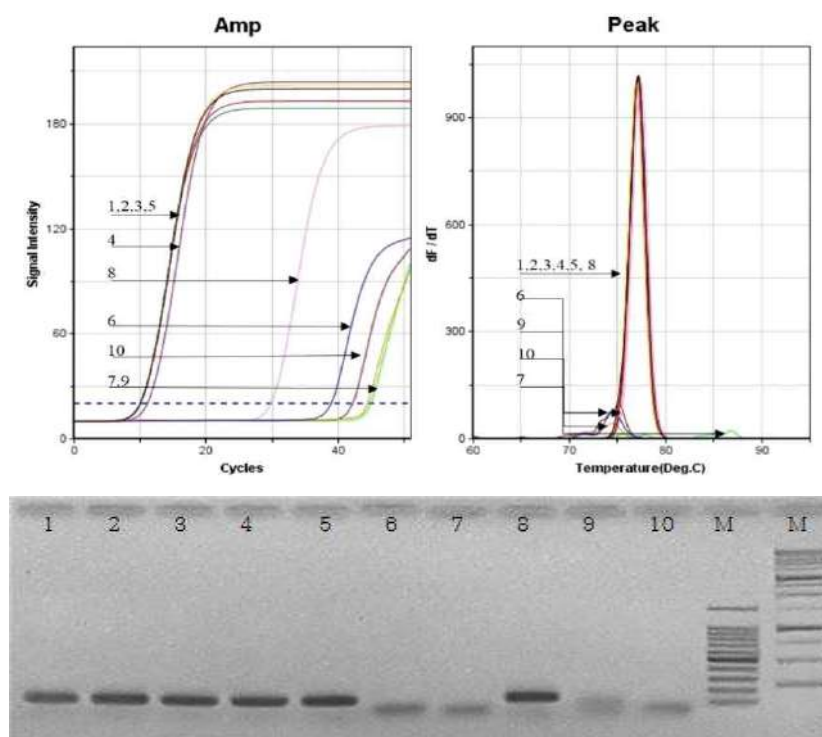
3.4 Analysis of SCIR

한국식품산업공단에 따르면 규격기준은 천연벌꿀의 경우 -22%이하, 혼합벌꿀의 경우 -22%이상이다. 검사를 의뢰한 검체는 19-01, 19-02, 19-03, 19-04, 19-07, 20-06, 20-09, 20-17, 20-30, 20-34였다. 값의 범위는 -22%에서 -27%이다. 모든 샘플은 Codex 사양을 통과하였다. 그러나 19-02 및 19-03 샘플은 nested PCR을 사용하여 사탕무 유전자로 검출되었다.

4. Conclusion

UR-qPCR은 사탕무의 잔류 DNA를 사용하여 사탕무의 특정 유전자를 검출하는 데 사용되었다. 기존 꿀의 CTAB. PCR을 이용한 잔류 유전자 검출 방법은 아직 개발되지 않았다. 이 방법은 비트 특이적 유전자를 증폭하고 정량화할 수 있게 하였다. Nested PCR은 1차 PCR의 증폭을 확인하였다. 또한, 우리의 결과는 nested PCR이 미량의 DNA를 감지할 수 있음을 보여주었다.

이 PCR 시스템의 장점은 짧은 실행 시간이다. RdDp-specific PCR의 실행 시간은 용점 분석을 포함하여 19분 51초였다. 또한, nested PCR은 21분 13초에 수행되었으며, 1시간 내에 불순물이 섞인 꿀을 평가할 수 있었다. UR-qPCR은 기존의 qPCR보다 빠르고 다른 분석 기술의 결과를 얻는 데 필요한 시간보다 훨씬 빠르다. Nested PCR이 있는 UR-qPCR을 사용하여 다양한 다른 분석 기술과 함께 꿀의 불순물을 검출할 수 있다고 제안한다.



Lane	Sample	Ct (Cycle)	Tm (°C)
1	Amplicon of pTOP-RdDp315 at 1×10^4	10.50	77.01
2	Amplicon of pTOP-RdDp315 at 1×10^3	10.52	77.01
3	Amplicon of pTOP-RdDp315 at 1×10^2	10.54	77.01
4	Amplicon of pTOP-RdDp315 at 1×10^1	11.54	77.01
5	Amplicon of pTOP-RdDp315 at 1×10^0	10.53	77.34
6	Amplicon of 20-32	38.31	74.39
7	Amplicon of 20-33	43.56	0.00
8	Amplicon of 20-34	29.49	77.34
9	Amplicon of 20-35	44.12	0.00
10	No template	41.42	75.05
			77.08 ±
			0.13

Fig. 229 Confirmation of sugar beet-specific gene in honey sample using nested PCR
 Nested PCR was performed using the B_RdDp315 nF1/nR1 primers. A $100\times$ diluted amplicon of UR-qPCR (Fig. 3) was used as template. Lane 8 (20-34) had a Tm value of 77.34, consistent with the Tm value of pTOP-RdDp315, and a Ct value of 29.49. Electrophoresis was performed to identify PCR products with a size of 151 bp. A: Amplification graph and melting curve analysis graph; B: 1.5% agarose gel electrophoresis of UR-qPCR performed for 40 min at 50 V; M: Marker (left: 100 bp DNA ladder, Intron, right: 1 kb DNA marker, GeneDirex); C: Ct and Tm values of each sample.

인용 문헌

Aishath Naila, Steve H. Flint, A. Z. Sulaiman, Azilah Ajit, Zuben Weeds. 2018. Classical and novel approaches to the analysis of honey and detection of adulterants. *Food Control* 90:152-165

Elisabeta-Irina Geană, Corina Teodora Ciucure, Diana Costinel, Roxana Elena Ionete. 2020. Evaluation of honey in terms of quality and authenticity based on the general physicochemical pattern, major sugar composition and $\delta^{13}C$ signature. *Food Control* 109:106919

Improved detection of honey adulteration by measuring differences between $^{13}C/^{12}C$ stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography - isotope ratio mass spectrometry ($\delta^{13}C$ -EA/LC-IRMS) *Apidologie* 39 (2008) 574-587

Kim, B. H., Kim, S. M., Kim, M. J., Kim, J. M., Truong, A. T., Yoon, B. S. 2018. Detection of Sugar Cane (*Saccharum officinarum*)-specific Gene from Sugar and Sugar-honey. *Journal of Apiculture* 33(3): 221-226.

Kim, S. M., Kim, B. H., Kim, M. J., Kim, J. M., Truong, A. T., Yoon, B. S. 2018. Detection of Sugar Beet (*Beta vulgaris*)-Specific Gene from Honey Made by Sugar of Sugar Beet. *Journal of Apiculture* 33(3): 213-219.

Kuan Wei Sea, Roswanira Abdul Wahab Syariffah Nuratiqah Syed Yaacob, Sib Krishna Ghoshald. 2019. Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends. *Journal of Food Composition and Analysis* 80:16-32

Lara Sobrino-Gregorio, Santiago Vilanova, Jaime Prohens Isabel Escriche. 2019. Detection of honey adulteration by conventional and real-time PCR. *Food Control* 95:57-62

María José Aliaño-González, Marta Ferreiro-González, Estrella Espada-Bellido, Gerardo F. Barbero, Miguel Palma. 2020. Novel method based on ion mobility spectroscopy for the quantification of adulterants in honeys. *Food Control* 114:107236

Rapid detection of deformed wing virus in honeybee using ultra-rapid qPCR and a DNA-chip. *J Vet Sci.* 2020 Jan;21(1):e4 <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e4>

Sónia Soares, Joana S. Amaral, Maria Beatriz P. P. Oliveira, Isabel Mafra. 2015. Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification. *Food Control* 48:130-136

Tsunashi Kamo, Yoshinobu Kusumoto, Yoshinori Tokuoka, Satoru Okubo, Hiroshi Hayakawa, Mikio Yoshiyama, Kiyoshi Kimura & Akihiro Konuma. 2018. A DNA barcoding method for identifying and quantifying the composition of pollen species collected by European honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Applied Entomology and Zoology* 53:353-361

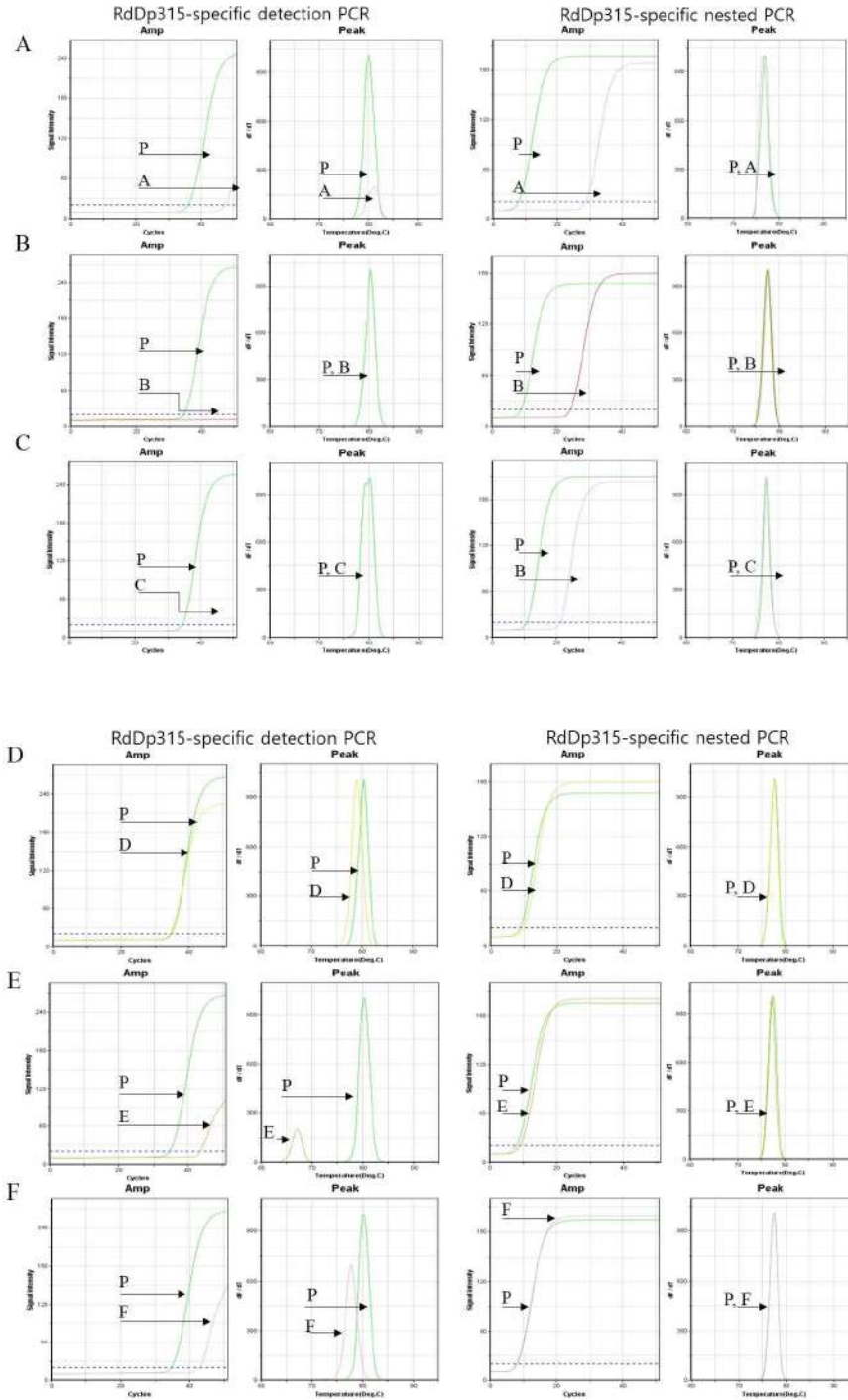


Fig. 230 Detection of sugar beet-specific gene in honey sample

With B_RdDp315 dF/dR primers and the DNA extracted from sample as template, UR-qPCR was performed using GENECHECKER under the following conditions: pre-denaturation at 95°C for 30 s, followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 3 s, annealing at 59°C for 3 s, and polymerization at 72°C for 3 s. After detection PCR, the 100 times diluted PCR product was used as template for nested PCR, which was performed using 10 pmole/μL beet_RdDp315 nF/nR primers under the following conditions: pre-denaturation at 95°C for 30 s, followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 3 s, annealing at 57°C for 3 s, and polymerization at 72°C for 3 s. P: 102 molecules of pTOP-RdDp315; A: sample 18-08; B: 19-02; C: 20-08; D: sample 19-03; E: 18-16; F:18-17.

/// 끝 //////////////////////////////////////

아래의 논문은 본 과제인 “토종꿀의 잔류 유전자를 이용한 사탕수수 고유 유전자 및 사탕무우 고유 유전자의 detection PCR 및 nested PCR검출법”을 널리 활용하기 위하여 제반 조건을 국문 논문화 시킨 것이다. 이는 우선 국내의 표준 실험 법으로 활용되고자 2021년 가을에 “한국양봉학회지”에 “벌꿀의 잔류 DNA에서 사탕수수 또는 사탕무우 고유 유전자 검출을 위한 표준 유전자 검사법”의 제목으로 투고되었으며, 2021년 9월24일 동 학회지에서 게재 승인을 받았다. 논문은 가장 간결하게 내용을 정리한 것이기에, 보다 요약하여 본 보고서에 기재하였다.

/// 시작////////////////////////////////////

벌꿀의 잔류 DNA에서 사탕수수 또는 사탕무우 고유 유전자 검출을 위한 표준 유전자 검사법

Standard protocols for molecular detection of specific genes originated Sugar-cane or Sugar-beet among residual DNA in honey

Abstract

천연 꿀과 불순물이 섞인 꿀을 구별하기 위해 SugarCane 특이적 검출 PCR 및 nested PCR 또는 SugarBeet 특이적 검출 PCR 및 꿀에서 분리된 잔류 DNA에 대한 nested PCR에 대한 표준 프로토콜을 설정하였다. 제안된 프로토콜에 따라 Kim et al. (2021). SugarCane 특이적 검출 PCR 및/또는 SugarBeet 특이적 검출 PCR은 꿀 샘플에서 분리된 DNA 샘플을 초기 템플릿으로 사용하여 수행되었다. 그런 다음 SugarCane-specific nested PCR 및/또는 SugarBeet-specific nested PCR도 초기 템플릿으로 동일한 꿀의 1차 라운드 PCR(Detection PCR) 제품의 1/000 희석액으로 수행하였다. 이러한 종류의 PCR에 대한 각각의 재료 또는 시약 및 실험 조건은 8개의 꿀 샘플에 대한 사례 연구와 함께 자세히 설명되었다. 제안된 프로토콜은 꿀의 잔류 DNA 분석을 위한 표준 방법으로 널리 사용될 것으로 기대한다.

서 론

벌꿀에는 다양한 출처의 유전자(DNA)가 혼입되어 보존되고 있으며, 밀원의 화분 유전자를 비롯하여 꿀벌 고유의 유전자 및 꿀벌 장내 미생물 유전자, 그리고 환경에서 유래된 미생물 유전자 등 꿀벌이 벌꿀을 생산하는 과정에서 접촉되는 모든 생물체의 흔적이 남아 있게 된다 (Ruppert, K. M., et al., 2019).

이들 유전자 중 가장 많은 것은 화분유전자 (pollen DNA)이며, 이들은 대부분 화분의 형태로 벌꿀에 포함되어 있으나, 그 외의 것은 분해되어 DNA분자의 형태(naked DNA fragments)로 잔류하게 되며, 이 유전자들을 벌꿀의 잔류유전자 (Residual DNA)라 한다.

꿀벌이 벌꿀을 생산하는 과정에서 밀원이 되는 식물체들의 화분들은 자연스럽게 벌꿀 내 축적이 되며, 꽃이 피는 시기에 따라 벚꽃꿀, 아카시아꿀, 밤꿀의 순서로 해당 화분들도 벌꿀 내 일정 수준의 개별 함량을 보이고 있다(Truong et al., 2020).

사탕수수 설탕 또는 사탕무우 설탕에 의해 만들어진 사탕벌꿀은, 천연 벌꿀(Natural honey)의 가치를 크게 위협하고 있으며, 특히 국내 주요 벌꿀인 아카시아벌꿀에 대한 신뢰를 크게 해치고 있다.

설탕은 Sucrose 함량이 99.99%로 표시될 정도로 높은 순도를 자랑하고 있으나, 설탕의 제조가 식물체 사탕수수 줄기 또는 사탕무우의 뿌리를 수집, 세척, 분쇄하고, 이하 정제과정을 거치게 되는 것으로, 이 과정에서 사탕수수, 사탕무우 식물체 고유유전자는 대부분 제거되나, 극미량의 고유 유전자는 최종 제품인 설탕(분말)에 잔류하게 된다.

사탕꿀의 제조에서, 꿀벌에게 설탕물을 사양하게 되면, 극미량의 사탕수수 또는 사탕무우 고유유전자들도 벌꿀로 혼입되

며, 이들 유전자들은 벌꿀의 보존성에 의해 생산된 벌꿀 제품에 그대로 잔류되게 된다.

근래 PCR기술의 발전은 35회전의 PCR에 2시간이 소요되던 2000년대 초반에 비하여, 50회전의 PCR을 10분대에 완료하는 수준에 이르렀다(Kim, et al., 2020, Kim, et al., 2019; Troung et al., 2021a,b). 이런 신속성은 연속된 2차례의 PCR을 수행하는, 즉 1차 PCR산물에 대한 PCR인 nested PCR (2차 PCR)까지 30분 이내에 완료할 수 있게 되어, nested PCR의 활용은 극미량의 특이 유전자에 대한 민감성(sensitivity) 및 정확성(accuracy)을 비약적으로 높일 수 있게 되었다(Kim et al., 2018a; Kim et al., 2018b; Trong et al., 2021c).

본 연구는 사탕수수 및 사탕무 특이 유전자의 증폭법을 처음 발표한 이래(Kim et al., 2018a; Kim et al., 등, 2018b), 다양한 벌꿀 시료에 유전자 검사법을 적용한 결과들을 바탕으로, 사탕수수 유전자 및 사탕무 유전자의 검출 및 정량을 위한 1차, 2차 PCR법을 실용적으로 정리한 것이다.

이 실험법을 사양꿀과 천연꿀의 판별을 위한 벌꿀의 유전자 검사에 표준으로, 또는 실용적 protocol로 제시하고자 한다.

재료 및 방법

국내 벌꿀 8종의 수집

국내에서 생산된 8종의 벌꿀을 수집하였다. 8종 중 6종은 구매한 것으로 사양꿀벌에 의해 생산된 아카시아벌꿀, 밤꿀, 잡화꿀 등이었으며, 2종은 토종벌에 의해 생산된 토종꿀이었다.

또한, 100% 사양꿀이라 표기된 사양꿀을 별도 구매하였으며, 사탕수수 특이 PCR검사에서 검출여부를 확인하였다. 그 외 본 연구진에 검사가 의뢰된 벌꿀들도 시료로 사용되었다(Supplement Data).

사탕수수 고유 유전자를 탑재한 표준물질(standard DNA)

사탕수수 특이 PCR법의 표준물질(Standard material)로써 사탕수수 고유유전자를 탑재한 plasmid, p-SugarCane-cp (pSC)를 사용하였다. 이 재조합 DNA는 사탕수수(Sugar Cane, *Saccharum officinarum*) 엽록체에 위치한 maturase K (matK, GenBank accession No. LN 849913) 유전자를 pGEM-Vector에 탑재한 것으로(Kim et al., 2018), 사탕수수 씨앗의 DNA를 주형으로, cloning용 프라이머, Cane-cp-F (5'-GGATTAATGGTTCCGAACCTG), Cane-cp-R (5'-TTCCGAAAAACCCCGGGTA)의 증폭된 698 bp의 DNA를 클론화 한 것이다(Kim et al., 2018a).

사탕무 고유 유전자를 탑재한 표준물질(standard DNA)

사탕무 특이 PCR법의 표준물질(Standard material)로써 사탕무 고유유전자를 탑재한 plasmid, p-SugarBeet-mt (pSB)를 사용하였다. 이 재조합 DNA는 사탕무 미토콘드리아(Mitochondria)에 위치한 250 bp의 유전자(GenBank accession No. BA000024.1)를 pGEM-Vector에 탑재한 것이다(Kim et al., 2018b).

또한, pTOP-Beet-RdDp315는 사탕무의 genomic DNA에 위치한 RdDP (RNA dependent DNA Polymerase; GenBank Accession no. EF101866) 유전자를 탑재한 재조합 DNA로, 사탕무 고유 유전자 검출에 또 다른 표준물질로 사용되었다.

사탕무의 genomic DNA는 설탕 제조과정 중 naked DNA로 분쇄되어 설탕에 잔류된다. 이는 사양꿀의 잔류유전자를 분리하는 과정에서 mitochondrial DNA 또는 chloroplast DNA 보다 높은 수율로 분리되기에 표준물질로 채택되었다.

한편, 사탕무는 설탕의 제조에서 식물체의 뿌리부위를 사용하며, 사탕수수는 식물체의 줄기부위를 사용한다. 식물세포의 3종 DNA, 즉 Genomic, Mitochondria, Chloroplast DNA는 잎, 줄기, 뿌리에 따라 그 수가 다르며, 일례로 사탕무의 뿌리세포의 Chloroplast DNA는 상대적으로 매우 소수이며, 이는 벌꿀의 잔류 DNA 중 상대적으로 가장 낮은 분자수를 기록하였다.

사탕수수 고유 유전자 증폭을 위한 프라이머들

실험된 많은 프라이머쌍들 중 사탕수수 고유 유전자를 PCR증폭하기 위한 검출용(1차 PCR) 프라이머로 Cane-cp-dF/dR이 선발되었다. 또한, 1차 PCR산물을 재증폭하기 위한 2차 PCR (Nested PCR) 프라이머로 Cane-cp-nF/nR이 선발되었다.

Table 110. Detection- or nested primers for amplification of sugar-cane specific gene

Detection	Cane-cp-dF	5' CACCGCAATTATTTTTATTCTGAG	271bp
PCR	Cane-cp-dR	5' GAACATCTTGAATCCGGTATTC	
Nested	Cane-cp-nF	5' CTAGGGCAACTATCTTGTC	137bp
PCR	Cane-cp-nR	5' GGATAGGGTATTTCTATATGTGATAG	

사탕무우 고유 유전자 증폭을 위한 프라이머들

실험된 많은 프라이머쌍들 중 사탕무우 고유 유전자를 PCR증폭하기 위한 검출용(1차 PCR) 프라이머로 Beet-mt-dF/dR 이 선발되었다. 이 경우 표준물질은 p-SugarBeet-mt (pSB)를 사용되며, 1차 PCR산물을 재증폭하기 위한 2차 PCR (Nested PCR) 프라이머는 Beet-mt-nF/nR 가 선발되었다(표 111).

또한, pTOP-Beet-RdDp315를 사탕무우 고유 유전자의 표준물질로 사용하는 경우, 사탕무우 고유 유전자를 PCR증폭하기 위한 검출용(1차 PCR) 프라이머로 Beet-RdDP-dF/dR 이 선발되었으며, 1차 PCR산물을 재증폭하기 위한 2차 PCR (Nested PCR) 프라이머로 Beet-RdDP-nF/nR 이 선발되었다(표 112).

Table 111. Detection- or nested primers for amplification of sugar-beet specific mitochondrial gene

Detection	Beet-mt-dF	5' CTCGCTTATCTCTTTCTACCGG	250bp
PCR	Beet-mt-dR	5' GAAATCTCCTTCAGGTTCAAGTCG	
Nested	Beet-mt-nF	5' GAATTGCTGCTTCAAAGTTTTTC	196bp
PCR	Beet-mt-nR	5' CAATTCTCCTATTCTCCTGC	

Table 112. Detection- or nested primers for amplification of sugar-beet specific RNA dependent DNA polymerase gene

Detection	Beet-RdDP-dF	5' ATGTGTAGTGCCCATATTTG	315bp
PCR	Beet-RdDP-dR	5' GCATTATGAGGAGTGTTTAGTAC	
Nested	Beet-RdDP-nF	5' AGCGCTTCTTCATTCCAAGA	160bp
PCR	Beet-RdDP-nR	5' CCTTGGTAGGGAATGGAAGG	

사탕수수 또는 사탕무우 고유 유전자 증폭을 위한 초고속 PCR 의 조성

사탕수수 및 사탕무우 고유 유전자 검출을 위한 초고속 PCR은 1) Cane-specific detection PCR, 2) Beet-specific detection PCR, 3) Cane-specific Nested PCR, 4) Beet-specific Nested PCR의 4종 PCR을 순차적으로 실시하는 것이다.

Detection PCR에서 주형 DNA용액은, 표준 DNA 또는 벌꿀시료에서 분리한 DNA 용액을 사용하였으며, 한편 Nested PCR에서 주형 DNA용액은 해당 PCR 산물을 1/1000 또는 1/10000으로 희석하여 그 희석액 1 µl를 사용하였다.

초고속 PCR에서 각 개별 PCR의 총량은 10 μ l이었으며, 증류수 2 μ l에 주형 DNA를 1 μ l 넣어주고, 이에 PCR 종류에 따른 Primer들, 즉 forward primer와 reverse primer를 각 1 μ l (10 pmole/ μ l) 씩을 넣고, 이에 5 μ l 2x Rapi:Detect Master mix (Genesystem Co., Korea)을 넣어 총 10 μ l로 조성하였다.

사탕수수 또는 사탕무우 고유 유전자 증폭을 위한 4종 초고속 PCR 의 조건들

초고속 PCR은 Genechecker II (Genesystem, Korea)를 사용하였으며, 이 기기에 사용되는 PCR-Chip은, 각 10 μ l 씩인 10개 PCR이 동시에, 같은 온도 및 시간조건으로 운용할 수 있게 되었다.

사탕수수 및 사탕무우 고유 유전자 검출을 위한 초고속 PCR의 온도 및 시간에 대한 일반조건은 초기변성 95°C 30 sec 후, 95°C 변성 3 sec, 55°C 혼성 3 sec, 72°C 중합 3 sec를 1 회전으로 하여 총 50 회전을 수행하는 것이다. 이는 10개의 개별 PCR을 4종 프라이머쌍들을 한번의 초고속 PCR로 동시에 수행(같은 온도 및 시간)하였을 때 사용되었다.

그러나 초고속 PCR에서 각 PCR의 종류에 따라 최적 온도 및 시간 조건은 조금씩 상이하였으며, 특히 혼성 온도 및 시간은 53°C 혼성 4초(beet-mt-detection PCR), 또는 55°C 혼성 4초(cane-detection PCR; cane-nested PCR), 57°C 혼성 4초(beet-RdDP-nested PCR), 59°C 혼성 3초(beet-RdDP-detection PCR)에서 보다 높은 증폭성능을 보여주었다.

그러나, 전술한 일반 공통조건으로 4종 초고속 PCR을 모두 운용하더라도 PCR증폭에 큰 차이는 보이지 않았으며, 같은 조성에서 약간의 Ct값 감소를 보여주었다.

또한, 초고속 PCR에서 각 온도단계(step)의 반응시간을 3초에서 4초로 연장하는 것은 유리한 것으로 보였으나, 5초 이상의 반응시간은 불필요한 것으로 판정되었다.

일반 PCR기기를 사용한 사탕수수 또는 사탕무우 고유 유전자 증폭

일반 PCR기기를 사용하여 본 검출법이 적용될 수 있는지 여부를 판단하고자, 일반 PCR기기인 PTC-200 Peltier thermal cycler (MJ Research, USA), 그리고 Exicycler™ 96 (Bioneer, Korea)를 사용하여 사탕무/사탕수수 고유 DNA 증폭을 시행하였다.

PCR 조건은 초기변성 95°C에서 5분 진행한 후, 95°C 변성 30초, 55°C 혼성 30초, 72°C 중합 30초를 1 cycle로 하였으며, 총 cycle 수는 40 cycle로 설정하였다.

각 PCR 반응액은 DNA 용액 중 1 μ l를 주형으로 사용하였으며, Cane-specific Detection or nested PCR의 Cane-cp-dF or nF/dR or nR, Beet-specific Detection or nested PCR의 Beet-mt-dF or nF/dR or nR을 각 1 μ M(최종농도)로 조정하여 주었고, AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master Mix (Bioneer, Korea)을 사용하였다.

결과 및 고찰

Beet-specific Detection PCR의 특이성 및 정량성

표준물질 p-SugarBeet-mt (pSB)를 계단 희석하여 초고속 PCR을 수행하였다. 희석된 표준물질은 initial template로 2.1개 특이 분자를 주어져도 특이 증폭되었으며(Ct, 31.71 cycles; Tm, 78.82OC), initial template 103-108분자 구간에서 우수한 정량성이 인정되었다(그림 231).

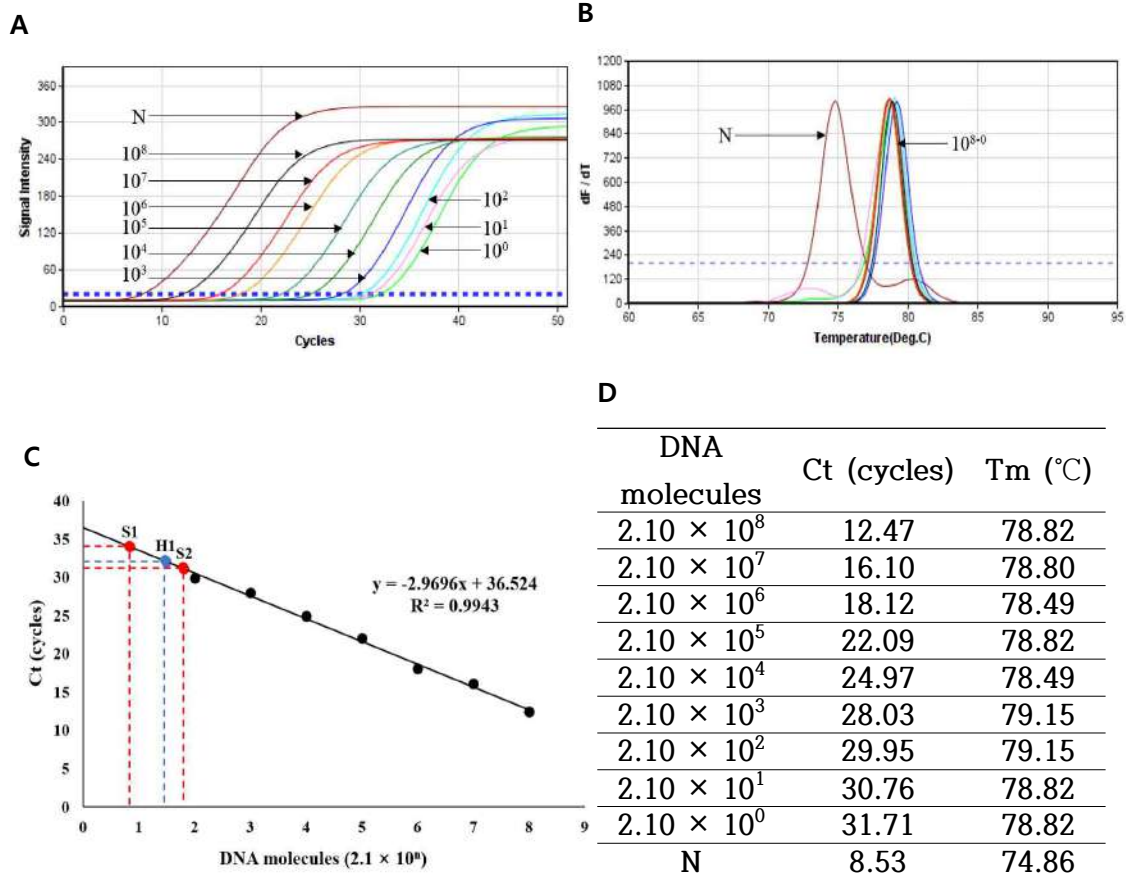


Figure 231. Beet-specific, quantitative detection PCR with 10-fold diluted standard DNA, pSugarBeet-mt (pSB)

Beet-specific quantitative PCR were performed with 10-fold diluted standard DNA, pSugarBeet-mt (pSB). Panel A shows amplification curves, N is negative control using no template. Panel B shows analysis of melting-point. Apex of each peak (dF/dT) indicates each mid-point of melting temperature (Tm) of each PCR product. Panel C shows regression analysis. Regression coefficient was calculated, as $R^2 = 0.9943$. Panel D comprised the number of molecules of initial template, Threshold cycles (CT) in each PCR. In the range of $10^3 - 10^8$ molecules of initial template show acceptable quantities for quantitative analysis.

8개 벌꿀시료의 잔류 DNA에 대한 Cane-specific Detection PCR

벌꿀내 사탕수수 고유 유전자가 존재하는지 여부를 가리기 위하여, 국내 8종의 벌꿀을 수집하여 벌꿀시료로 사용하였다. 벌꿀에서 잔류 DNA를 분리하였고(Kim et al., 2021), 이들 DNA에 대한 Cane-specific Detection PCR을 수행하였다(그림 232).

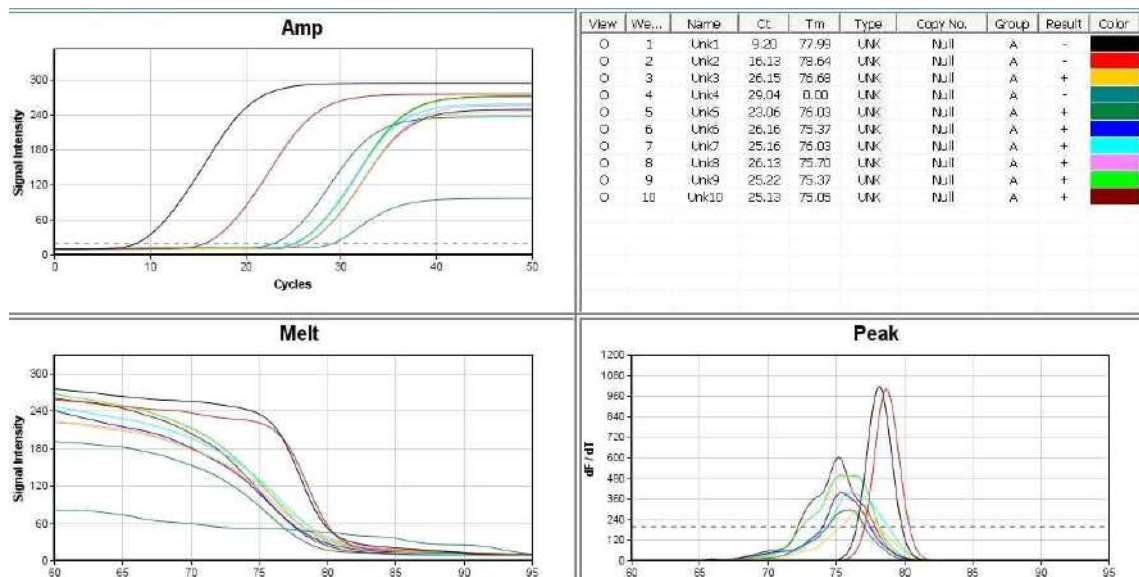


Figure 232. Cane-specific detection PCRs with 8 residual DNA from 8 different honey

The conditions of temperature/incubation-time in cane-detection PCR were 95°C 4 sec, 55°C 4 sec, 72°C 4 sec (50 cycles). 10 pmole Cane-cp-dF/dR primers were used in each PCR. Lane 1 (positive control), 1 ng standard DNA p-Cane-cp (pSC) was used as initial template; lane 2 (positive control), 0.01 ng pSC. In lane 3-10, residual DNA from each honey sample was used as initial template. Left-high, amplification curves of 10 PCRs; Right-high, CT and Tm; Left-low, melting-point analysis; Right, peak-curve ((dF/dT).

Cane-detection PCR은 95°C 4 sec, 55°C 4 sec, 72°C 4 sec (50회전)의 조건에서, 용점분석 완료까지 총 24분 22초가 소요되었으며, positive control인 lane 1과 2는 Ct (Threshold cycles)가 각기 9.20 cycles, 16.13 cycles로 나타나 좋은 정량성을 보여주었다. Tm (Temperature of Mid-point)은 각기 77.99°C, 78.64°C로 측정되어, 같은 특이 PCR product임을 보여주었다(차는 0.65°C).

한편, 벌꿀시료의 DNA를 기질로 사용한 lane 3-10의 일부는, 증폭곡선에서 Ct 값이 23-26 cycles 수준으로 증폭된 듯 보이나, 용점곡선에서 온도의 증가에 따른 형광강도의 기울기가 positive control인 lane 1과 2의 그것과 분명히 구분되며, 피크곡선에서도 lane 1, 2 (Tm평균 78.32°C)와 lane 3-10 (Tm : 75°C- 76°C)은 분명히 다른 Tm값으로 계산되었다.

Cane-detection PCR에서, 이 측정값들은 lane 3-10의 PCR 산물들이 비특이 증폭임을 나타내고 있으며, 이 PCR산물들을 Agarose gel 전기영동으로 확인하였다(그림 233).

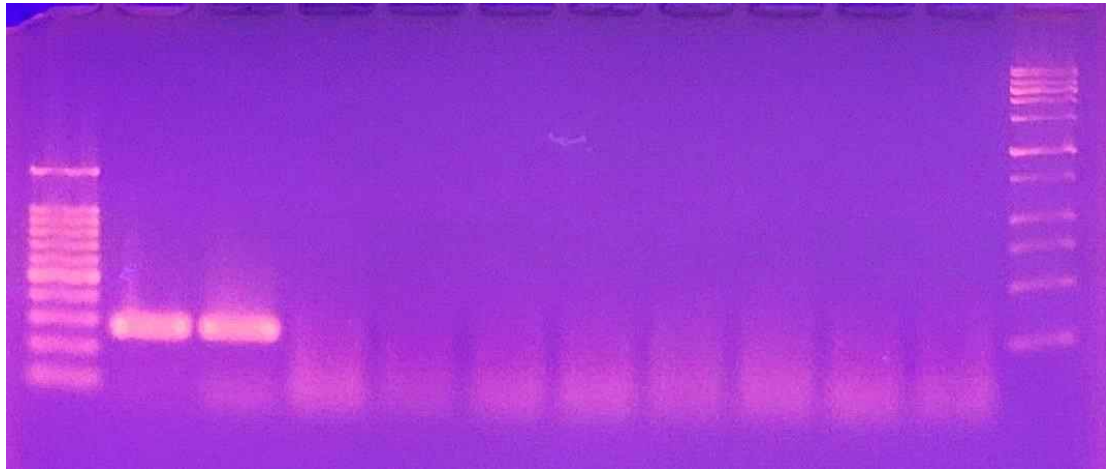


Figure 233. Agarose gel electrophoresis of 8 different cane-specific detection PCRs
 10 cane-specific detection PCR products were separately migrated in 2% Agarose gel, 1xTAE buffer, 50 volt, 45 min long. Left DNA size marker shows 100, 200, 300, 400 bp, etc, right DNA size marker indicates 250, 500, 750 bp etc from lowest band. As positive control, 271bp long-cane specific PCR products were shown in lane 1 and 2. In lane 3-10 non-specific PCR products were shown

8개 벌꿀시료의 잔류 DNA에 대한 Beet-specific Detection PCR

벌꿀 내 사탕무우 고유 유전자가 존재하는지 여부를 가리기 위하여, 국내 8종의 벌꿀을 수집하여 벌꿀시료로 사용하였다. 벌꿀에서 잔류 DNA를 분리하였고(Kim et al. 2021), 이들 DNA들(Cane Detection PCR과 같은 시료)에 대한 Beet-specific Detection PCR을 수행하였다(그림 234).

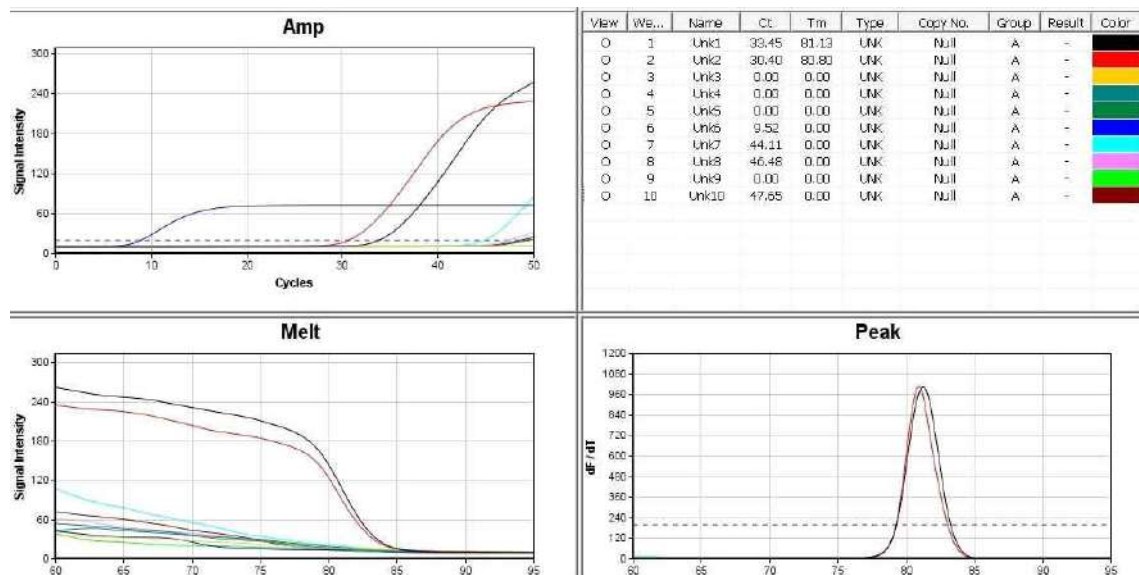


Figure 234. Beet-specific detection PCRs with 8 different residual DNA from 8 honey
 The conditions of temperature/incubation-time in beet-detection PCR were 95°C 4 sec, 59°C 4 sec, 72°C 4 sec (50 cycles). 10 pmole Beet-RdDP-dF/dR primers were used in each PCR. Lane 1 (positive control), 1 ng standard DNA pTOP-Beet-RdDp315 was used as initial template; lane 2 (positive control), 0.01 ng pTOP-Beet-RdDp315; In lane 3-10, residual DNA from each honey sample was used as initial template. Left-high, amplification curves of 10 PCRs; Right-high, CT and Tms; Left-low, melting-point analysis; Right-low, peak-curve ((dF/dT).

Beet-detection PCR은 95°C 4 sec, 59°C 4 sec, 72°C 4 sec (50회전)의 조건에서, 용점분석 완료까지 총 26분 11초가 소요되었으며, positive control인 lane 1과 2는 Ct (Threshold cycles)가 각기 33.45 cycles, 30.40 cycles로 나타나 표준물질의 농도가 정확한 것이었는지 의심이 들었으나, Tm (Temperature of Mid-point)은 각기 81.13°C, 80.80°C로 측정되어, 같은 특이 PCR 산물임을 보여주었다(차는 0.33°C).

한편, 8종 벌꿀시료의 DNA를 기질로 사용한 lane 3-10의 일부는, 증폭곡선에서 Ct 값이 45 cycles 이후의 수준으로 증폭된 듯 보이나, 용점곡선에서 온도의 증가에 따른 형광강도의 기울기가 positive control인 lane 1과 2의 그것과 분명히 구분되며, 피크곡선에서 lane 1, 2 (Tm평균 80.97°C)와 lane 3-10 (Tm 모두 측정되지 않음; 0.00°C)은 분명히 다른 Tm 값으로 계산되었다.

Beet-detection PCR에서, 이 측정값들은 lane 3-10의 PCR 산물들이 비특이 증폭임을 나타내고 있으며, 이 PCR산물들을 Agarose gel 전기영동으로 확인하였다(그림 235).

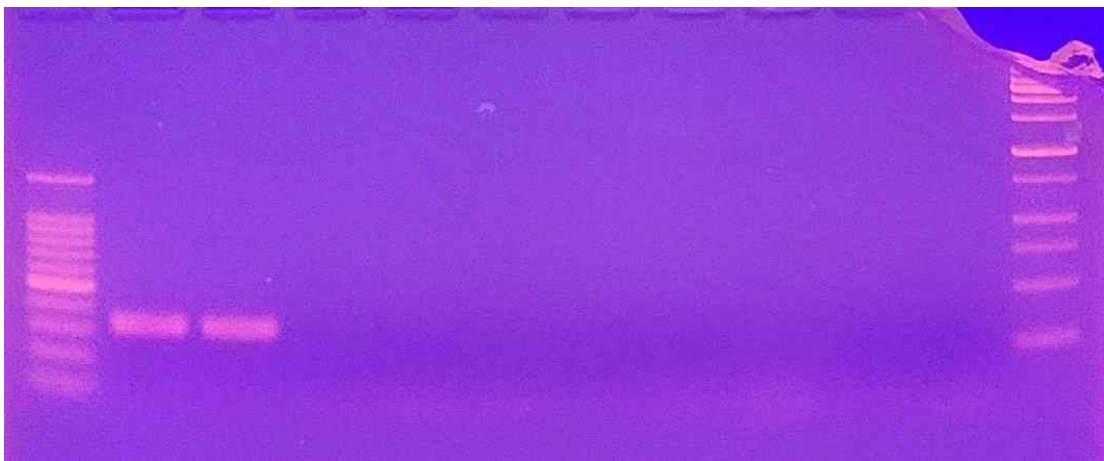


Figure 235. Agarose gel electrophoresis of 8 different Beet-specific detection PCRs

10 beet-specific detection PCR products were separately migrated in 2% Agarose gel, 1xTAE buffer, 50 volt, 45 min long. Left DNA size marker shows 100, 200, 300, 400 bp, etc, right DNA size marker indicates 250, 500, 750 bp etc from lowest band. As positive control, 315bp long-beet specific PCR products were shown in lane 1 and 2. Non-specific PCR products were shown in lane 3-10.

8개 벌꿀시료의 Cane detection PCR product에 대한 Cane-specific Nested PCR

Cane-specific Nested PCR은, 국내 8종 벌꿀 시료에서 잔류 DNA를 분리하고, 각기 Cane Detection PCR을 수행하고, 그 PCR산물들을 각기 1/10000로 희석하여, 희석액 1 µl를 주형으로 사용한 것이다(그림 236).

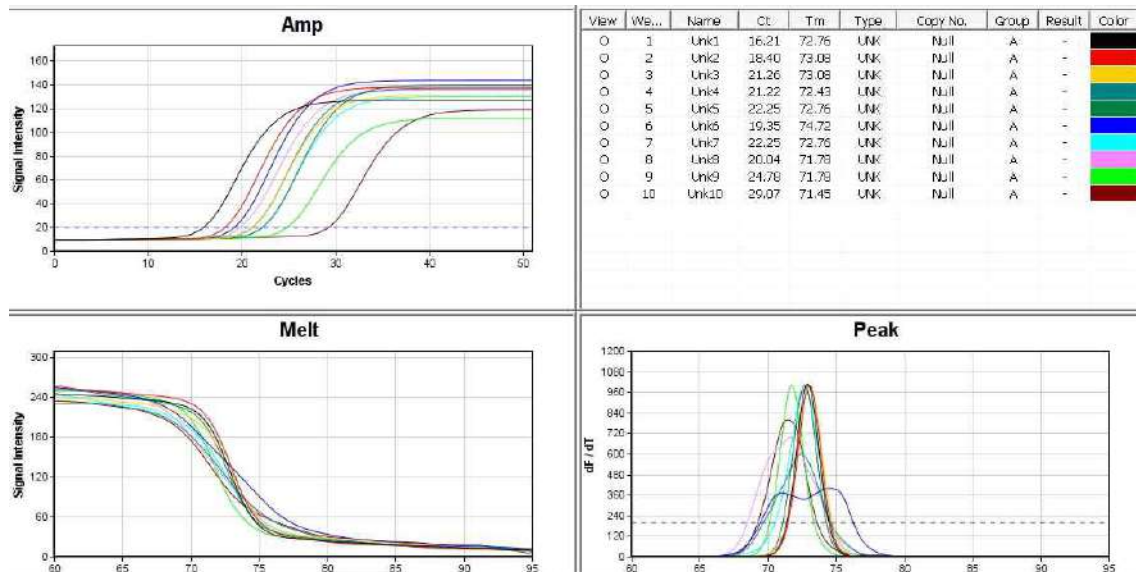


Figure 236. Cane-specific Nested PCRs with 8 different Cane-specific Detection PCRs

The conditions of temperature/incubation-time in cane-nested PCR were 95°C 4 sec, 55°C 4 sec, 72°C 4 sec (50 cycles). 10 pmole Cane-cp-nF/nR primers were used in each PCR. Lane 1 (positive control), 1 ng standard DNA p-Cane-cp (pSC) was used as initial template; lane 2 (positive control), 0.01 ng pSC. In lane 3-10, each 1 µl of 1/10000 diluted Cane Detection PCR product (Fig. 2). Left-high, amplification curves of 10 PCRs; Right-high, CT and Tm; Left-low, melting-point analysis; Right-low, peak-curve ((dF/dT).

Cane-Nested PCR은 95°C 4 sec, 55°C 4 sec, 72°C 4 sec (50회전)의 조건에서, 용점분석 완료까지 총 24분 22초가 소요되었으며, positive control인 lane 1과 2는 Ct (Threshold cycles)가 각기 16.21 cycles, 18.40 cycles로 나타나 정량성을 보여주었고, Tm (Temperature of Mid-point)은 각기 72.76°C, 73.08°C로 측정되어, 같은 특이 PCR 산물임을 보여주었다(차는 0.32°C).

Cane-Nested PCR의 initial template는, 벌꿀시료의 DNA를 기질로 사용한 Cane Detection PCR의 lane 3-10 산물을 각기 1/10000 희석한 희석액 1 µl이었으며, 같은 순서로 Cane-Nested PCR의 lane 3-10을 수행하게 하였다. Lane 3-10은 증폭곡선에서 19.35 cycles에서 29.07 cycles까지 다양한 Ct 값으로 증폭된 듯 보였으며, 증폭선의 형태가 lane 1-2와 유사하였고, 용점곡선에서도 온도의 증가에 따른 형광강도의 기울기가 positive control인 lane 1과 2의 그것과 매우 유사하게 나타났다. 피크곡선에서 lane 1, 2의 Tm값 평균인 72.92°C와 유사하지 않은 것은 lane 6 (Ct, 19.35 cycles; Tm, 74.72°C)뿐 이었다.

Cane Nested PCR에서 나타난 측정값들은 lane 3에서 lane 10까지 모두 사탕수수 특이 유전자의 증폭을 나타내고 있었으나, lane 6 은 Tm (74.72°C)이 표준 DNA의 평균(72.92°C)과 1.80°C의 차를 보이기에, 개별검증을 수행하였다(그림 237).

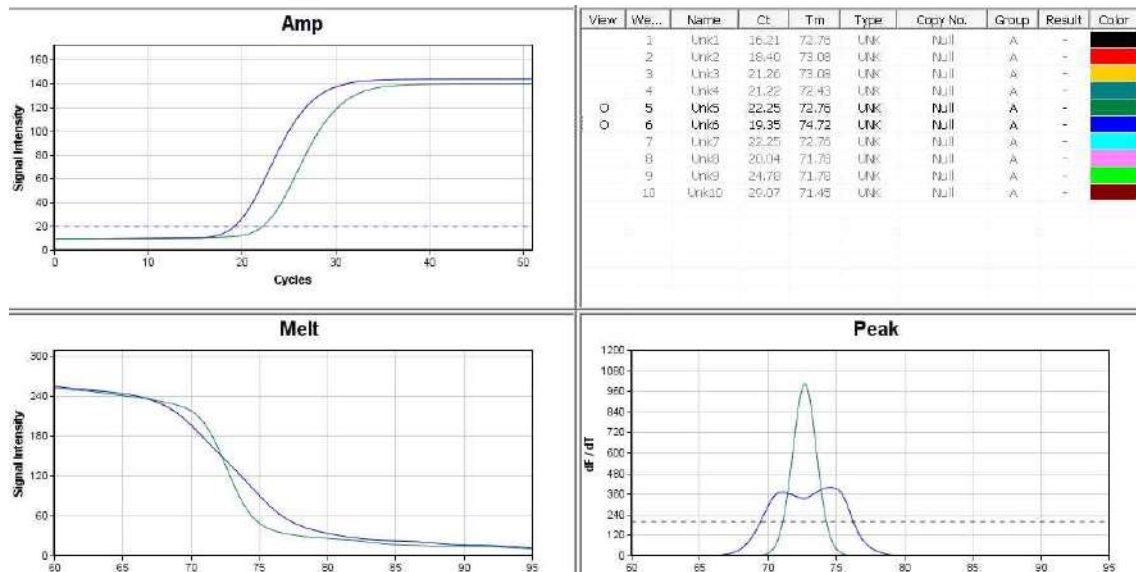


Fig. 237. Cane-specific Nested PCRs with 2 different Cane-specific Detection PCRs

The conditions of temperature/incubation-time in cane-nested PCR were 95°C 4 sec, 55°C 4 sec, 72°C 4 sec (50 cycles). 10 pmole Cane-cp-nF/nR primers were used in each PCR. Lane 5 (green line), lane 6 (blue line) were performed with each 1 µl of 1/10,000 diluted lane 5, lane 6 PCR products, respectively, as initial template in Cane Detection PCR (Fig. 2), Left-high, amplification curves of 2 PCRs; Right-high, CT and Tm; Left-low, melting-point analysis; Right-low, peak-curve ((dF/dT). In peak-curve of lane 6, double peaks were observed.

또한, Cane Nested PCR의 각 산물들은 전기영동으로 과연 137 bp 크기의 사탕수수 특이 유전자의 여부를 확인할 수 있다. 따라서 이 Cane Nested PCR의 PCR산물들은 Agarose gel 전기영동으로 PCR에 측정치에 의한 판정을 재확인하였다(Fig. 238).

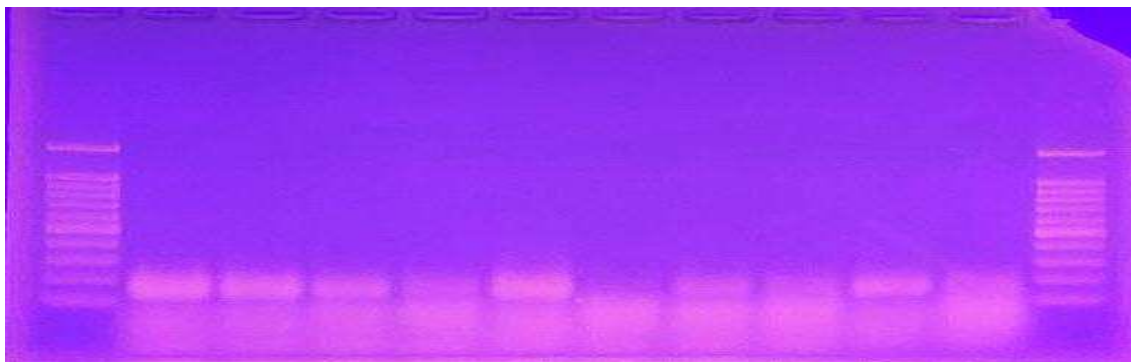


Figure 238. Agarose gel electrophoresis of 8 different Cane-specific Nested PCRs

10 cane-specific nested PCR products were separately migrated in 2% Agarose gel, 1xTAE buffer, 50 volt, 60 min long. Left and right DNA size marker shows 100, 200, 300, 400 bp, etc from lowest band. As positive control, 137 bp long cane specific nested PCR products were shown in lane 1 and 2. Also, 137 bp long PCR products were observed in lane 3, 4, 5, 7, 8, 9 and 10, except lane 6.

Cane Nested PCR의 측정값들에 의한 판정은 lane 6을 제외한 lane 3에서 lane 10까지 모두 양성이었으나, PCR산물의 전기영동에 의한 판정은 lane 6의 음성(검출되지 아니함)을 다시 확인시켜주는 것이었다. 따라서, Cane Nested PCR의 각 lane에 대한 정밀한 개별분석과 더불어 아가로우스 젤 상에서 분명한 137 bp 크기의 사탕수수 특이 유전자 산물을 확인하는 것이 정확한 판정을 위하여 요구된다 할 것이다.

Cane Nested PCR의 결과에 따라, 벌꿀시료 중 사탕수수 고유 유전자의 존재가 확인되는 것은 lane 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10이라 최종 판정될 수 있을 것이다.

8개 벌꿀시료의 Beet detection PCR product에 대한 Beet-specific Nested PCR

Beet-specific Nested PCR은, 국내 8종 벌꿀 시료에서 잔류 DNA를 분리하고, 각기 Beet Detection PCR을 수행하고, 그 PCR산물들을 각기 1/10000로 희석하여, 희석액 1 μ l를 주형으로 사용한 것이다(그림 239).

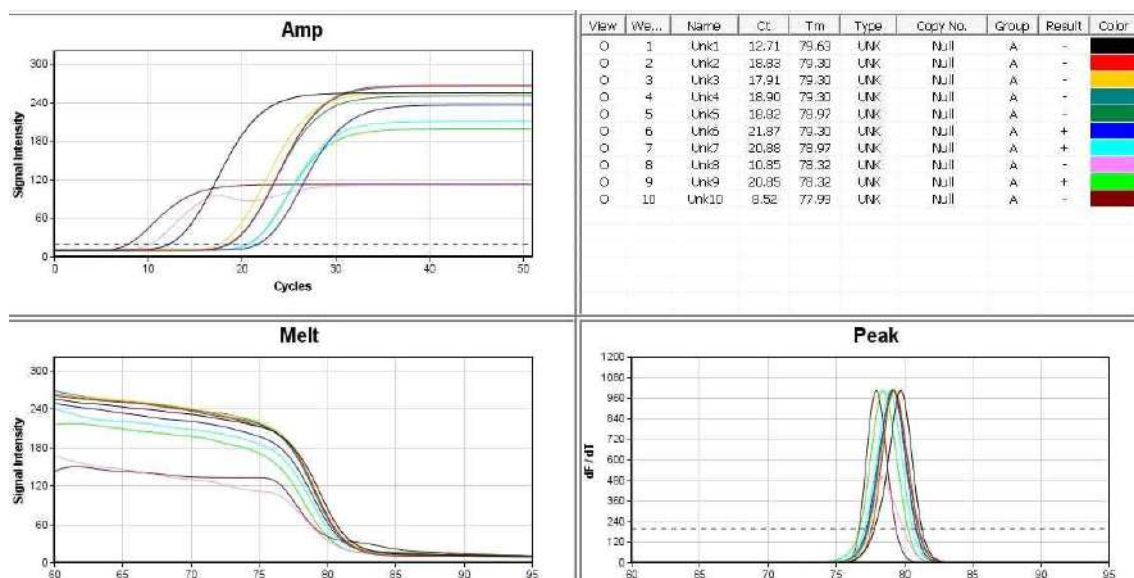


Figure 239. Beet-specific Nested PCRs with 8 different Beet-specific Detection PCR

The conditions of temperature/incubation-time in Beet-nested PCR were 95°C 4 sec, 57°C 4 sec, 72°C 4 sec (50 cycles). 10 pmole Beet-RdDP-nF/nR primers were used in each PCR. Lane 1 (positive control), 1 ng standard DNA pTOP-Beet-RdDp315 was used as initial template; lane 2 (positive control), 0.01 ng In pTOP-Beet-RdDp315. lane 3-10, each 1 μ l of 1/1000 diluted Beet Detection PCR product (Fig. 4). Left-high, amplification curves of 10 PCRs; Right-high, CT and Tm; Left-low, melting-point analysis; Right-low, peak-curve ((dF/dT).

Beet-Nested PCR은 95°C 4 sec, 57°C 4 sec, 72°C 4 sec (50회전)의 조건에서, 융점분석 완료까지 총 25분 45초가 소요되었으며, positive control인 lane 1과 2는 Ct (Threshold cycles)가 각기 12.71 cycles, 18.33 cycles로 나타나 정량성을 보여주었으며, Tm (Temperature of Mid-point)은 각기 79.63°C, 79.30°C로 측정되어, 같은 특이 PCR 산물을 만들었음을 보여주었다(차는 0.33°C).

한편, 벌꿀시료의 DNA를 기질로 사용한 Beet Detection PCR (그림 4)의 lane 3-10 산물을 1/10000 희석하여 initial template로 사용한 본 Beet-Nested PCR의 lane 3-10은, 증폭곡선에서 다양한 Ct 값으로 증폭된 듯 보였으며, 융점곡선에서도 온도의 증가에 따른 형광강도의 기울기가 positive control인 lane 1과 2의 그것과 분명히 구분되지 아니 하였고, 피크곡선에서도 lane 1, 2 (Tm평균 79.46°C)와 lane 3-10 (Tm : 77.99°C- 79.30°C)은 매우 유사하여 같은 PCR산물이 생성된 것으로 분석되었다.

Beet Nested PCR에서, 이 측정값들은 lane 3-10의 PCR 산물들이 모두 lane 1, 2 (positive control)과 같은 사탕수수 특이 증폭임을 나타내고 있는 것으로 판단되었으며, 이는 PCR산물들을 Agarose gel 전기영동으로 확인하였다(그림 240).

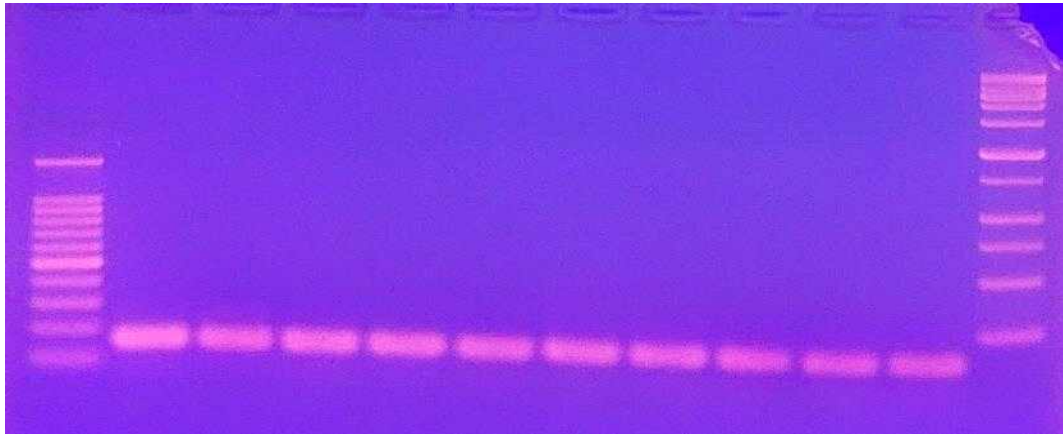


Figure 240. Agarose gel electrophoresis of 8 different Beet-specific Nested PCRs

10 Beet-specific nested PCR products were separately migrated in 2% Agarose gel, 1xTAE buffer, 50 volt, 45 min long. Left DNA size marker shows 100, 200, 300, 400 bp, etc, right DNA size marker indicates 250, 500, 750 bp etc from lowest band. As positive control, 160 bp long Beet-specific nested PCR products were shown in lane 1 and 2. Also, 160 bp long PCR products were observed in each lane of lane 3-10.

Beet Nested PCR 및 그 산물의 전기영동 결과는 검사된 8종 벌꿀시료 모두에서 160 bp 크기의 사탕무우 특이 PCR 산물들이 존재하는 것으로, 이는 8종 벌꿀이 사탕무우 설탕물로 사양된 사실이 있음을 입증하는 것이다.

8개 벌꿀시료의 잔류 DNA에 대한 사탕수수 및 사탕무우 유전자 검사의 판정

8종 벌꿀시료에 대한 Cane Detection PCR의 결과는 positive control인 lane 1, 2만 양성되었고, 나머지 lane 3-10은 사탕수수 특이 유전자를 검출할 수 없었다(판정 보류). 그러나, 같은 시료에 대한 Cane Nested PCR의 결과는 명백하게 lane 3, 4, 5, 7, 8, 9 및 양성임을, 즉 사탕수수 고유 유전자가 벌꿀시료 중에 존재한다는 것을 나타내며, 이는 해당 벌꿀의 생산과정에서 사탕수수 설탕물로 사양된 사실이 있음을 입증하는 것이었다.

또한, 같은 8종 벌꿀시료에 대한 Beet Detection PCR의 결과는 positive control인 lane 1, 2만 양성되었고, 나머지 lane 3-10은 사탕무우 특이 유전자를 검출할 수 없었다(판정 보류). 그러나, 같은 시료에 대한 Beet Nested PCR의 결과는 명백하게 lane 3 - 10 모두가 양성임을, 즉 사탕무우 고유 유전자가 벌꿀시료 중에 존재한다는 것을 나타내며, 이는 해당 벌꿀의 생산과정에서 사탕무우 설탕물로 사양된 사실이 있음을 입증하는 것이었다.

일반 PCR기기를 사용한 사탕수수 또는 사탕무우 고유 유전자 증폭

일반 PCR기기인 PTC-200 Peltier thermal cycler (MJ Research, USA), 그리고 Exicycler™ 96 (Bioneer, Korea)를 사용하여 사탕수수 및 사탕무우 고유 유전자 증폭을 시행한 결과는, 우선 충분히 활용할 수 있는 민감도(sensitivity), 정확성(accuracy)을 보인 것으로 나타났다. 그러나 예상대로 신속성(rapidity)의 면에서 크게 뒤지는 것으로 판단되었다(결과 미제시).

적요

천연벌꿀을 사양벌꿀과 판별하기 위하여, 벌꿀에서 분리한 잔류 유전자에 대한 사탕수수 특이 detection PCR 및 nested PCR을, 그리고 사탕무우 특이 detection PCR 및 nested PCR 을 표준 검사법으로 정형화하고자 하였다.

이 표준 검사법은 먼저 벌꿀시료에서 잔류DNA를 분리해 내고, 이 DNA시료를 initial template로 사용하여, 사탕수수 특이 detection PCR 그리고 사탕무우 특이 detection PCR을 수행하는 것이다. 그리고 해당 PCR 산물을 1/10,000 희석하여, 이 희석액을 initial template로 사탕수수 특이 nested PCR과 사탕무우 특이 nested PCR을 각기 수행하는 것이다.

수천 분자 이하의 특이 분자를 기질로 사용하였던 detection PCR (1차 PCR)은 해당 특이 분자를, 형광검출기가 인지할 수 없는 수준이나마, 증폭시키기는 하였기에, 그 1차 PCR 산물을 희석하여 초기기질로 사용한 Nested PCR (2차

PCR)은 해당 특이분자를 검출이 가능한 분자수로 쉽게 증폭시킬 수 있었다.

벌꿀에서 분리한 사탕수수 또는 사탕무우 고유 유전자의 PCR 검출로 해당 당원을 사양한 사양벌꿀은 보다 명백히 판정될 수 있을 것이며, 이 유전자 검사에 필요한 모든 물질과 시약, 그리고 세부 실험방법들을 8개 벌꿀에 대한 실험예와 함께 적시하였다. 제안하는 실험법이 벌꿀의 잔류유전자 분석의 표준 실험법으로, 국내 사양꿀 판별의 기본 실험법으로 널리 활용되기를 기대한다.

인용문헌

Kim S. M., B. H. Kim, M. Kim, J. Kim, A T. Truong, B. S. Yoon. 2018b. Detection of Sugar Beet (*Beta vulgaris*)-Specific Gene from Honey Made by Sugar of Sugar Beet. *Journal of Apiculture*, 33(3), 213-219.

Kim, B. H., S. Kim, M. Kim, J. Kim, A T. Truong, B. S. Yoon. 2018a. Detection of Sugar Cane (*Saccharum officinarum*)-specific Gene from Sugar and Sugar-honey. *Journal of Apiculture*, 33(3), 221-226.

Kim, B. H., S. Kim, M. Kim, J. Kim, A T. Truong, K. J. Cho, B. S. Yoon., 2019. Detection of chronic bee paralysis virus using ultra-rapid PCR and nested ultra-rapid PCR. *Journal of Apicultural Reserach*, 58(1), 133-140.

Kim, J. M., S. J. Lim, S. Kim, M. Kim, B. H. Kim, A T. Truong, S. Kim and B. S. Yoon. 2020. Rapid detection of deformed wing virus in honeybee using ultra-rapid qPCR and a DNA-chip. *J Vet Sci*, 20(1), e4, <http://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e4>

Ruppert, K. M., Kine, R. J., Rahman, M. S. 2019. Past, present, and future perspectives of enviromental DNA(eDNA) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring, and application of global eDNA. *Global Ecology and Concervation*, 17, <http://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>.

Sobrino-Gregorio, L., S. Vilanova, J. Prohens and I. Escriche. 2018, Detection of honey adulteration by conventional and real-time PCR. *Food Control*, 95, 57-62.

Truong, A-T, B. H. Kim, J. Kim, S. Kim and B. S. Yoon. 2019. Rapid detection of Israeli acute paralysis virus using multi-point ultra-rapid real-time PCR (UR-qPCR). *Journal of Apicultural Research*,

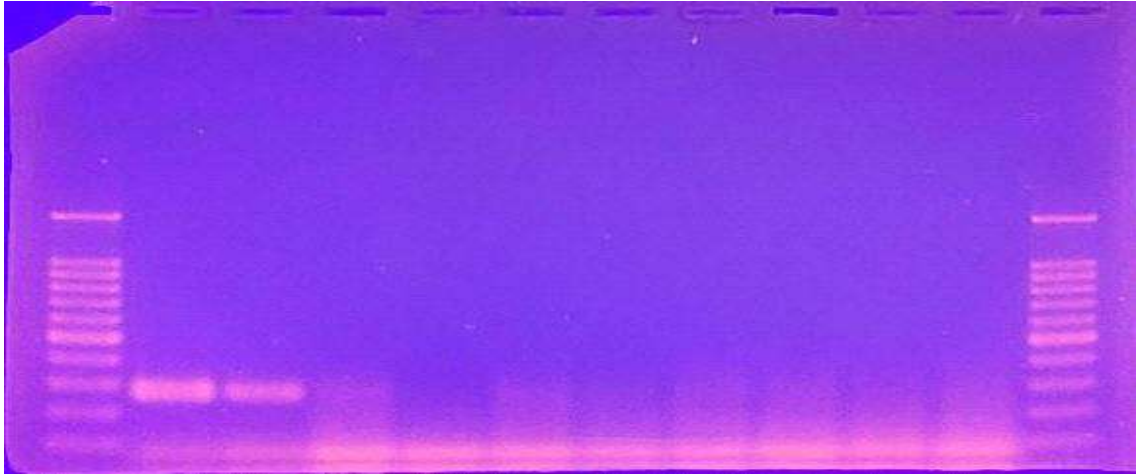
Truong, A-T., S. Kim, B.S. Yoon. 2021c. Determination of honey adulterated with corn syrup by quantitative amplification of maize residual DNA using ultra-rapid real-time PCR. *J Sci Food Agric* 2021,

Truong, A-T., S. M. Kim, M. S. Yoo, Y. S. Cho, B. S. Yoon. 2021b. Susceptibility of *Apis mellifera* Larvae of Different Ages to Infection from *Melissococcus plutonius*, an European Foulbrood Disease-causing Pathogen. *Journal of Apiculture*, 36(2), 47-54.

Truong, A-T., S. Sevin, S. M. Kim, M. S. Yoo, Y. S. Cho, B. S. Yoon. 2021a. Rapidly quantitative detection of *Nosema ceranae* in honeybees using ultra-rapid real time quantitative PCR. *J Vet Sci*, 22(3), e40, <http://doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e40>

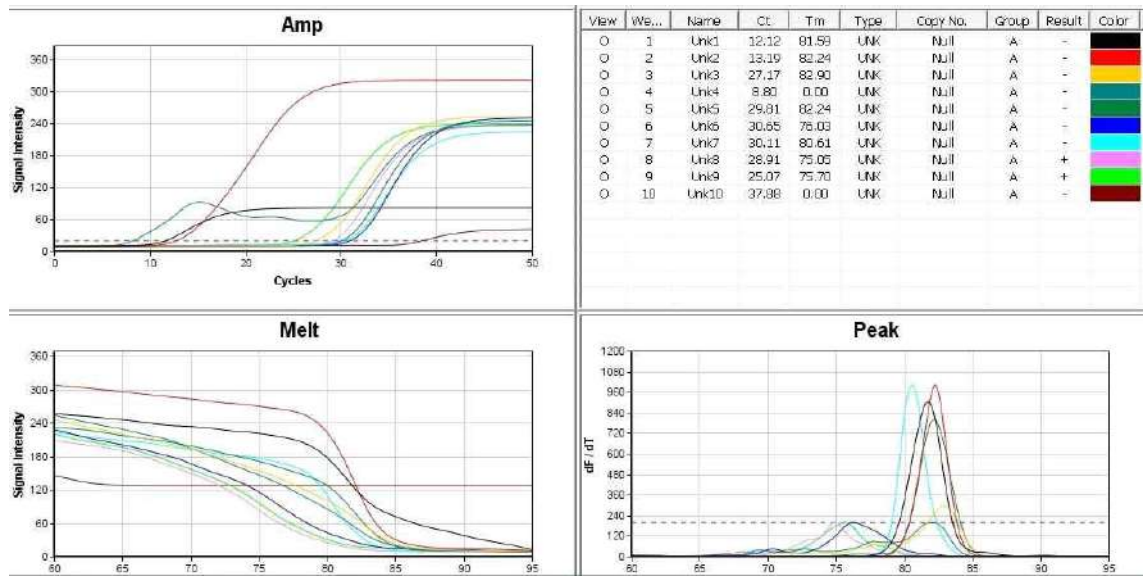
김선미, 김세건, 한상미, 윤병수. 2021. 벌꿀에서 잔류 DNA의 분리를 위한 과정의 최적화. *Journal of Apiculture*, 3(3), 심사중.

Supplement Data



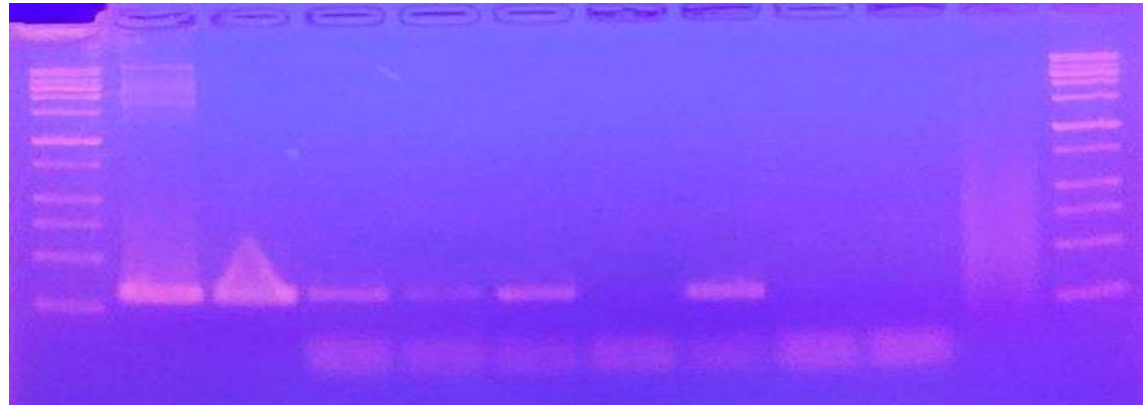
Supplement Figure 241. Cane detection PCR products with residual DNAs from 8 different 100% adulterated honey.

10 Cane-specific detection PCR products were separately migrated in 2% Agarose gel, 1xTAE buffer, 50 volt, 60 min long. Left and right DNA size marker shows 100, 200, 300, 400 bp, etc from lowest band. As positive control, 271 bp bp long Cane-specific Detection PCR products were shown in lane 1 and 2. Also, same sized bands might be observed in lane 3, 5, 7 and 8. However, it is very hard to clear decision based on this kind of Cane detection PCR (1st round PCR). Using Cane-specific nested PCR (2nd round PCR), all 100% adulterated honey samples were determined as clear positive (detection of 137 bp-long cane specific gene).



Supplement Figure 242. Beet-specific Detection PCRs with residual DNA from 8 commercial honey products

The conditions of temperature/incubation-time in Beet-nested PCR were 95°C 4 sec, 59°C 4 sec, 72°C 4 sec (50 cycles). 10 pmole Beet-RdDP-nF/nR primers were used in each PCR. Lane 1 (positive control), 1 ng standard DNA pTOP-Beet-RdDp315 was used as initial template; lane 2 (positive control), 0.01 ng In pTOP-Beet-RdDp315. lane 3-10, each 1 µl of residual DNA from 8 commercial honey. Left-high, amplification curves of 10 PCRs; Right-high, CT and Tm; Left-low, melting-point analysis; Right-low, peak-curve ((dF/dT). Based on Tm value, lane 3, 5 indicate as positive, and lane 7 might be positive (amplification of beet-specific gene).



Supplement Figure 243. Beet-specific Detection PCR products using 8 commercial honey products
 10 Beet-specific Detection PCR products were separatedly migrated in 2% Agarose gel, 1xTAE buffer, 50 volt, 60 min long. Left and right DNA size marker shows 100, 200, 300, 400 bp, etc from lowest band. As positive control, 160 bp long Beet-specific Detection PCR products were shown in lane 1 and 2. Also, same sized bands were observed in lane 3, 4, 5 and 7 (positive).

//// 끝 //////////////////////////////////////

㊦ 주밀원의 화분 유전자에 의한 토종꿀의 지역별 특성 규명

아래의 논문은 본 과제인 “주 밀원 고유 유전자를 이용한 토종꿀의 화분 유전자 분석법”이, 널리 활용되기 위하여 결과를 정리하여 논문을 준비한 것이다. 이는 본 과제에 의해 지원을 받은 Dr. Truong A Tai의 thesis, “Development of methods for accurate detection of honeybee pathogens and molecular determination of adulterated honey”의 Part 1의 Chapter 2에 “Molecular identification of monofloral honey by specific quantification of typical plant pollen compositions”의 제목으로 잘 정리되어 있어 이를 국문 번역하여 이에 기재한다. 이 내용은 2021년 가을.

/// 시작////////////////////////////////////

2장. 전형적인 식물 꽃가루 조성의 특정 정량화에 의한 단일 꽃 꿀의 분자 식별

Introduction

꿀은 꿀벌이 꽃의 꿀이나 식물의 분비물 또는 살아있는 부분에서 생산하는 천연 단맛 물질이다(Martin, 1979; Codex Stan, 1981). 맛과 건강상의 이점을 높이 평가하여 인간 생활의 안전 제품으로 널리 사용되어 왔으며 결과적으로 꿀은 경제적 사기의 표적이되었다 (Soares et al., 2015; Al-Waili and Boni, 2003; Viuda- Martos et al., 2008; Wang et al., 2002). 단일 꽃꿀은 단일 식물 종의 주요 꿀로 생산되며(총 꽃가루 함량의 > 45%), 다꽃꿀은 여러 식물 종의 꿀에서 생산된다. Monofloral은 고유한 특성, 희귀성 또는 의학적 특성을 가지므로 잘못된 라벨링 또는 다른 저렴한 꿀과 혼합하여 불순물을 표적으로 한다(Soares et al., 2015; Prosser and Hebert, 2017; Ahmed and Othman, 2013; Yaghoobi et al., 2013). 이러한 혼입은 소비자를 속이고 시장 점유율에서 불공정한 경쟁을 만든다(Croft, 1987; Swallow and Low, 1990; Abdel-Aal et al., 1993; Bogdanov and Martin, 2002; Doner et al., 1979; Tosun, 2013; Guler et al., 2008; Sorkun and Dogan, 2002).

꿀에 남아있는 꽃가루는 꿀 원산지 식별에 유용한 지표로 사용되었다. 식물종은 현미경을 사용하여 꽃가루의 형태를 기반으로 식별할 수 있다. 그러나 이 방법은 식물 분류에 대한 숙련된 전문가와 많은 시간이 필요로 한다(Soares et al., 2015). 또한, 꽃가루에서 분리된 DNA를 사용하여 꿀에서 특정 식물 종을 검출하는 것은 꿀 기원의 정확한 결정을 위한 신뢰할 수 있는 방법으로 간주되었으며, 결과적으로 꿀에서 꽃가루로부터 DNA 분리 수율을 향상시키기 위한 여러 방법이 개발되었다(Cheng et al., 2007; Waiblinger et al., 2012; Soares et al., 2015).

본 연구에서는 단일 꽃꿀의 원산지와 벌꿀이 생산된 계절을 확인할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 연속된 계절에 채취한 천연꿀의 꿀 식물의 DNA 양을 결정하고 서로 비교하여 각 꿀 샘플에서 꿀의 주요 공급원을 식별하여 꿀이 생산된 시기를 추정할 수 있었다. 그런 다음 이 방법을 적용하여 상업적으로 단일 꽃꿀의 원산지를 확인하였다. 초고속 실시간 PCR(UR-qPCR) 시스템은 검출의 신속성과 감도를 위해 사용되었다.

Materials and methods

Selection of major nectar plants

꿀의 정량적 검출을 위해 벚꽃(*Prunus* sp.), 검은메뚜기(*Robinia pseudoacacia*), 밤나무(*Castanea* sp.), 한국 예보디아(*Tetradium* sp.) 및 피마자(*Kalopanax* sp.)에 속하는 식물을 선별하였다. 이 식물은 개화시기를 가지며 한국에서 각각 4월, 5월, 6월 및 7월에 꿀 생산을 위한 주요 꿀을 공급한다.

Honey samples

경기대학교 양봉장에서 4월부터 7월까지 매 달 5개의 천연꿀 샘플을 다른 군체에서 채취하였다(한국, 수원, 표 30). 총 20개의 샘플을 수집하여 식물 조성의 정량적 검출에 사용하였다. 벚꽃, 검은 메뚜기, 밤 및 피마자 aralia의 다른 4개의 상업적인 단일 꽃꿀은 구입하였다.

Table 113. Collection of natural honeys for nectar sources identification

No.	Collection date	Number of sample	Expected major nectar
1	April 22, 2019	5	<i>Prunus</i> sp.
2	May 30, 2019	5	<i>Robinia pseudoacacia</i>
3	June 30, 2019	5	<i>Castanea</i> sp.
4	July 30 2019	5	<i>Tetradium</i> sp.; <i>Kalopanax</i> sp.

Primer design and standard DNA construction

프라이머는 5개의 표적 식물의 엽록체 DNA 검출을 위해 설계되었다. NCBI 수탁 번호: KU985054(*Prunus* sp.), KJ468102(*Robinia pseudoacacia*), MH998384(*Castanea* sp.), MG975304(*Tetradium* sp.) 및 AY393733(*Kalopana*)의 엽록체 DNA 단편을 사용하였다.

특정 프라이머 디자인을 위해 Clustal X 버전 2.0(Larkin et al. 2007)과 정렬하였다. 5개의 검출 프라이머 쌍을 표 31에 나타내었다. 5개의 표적 식물의 잎으로부터 직접 증폭된 DNA 단편을 TA 클로닝 방법을 사용하여 플라스미드 pBlueXcm에 삽입하여 표준 재조합 DNA를 구축하였다. 또한, 양성 결과의 정확한 증폭을 확인하기 위해 중첩 PCR을 위해 다른 프라이머를 설계하였다(표 114).

Table 114. Primers for detection of seasonal nectar plants

No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Length (Mer)	Annealing temperature	Target plant	Target gene	Amplicon size	Reference
1	Pruchlo-F	GGTGTACTCTTCTTCGAGT	20	53°C	<i>Prunus</i> sp.	ndhF rpl32	-	This study
	Pruchlo-R	GAAGTTGATAAAATACAATAC	21					
2	Acasia-F	GTGGTGAACAAAATATCTAGA	22	58°C	<i>Robinia pseudoacacia</i>	rpoC2	299 bp	This study
	Acasia-R	AACGATTGTGTACCGAGCTT	20					
3	Castanea-F	CCATGGACCGTATTCTTCG	19	61°C	<i>Castanea</i> sp.	atpI	286 bp	This study
	Castanea-R	AGAGGGCAATATGAAATTATG	21					
4	Tetradium-F	CGAGAATAAAGATAGAGTCCT	21	56°C	<i>Tetradium</i> sp.	trnL-trnF	430 bp	This study
	Tetradium-R	TTAAAGGTCTTGGGAGGGA	19					
5	Kalopana-F	ACGAAAGAATCGAATATCGA	20	57°C	<i>Kalopanax</i> sp.	trnL-trnF	435 bp	This study
	Kalopana-R	GCGAGTTTCAGTATGAATAATT	22					
6	Pruchlo-F	GGTGTACTCTTCTTCGAGT	20	53°C	<i>Prunus</i> sp.	ndhF rpl32	-	This study
	Pruchlo-R1	AAGAAAAGATTGTGCGTTTA	20					
7	Acasia-F1	AGTAATCTGTGCATCTTCT	20	50°C	<i>Robinia pseudoacacia</i>	rpoC2	187 bp	This study
	Acasia-R1	AAGTTTCATATCCGAAGCA	19					
8	Castanea-F1	AATCTGAGTTTGCTCACA	19	51°C	<i>Castanea</i> sp.	atpI	235 bp	This study
	Castanea-R1	CACACTAAAAGGCTTATCT	19					
9	Kalopana-F1	TTTGAAGAAGCTGATTAAGT	19	49°C	<i>Kalopanax</i> sp.	trnL-trnF	200 bp	This study
	Kalopana-R1	CGAAATTTTAACTGCTACT	19					

Note: primer pair No. 1-5 were used for detection PCR, and primer pair No. 6-9 were used for nested PCR.

DNA extraction

Soares et al.(2015) 및 Kamo et al. (2018)의 방법에 따라 DNA 분리를 위해 꿀 샘플에서 꽃가루를 수집하였다. 각 시료의 꿀 10ml를 원뿔형 튜브에 나누고 증류수 20ml를 가하여 30초 동안 볼텍싱하였다. 더 많은 물을 첨가하고 50 ml로 조정한다. 다음, 용액을 40°C에서 10분 동안 인큐베이션하고, 혼합을 위해 2분마다 튜브를 뒤집었다. 꽃가루는 11,000 xG에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 버려 수집하였다. DNA 분리는 DNeasy Plant Mini Kit(QUIAGEN)를 사용하여 수행되었다. 꽃가루가 있는 펠렛을 400µl의 용해 완충액에 현탁시킨 다음, 9개의 유리 비드를 첨가하고 1분 동안 보톡싱 하였다. 제조업체의 지시에 따라 단계를 수행하였다. 마지막으로 각 꿀 샘플에서 80µl의 DNA 용액을 얻었다. DNA 농도는 Biophotometer(Eppendorf, Germany)를 사용하여 측정하였다.

각 표적 식물의 잎에서 DNA를 추출하기 위해 DNeasy Plant Mini Kit(QUIAGEN)를 사용하였다. 시료를 액체질소에서 분쇄하여 분말로 하고, 제조사의 지침에 따라 다음과 같은 DNA 분리 절차를 수행하였다.

PCR performance

식물 샘플에서 표준 DNA 증폭을 위한 PCR은 95°C(5분), 35주기 95°C(30초)-54°C(30초)-72°C(30초) 및 72°C(7분). 시약 AccuPower® PCR PreMix(BIONEER, Daejeon, Korea)와 기존의 PCR 기계를 사용하였다.

꿀 샘플에서 꿀 식물의 특이적인 검출을 위한 정량적 PCR은 GENE CHECKER PCR 기계(Genesystem Co., Ltd., 대전, 한국)와 2X Detect Master Mix 시약 with Fluorescent Dye (SYBR green; Genesystem)를 사용하여 수행되었다. PCR 조건은 95°C(30초), 50주기 95°C(4초)-///°C(4초)-72°C(4초)였습니다. 각 프라이머 쌍의 어닐링 온도는 다양한 온도에서 평가되었고 최종적으로 교차 검출을 피하기 위해 고정되었습니다. 각 프라이머 쌍의 최종적으로 고정된 어닐링 온도는 표 31에 나타내었다. 검출 PCR에서 양성 결과의 PCR 생성물을 500배 희석하고, 증폭의 정확도를 확인하기 위해 nested PCR을 위한 DNA 주형으로 사용하였다. 각 프라이머 쌍의 어닐링 온도는 표 31에 나와 있다. PCR 조건은 95°C(30초), 35 사이클 95°C(3초)-///°C(3초)-72°C(3초)였다.

Standard curves for calculation of DNA copy

각 표적 식물의 재조합 DNA는 2.91×108에서 2.91×100(*Prunus sp.*), 2.83×108에서 2.83×100(*Robinia pseudoacacia*), 2.84×108에서 2.84×100(*Castanea sp.*)으로 10배 연속 희석되었다. , 2.72×108 ~ 2.72×100(*Tetradium sp.*) 및 2.72×108 ~ 2.72×100(*Kalopanax sp.*) 사본/μl, 각 농도의 1μl를 PCR에 사용하였다. 검출 한계를 확인하기 위해 PCR을 3회 수행하였다. 각 식물 검출의 표준 곡선은 DNA 주형의 초기 사본의 log10과 증폭의 해당 Ct 값 사이의 관계를 기반으로 설정되었다.

Results and discussion

Standard linear regression for DNA quantification

재조합 DNA에서 각 특이적 프라이머 쌍의 검출은 안정한 증폭을 위한 초기 DNA의 한계 수를 보여주었으며, *Prunus sp.*, *Robinia pseudoacacia*, *Castanea sp.*, *Tetradium sp.* 및 *Kalopanax sp.* 각각 표준 DNA. *Prunus sp.*, *Robinia pseudoacacia*, *Castanea sp.*, *Tetradium sp.* 및 *Kalopanax sp.*의 선형 회귀. DNA 검출은 $y = -3.6341x + 45.049$, $R^2 = 0.996$; $y = -2.9661x + 37.786$, $R^2 = 0.997$; $y = -4.3563x + 52.247$, $R^2 = 0.9934$; $y = -3.9773x + 48.259$, $R^2 = 0.9985$; 및 $y = -3.5549x + 43.6$, $R^2 = 0.9939$, 각각 여기서 x 및 y는 초기 DNA 카피 수의 log10 및 증폭의 해당 Ct 값이다.

Determination of plant compositions in natural honeys

20개의 꿀 샘플 모두에서 *Prunus* DNA의 존재가 나타났으며, 5~7월에 수집된 꿀 샘플에서 *Robinia pseudoacacia*, 5월에 수집된 5개 샘플 중 2개, 6월 및 6월에 수집된 모든 샘플에서 카스타니아 꽃가루가 검출되었다. 한편 칼로파낙스 DNA는 6월(5개 중 2개)과 7월에 채취한 샘플에서만 검출됐다. 그러나 *Tetradium*의 DNA는 모든 샘플에서 검출되지 않았으며(표 115), *Tetradium*의 식물은 꿀을 채집한 지역에 존재하지 않을 수 있다.

Table 115. Detection of seasonal nectar plants from honey samples

Target plant	Samples collected in April					S a m p l e s collected in May					Samples collected in June					Samples collected in July				
	1*	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>Prunus sp.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R o b i n i a pseudoacacia</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Castanea sp.</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Tetradium sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kalopanax sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+

Note: (*) number 1-5 indicate the 5 different honey samples collected in each time. (+) and (-) indicate the positive and negative detection, respectively.

정량적 결과 벌꿀에 존재하는 식물종의 조성은 4월부터 7월까지 증가하였으나 각 종의 DNA량은 감소하였다. 각 식물의 DNA는 개화월에 가장 많은 양을 보였고 다음 달에 채취한 꿀 샘플에 잔류하며 점차 감소하는 경향을 보였다. 4개월 동안 수집한 20개의 샘플 중 Prunus DNA는 4월에 가장 높은 DNA 양을 보였고 다음 달에는 점차 감소하였다. 5월에 가장 높은 DNA 양이, 6월과 7월에 감소하는 Robinia pseudoacacia에서도 동일한 경향이 나타났다. Castanea sp.의 꽃가루 DNA는 5월 하순부터 채취한 시료에서 관찰되어 6월에 최고량에 도달한 후 7월에 감소하였다. 한편 Kalopanax DNA는 6월에 나타났고 7월에 증가하였다(그림 244).

Prunus sp. 는 4월에만 꽃을 피웠고, 그 다음 달에는 많은 양의 DNA가 보였다. 이것은 개화시기에 이 과즙원의 우세일 수 있으며 이 시기에 꽃을 피우는 식물의 수가 많지 않았다. 따라서 벌집에 다량의 벚나무 꽃가루가 축적되어 다음 달에 남아있었다. 또한 꿀 추출 빈도는 개화 이전 식물의 잔여 꽃가루에도 영향을 미쳤다. 따라서 이 연구에서 매월 꿀을 한 번만 추출하면 프루너스와 로비니아 슈도아카시아 꽃가루가 오랜 시간 남아 있고 다음 달에 많은 양의 꿀이 남을 수 있다.

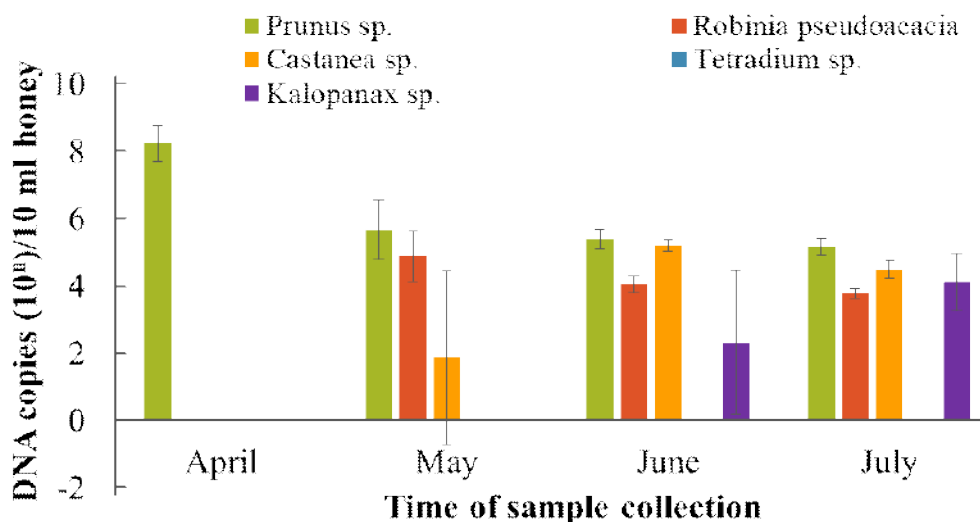


Figure 244. DNA quantity of targeted plants in honey samples

DNA copy of each targeted plant was the average number of five samples collected in each month. Plant compositions increased from April to July, by contrast the DNA amount of each plant showed a decreased trend.

Confirmation of commercial monofloral honeys

꽃가루의 다중 출처는 상업적으로 사용되는 단일 꽃 꿀에서도 볼 수 있다. 검출 PCR에서 양성 결과의 정확도는 희석된 PCR 산물을 사용하여 수행된 중첩 PCR(그림 52)에서 확인되었다. 녹는점과 전기영동의 예상 밴드를 분석한 결과, 벚꽃꿀은 벚나무와 로비니아 슈도아카시아의 꽃가루가, 블랙메뚜기와 밤나무 꿀은 4가지 대상 식물(테트라디움 sp. 제외)의 꽃가루 성분이 비슷했으며, 5개의 표적 식물(Robinia pseudoacacia, Castanea 및 Kalopanax)이 밤나무 꿀에서 검출되었다(표 116).

각 시료의 식물조성 DNA양에 따르면 벚꽃꿀에 Prunus DNA(1.39×10^5 카피/10ml꿀)가 가장 많았고, Robinia pseudoacacia (1.07×10^2 카피/10ml꿀)가 더 적었다. 따라서 이 꿀은 Prunus와 Robinia pseudoacacia nectar와 Prunus의 대부분을 혼합한 것일 수 있다. 결과적으로 꿀 채취 시기는 4월 하순에 로비니아 슈도아카시아 꽃이 만개하는 시기였다.

Table 116. Plant composition detected in the commercial monofloral honeys

Target plant	Monofloral honey			
	Cherry blossom	Black locust	Chestnut	Castor aralia
<i>Prunus</i> sp.	+	+	-	+
<i>Robinia pseudoacacia</i>	+	+	+	+
<i>Castanea</i> sp.	-	+	+	+
<i>Tetradium</i> sp.	-	-	-	-
<i>Kalopanax</i> sp.	-	+	+	+

Note: (+) and (-) indicate the positive and negative detection, respectively

다른 단일 꽃 꿀은 단일 꽃 꿀의 잘못된 표시를 보였으며, 검은 메뚜기 꿀(*Robinia pseudoacacia*)의 *Kalopanax* sp. (1.65×10^6 사본/10 ml 꿀) 및 더 낮은 DNA 양의 *Castanea* (5.99×10^5 사본), *Robinia pseudoacacia* (6.09×10^4 사본), 마지막으로 3.53×10^3 사본/10 ml 꿀이 있는 *Prunus* DNA. 그 결과 이 꿀은 7월에 채취할 수 있지만 5월에는 채취할 수 없음을 보여 주었다. 밤꿀에서도 DNA 양의 동일한 구성이 나타났다. 한편, 피마자 꿀(*Kalopanax*) 꿀은 카스타네아(*Castanea*)의 DNA가 우세하고 DNA 양은 칼로파낙스(*Kalopanax*)가 가장 낮았는데, 이 결과를 통해 카로파낙스 꿀이 일찍 개화하는 6월 하순에 꿀을 채취한 것으로 나타났다(그림 245).

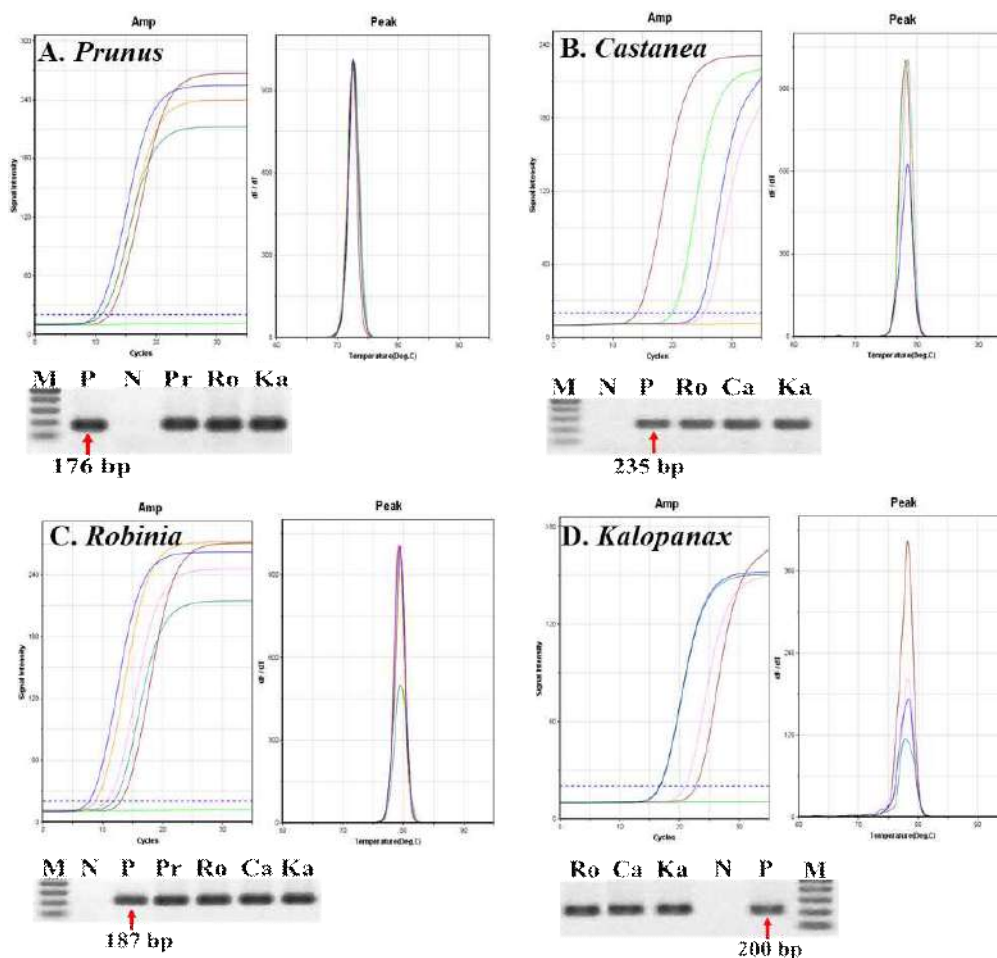


Figure 245. Confirmative detection of nectar plants in commercial honeys

The presence of *Prunus*, *Castanea*, *Robinia pseudoacacia*, and *Kalopanax* DNA (A-D) in commercial monofloral honeys of Cherry blossom (Pr), Black locust (Ro), Chestnut (Ca), and Castor aralia (Ka), was confirmed in nested PCR. The accuracy of amplification was seen by the similar melting temperatures in the florescent curves and amplicon size in electrophoresis images of sample DNA to recombinant DNA (P) of each targeted plant, amplicon sizes were indicated by the arrows. "M" and "N" are 100 bp DNA marker and negative control without DNA template, respectively.

천연꿀에 함유된 옥수수 계통 DNA의 양은 옥수수 시럽과 혼합된 10% 범위에 있었다. 따라서 UR-qPCR은 옥수수 시럽이 20% 이상 함유된 불량꿀을 식별하는 데 도움이 될 것이다.

결론: 꿀에서 옥수수 잔류 DNA의 정확한 검출 및 정량화를 위해 신속한 PCR 분석이 개발되었다. 꿀 불순물에 사용되는 옥수수 시럽의 특정 식별에 유용한 도구일 것이다.

Keywords: High-fructose corn syrup, adulterated honey, molecular characterization, ultra-rapid PCR

INTRODUCTION

꿀은 꿀벌이 꽃의 꿀이나 식물의 살아있는 부분의 분비물에서 생성되는 천연 단맛 물질이다^{1, 2}. 천연 꿀 맛은 지역, 계절, 식물 종에 따라 다르다. 맛과 건강상의 이점으로 오랫동안 인간에 의해 널리 사용되어 왔으나 꿀의 불순물은 심각한 경제적 문제이다⁴⁻⁷. 고과당 옥수수 시럽(HFCS)은 꿀의 불순물 혼합에 반복적으로 사용되어 왔다⁸⁻¹¹. 꿀벌에게 값싼 설탕 시럽을 먹이거나 순수 꿀과 직접 혼합하면 꿀 가격이 낮아져 순수 꿀 생산자의 수익에 큰 영향을 미치고 소비자를 오도하게 된다¹²⁻¹⁵.

꿀의 화학적 조성 또는 기타 특성 분석에 의존하는 다양한 방법이 옥수수 시럽이 섞인 꿀을 검출하기 위해 개발되었다. 이러한 방법에는 분취용 HPLC^{10, 16}, 가스 크로마토그래피-질량 분석법¹⁷, 푸리에 변환 적외선 분광법¹⁸, 시차 주사 비색법¹⁹, 펄스 전류 측정법 검출을 사용한 고성능 음이온 교환 크로마토그래피^{19, 20}를 사용한 꿀에서 HFCS의 검출 및 정량화^{19, 20}이 포함된다. 그러나 기술 및 환경 조건의 다양성으로 인해 신뢰할 수 없을 수 있다^{16, 22-26}. 옥수수당 시럽(C4 식물)의 $\delta^{13}C$ 는 C3 식물²⁷⁻²⁹에서 주로 생산되는 천연 꿀의 $\delta^{13}C$ 와 다른 것으로 나타났다. 그러나 이 방법은 옥수수 식물을 꿀의 불순물에 사용되었던 사탕수수과 같이 C4 식물에 속하는 다른 식물과 구별할 수 없다³⁰.

중합효소연쇄반응(PCR) 기반 기술은 꿀의 식물 기원을 식별하는 유용한 도구로 사용되었다³¹⁻³⁴. 이 방법은 꿀에서 채취한 펠릿 꽃가루에서 식물 DNA를 검출하는 방법을 기반으로 한다. 따라서 꿀의 꽃가루로부터 DNA를 분리하는 다양한 방법이 개발되었다^{4, 35, 36}. 그러나 이러한 방법은 원심 분리 중 펠릿DNA가 상층액에 남아 있기 때문에 꿀에 용해된 노출된 잔류 DNA를 검출하는 데 적용할 수 없다. 시럽 생산 과정에서 옥수수 시럽에 남아 있는 노출된 DNA는 옥수수 시럽이 불순물에 사용될 때 꿀에 옥수수 잔류 DNA가 증가하는 결과를 초래할 수 있다. 그러나 벌꿀의 잔류 DNA를 직접 정제하고 정량적으로 검출하는 방법에 대한 연구는 없었다.

이에 본 연구에서는 옥수수 시럽에 함유된 잔류 DNA를 직접 정제하는 방법을 개발하고자 하였으며, 이를 적용하여 옥수수 시럽 불량 꿀을 동정하였다. 옥수수 시럽 불량 꿀의 검출은 옥수수 시럽의 다양한 비율과 혼합된 꿀에서 옥수수 잔류 DNA의 정량적 증폭에 의해 수행되었다. 열전달이 빠른 새로 개발된 PCR 시스템인 Ultra-rapid real-time PCR(UR-qPCR)을 사용하여 PCR 성능에 소요되는 시간을 절약하였다.

MATERIALS AND METHODS

Maize samples

종자는 한국에서 다양한 변종 옥수수에서 수집되었으며 또한 베트남에서 수입되었다. 3개의 샘플을 한국에서 수집하여 Kr1, Kr2 및 Kr3으로 표시하였고, 5개의 샘플을 베트남에서 수입하여 Vn1-Vn5로 표시하였다. 이 베트남에서 수입된 샘플 중 베트남산이 2개(Vn1, Vn4), 인도산이 2개(Vn2, Vn5), 태국산이 1개(Vn3)이었다.

Corn syrup samples

Karò Dark Corn Syrup(Ach Food Companies, Inc., Oakbrook Terrace, Illinois, United States)은 옥수수 DNA의 검출과 불량 꿀 생산에 사용되었다.

Honey samples

한국 수원에 있는 경기대학교의 동일한 양봉장에서 천연 순수 꿀을 추출하였다. 양봉장의 위도 및 경도 좌표는 37.305103, 127.034930이다. 2019년 4월 25일에 서로 다른 지역에서 6개의 샘플을 수집했습니다. 샘플은 Nat4에서

Nat9로 지정되었다. 다른 3개의 순수 천연 꿀 샘플은 베트남 Quang Ninh성 Hai Ha 지역의 3개 지역에서 추출되었다. 이 콜로니는 옥수수 재배지 근처에 두었고 꽃이 핀 지 2주 후(2019년 4월 28일) 꿀을 추출하였다. 이 3개의 샘플은 Nat1에서 Nat3으로 지정되었다. 세 지역의 위도 및 경도 좌표는 순서대로 21.556810, 107.718089(Nat1), 21.555293, 107.721179(Nat2), 21.553936, 107.718523(Nat3)이다. 이 천연 샘플은 옥수수 시럽이 첨가된 꿀의 특성화를 위한 음성 대조군으로 사용되었다. 나머지 7개의 상업용 꿀 샘플은 온라인 쇼핑 웹사이트 <https://www.ebay.com> 및 <https://amazon.com>에서 구입했으며 각 샘플의 웹사이트 링크는 표 S1과 같습니다. 상업용 샘플의 명칭과 원산지는 UK1(영국), Ne2(네팔), Pol3(폴란드), Por4(포르투갈), US5(미국), Ca6(캐나다), In7(인도)이다. 이러한 상업적 샘플은 개발된 UR-qPCR 분석을 테스트하는 데 사용되었다.

Production of adulterated honey

순수한 꿀에 다양한 양의 옥수수 시럽을 직접 첨가하여 불순물이 섞인 꿀을 생산하였다. 천연꿀 샘플 Nat4 (경기대학교, 수원, 한국)에서 잔류 DNA 및 꽃가루 DNA를 추출하여 UR-qPCR에 사용하여 옥수수 DNA가 없는지 확인한 다음 이 샘플에 다크 콘시럽(KARO, 미국), 시럽을 순수한 꿀에 첨가하여 시럽 대 꿀의 비율(v/v)을 각각 4/1(80%), 3/2(60%), 2/3(40%), 1/4(20%), 1/9(10%) 및 1/19(5%)로 제조하여 사용하였으며, 이들 의 명칭은 각각 Adu1에서 Adu6이었다. 각 불순물이 섞인 꿀 샘플 5ml의 부피는 분석을 위한 DNA 정제에 사용되었다.

Specific primers for the detection of maize DNA

프라이머는 게놈 DNA(gDNA), 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 및 엽록체 DNA(cpDNA)의 검출을 위해 설계되었다. 미토콘드리아 DNA (NCBI 수탁 번호: DQ645536), 엽록체 DNA (NCBI 수탁 번호: X86563.2) 및 게놈 DNA (NCBI 수탁 번호: XM_020543305.1) 단편 서열을 GenBank에서 검색하고 Clustal X 버전과 정렬하였다. 2.0 특정 프라이머 디자인37 으로 설계한 특이 프라이머 서열은 표 1에 제시하였다. 옥수수 샘플 Kr1의 증폭된 DNA 단편을 TA 클로닝 방법38을 사용하여 플라스미드 pBlueXcm에 삽입하여 양성 PCR 대조군으로 사용된 표준 재조합 DNA를 구성하였다.

Table 117. Primers for maize DNA detection

Primer name	Sequences (5'-3')	Length (mer)	NCBI reference	Amplicon size (bp)	Reference
Zeachlo-F	CTTAGATAGAAAAAATAATAC	23	cpDNA (X86563)	254	This study
Zeachlo-R	CATATATATTCTTCTTTTCTTC	23			
Zeamito-F	TGAAGGAAGGGCGGGCTGA	19	mtDNA (DQ645536)	297	This study
Zeamito-R	TCTCGGCTGCTGTCCTACTC	21			
Zeagenom-F	TCTATAAGCTTTGATTCAGGG	22	gDNA (XM_020543305)	275	This study
Zeagenom-R	TTGCTCTCCGAAATGACACTAT	22			
Zeagenom-F1*	CTGCACATGAGTTGAAATCG	20			
Zeagenom-R1	AATCTTGTGCAACTTCATGAA	21			

Note: "*" primer pair Zeagenom-F1/R1 was used for nested PCR.

DNA isolation from maize seeds

DNA 분리에는 DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)를 사용하였다. 옥수수 종자를 액체 질소에서 분말로 분쇄하고 제조업체의 지침에 따라 DNA를 분리하였다. 각 샘플에서 총 100µl의 DNA를 얻었다.

Isolation of pollen DNA

DNA 분리를 위해 전에 사용된 method4, 39를 변형시켜 DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)를 사용하였다. 약술하면, 5ml의 꿀을 원뿔형 튜브에 첨가한 다음 20ml의 증류수를 첨가하였다. 용액을 15초 동안 볼텍싱하고 더 많은 물을 넣어 최종 부피 40ml로 조정하였다. 혼합물을 40°C에서 10분 동안 교반하며 인큐베이션하였고, 이때 튜브를 2분마다 invert-mix하였다. 그런 다음 혼합물을 11,000 x g에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 버렸다. 펠렛을 마이크로 페슬을 사용하여 액체 질소에서 분말로 분쇄하고, 400µl의 용해 완충액(DNeasy Plant Mini Kit)을 첨가하고, 혼합물을 65°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 절차는 제조업체의 프로토콜에 따라 수행되었다. 각 샘플에서 얻은 DNA 용액의 최종 부피는 100 µl이었다.

Purification of residual DNA

QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN) 절차는 꿀에서 잔류 DNA를 분리하기 위해 수정되었다. 꿀 5ml를 원뿔형 튜브에 넣고 5M 구아니딘 염산염(Bio Basic, Canada)과 30% 이소프로판올을 포함하는 결합 완충액 25ml를 최종 부피 30ml로 가하였다. 혼합물을 30초 동안 볼텍싱하고 40°C의 수조에서 10분 동안 인큐베이션하였고, 이때 튜브를 2분마다 invert-mix하였다. 다음으로, 혼합물을 11,000 x g에서 5분 동안 원심분리하고 상층액을 새로운 원뿔형 튜브로 옮겼다. 필터 컬럼(QIAquick PCR Purification Kit)을 사용하여 잔류 DNA를 수집하고 30초 동안 10,000 x g에서 원심분리하였다. 세척 및 용리 단계는 키트의 제조업체 지침에 따라 수행되었다. 마지막으로 각 샘플에서 100µl의 DNA 용액을 얻었다. DNA 용액을 다시 정제하여 남은 꿀을 완전히 제거하였다. 절차는 제조업체의 지침에 따라 수행되었으며 모든 재료는 QIAquick PCR Purification Kit에서 얻었다. 각 샘플에서 40 마이크로리터의 DNA 용액을 얻었다. DNA 농도는 Biophotometer (Eppendorf, Germany)를 사용하여 결정하였다.

PCR protocol

초고속 실시간 PCR (UR-qPCR)은 GENECHECKER® Model UF150 Real-time PCR system (Genesystem Co., Ltd., Daejeon, Korea), 2x Rapi Mix, 형광물질 SYBR green((주)진시스템)을 사용하여 수행되었다. 각 반응 혼합물의 부피는 10µl이었으며, 5µl 2x Rapi Mix, 2µl의 프라이머 (각 프라이머는 10pmol) 및 최대 3µl의 DNA 템플릿이었다. gDNA 증폭을 위한 PCR 조건은 95°C (30초), 95°C (2초), 55°C (3초) 및 72°C (2초)의 50회전 이었다. mtDNA와 cpDNA 증폭에 대한 PCR 조건은 genomic DNA와 유사하였으나 annealing 온도는 각각 61°C와 48°C였다.

500배 희석된 PCR 산물을 이용하여 gDNA 증폭을 위한 Nested PCR을 수행하여 검출의 정확성을 확인하였다. 프라이머 쌍 Zeagenom-F1/R1 (표 1)을 사용하고 PCR 조건은 95°C(30초), 이어서 95°C (2초), 54°C (3초) 및 72°C (2초)의 50 사이클이었다. Nested PCR의 산물은 Sanger 방법을 사용하여 염기서열분석을 의뢰하였다(Bionics Co., Ltd., Korea). 옥수수 고유 DNA 증폭의 민감도를 조사하고 초기 DNA 복제 수 계산을 위한 표준 곡선을 생성하기 위해 UR-qPCR을 2.85×10^8 사본/µl에서 2.85×10^2 /µl(gDNA)사본까지, 또는 2.87×10^8 복사체/µl ~ 2.87×10^2 복사체/µl(cpDNA) 및 2.72×10^8 복사체/µl ~ 2.72×10^2 복사체/µl(mtDNA) 10배 연속 희석한 재조합 DNA를 사용하여 수행하였다. 각 PCR 은 삼반복으로 수행하고 log10 초기 DNA 사본과 해당 임계값 주기(Ct) 사이의 관계를 나타내는 각 표준 DNA의 선형 회귀를 설정하였다.

RESULTS

Specific amplification of maize DNA

gDNA, mtDNA 및 cpDNA 증폭을 위한 특이 프라이머는 8개 지역 옥수수 변이체의 검출에서 안정적이었다. 증폭의 녹는 온도는 옥수수의 변이체마다 크게 다르지 않았으며, 각 DNA 앰플리콘의 크기는 겔 전기영동에 의해 275 bp(gDNA), 297 bp(mtDNA), 254 bp(cpDNA)로 확인되었다(그림 247).

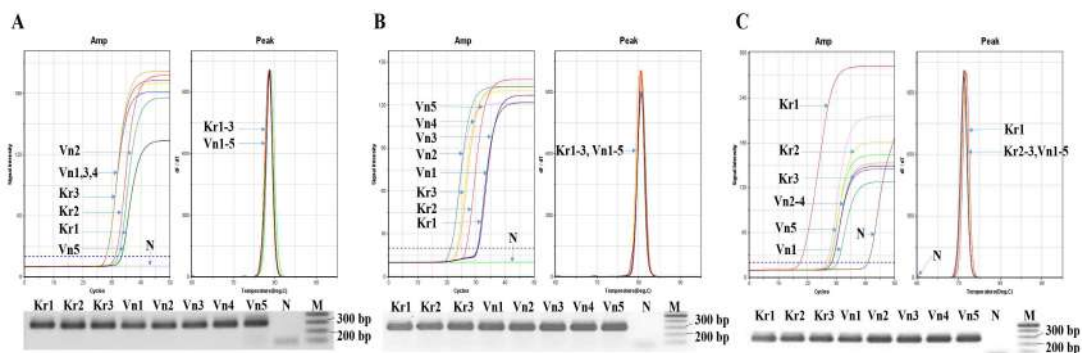


Figure 247. Amplification of the genomic, chloroplast, and mitochondrial DNA from maize variants PCR was performed using 30 ng of the total DNA of samples Kr1-Kr3 and Vn1-Vn5. The amplification of gDNA (A), mtDNA (B), and cpDNA (C), shown by the fluorescent curves of Ct values and peak melting temperatures, was confirmed by gel electrophoresis with the expected bands of 275 bp, 297 bp, and 254 bp, respectively. "N" indicates a negative control without a DNA template and "M" indicates a 100-bp DNA marker.

프라이머는 각각 최소 2.85×100카피/μl, 2.72×100카피/μl 및 2.87×100카피/μl로 gDNA, mtDNA 및 cpDNA를 검출할 수 있었다. 역치 주기(Ct)와 초기 DNA 복제 수 사이의 관계를 나타내는 표준 선형 회귀는 재조합 DNA의 연속 희석을 사용한 증폭을 기반으로 다음과 같이 설정되었다. $y = -3.2156x + 37.706$, $R^2 = 0.994$ (gDNA); $y = -3.2305x + 40.427$, $R^2 = 0.9816$ (mtDNA); $y = -3.489x + 46.139$, $R^2 = 0.9843$ (cpDNA). 여기서 x 및 y는 각각 초기 DNA 사본 수의 log10 및 해당 Ct 값이다. 공식 $E = 10(-1/slope)-1$ 을 사용하여 계산된 세 개의 프라이머 쌍의 증폭 효율은 112.89% (gDNA), 103.96% (mtDNA) 및 93.47% (cpDNA)이었다.

Maize DNA detection in natural and adulterated honey samples

UR-qPCR 시스템은 gDNA, cpDNA, mtDNA를 증폭하여 옥수수 시럽의 최소 농도 10%로 불순물이 섞인 꿀에서 옥수수 DNA를 검출할 수 있었다. 3가지 표적 DNA (gDNA, cpDNA, mtDNA) 중 옥수수 시럽 농도가 10%에서 80%로 증가했을 때 gDNA의 양이 점차 증가하였고 꿀 5ml의 DNA copy 수는 14.82 ± 21.11 copy로 증가하였다. 각각 2478 ± 827 카피이며, 천연 꿀 샘플 Nat4-9 및 5%의 불순물에서는 증폭이 보이지 않았다. 한편, 개화기 옥수수밭에 보관된 콜로니에서 채취한 천연꿀(샘플 Nat1-3) 5ml에서도 gDNA 함량이 $7 \sim 47 \pm 14$ 카피로 불순물의 10% 범위에서 검출되었다(그림 248). 결과적으로 옥수수 꽃가루와 꿀이 없는 꿀에서 PCR 시스템은 옥수수 시럽의 최소 농도 10%에서 불순물을 검출할 가능성을 보여주었다(그림 249). 그러나 개화시기에 옥수수밭 근처에 있는 양봉장에서 채취한 꿀에서 PCR 시스템은 최소 20%의 불순물을 함유한 옥수수 시럽이 섞인 꿀을 식별할 수 있었다.

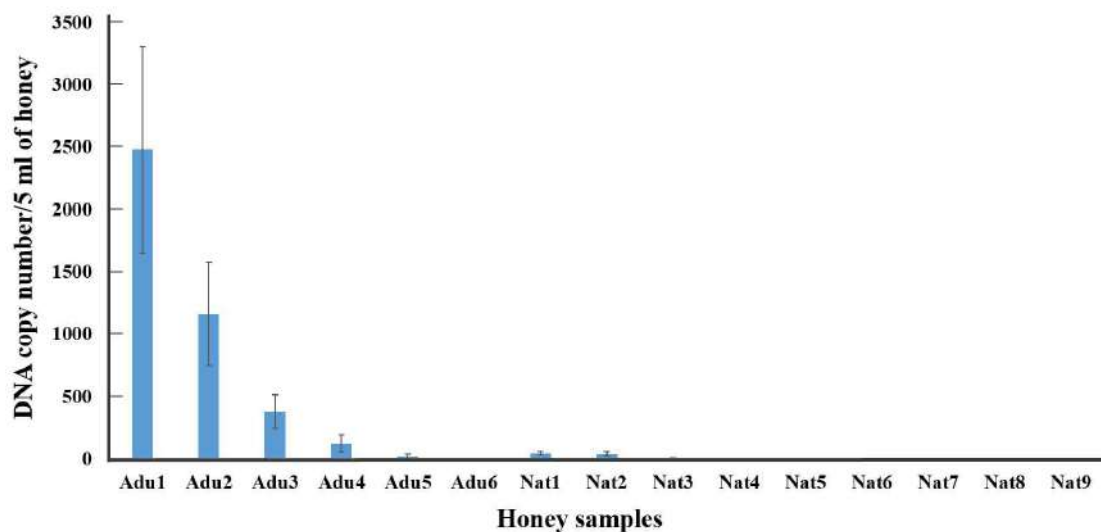


Figure 248. Quantification of the maize gDNA in natural and adulterated honey samples

DNA copy number was calculated based on the PCR Ct value, and the amount of the total target DNA was calculated for 5 ml of the honey sample. The gDNA copy number in corn syrup-adulterated honey gradually increased when the concentration of the adulterant increased from 10% (Adu5) to 80% (Adu1). Meanwhile, the natural honeys (Nat1-Nat3) collected from apiaries kept nearby the corn field show the quantity of corn gDNA as high as it in the adulterated honey with 10% of corn syrup. Maize DNA was not detected in natural honey sample Nat4-Nat9 and adulterated honey with 5% of corn syrup.

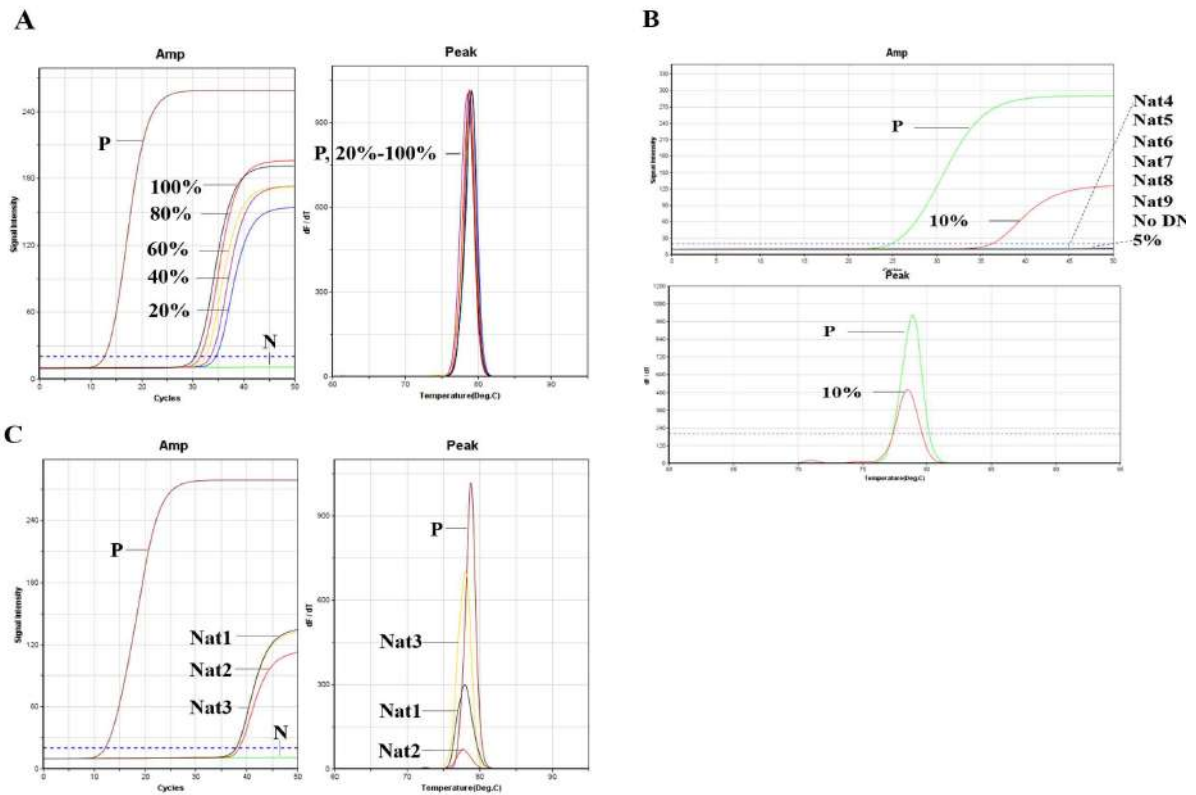


Figure 249. Amplification of the maize DNA from natural honey and adulterated honey samples. Fluorescence curves show the amplification of maize DNA (using the primer pair Zeagenom-F/R) from 100% corn syrup and honey samples adulterated with 20%–80% corn syrup (A). The amplification curves show a limit of detection at 10% of corn syrup adulteration, and negative detection was seen from 5% adulterated sample, natural honey Nat4–9, no DNA template (B). The amplification curves also showed the presence of the residual maize DNA in the three natural honey samples (Nat1–Nat3), collected in the region from corn flowers (C). “N” and “P” indicate the negative control without a DNA template and positive control with maize recombinant DNA, respectively.

mtDNA 및 cpDNA 검출 결과는 서로 다른 불순물이 첨가된 꿀 샘플에 대해 안정적이지 않았으며, DNA의 양은 불순물이 들어간 꿀과 천연 꿀에서 큰 차이가 없었습니다. mtDNA 복제 수는 10%~80% 불순물이 첨가된 꿀에서 각각 5ml당 29~96개, 3개의 천연 꿀 샘플에서 5ml당 59~490개 범위이었다. 불순물이 섞인 꿀 샘플의 cpDNA 복제 수는 238~1357개 인 반면 천연 꿀 샘플 5ml당 305~854이다(그림 250). 따라서 mtDNA와 cpDNA의 정량은 불순물이 섞인 꿀을 검출하는 효과적인 방법이 아닌 것으로 판단되었다.

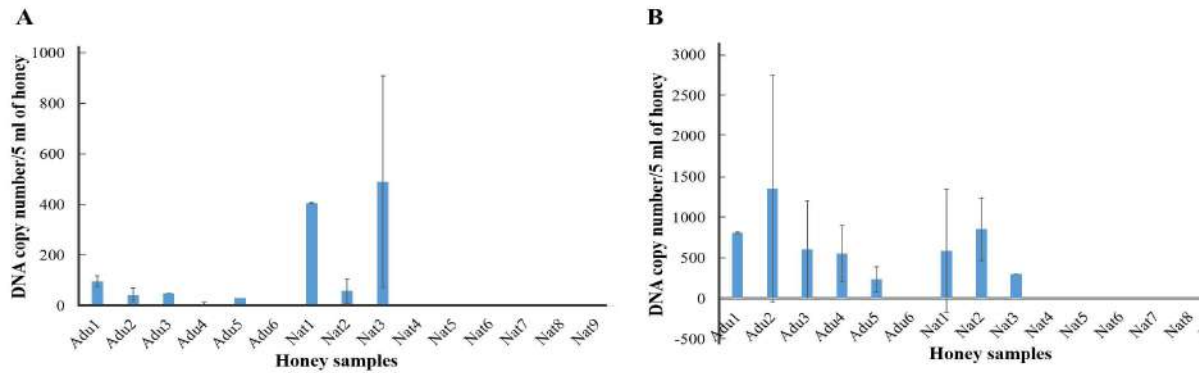


Figure 250. Quantification of maize mtDNA and cpDNA in natural and adulterated honey samples. DNA copy number was calculated based on the Ct value, and the copy number of target DNA was calculated for 40 μ l of the DNA solution isolated from 5 ml of honey. DNA copy number for mtDNA (A) and cpDNA (B) was calculated for 5 adulterated honey samples that were mixed with 80%, 60%, 40%, 20%, and 10% corn syrup, Adu1-Adu5, respectively, and three samples of natural honey, Nat1-Nat3. The 5% adulteration sample and natural honey Nat4-Nat9 were negative detected with Maize DNA.

1.1. Identification of corn syrup adulteration in commercial honey samples

7개의 상업적 샘플에서 옥수수 DNA의 존재는 gDNA의 증폭에 의해 확인되었다. 옥수수 gDNA는 7개 샘플 중 6개에서 검출되었다(샘플 In7 제외, 그림 251 A). 그러나 nested PCR에서는 7개 샘플 모두에서 옥수수 gDNA의 존재를 보여주었으며 검출의 정확성은 용융 온도를 결정하여 확인되었다. 예상 밴드(192 bp)가 겔 전기영동 이미지에 존재하였다(그림 251 B).

Nested PCR 산물의 염기서열 분석 결과, 7개 시료의 DNA 염기서열은 NCBI 데이터베이스(수탁번호: XM_020548728, 표 S2)에서 얻은 옥수수 DNA 염기서열과 100% 상동성 및 100% 동일한 것으로 나타났습니다. 한편, mtDNA와 cpDNA는 각각 4개의 시료(Pol3, US5, Ca6, In7)와 6개의 시료(US5를 제외한 모든 시료)에서 검출되었다.

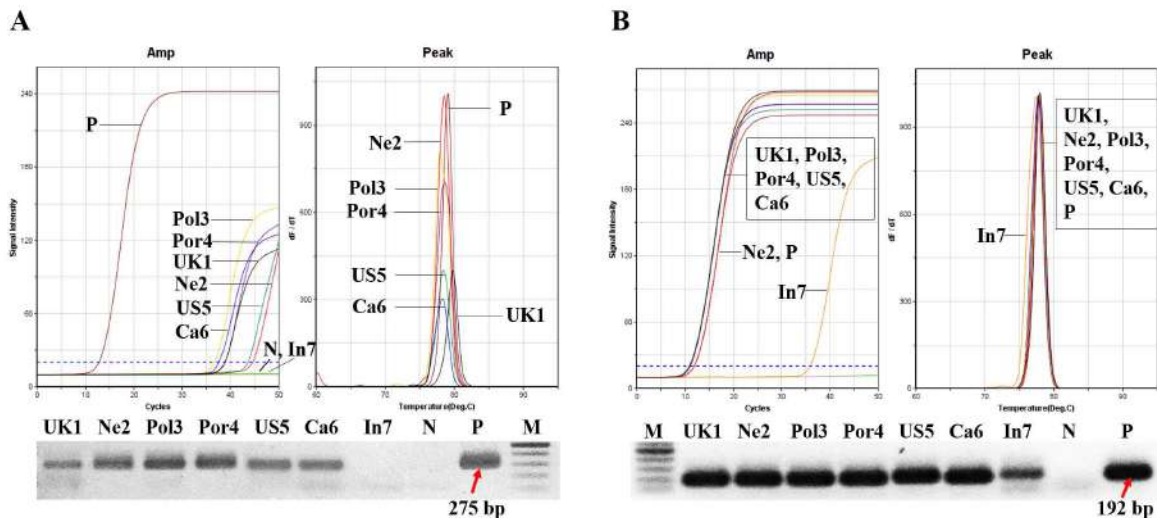


Figure 251. Detection of maize DNA in commercial honey samples

The results of gDNA detection showed that six out of the seven samples contained maize DNA (except for sample In7) (A). Nested PCR data using the 500-fold diluted PCR products showed the presence of maize DNA in all seven samples; the sample In7 had the lowest DNA amount that could be detected only by nested PCR. The presence of a 192-bp band on a DNA gel confirmed accurate detection of the maize DNA (B). “N” and “P” indicate the negative control without a DNA template and positive control with recombinant DNA, respectively.

그러나 5ml의 꿀에서 분리된 총 잔류 DNA의 DNA 복사체 수를 계산한 결과 모든 상업용 샘플의 옥수수 gDNA 복사체 수는 20~80% 옥수수 시럽이 섞인 꿀 샘플보다 낮았으며 유의미한 차이가 없었다. 천연꿀 샘플과 다른 것으로 나타났다 (표 118).

Table 118. Amount of maize DNA in honey samples

No.	Sample	Type	Origin	gDNA copy number/5 ml of Adulterated honey	
1	Nat1	Natural honey	Vietnam	47 ± 14	-
2	Nat2			41 ± 19	-
3	Nat3			7 ± 0	-
4	Nat4		South Korea	0	-
5	Nat5			0	-
6	Nat6			0	-
7	Nat7			0	-
8	Nat8			0	-
9	Nat9			0	-
10	Syrup	Corn syrup	USA	9187 ± 2509	-
11	Adu1	80% adulteration	South Korea	2478 ± 827	+
12	Adu2	60% adulteration		1160 ± 415	+
13	Adu3	40% adulteration		379 ± 136	+
14	Adu4	20% adulteration		123 ± 70	+
15	Adu5	10% adulteration		14.82±21.11	+
16	Adu6	5% adulteration		0	+
17	UK1	C o m m e r c i a l honey	United Kingdom	21 ± 25	-/+
18	Ne2		Nepal	1 ± 1	-/+
19	Pol3		Poland	76 ± 15	-/+
20	Por4		Portugal	13 ± 6	-/+
21	US5		USA	2 ± 2	-/+
22	Ca6		Canada	42 ± 0	-/+
23	In7		India	0	-

Note: "+" and "-" indicate adulteration and no adulteration, respectively.

Quantification of residual DNA and pollen DNA in natural honey samples

천연꿀(5ml)의 각 시료에서 분리된 잔여물과 꽃가루 gDNA, mtDNA, cpDNA의 양을 계산하였다. 그 결과, 꽃가루 gDNA의 양은 잔류 DNA의 양보다 훨씬 많았고, cpDNA와 mtDNA의 양 사이에는 큰 차이가 없었다. 꽃가루/잔류 소스에 대한 gDNA 카피 수는 Nat1, Nat2 및 Nat3 샘플에 대해 각각 $2 \times 10^5 / 5 \times 10^1$, $6 \times 10^3 / 4 \times 10^1$, and $2 \times 10^4 / 7 \times 10^0$ 이었다(그림 252 A). mtDNA 복제 수는 $7 \times 10^3 / 4 \times 10^2$, $2 \times 10^1 / 5 \times 10^1$, and $6 \times 10^2 / 4 \times 10^2$ (Figure 252 B), cpDNA 복제 수는 $9 \times 10^4 / 2 \times 10^2$, $2 \times 10^4 / 8 \times 10^2$, and $3 \times 10^4 / 3 \times 10^2$ 이었다(그림 252 C).

3개의 샘플에 대한 \log_{10} (꽃가루 DNA 사본 수) 대 \log_{10} (잔여 DNA 사본)의 비율은 계놈, 미토콘드리아 및 엽록체 DNA에 대해 각각 3.51 ± 1.34 , 1.12 ± 0.33 및 1.79 ± 0.31 이었다. 혼입 과정에서 천연 꿀에 옥수수 시럽을 첨가하면 잔류 DNA의 양이 증가하여 잔류 DNA에 대한 꽃가루 DNA의 비율이 감소할 수 있다.

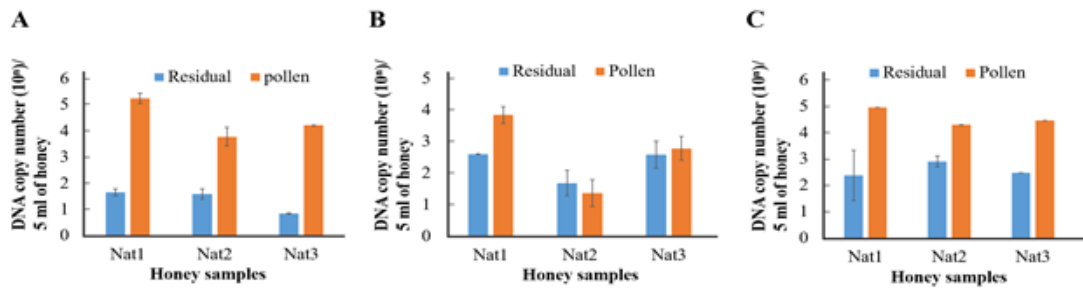


Figure 252. Quantification of residual DNA and pollen DNA in natural honey samples
DNA copy number of genomic DNA (A), mitochondrial DNA (B), chloroplast DNA (C), and total DNA isolated from 5 ml of honey was calculated based on the Ct value of amplification for three samples of natural honey (Nat1-Nat3). The error bar indicates standard deviation for 3 independent PCR experiments.

DISCUSSION

우리는 옥수수 시럽이 첨가된 꿀의 검출을 위한 새로운 간단한 초고속 PCR 방법을 개발하였다. 시럽에 남아 있는 많은 양의 옥수수 잔류 DNA는 불순물이 섞인 꿀의 잔류 DNA 함량을 증가시켜 옥수수 꽃이 자라는 지역에서 채취한 천연 꿀과 구별하는 데 도움이 된다. 또한 $13C/12C$ 의 안정적인 탄소 동위원소 비율을 사용하여 C_4 식물에서 생산된 불순물이 섞인 꿀을 검출하였다^{4, 40}. 그러나 이 방법은 천연 옥수수 화분이 벌꿀에 유입될 수 있다는 사실에 근거하여, 옥수수 유전자의 존재만으로 사양꿀인지는 판정할 수 없다. 따라서 특정 옥수수 또는 사탕수수 유전자의 검출 및 정량화(Kim et al., 2018; 미공개 데이터)는 불량 꿀을 특성화하는 신뢰할 수 있는 방법을 제공한다. 안정적인 탄소 동위원소 비율 분석과 특정 유전자의 정량적 검출을 결합하여 불순물에 사용된 당의 출처를 정확하게 식별할 수 있다.

벌꿀 샘플에서 잔류 Naked DNA가 검출되어 보관 기간 동안 DNA 분해가 발생할 수 있다. 이 연구에서 옥수수 시럽의 네이키드 DNA 함량은 실온에서 8개월 보관 후 현저하게 감소하여(데이터는 미제시) 천연 꿀 샘플과 불순물이 섞인 꿀 샘플을 구별하기 어렵다. 따라서 시럽이나 꿀이 생산된 시기와 옥수수 시럽의 종류를 알면 보다 정확한 결과를 얻는 데 도움이 될 수 있다. 또한 꿀 샘플에서 옥수수 꽃가루 DNA의 검출은 잔류 DNA의 기원을 옥수수 시럽 또는 천연 꽃가루로 확인하는 데 도움이 될 수 있다.

DNA 카피 수는 재조합 DNA에 대해 확립된 표준 선형 회귀 분석을 사용하여 계산되었다. 우리는 순수한 재조합 플라스미드를 사용했고, 역치 사이클 값이 gDNA의 2.85 사본에서 약 36이므로 증폭이 유리하였다. 그러나 샘플에서 분리된 전체 DNA의 증폭은 40회전 이상으로 확장될 수 있다. 따라서 표준 곡선을 기반으로 한 계산은 전체 DNA의 실제 DNA 사본 수를 과소 평가할 수 있다. 그러나 표준 선형 회귀 분석의 사용은 두 소스 모두 전체 DNA의 혼합물을 포함하고 있기 때문에 천연 꿀 샘플과 불순물이 섞인 꿀 샘플 간의 비교에 영향을 줄 수 없다.

이 연구에서 사용된 UR-qPCR은 옥수수 DNA 검출을 위한 시간 절약의 이점을 보여주었으며, PCR의 50회전을 완료하는데 필요한 단 20분의 신속성이 입증되었다. PCR 성능이 1시간 30분 이상 걸리는 기존의 다른 Real-Time PCR을 사용했을 때보다 약 5배 가량 빨랐다. 또한, PCR 반응을 준비하고 벌꿀에 있는 네이키드 DNA를 직접 정제하기 위한 간단한 프로토콜은 기존의 실시간 PCR 시스템을 사용한 분자 검출뿐만 아니라 다른 방법에 비해 옥수수 시럽 불순물이 섞인 꿀의 검출에 소요되는 총 시간을 크게 줄일 수 있다.

요약하면, 이 연구에서는 불순물이 섞인 꿀의 특성을 규명하기 위해 옥수수 시럽의 옥수수 DNA 정량화에 의존하는 새로운 방법을 개발한 것이다. 이 방법은 혼입율이 20% 이상인 옥수수 시럽 혼입 꿀을 판정하는 데 유용하다. UR-qPCR 시스템을 사용한 빠른 DNA 정제 및 PCR 성능은 옥수수 시럽이 첨가된 꿀 분석의 효율성에 기여하였다. 벌꿀에서 naked 옥수수 DNA의 특이적인 검출은 불순물에 사용된 C_4 식물 당 공급원을 식별하는 데 중요하다.

- 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).
- Al-Waili NS and Boni NS, Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. *J Med Food* 6:129-133 (2003).
- Anklam E, A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem* 63:549-62 (1998).
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis (998.12). C-4 plant sugars in honey. Internal standard stable carbon isotope ratio method. *Official Meth Anal* 44:33 (2005).
- Bogdanov S and Martin P, Honey authenticity. *Mitt Lebensmittelunters Hyg* 93:232-254 (2002).
- Codex Stan. Codex standard for honey. (Rev.1 (1987), Rev. 2 (2001)). Codex Alimentarius Commission (1981).
- Cordella C, Antinelli JF, Aurieres C, Faucon JP, Carbol-Bass DC and Sbirrazzuoli N, Use of differential scanning calorimetry (DSC) as a new technique for detection of adulteration in honeys. 1. Study of adulteration effect on honey thermal behavior. *J Agr Food Chem* 50:203-208 (2002).
- Croft LR, Stable isotope mass spectrometry in honey analysis. *Trend Anal Chem* 6:20-29 (1987).
- Doner LW, Kushnir I and White JW, Assuring the quality of honey. Is it honey or syrup?. *Anal Chem* 51:224-232 (1979).
- Elflein L and Raetzke KP, Improved detection of honey adulteration by measuring differences between $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer-isotope ratio mass spectrometry and liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -EA/LC-IRMS). *Apidologie* 39:574-587 (2008).
- Guler A, Bek Y and Kement V, Verification test of sensory analyses of comb and strained honeys produced as pure and feeding intensively with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. *Food Chem* 109:891-898 (2008).
- Guler A, Kocaokutgen H, Garipoglu AV, Onder H, Ekinci D and Biyik S, Detection of adulterated honey produced by honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies fed with different levels of commercial industrial sugar (C(3) and C(4) plants) syrups by the carbon isotope ratio analysis. *Food Chem* 155:155-60 (2014).
- Hawkins J, de Vere N, Griffith A, Ford CR, Allainguillaume J, Hegarty MJ, et al., Using DNA Metabarcoding to Identify the Floral Composition of Honey: A New Tool for Investigating Honey Bee Foraging Preferences. *PLoS ONE* 10(8):e0134735 (2015).
- Holton TA and Graham MW, A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res* 19(5):1156 (1991).
- Jain SA, de Jesus FT, Marchioro GM and de Araujo ED, Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. *Food Sci Technol (Campinas)* 33(4): 753-756 (2013).
- Kamo T, Kusumoto Y, Tokuoka Y, Okubo S, Hayakawa H, Yoshiyama M, Kimura K and Konuma A, A DNA barcoding method for identifying and quantifying the composition of pollen species collected by European honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Appl Entomol Zool* 53:353-361 (2018).
- Lahmangaihi R, Ghatak S, Laha R, Gurusubramanian G and Kumar NS, Protocol for Optimal Quality and Quantity Pollen DNA Isolation from Honey Samples. *J Biomol Tech* 25:92-95(2014).
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG, Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948 (2007).
- Madesis P, Ganopoulos I, Sakaridis I, Argiriou A and Tsaftaris A, Advances of DNA-based methods for

-
- tracing the botanical origin of food products. *Food Res Int* 60:163-72 (2014).
- Manivanan P, Rajagopalan SM and Subbarayalu M, Studies on authentication of true source of honey using pollen DNA barcoding. *J Entomol Zool Stud* 6(3):255-261 (2018).
- Martin PG. *Manuals of Food Quality Control: 3. Commodities: Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, Italy (1979).
- Martin IG, Macias EM, Sanches JS, Rivera BG, Detection of honey adulteration with beet sugar using stable isotope methodology. *Food Chem* 61:281-286 (1998).
- Morales V, Corzo N and Sanz ML, HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. *Food chem* 107:922-928 (2008).
- Padovan GJ, De Jong D, Rodrigues LP and Marchini JS, Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. *Food Chem* 82:633-636 (2003).
- Prosser SWJ and Hebert PDN, Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding. *Food Chem* 214:183-191 (2017).
- Ruiz-Matute AI, Soria AC, Martinez-Castro I and Sanz ML, New methodology based on GC-MS to detect honey adulteration with commercial syrups. *J Agr Food Chem* 55:7264-7269 (2007).
- Se KW, Wahab RA, Yaacob SNS and Ghoshal SK, Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends. *J Food Compost Anal* 80:16-32 (2019).
- Simsek A, Bilsel M and Goren AC, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pattern of honey from Turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using EA-IRMS. *Food Chem* 130:1115-1121 (2012).
- Singhal R, Kulkarni P and Rege D. Honey, quality criteria, in *Handbook of indices of food quality and authenticity* by Woodhead publishing ltd: Woodhead publishing ltd, Cambridge, England, pp. 358-385 (1997).
- Sivakesava S and Irudarayaj J, A rapida spectroscopic technique for determining honey adulteration with corn syrup. *J Food Sci* 66:787-792 (2001).
- Soares S, Amaral JS, Oliveira MBPP and Mafra I, A Comprehensive Review on the Main Honey Authentication Issues: Production and Origin. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 16:1072-1100 (2017).
- Sorkun K and Dog˘an C, The importance of the total number of pollen types in 10 Gr of honey in distinguishing between natural honey and artificial honey produced in Turkey. *Mellifera* 2:2-6 (2002).
- Swallow KW and Low NH, Detection of adulteration of honey with high fructose corn syrup and beet invert sugar using HPLC, in Paper presented at 33rd Annual Conference, Canadian Institute of Food Science and Technology, Saskatoon, Saskatchewan, Canada (1990).
- Tosun M, Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis method. *Food Chem* 138:1629-1632 (2013).
- Tremblay D, Duceppe MO, Thurston GB, Gagnon MC, Côte MJ, Bilodeau GJ, High-resolution biomonitoring of plant pathogens and plant species using metabarcoding of pollen pellet contents collected from a honey bee hive. *Environmental DNA* 1(2):155-175 (2019).
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J and Pérez-Alvarez JA, Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci* 73:R117-R124 (2008).
- Wang X, Andrae L and Engeseth NJ, Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. *J Agr Food Chem* 50:6923-6928 (2002).
- White JWJR and Robinson FA, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ rations of citrus honeys and Their Regulatory implications. *J AOAC Int* 66:1-3 (1983).
- White JWJR and Winters K, Honey protein as international standard for stable isotope ratio detection of adulteration of honey. *J AOAC Int* 72:907-911 (1989).
- White JWJR, Detection of honey adulteration by carbohydrate analysis. *J AOAC Int* 66:11-18 (1980).
-

Table 119. Commercial honey samples used to test the UR-qPCR system

Designation	Type	Weight	Origin	Link of website
UK1	Healthy Raw Organic Unfiltered African Honey	800g	UK	https://www.ebay.com/itm/Healthy-Raw-Organic-Unfiltered-African-Honey/173817612982?var=472505559038&hash=item2878564ab6:m:m_yjh8I_oNgEvs0qCtRQADQ
Ne2	Wild Himalayan Cliff Honey	300g	Nepal	https://www.ebay.com/itm/Wild-Himalayan-Cliff-Honey-From-Butwal-Nepal/183637908200?var=691090702334&hash=item2ac1ac1ae8:m:mMXr5wCVX7uHSHF_c0BNEBw
Pol3	Pure, Raw, Organic, Unheated Honey 2018 From Wild Fields	1.2kg	Poland	https://www.ebay.com/itm/Pure-Raw-Organic-Unheated-Honey-2018-From-Wild-Fields-of-Poland-1-2kg-2-65lb/283258827624?var=583857993929&hash=item41f38ab368:m:mxrfm6-16oksYkLsaL6q60w
Por4	Portuguese HONEY Raw Pure Natural Wildflower	500g	Portugal	https://www.ebay.com/itm/1-bottle-500-gr-17-6-oz-Portuguese-HONEY-Raw-Pure-Natural-Wildflower-Top-Down/201910069574?hash=item2f02c72946:g:JYAAOSw2gxYyw9f
US5	Nature Nate's 100% Pure Raw & Unfiltered Honey	453.5g	USA	https://www.amazon.com/gp/product/B00CMQD282/ref=ppx_yo_dt_b_asin_title_o01_s00?ie=UTF8&th=1
Ca6	Dabur Honey	453.6g	Canada	https://www.amazon.com/gp/product/B00KF3PR14/ref=ppx_yo_dt_b_asin_title_o03_s00?ie=UTF8&psc=1
In7	Patanjali Pure Honey	250g	India	https://www.amazon.com/gp/product/B07N9573X7/ref=ppx_yo_dt_b_asin_title_o02_s00?ie=UTF8&psc=1

Table 120. Sequencing result of seven commercial honeys

Sample	Sequence (5'-3')	NCBI reference
UK1-In7	CTGCACATGAGTTGAAATCGGAAATAGTTGTCCTACCTGTCAAGTGTGATACTCATGACAATATTGTGGAACAGAACTCCTCATGCAAAAAAGCGTGATCTTGAAGA TAACAATACTACAGATGTATCTACCGAGTCTAATGATGAGGGATTAATCCCA AACAAATTACCATTTCATGAAGTGCACAAGATT	100% similar to the <i>Zea mays</i> species (XM_020548728)

/// 끝////////////////////////////////////

(6) 실제 시판되고 있는 토종꿀에 유전자 검사법의 적용

(가) 토종꿀 4종 시료에 대한 일반검사와 본 과제 유전자 검사의 비교

한봉협회에서 제공한 토종꿀 시료 4종에 대한 일반검사를 전문기관에 요청하여 수행하였으며, 그 결과와 본 과제에서 개발된 유전자 검사의 결과를 비교하였다(표 121).

표 121. 한봉협회 제공 4개 시료에 대한 일반 검사 결과

번호	과당	포도당	수분	전화당	자당	HMF	탄소 동위 원소	F/G	산도	잔류	접수번호
4	37.1	28.6	18.0	65.7	2.9	0.0	-26.8	1.30	35.9	적합	21-연구 12
2	37.5	30.3	19.8	67.8	1.9	1.3	-22.3	1.24	23.4	적합	21-연구 10
1	37.8	30.6	15.0	68.4	3.0	0.0	-24.7	1.24	28.1	적합	21-연구 9
3	34.8	26.2	17.5	61.0	3.0	1.0	-27.3	1.33	28.1	적합	21-연구 11

표준물질 pCane-Cp를 사용한 lane 1-5는 Ct값에서 정량성을 Tm분석에서 정확성을 보여주었다. 한편, 한봉협회제공 4개 토종꿀 시료는 Tm분석에서 음성(사탕수수 고유 유전자 불검출)을 보여주었다.

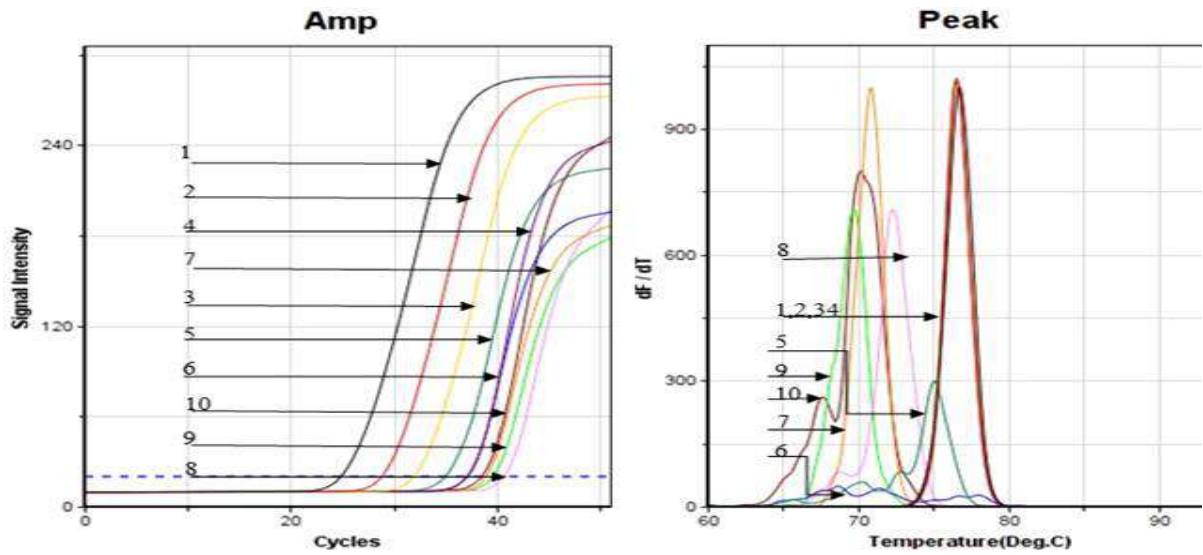


그림 253. 한봉협회제공 4개 시료에 대한 Cane-specific Detection PCR

표 122. 한봉협회제공 4개 시료에 대한 Cane-specific Detection PCR의 분석

Lane	Sample	Ct(cycle)	Tm(°C)
1	1x10 ⁴ of pGEM-cane-CP	24.74	76.68
2	1x10 ³ of pGEM-cane-CP	28.52	76.36
3	1x10 ² of pGEM-cane-CP	31.52	76.68
4	1x10 ¹ of pGEM-cane-CP	36.47	76.36
5	1x10 ⁰ of pGEM-cane-CP	34.43	75.05
6	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 평창	36.48	0.00
7	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 소백산	38.25	70.79
8	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 최상현	40.01	72.10
9	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 연천	38.98	69.81
10	No template	37.89	70.14
			76.23±0.68

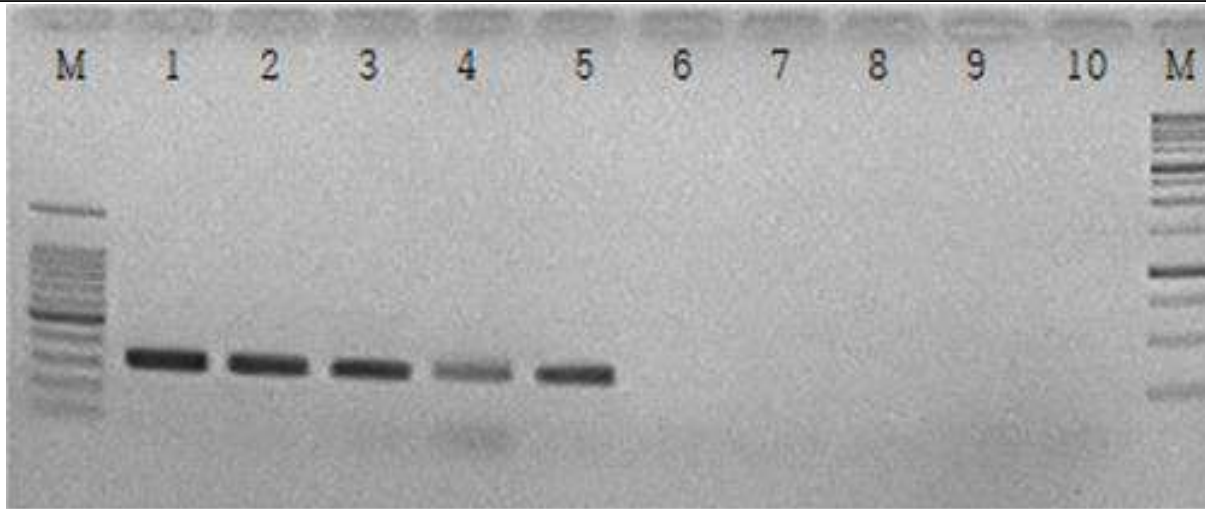


그림 254. 한봉협회제공 4개 시료에 대한 Cane-specific Detection PCR 산물의 전기영동

표준물질 pCane-Cp를 사용한 lane 1-5는 모두 특정 크기의 증폭산물을 만들었으나, 한봉협회 제공 4개 토종꿀 시료는 음성(사탕수수 고유 유전자 불검출)을 보여주었다.

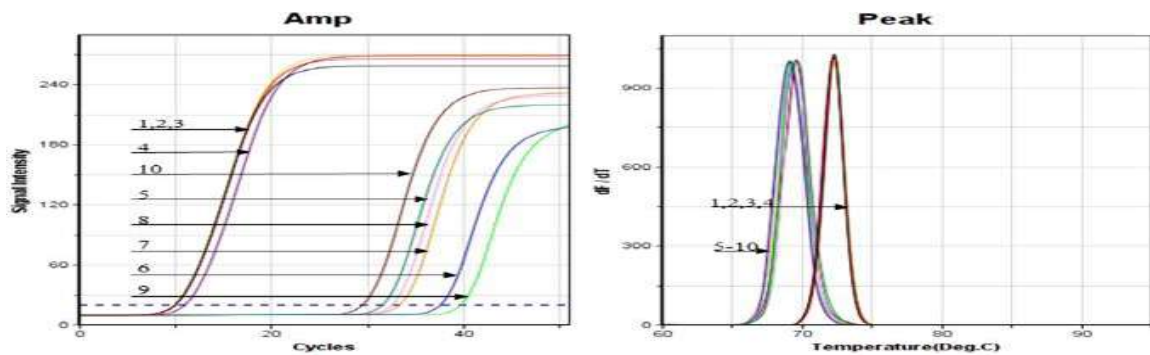


그림 255. 한봉협회 제공 4개 시료에 대한 Cane-specific Nested PCR

표준물질 pCane-Cp를 사용하여 detection PCR을 수행한 후, 각 반응물을 1/1000으로 희석하여 사탕수수 특이 nested PCR을 수행하였다. lane 1-4는 Ct값에서 과량의 특이 target가 있음을 보여주었으며, 모두 정확한 특이 Tm을 보여주었다. 한편, 한봉협회 제공 4개 토종꿀 시료는 Tm분석에서 음성(사탕수수 고유 유전자 불검출)을 보여주었다.

표 123. 한봉협회제공 4개 시료에 대한 Cane-specific Nested PCR의 분석

Lane	Sample	Ct(cycle)	Tm(°C)
1	1x10 ⁴ of pGEM-cane-CP	10.38	72.43
2	1x10 ³ of pGEM-cane-CP	10.43	72.10
3	1x10 ² of pGEM-cane-CP	10.43	72.43
4	1x10 ¹ of pGEM-cane-CP	11.40	72.10
5	1x10 ⁰ of pGEM-cane-CP	31.20	69.49
6	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 벌꿀	37.03	69.16
7	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 소맥산	32.96	69.16
8	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 최산형	32.18	69.49
9	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 연천	39.09	69.16
10	No template	29.20	69.49
			72.27 ± 0.17

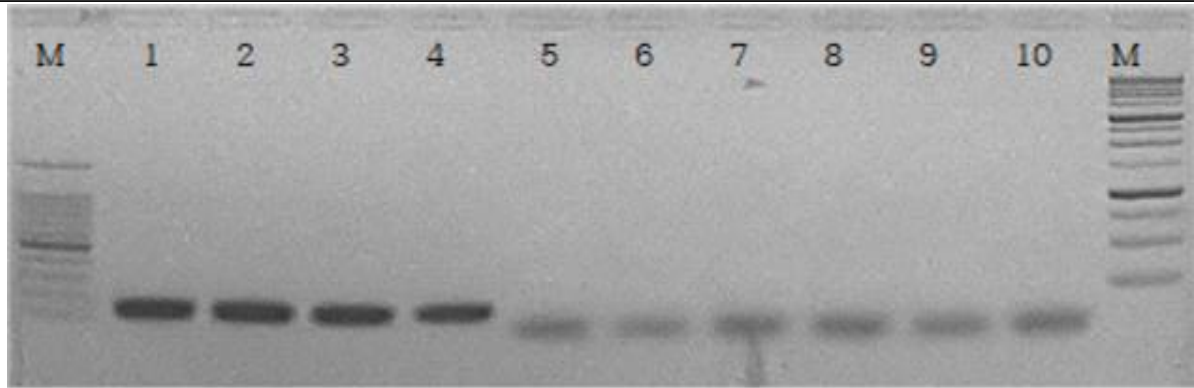


그림 256. 한봉협회제공 4개 시료에 대한 Cane-specific Nested PCR 산물의 전기영동

표준물질 pCane-Cp를 사용하여 detection PCR을 수행한 후, 각 반응물을 1/1000으로 희석하여 사탕수수 특이 nested PCR을 수행한 lane 1-4는 Ct값에서 과량의 특이 target가 있음을 보여주었다. Lane 5는 계산상 1개의 pCane-Cp를 template로 detection PCR한 산물을 같이 1/1000으로 희석하여 사탕수수 특이 nested PCR을 수행한 것으로, 이 수준의 극소 특이 분자에 대하여는 증폭되지 아니함을 보여주었다. 한편, 한봉협회 제공 4개 토종꿀 시료들도 모두 음성(사탕수수 고유 유전자 불검출)임을 보여주었다.

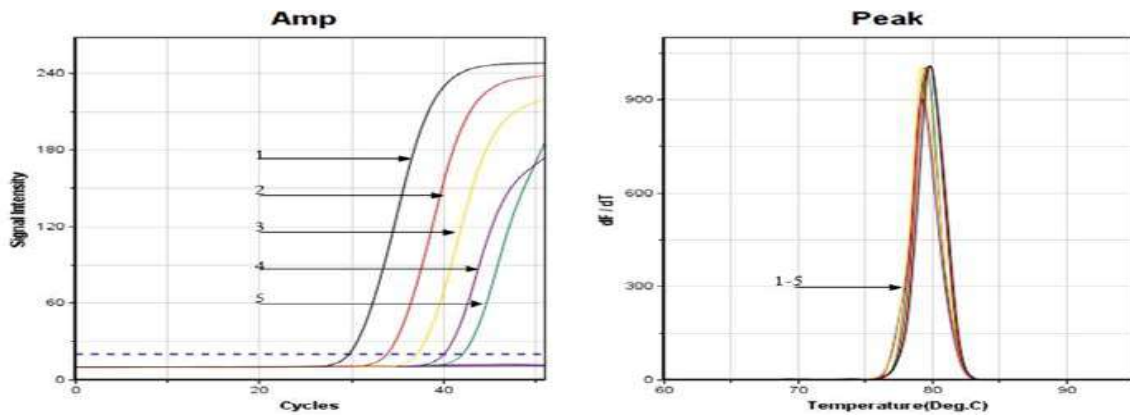


그림 257. 한봉협회제공 4개 시료에 대한 Beat-specific Detection PCR

표준물질 pBeet-RdRP를 사용한 lane 1-5는 Ct값에서 정량성을 Tm분석에서 정확성을 보여주었다. 한편, 한봉협회제공 4개 토종꿀 시료는 Tm분석에서 음성(사탕무우 고유 유전자 불검출)을 보여주었다.

표 124. 한봉협회제공 4개 시료에 대한 Beet-specific Detection PCR의 분석

Lane	Sample	Ct(cycle)	Tm(°C)
1	1x10 ⁴ of pTOP-RdDp315	29.43	79.95
2	1x10 ³ of pTOP-RdDp315	33.40	79.95
3	1x10 ² of pTOP-RdDp315	36.51	79.30
4	1x10 ¹ of pTOP-RdDp315	39.35	79.30
5	1x10 ⁰ of pTOP-RdDp315	41.31	79.63
6	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 평창	0.00	0.00
7	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 소백산	0.00	0.00
8	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 최상현	0.00	0.00
9	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 연천	0.00	0.00
10	No template	0.00	0.00
			79.63 ± 0.29

표준물질 pBeet-RdRP를 사용한 lane 1-4는 모두 특정 크기의 증폭산물을 만들었으나, 계산상 1개의 pBeet-RdRP를 template로 detection PCR한 lane 5는 특이 증폭산물을 볼 수 없었다. 한편, 한봉협회 제공 4개 토종꿀 시료는 음성(사탕무우 고유 유전자 불검출)을 보여주었다.

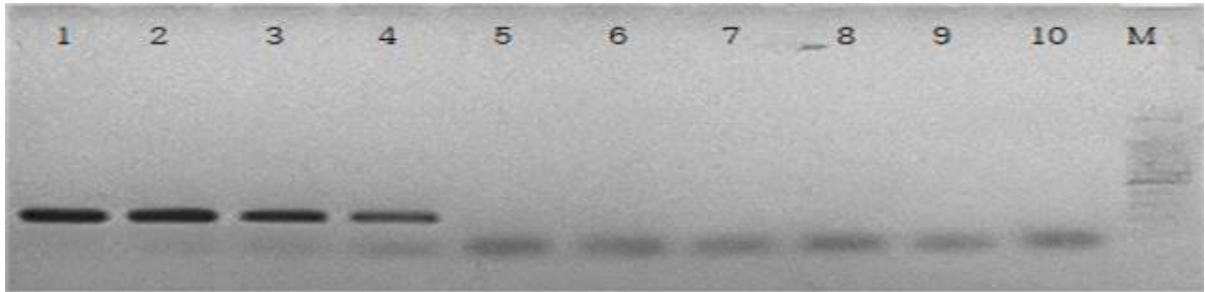


그림 258. 한봉협회제공 4개 시료에 대한 Beet-specific Detection PCR 산물의 전기영동

표준물질 pBeet-RdRP를 사용하여 detection PCR을 수행한 후, 각 반응물을 1/1000으로 희석하여 사탕무우 특이 nested PCR을 수행하였다. lane 1-5는 Ct값에서 과량의 특이 target가 있음을 보여주었으며, 모두 정확한 특이 Tm을 보여주었다. 한편, 한봉협회 제공 4개 토종꿀 시료 중 lane 8은 증폭 곡선, Ct값, Tm분석에서 모두 사탕무우 특이 유전자가 존재함을 보여주었으며, 나머지 3종 시료는 음성(사탕무우 고유 유전자 불검출)을 보여주었다.

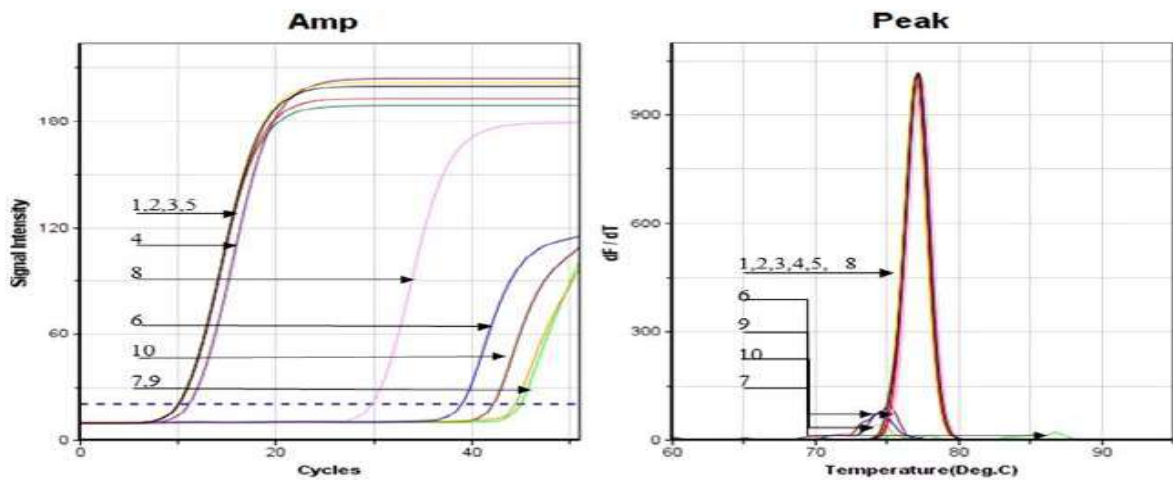


그림 259. 한봉협회제공 4개 시료에 대한 Beet-specific Nested PCR

표 125. 한봉협회제공 4개 시료에 대한 Beet-specific Nested PCR의 분석

Lane	Sample	Ct(cycle)	Tm(°C)
1	1x10 ⁴ of pTOP-RdDp315	10.50	77.01
2	1x10 ³ of pTOP-RdDp315	10.52	77.01
3	1x10 ² of pTOP-RdDp315	10.54	77.01
4	1x10 ¹ of pTOP-RdDp315	11.54	77.01
5	1x10 ⁰ of pTOP-RdDp315	10.53	77.34
6	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 평창	38.31	74.39
7	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 소백산	43.56	0.00
8	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 최상현	29.49	77.34
9	1 ul from total 50 ul DNA isolate d 2ml honey 연천	44.12	0.00
10	No template	41.42	75.05
			77.08±0.13

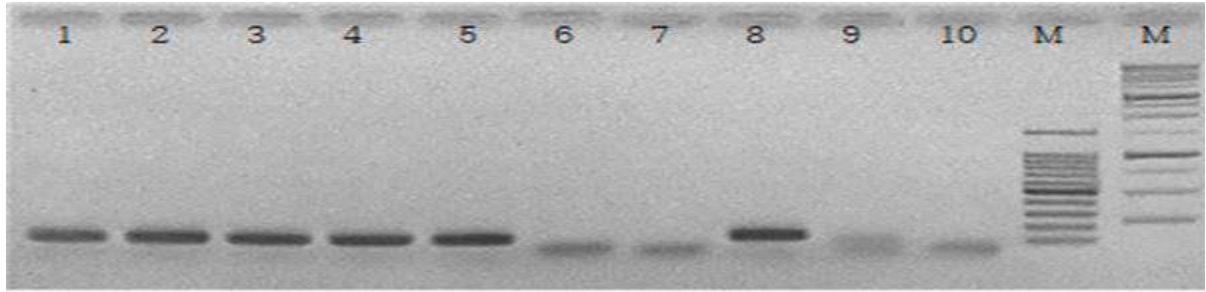


그림 260. 한봉협회제공 4개 시료에 대한 Beet-specific Nested PCR 산물의 전기영동

표준물질 pBeet-RdRP를 사용하여 detection PCR을 수행한 후, 각 반응물을 1/1000으로 희석하여 사탕수수 특이 nested PCR을 수행한 lane 1-5는 Ct값에서 과량의 특이 target가 있음을 보여주었다. Lane 5는 계산상 1개의 pBeet-RdRP를 template로 detection PCR한 산물을 같이 1/1000으로 희석하여 사탕무우 특이 nested PCR을 수행한 것으로, 이 수준의 극소 특이 분자에 대하여도 증폭됨을 보여주었다. 한편, 한봉협회 제공 4개 토종꿀 시료 중 lane 8은 Beet-specific product가 증폭되었음을 전기영동 상으로도 보여주었으며, 나머지 3종의 시료들은 모두 음성(사탕무우 고유 유전자 불검출)임을 보여주었다.

(나) 한봉협회 토종꿀 시료에 대한 사탕무우 및 사탕수수 유전자 검출

한봉협회로부터 수집된 토종꿀 시료 48종에 대한 사탕수수, 사탕무우 고유 유전자 증폭을 위한 detection PCR 및 nested PCR을 수행하였다.

사양꿀 판별을 위한 유전자 검사 PCR 실험의 개요는 아래와 같았다.

1) 벌꿀 유전자 검사: 4종 PCR은

- 가) 사탕수수 고유 유전자 detection PCR (Cane D-PCR)
- 나) 사탕무우 고유 유전자 detection PCR (Beet D-PCR)
- 다) 사탕수수 고유 유전자 nested PCR (Cane N-PCR)
- 라) 사탕무우 고유 유전자 nested PCR (Beet N-PCR) 이며,

2) 4종 PCR의 Template와 primer들은,

	Template	Forward primer	Reverse primer
가) Cane D-PCR	잔류DNA 1ul,	cane-cp-dF	cane-cp-dR
나) Beet D-PCR	“	Beet-RdRp-315dF	Beet-RdRp-315dR
다) Cane N-PCR	“	cane-cp-nF	cane-cp-nR
라) Beet N-PCR	“	Beet-RdRp-315nF	Beet-RdRp-315nR

3) 각 PCR의 standard PCR:

표준 DNA는 정량하여, 각 PCR 당 108 -106분자(약 1ng-0.01ng)의 standard DNA를 initial template로 넣어 주었다(주로 lane 1, lane 2 사용; Detection PCR과 Nested PCR 공통). 벌꿀에서 분리된 DNA에 대한 Nested PCR (2차 PCR)은 해당 DNA시료를 증폭시킨 Detection PCR (1차 PCR) 산물을 1/1000 또는 1/10000로 희석하여 initial template로 넣어 주었다.

- 가) pGEM-cane-cp DNA
- 나) pTop-beet-RdRp-315 DNA
- 다) pGEM-cane-cp DNA
- 라) pTop-beet-RdRp-315 DNA

-
- 4) 각 시료당 PCR의 조건 : 공통으로 95°C 30 sec 후,
가) 사탕수수 d : 95°C 3sec, 55°C 3sec, 72°C 3sec (50회전)
나) 사탕무우 d : 95°C 3sec, 59°C 3sec, 72°C 3sec (50회전)
다) 사탕수수 n : 95°C 3sec, 55°C 3sec, 72°C 3sec (50회전)
라) 사탕무우 n : 95°C 3sec, 57°C 3sec, 72°C 3sec (50회전)

5) 각 PCR의 조성 : 공통

Initial template	1 ul (표준 DNA 또는 벌꿀 시료에서 분리한 DNA)
Forward primer	1 ul (10 pmole 기준)
Reverse primer	1 ul (10 pmole 기준)
Distilled water	2 ul
2x PCR premix	5 ul (Genchecker 전용 PCR mix)
Total volume	10 ul / each PCR

6) 일반적 PCR-chip의 lane 구성

초고속 PCR-chip은 10개 lane으로 구성되었으며, 각 PCR은 10 ul의 조성으로 독립적으로 증폭한다. PCR-chip 내 각 lane은 아래와 같다.

- lane 1 : 108 분자(약 1ng)의 표준 DNA 및 해당 primer 쌍,
- lane 2 : 106분자(약 0.01ng)의 표준 DNA 및 해당 primer 쌍,
- lane 3 : 벌꿀로부터 분리된 시료 DNA1 및 해당 primer 쌍,
- lane 4 : 벌꿀로부터 분리된 시료 DNA2 및 해당 primer 쌍,
- lane 5 : 벌꿀로부터 분리된 시료 DNA3 및 해당 primer 쌍,
- lane 6 : 벌꿀로부터 분리된 시료 DNA4 및 해당 primer 쌍,
- lane 7 : 벌꿀로부터 분리된 시료 DNA5 및 해당 primer 쌍,
- lane 8 : 벌꿀로부터 분리된 시료 DNA6 및 해당 primer 쌍,
- lane 9 : 벌꿀로부터 분리된 시료 DNA7 및 해당 primer 쌍,
- lane 10 : 벌꿀로부터 분리된 시료 DNA8 및 해당 primer 쌍,

하나의 초고속 PCR-chip으로 1-2개 표준물질에 의한 PCR을 병행한다면, 나머지 9-8개 lane은 시료 DNA에 대한 유전자 검사를 수행할 수 있으며, 대략 100개 벌꿀시료에 대한 사탕수수 및 사탕무우 detection PCR과 nested PCR을 수행하여 검사한다면, 각 시료 DNA 당 4종의 PCR이기에 약 480 PCR을 수행하여야 하며, 약 48개의 PCR-chip이 소요될 것이다(표준 DNA의 lane 포함하여 약산함).

총 48개의 토종꿀 시료 중, 본 과제에서 제시하는 사탕수수 및 사탕무우 유전자 검사법에 의해 사탕수수 또는 사탕무우 설탕에 의한 사양의 흔적이 있는 것은 상당한 수의 시료로 나타났다(결과의 통계는 의미가 없으므로 제시하지 않음).

서양종 벌꿀에 대하여 시행하고 있는 일반 벌꿀검사에서는 단 하나의 시료만이 탄소동위원소비의 결과(EA-IRMS를 사용한 탄소동위원소비 판별)에 의해 천연꿀로 인정받지 못할 것으로 나왔으며, 나머지 모든 시료(45개)는 서양종 벌꿀의 품질 등급에서 등외의 판정을 받을 수 있는 것을 포함하여, 천연꿀로 인정받을 수 있는 탄소동위원소비를 보여주었다. 주지된 바와 같이 사탕무우 설탕으로 사양된 벌꿀은 천연꿀로 인정받을 수 있는 탄소동위원소비를 나타낸다. 우려되는 바는 상당수의 한봉협회 제공 토종꿀 시료에서 사탕무우 설탕에 의한 사양의 흔적이 발견되는 점이다. 이는

이미 토종꿀을 생산하는 많은 토봉농가가 전기한 사실을 알고 있으며, 탄소동위원소비 검사에 의한 불이익을 고려하여 사탕무우 설탕을 사용한 것이 아닌가 우려되는 것이다.

한봉협회에서 제공한 토종꿀 시료들(총 48개)은 사탕수수 및 사탕무우 고유 유전자의 증폭 여부를 모두 확인하였으며, 해당 토봉 농가의 불이익을 고려하여, 모두 익명으로 처리하였다. 본란에서는 한봉협회에서 제공한 48개 시료 중 사탕수수 고유 유전자가 검출된 시료의 수는 19 시료이며, 사탕무우 고유 유전자가 검출된 시료의 수는 24 시료라는 것을 밝히고, 한봉협회에서 제공한 시료 및 본 과제에서 수집한 시료(서양종 꿀벌에 의한 벌꿀 시료 포함)의 결과는 모두 익명으로 처리하여, 본 보고서 중 인용된, Food Control지에 발표예정인 논문 “Ultra-rapid qPCR for the detection of residual DNA in honey adulterated with sugar beet”에 포함시켰다.

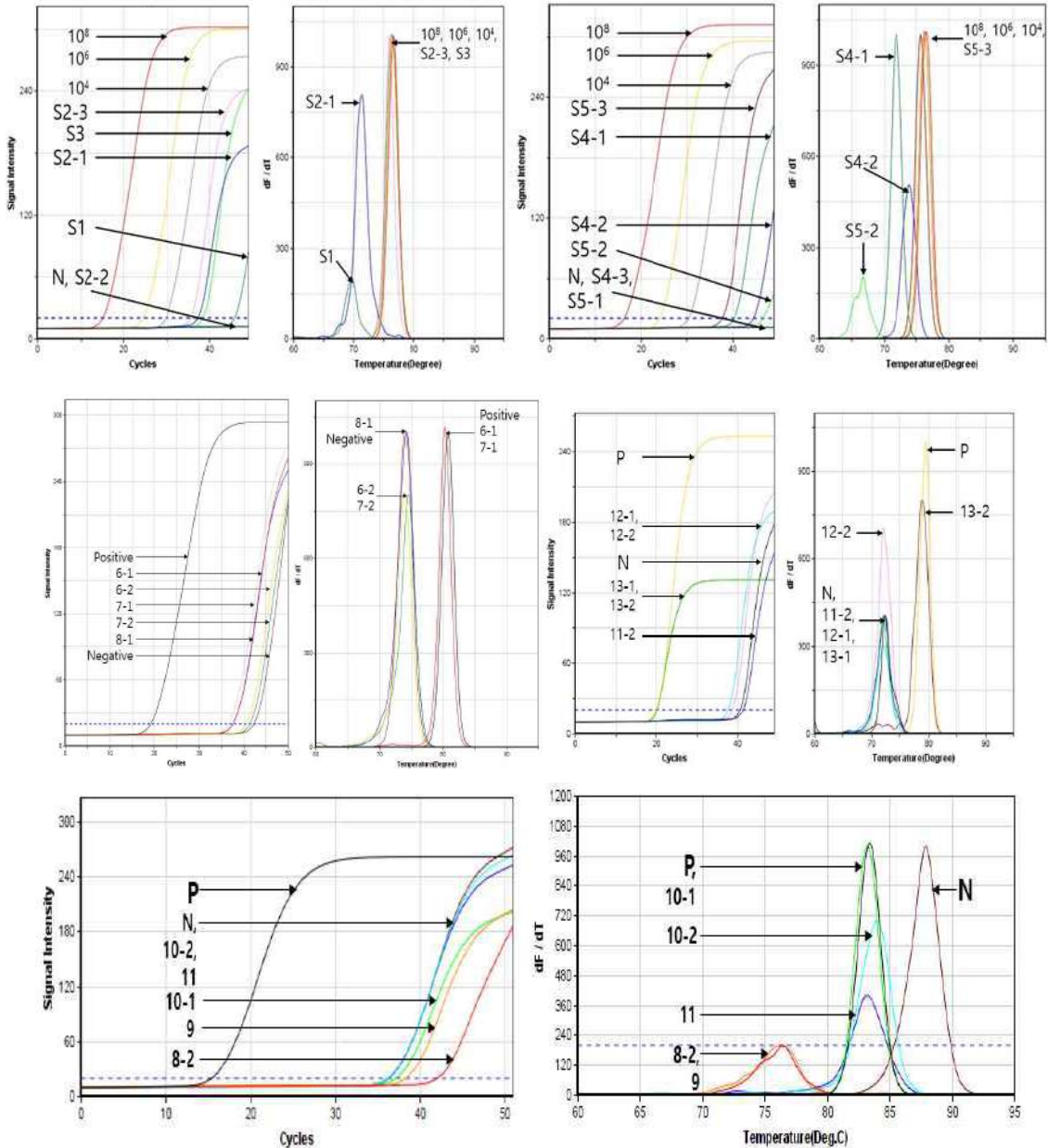


그림 261. 한봉협회에서 제공된 토종꿀 시료(26개)에 대한 사탕수수 특이 유전자 증폭

총 26개 토종꿀 시료를 사용하여 Cane-specific Detection PCR을 수행하여 사탕수수 고유 유전자의 증폭을 진행하였다. 이 결과를 보다 분명히 하기 위하여 Cane-specific Nested PCR을 수행하였으며, 9개의 시료(S2-3, S3, S5-3, 6-1, 7-1, 10-1, 10-2, 11, 13-2)로부터 사탕수수 특이 유전자의 증폭을 확인하였다.

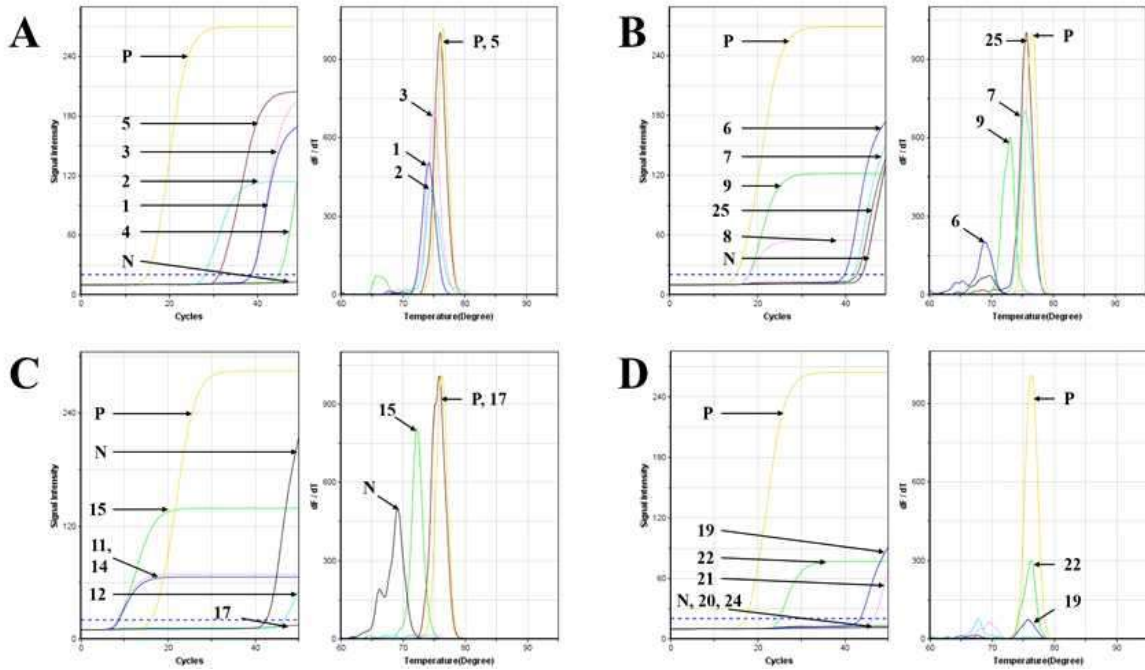


그림 262. 한봉협회에서 제공된 토종꿀 시료(22개)에 대한 사탕수수 특이 유전자 증폭

총 22개 토종꿀 시료를 사용하여 Cane-specific Detection PCR을 수행하여 사탕수수 고유 유전자의 증폭을 진행하였다. 이 결과를 보다 분명히 하기 위하여 Cane-specific Nested PCR을 수행하였으며, 8개 시료 (2, 3, 5, 7, 17, 19, 22, 25)로부터 사탕수수 특이 유전자의 증폭을 확인하였다.

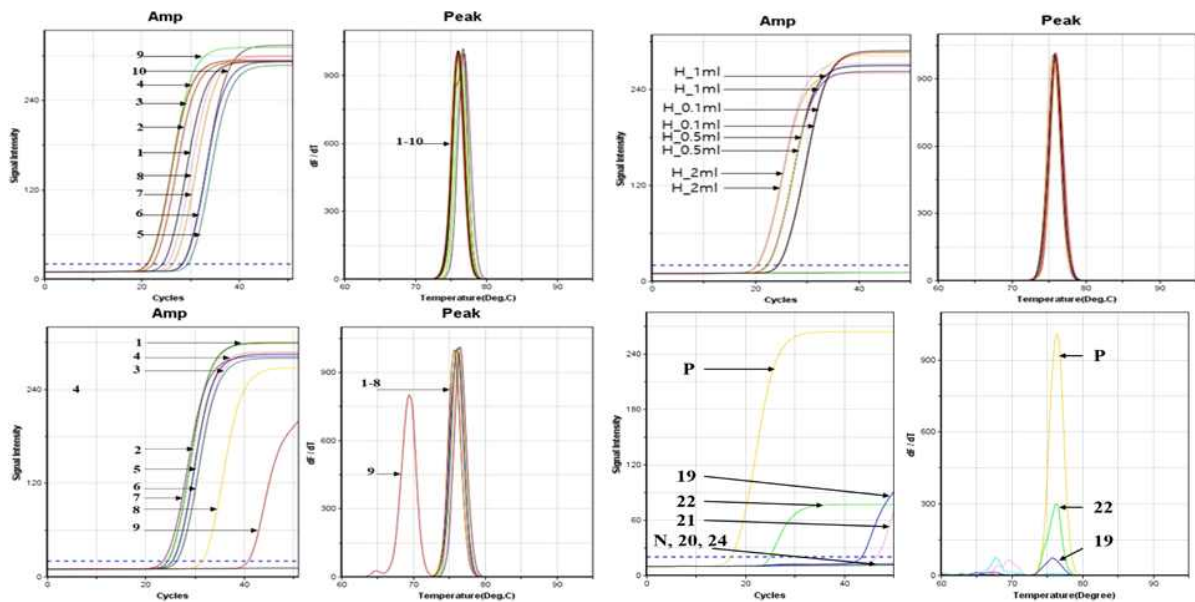


그림 263. 한봉협회에서 제공된 토종꿀 시료(26개)에 대한 사탕수수 특이 유전자 증폭

총 26개 토종꿀 시료에 대하여 Cane-specific Nested PCR으로 사탕수수 고유 유전자의 증폭을 수행하였다. 이 결과로 9개의 시료(S2-3, S3, S5-3, 6-1, 7-1, 10-1, 10-2, 11, 13-2)로부터 사탕수수 특이 유전자 증폭을 확인하였다.

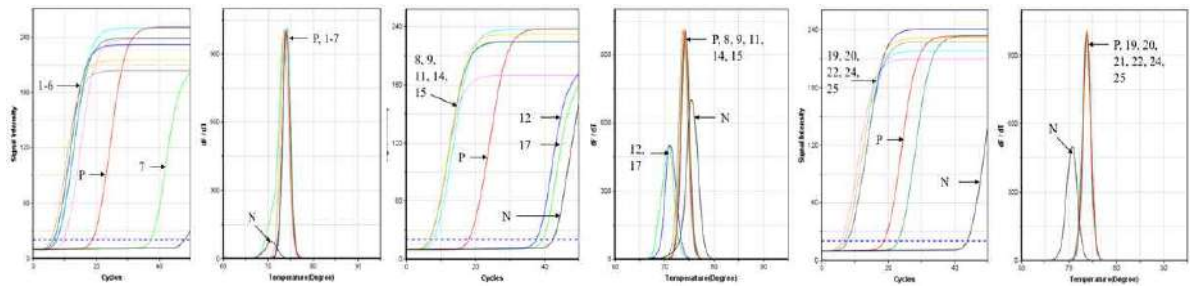


그림 264. 한봉협회에서 제공된 토종꿀 시료(22개)에 대한 사탕수수 특이 유전자 증폭

총 22개 토종꿀 시료에 대하여 Cane-specific Nested PCR으로 사탕수수 고유 유전자의 증폭을 수행하였다. 이 결과로 8개 시료 (2, 3, 5, 7, 17, 19, 22, 25)로부터 사탕수수 특이 유전자 증폭을 확인하였다.

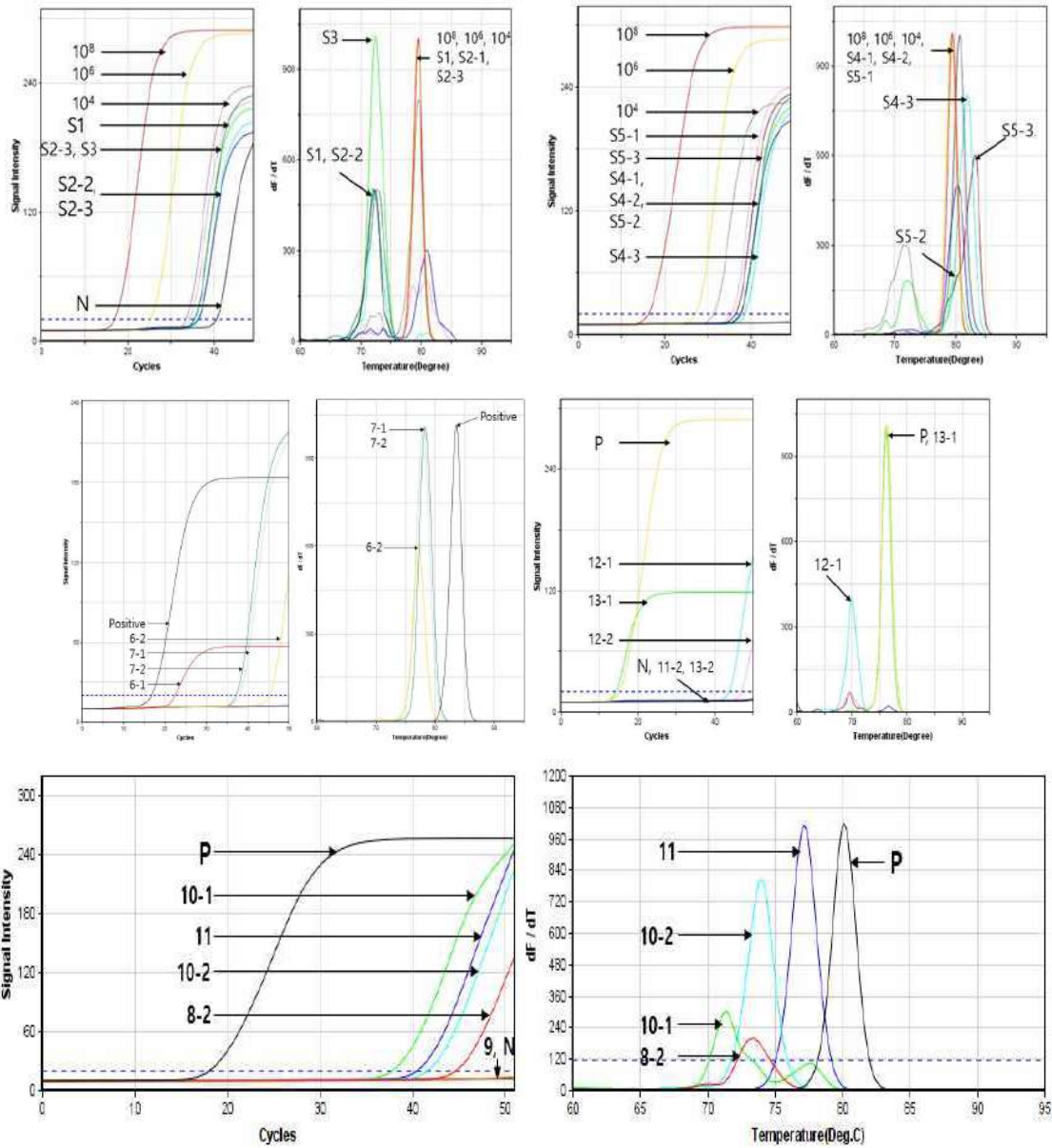


그림 265. 한봉협회에서 제공된 토종꿀 시료(26개)에 대한 사탕수수 특이 유전자 증폭

총 26개 토종꿀 시료를 사용하여 Beet-specific Detection PCR을 수행하여 사탕무우 고유 유전자의 증폭을 진행하였다. 이 결과를 보다 분명히 하기 위하여 Beet-specific Nested PCR을 수행하였으며, 8개 시료(S1, S2-1, S2-3, S4-1, S4-2, S4-3, S5-1, 13-1)로부터 사탕무우 특이 유전자 증폭을 확인하였다.

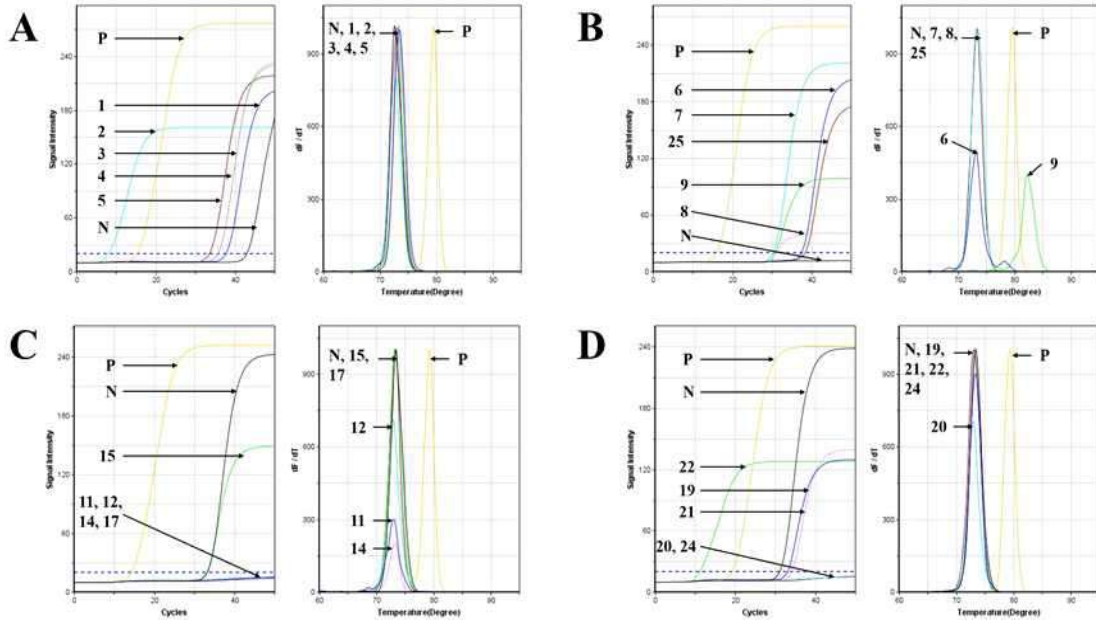


그림 266. 한봉협회에서 제공된 토종꿀 시료(22개)에 대한 사탕무우 특이 유전자 증폭

총 22개 토종꿀 시료를 사용하여 Beet-specific Detection PCR을 수행하여 사탕무우 고유 유전자의 증폭을 진행하였다. 이 결과를 보다 분명히 하기 위하여 Beet-specific Nested PCR을 수행하였으며, 사탕무우 특이 유전자 증폭을 확인하였다.

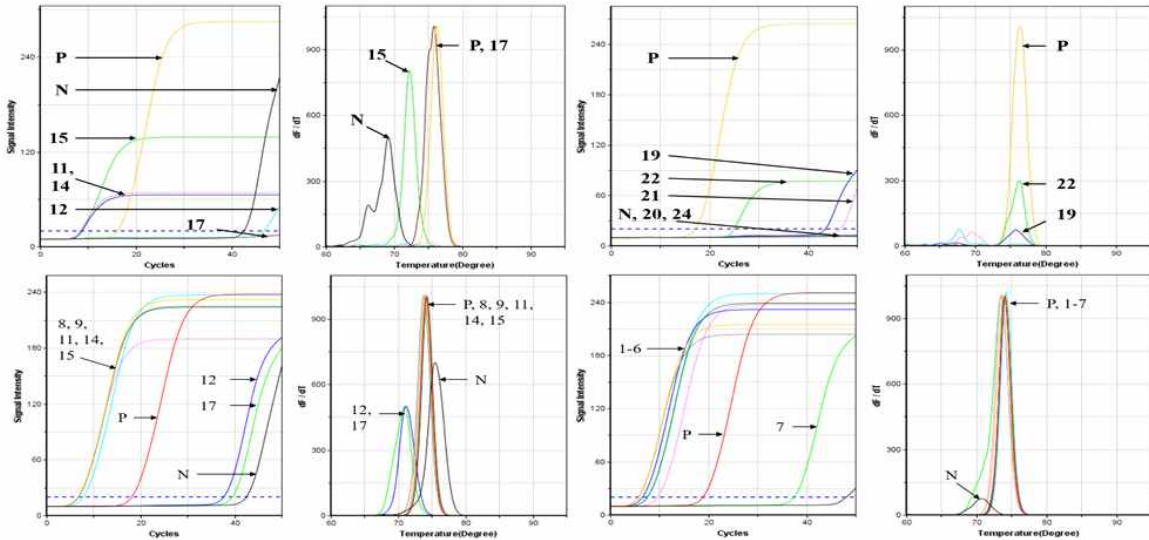


그림 267. 한봉협회에서 제공된 토종꿀 시료(26개)에 대한 사탕무우 특이 유전자 증폭

총 26개 토종꿀 시료를 사용하여 Beet-specific Nested PCR로 사탕무우 고유 유전자의 증폭을 수행하였다. Beet-specific Nested PCR은 8개 시료(S1, S2-1, S2-3, S4-1, S4-2, S4-3, S5-1, 13-1)로부터 사탕무우 특이 유전자 증폭을 확인하였다.

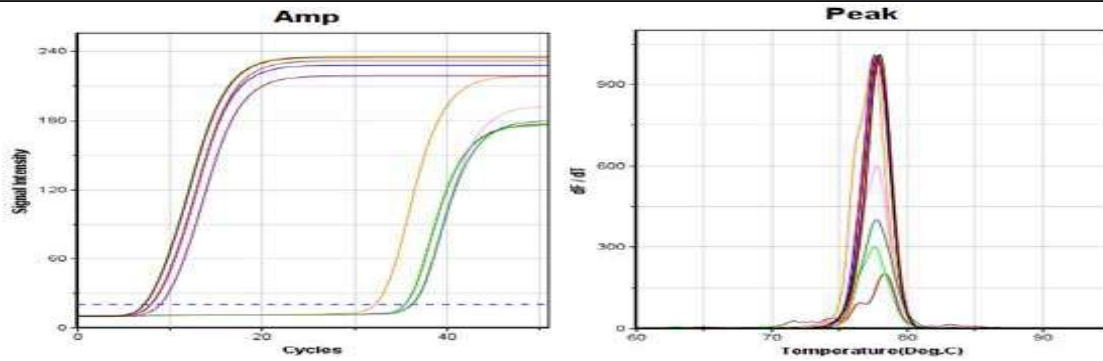


그림 268. 한봉협회에서 제공된 토종꿀 시료(22개)에 대한 사탕무우 특이 유전자 증폭

총 22개 토종꿀 시료를 사용하여 Beet-specific Nested PCR로 사탕무우 고유 유전자의 증폭을 수행하였다. Beet-specific Nested PCR은 사탕무우 특이 유전자 증폭을 확인하였다.

나) 국산 토종꿀의 품질평가법 개발

(1) 국산 토종꿀 성분 분석 및 지표 후보 물질의 분리

(가) 한봉협회를 통한 국내 토종꿀의 수집

본 과제의 1차년, 2차년 및 3차년 과제의 기간에 접수된 모든 시료를 2021년 7월 1일 현재로 정리하였다. 토종별 시료는 2018년 11월-12월에 20개 시료가 경기대에 접수되었으며(시료번호 2018-001에서 2018-020까지), 이를 1차년 시료로 통칭하였다. 이후, 2019년 12월에 18개 시료가 경기대에 접수되었으며(시료번호 2019-001부터 2019-018까지), 이 18개 시료는 2차년 시료로 통칭하였다. 따라서, 1, 2차년까지 접수된 시료의 총 수는 38개 이었다. 또한, 2020년 8월부터 현 시점까지 10개의 시료가 추가로 접수되었으나, 본 과제의 2차년 종료시점이 2020년 8월 19일이기에, 이들 10개의 시료(시료번호 2020-001에서 2020-010까지)에 대하여 3차년 연구를 수행하였으며, 이들 시료들은 3차년 시료로 통칭하였다. 현시점은 본 과제의 종료시점이기에, 이들 시료의 제공자를 밝히는 것은, 개인정보의 무단 공개의 문제 뿐 아니라, 본 과제의 연구결과에 따른, 제공된 꿀의 품질적 우열에 관한 논란이 파생될 것으로 예상되기에, 인적사항은 가급적 익명으로 하고, 연락처, 양봉장 상호 모두를 비공개로 하며, 지역도 군단위가 아닌 도단위만을 기재하고자 한다.

표 126. 한봉협회의 회원으로 부터 토종꿀 시료에 관한 접수 및 관련정보

경기대접수 시료번호	접수시기	시료수	비고
2018-001~2018-020	2018.11. ~2018.12.	20	1차년시료
2019-001~2019-018	2019.12. ~2019.12.	18	2차년시료
2020-001~2020-010	2020.08~2020.09.10	10	3차년시료

표 127. 한봉협회에서 토종꿀 시료에 관한 접수 및 관련정보 (한봉협회 시료 정보)

No.	시료이름 2018-	꿀 채취지역	채밀일시	생산량	재고량	예상주밀원	사양여부 [§]	비고
1	2018-1	경기도 포천시	2018.11.30		2되	밤, 아카시아, 나무종류 꽃	×	
2	2018-2	경기도 포천시	2018.12.10	40L		야생, 잡화, 들꽃	×	
3	2018-3	경기도 연천군	2018.12.04	30되	1kg	아카시아, 싸리, 귀룽, 헛개	×	
4	2018-4	경기도 연천군	2018.12.10		3말	아카시아, 참옷, 싸리, 들국화 등등	×	
5	2018-5	경기도 연천군	2018.12.06		20L	아카시아, 밤, 유채, 잡화	미기입	
6	2018-6	경기도 연천군	2018.12.02		30L	아카시아, 밤, 유채, 잡화	미기입	
7	2018-7	경기도 파주시	2018.10.12	12kg	1kg	염주나무, 잡화	×	
8	2018-8	경북 의성군	2018.12.04	2되		잡화 (토종)	×	
9	2018-9	경북 의성군	2018.10.25	6되		잡화	×	
10	2018-11	경북 예천군	2018.11.15	14되	4되	잡화 및 야생화	×	
11	2018-12	충북 괴산군	2018.11.01	30되	15되	밤, 야생화	×	
12	2018-14	충북 보은군	2018.11.15	2.4kg(15병)	1병	산밤나무, 복숭아	×	
13	2018-15	충북 보은군	2018.09.30	20		잡화	×	
14	2018-17	충북 제천시	2018.12.01	80L	40L	잡화	×	
15	2018-19	충북 제천시	2018.11.07	200되	100되	아카시아, 밤, 잡꽃수액(나무수액)	×	
16	2018-20	충북 충주시	2018.11.05	205L	10L	잡화	미기입	
17	2018-21	충북 제천시	2018.	84kg	2.4kg	잡화	미기입	
18	2018-22	충북 제천시	2018.11.30	4kg		밤, 잡화	×	
19	2018-24*	충북 청주시	2018.11.20	80되	2되	잡화	O	설탕물, 0.5L씩 4회
20	2018-25	충북 청주시	2018.11	20kg	2kg	잡화	×	

No.	시료번호	채밀일시	병입일시	입고일	생산량	재고량	예상주밀원	종류	용량	시점
21	2019-001	2019.11.10	2019.11.30	2019.12.10	1.2kg/227병	8병	잡화	급이 절대안함.		
22	2019-002	2019.12.12	2019.12.12	2019.12.18	3말		잡화	해당없음		
23	2019-003	2019.12.03	2019.12.03	2019.12.18	5말		잡화	해당없음		
24	2019-004	2019.11.20	2019.11.22		3말7되		잡화	해당없음		
25	2019-005	2019.11.20	2019.11.20	2019.12.18	3되		잡화	해당없음		
26	2019-006	2019.10.15	2019.10.22	2019.12.10	5되	4되	잡화	-		
27	2019-007	2018.11.초		2019.12.10	양봉꿀병 약 30병	없음-	잡화	설탕일체 무 (겨울에 자쳐꿀 3되이상 뜨지않고1년에 한번 품)		
28	2019-008	2018.10.25	2019.06.10	2019.12.10	65되	10되	아카시아, 밤, 잡화			채밀 10개월전 2018.10-11
29	2019-009	2017.10.25	2019.12.25	2020.01.03			아카시아, 밤, 잡화	백색설탕물 1.5:1		채밀11개월전 2016년 11월
30	2019-010	2019.10.28		2019.12.10	70리터(2리터3 5병)		혼합(잡화)	전혀없음		
31	2019-011	2019.11.07		2019.12.10			쉬나무, 헛개나무, 잡화	무		
32	2019-012	2019.08.30		2019.12.10			잡화		30	채밀5개월전
33	2019-013	2019.10.27		2019.12.10	350	35말				
34	2019-014	2019.11.		2019.12.27	1120kg(50병)					
35	2019-015	2019.11.25	2019.11.28	2019.12.16	1kg		잡화	없음		
36	2019-016	2019.10.10		2019.12.10			잡화			
37	2019-017	2019.10.15	2019.10.25	2019.12.10	500되 1250kg			무사양		
38	2019-018	2019.11.20	2019.11.20	2019.12.10	150kg					

No.	시료번호	채밀일시	병입일시	입고일	생산당	재고량	예상주밀원	중류	용당	시험
39	2020-001	2019.11.07		2020.08.11			잡화			
40	2020-002	2019.1.10	2020.08.04	20.08.11	5말		잡화		50	
41	2020-003	2019.02.10	2020.08.04	20.08.11	2말		잡화			
42	2020-004	2019.02.10	2020.08.04	2020.08.11	1말		잡화			
43	2020-005	2019.10.02	2020.08.16	2020.08.24			야생화			
44	2020-006	2019.10.05	2020.08.12	2020.08.24			야생화			
45	2020-007			2020.08.24			야생화			
46	2020-008	2019.09.28	2020.08.15	2020.08.24			야생화			
47	2020-009	2019.10.05	2020.08.13	2020.08.24			야생화			
48	2020-010	2019.10.12	2020.08.16	2020.08.24			야생화			

(나) 한봉협회를 통하여 수집된 토종꿀에 대한 벌꿀 일반 성분 분석

한봉협회에서 제공한 토종꿀 시료 48종에 대한 일반검사를 전문기관에 요청하여 수행하였으며, 그 결과를 이에 제시하며, 이 일반검사 결과와 비교하기 위하여 본 과제에서 개발된 유전자 검사의 결과는 연구수행 결과에 제시하였다(표 128).

표 128. 한봉협회를 통하여 접수된 토종꿀 시료의 기본 성분 분석

No.	시료번호	수분함량 (%)	전화당(%)	자당(%)	당비(F/G)	HMF (mg/kg)	탄소비 (%)
1	2018-001	20.0	60.7	4.3	1.58	3.5	-26.2
2	2018-002	20.4	60.3	4.3	1.59	3.1	-26.6
3	2018-003	17.6	59.0	4.1	1.58	5.4	-26.9
4	2018-004	16.5	63.4	4.4	1.48	26.0	-26.7
5	2018-005	16.5	64.4	4.8	1.46	24.3	-26.8
6	2018-006	17.4	58.2	5.3	20.7	65.3	-26.7
7	2018-007	17.9	60.7	4.5	1.31	6.9	-26.9
8	2018-008	21.0	61.0	4.7	1.39	2.2	-26.0
9	2018-009	22.4	59.3	4.8	1.46	1.5	-25.6
10	2018-010	20.4	55.7	4.7	1.50	3.8	-26.4
11	2018-011	19.6	60.3	4.9	1.45	6.9	-25.8
12	2018-012	16.9	61.4	4.3	1.44	2.5	-24.5
13	2018-013	19.0	58.7	5.1	1.56	3.6	-25.1
14	2018-014	19.2	62.5	4.9	1.33	2.8	-25.3
15	2018-015	20.1	63.1	4.7	1.42	3.6	-26.3
16	2018-016	18.3	59.4	5.2	1.34	8.0	-24.6
17	2018-017	20.4	57.6	5.1	1.47	2.4	-24.7
18	2018-018	21.4	61.9	4.4	1.44	6.6	-25.5
19	2018-019	20.4	60.2	4.6	1.55	7.2	-26.6
20	2018-020	20.0	57.4	4.7	1.52	2.2	-25.7

No.	시료번호	수분함량 (%)	전화당(%)	자당(%)	당비(F/G)	HMF (mg/kg)	탄소비 (‰)
21	2019-001	18.6	60.6	4.8	1.55	2.6	-26.4
22	2019-002	21.6	60.8	4.7	1.56	4.1	-25.4
23	2019-003	17.8	59.3	5.4	1.42	3.7	-26.7
24	2019-004	18.4	59.8	5.0	1.36	2.5	-24.5
25	2019-005	20.0	61.5	4.5	1.47	2.6	-25.7
26	2019-006	21.1	63.4	4.8	1.42	3.2	-24.5
27	2019-007	22.1	58.7	4.7	1.51	1.6	-25.2
28	2019-008	18.6	60.5	4.8	1.39	2.5	-25.9
29	2019-009	21.0	60.4	4.9	1.43	2.8	-25.8
30	2019-010	20.4	62.8	4.3	1.47	4.7	-24.2

No.	시료번호	수분함량 (%)	전화당(%)	자당(%)	당비(F/G)	HMF (mg/kg)	탄소비 (‰)
31	2019-011	19.0	64.2	5.5	1.38	2.4	-25.3
32	2019-012	19.3	60.5	5.4	1.38	2.3	-25.4
33	2019-013	18.3	58.7	4.6	1.39	2.7	-25.3
34	2019-014	22.8	60.3	4.8	1.40	3.4	-26.1
35	2019-015	19.3	63.6	5.0	1.51	2.5	-25.4
36	2019-016	23.8	66.4	5.3	1.49	3.1	-25.8
37	2019-017	20.8	57.6	4.7	1.41	2.6	-24.6
38	2019-018	23.4	59.7	4.9	1.38	5.8	-25.7

No.	시료번호	수분함량(%)	전화당	자당	당비(F/G)	HMF (mg/kg)	탄소비 (‰)
39	2020-01	19.0	59.6	4.6	1.58	3.5	-26.2
40	2020-02	20.4	60.1	4.8	1.54	3.1	-25.8
41	2020-03	18.6	58.4	5.3	1.58	4.0	-26.4
42	2020-04	17.4	58.6	5.2	1.51	3.2	-25.7
43	2020-05	17.3	60.2	5.3	1.48	3.6	-26.1
44	2020-06	18.2	60.1	4.9	1.52	4.2	-24.6
45	2020-07	20.3	57.2	4.6	1.57	3.4	-25.1
46	2020-08	19.3	57.8	5.0	1.52	3.9	-25.2
47	2020-09	17.8	59.2	5.6	1.51	2.8	-24.0
48	2020-10	18.1	60.3	4.7	1.51	3.2	-25.1

본 과제의 기간내 접수된 모든 시료(1차년 20개, 2차년 18개, 3차년 10개; 총 48)에 대한 벌꿀 기본 분석의 결과에서 다음과 같은 일반적 평가를 할 수 있었다. 즉, 수분함량에서 17.4%에서 22.4%까지 서양종 벌꿀과 비교하여 정상적 범위에 있었으며, 당비(F/G)는 대부분이 1.4에서 1.6이하로 나타났고, HMF (mg/kg)의 경우 약간의 시료에서 극히 높은 양이 측정되었으나, 대부분 5.0 mg/kg 이하의 수치로 측정되었다. 탄소동위원소비(‰)는 모든 시료에서 -24.0 (‰) 이하로 측정되었으나, 일부 시료 제공자가 설탕사양을 한 것으로 신고한 점에 비추어, 탄소동위원소비의 측정으로 설탕사양여부를 판정하기 어렵다고 판단된다.

(다) 한봉협회 제공 토종꿀 시료에 대한 지표 후보 물질의 발굴 (HPLC)

본 과제는 토종벌꿀의 HPLC분석법을 서양벌꿀에 적용하였던 양식과 같은 조건으로 HPLC분석을 진행하였으며, 48개 시료에 대한 HPLC의 분석결과는 “라. 부록: HPLC에 의한 토종꿀 지표후보물질 발굴“에 수록하였다.

HPLC의 분석조건

- 기기: Waters I class (Waters Corporation)
- Column: Halo C18 (2.1*100 mm, 2.0 um)
- Column temp. : 30°C
- Flow speed: 0.4 ml/min
- Injection dose : 2 µl
- wavelength: 254 nm

이동상은 (A) Acetonitrile, (B) 0.1%H₃PO₄를 순서대로 5%, 2 min 및 5-50%, 2-30 min의 조건으로 진행함.

토종꿀 시료에서 지표후보물질 발굴을 위한 분석은 HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)법으로 수행하였으며, 한봉협회를 통하여 수집된 총 48개 시료에 대하여 전량 검사를 수행하였다. 고성능 HPLC의 일종인 UPLC를 사용하여, 토종꿀 시료 중 1차년 시료 20개, 2차년 시료 18개, 3년차 총 48개의 UPLC 분석을 시행하였으며, 지표물질이 될 수 있는 후보물질을 발굴하고자 노력하였다.

국산 토종꿀의 지표 후보물질 발굴은 수집된 토종꿀시료에 대하여 수행되었으며, 이들의 HPLC 분석 결과를 토대로 수행되었다. 분석결과는, 지역적으로 전국에 걸쳐 생산된 토종꿀 시료에서 공통 또는 지역적으로 공통이라 간주할 수 있는 우세한 pick는 발견되지 아니하였으며, HPLC분석으로 토종꿀의 지표 후보물질을 새로이 발굴할 수 있는 가능성은, 본 연구진의 실력으로는, 매우 희박하고 성과를 기대하는 것이 무망한 것이 아닌가 판단하였다.

(라) 토종꿀과 타꿀과의 생리활성 비교 및 기준 마련

본 과제에서 지표 후보 물질의 발굴 중 가장 유용한 지표 후보물질은, 현시점에서, 잔류유전자(residual DNA) 및 화분 유전자 (pollen DNA)로 나타나고 있다.

잔류유전자(residual DNA)는 천연꿀임을 입증할 수 있는 사양꿀 판정에 결정적 증거로 사용될 수 있으며, 화분 유전자 (pollen DNA)는 토종꿀 중 일부, 일부가 각 지역 특산품이며, 향후, 각 특산품의 브랜드 아이덴티티의 지표로 사용될 수 있을 것이다.

현재까지 발굴된 지표 후보물질인 잔류유전자(residual DNA) 및 화분 유전자 (pollen DNA)는 모두 DNA이며, 이는 일부 RNA바이러스를 제외한 모든 생명체가 가지고 있으며, 우리도 식품으로 상당량의 DNA를 매일 섭취하고 있다(소고기, 생선, 계 등). 그러나, 우리가 DNA섭식에서 이상 증상(또는 생리활성)이 나타나지 않음으로 증명되듯이, DNA가 생리활성물질일 가능성은 없다 할 것이다.

강력한 지표 후보물질이며, 강력한 생리활성물질(항산화제) 후보인 벌꿀 중 페놀류((Total Pheno Content: TPC)는 자주 거론되었던 물질이다. 토종꿀에 함유된 페놀류는 Caffeic acid 등 다수의 개별 성분으로 재분류되며, 토종꿀에는 총페놀류의 양(TPC)이 약 300 mg/kg of honey가 함유된 것으로, 개별 성분인 Caffeic acid는 약 40 mg/kg of honey 내외가 포함된 것으로 측정되었다.

Mice를 이용한 동물실험에서 토종꿀을 섭식시킬 경우, 20g/kg of mice/day 수준이며, 1마리 mice의 무게가 10g내외이기에, 한마리 mice에게 섭식시킬 수 있는 토종꿀의 양은 0.2g (200mg)이 될 것이다.

이 수준에서 한마리 mice에게 일일 섭취시킬 수 있는 총페놀류(TPC)의 양은 약 60 microgram (ug)/day이며, 총페놀류 중 개별물질이며 생리활성물질인 Caffeic acid의 양은 약 8 microgram (ug)/day로 계산된다. 이런 극미량의 Caffeic acid가 다량의 당을 함유한 벌꿀과 같이 공급될 경우, 당에 의한 효과가 Caffeic acid에 의한 효과를 크게 가리게 될 것이다.

이런 이유로 생리활성 입증에 위한 동물실험은 다량의 벌꿀 등에서 농축된 개별물질(예; Caffeic acid 등)을 사용하여, 마우스 등 실험동물을 대상으로 실시하며, 배양된 세포 또는 조직에 대하여 실시하는 실험도 농축된 개별물질을 사용하고 있다. 사실, 벌꿀에 함유되어 있는 생리활성물질들에 대한 각각의 생리활성기능들은 많은 보고된 바 있다. 이는 배양된 세포에 대한 농축된 또는 별도로 합성된 화합물의 생리활성기능을 보고한 것으로 참고는 되나 진실의 일부만을 보고한 것이라 판단한다. 벌꿀을 그대로 실험동물에 투여하여 실험동물의 건강상태를 측정하는 보고는 있으나, 이는 영양학적 관점에서 벌꿀은 매우 좋은 식품임을 보고한 것이며, 실험계획의 관점에서 복합물질에 의한 복합증상을 설명하게 되어 개념이상의 사실(fact)을 입증하기에는 어려움이 있다 할 것이다.

본 과제는 토종꿀에서 지표 후보물질의 발굴에 노력하여, 여러 지표 후보물질을 발굴하고자 하였으나, 생리활성이 기대되는 지표물질은 특정하지 못하였다. 이런 지표후보 물질이 발견되어야 이를 목표로 토종꿀에서 해당 물질을 순수분리하고 농축하여, 연구목표(항산화능력 등 생리활성능)를 달성할 수 있는 실험계획(세포, 조직 또는 실험동물)이나마 수립할 수 있을 것이다.

본 과제는 3차년의 연구에서 생리활성이 기대되는 지표물질의 발굴을 계속하였으나, 이런 특정 물질의 발견을 이루지 못하였고, 따라서 생리활성 관련 실험을 시행을 기대할 수도 없었다.

(2) 국산 토종꿀의 품질평가 분석법의 최적화

본 과제는 총 3차년의 연구에서 가장 적절한 토종꿀의 품질평가 분석법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과로 우선 현재의 토종꿀 생산관리 및 유통의 여러 문제점을 지적하고, 이를 해결할 수 있는 과정 또는 방법을 제시하고자 한다. 이들 문제점들을 먼저 정리하자면:

1) 토종꿀의 농가 당 생산량이 소규모임: 고가의 비용이 드는 정확한 품질 평가를 위하여 적정 규모 이상의 생산량이 필요하다. 서양벌꿀에서는 한 드럼(220kg) 당 하나의 시료를 채취하여 한국양봉협회 또는 한국양봉농협 등에서 품질검사를 수행하고 있으며, 시료 당 검사비는 일반 검사(탄소동위원소비 포함)가 8만원 수준이나, 비회원의 시료는 80만원을 요구하고 있다. 이런 검사를 위한 생산량의 규모를 위하여도, 소규모 생산자 연합(협회 내 지회, 지부)을 결성하고, 규모의 생산량을 이룬 후, 이를 검사하여야 할 것으로 생각된다(또는 브랜드 화).

2) 토종꿀의 유통을 보증할 수 있는 권위 있는 보증서 발급 기관의 부재: 토종꿀이 설탕사양에 의한 사양(설탕)꿀이 아님을 보증할 수 있는 보증서 발급기관이 필요하며, 이 기관의 권위는 검사 능력과 생산자와 다른, 객관성이라 할 것이다. 현재 서양벌꿀에 대해서 한국양봉협회 또는 한국양봉농협 등의 검사소에서 이 역할을 담당하고 있으나, 사양꿀에 대한 시비는 계속되고 있으며, 한편, 상기의 보증서와는 무관하게 벌꿀을 판매하는 행위, 또한 적지 않은 수량이라 할 것이다.

3) 토종꿀의 품질 평가를 위한 방법론이 정립되지 않음: 토종꿀은 생산자, 소비자 및 관련기관이 납득할 수 있는 품질 평가 방법이 확립되어야 하며, 서양벌꿀에 대하여 시행하고 있는 수분함량, 과당/포도당비, HMF (mg/kg), 탄소동위원소비 등을 고려하여야 할 것이다. 잔류 항생제 및 농약의 검출은 한국양봉협회 또는 한국양봉농협 등의 검사소에서 시행하고 있으나, 이는 일반 검사에는 포함되어 있지 않다. 토종꿀의 품질검사를 위하여 적절한 대안이 하나씩 논의 되어야 할 것이며, 시급히 결정되고 시행되어야 할 것이다.

다) 국산 토종꿀의 등급 기준 설정

(1) 기본 성분 분석에 의한 토종꿀의 등급기준 설정

등급기준 설정은 합리적 척도에 의한 품질검사를 통해 판정되어야 하며, 생산자의 다수가 인정하고, 시장에서 소비자의 선택을 받아야 확립될 수 있다. 중언하자면,

- 1) 합리적 척도: 수분함량, Glucose 함량(%), F/G%, 향미, 색도, 탄소동위원소비 등,
- 2) 적용될 신뢰성있는 품질검사법: HPLC에 의한 함량의 정량, 탄소동위원소비 측정법,
- 3) 생산자의 합의: 토종꿀 생산자의 다수가 우수한 꿀이라 인정하는 척도,
- 4) 소비자의 선택: 우수한 등급은 고가이어도 높은 구매의욕이 있음 등이 그것이다.

현시점에서 토종꿀의 등급화를 추구하기 위하여, 국내 유수의 벌꿀인 아카시아꿀의 등급화 결과를 먼저 검토해볼 필요가 있을 것이다(표 129)

표 129. 한국 양봉 농협에서 적용 중인 벌꿀 판정 기준(예)

등급판정 항목	1+ (Premium)	1 (Special)	2 (Standard)
수 분(%)	20% 이하	20%초과 ~ 25%이하	25%초과
(단, 소분 판매 시에는 20%이하로 적용)			
과당/포도당비	-아카시아, 밤꿀: 1.5 이상 -잡화: 1.3 이상	-아카시아, 밤꿀: 1.5 이상 -잡화: 1.1 ~ 1.3 미만	-아카시아, 밤꿀: 1.5 이상 -잡화: 1.1 미만
HMF (mg/kg)	3 이하	3 초과 ~ 30 이하	30 초과
항생제 및 농약	옥세테트라사이클린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 시미아졸, 네오마이신, 아미트라즈 등의 불검출 및 특정농도 이하		

* 출처: 축산물품질평가원 공고 제 2013-17호 (2013.12.30.)

* HMF (Hydroxymethyl Furfural; 환원당지수)

상기의 표와 함께 향미, 색도 및 결함을 포함하여 벌꿀의 등급을 정하고자 하는 시도가 있었으나, 객관적 지표로 부족하다는 의견이 적지않아 현지 적용되지는 못하고 있다(표 130).

표 130. 한국 양봉 농협에서 적용 중인 다른 벌꿀 판정 기준(예)

등급판정 항목	1+ (Premium)	1 (Special)	2 (Standard)
수분(%)	20% 이하	20%초과 ~ 25%이하 (단, 소분 판매시에는 20%이하로 적용)	25%초과
과당/포도당비	-아카시아, 밤꿀: 1.5 이상 - 잡화: 1.3 이상	-아카시아, 밤꿀: 1.5 이상 - 잡화: 1.1 ~ 1.3 미만	-아카시아, 밤꿀: 1.5 이상 - 잡화: 1.1 미만
HMF (mg/kg)	3 이하	3 초과 ~ 30 이하	30 초과
향미	밀원의 일반적인 향미를 갖고 있으며 발효, 화학물질 등 다른 원인으로 인한 불쾌한 향이 없는 꿀	밀원의 일반적인 향미를 갖고 있으며 발효, 화학물질 등 다른 원인으로 인한 불쾌한 향이 거의 없는 꿀	1+, 1 등급에 해당되지 않은 꿀 (단, 밤꿀의 경우 색도의 범위에 포함되지 않을 경우 잡화로 밀원을 변경하여 신청할 수 있다.)
색도	밀원 고유의 색을 가지고 있는 꿀 - 아카시아: No. 1 ~ No. 2 - 밤꿀: No. 9, No. 10 - 잡화: No. 1 ~ No. 10	밀원 색을 가지고 있으나 고유의 색보다 옅거나 짙은 꿀 - 아카시아: No. 3 ~ No. 4 - 밤꿀: No. 8 - 잡화: No. 1 ~ No.10	
결함	품질에 영향을 줄 수 있는 결함이 전혀 없는 꿀		

* HMF (Hydroxymethyl Furfural; 환원당지수)

그 내용을 한 항목씩 분석하여 보면 다음과 같다. 우선, 한국양봉농협은 등급판정 항목을 1+(프리미엄), 1(스페셜), 2(표준)의 3단계로 나누어 시행하고 있으며, 수분(%)는 20%이하, 20%-25%, 25% 초과로 각 등급을 나누고 있다. 현실적으로 생산자 중 일부는 수분함량을 맞추기 위하여 생산된 미완숙 벌꿀을 건조시키고 있으며, 사실 미완숙 벌꿀(수분함량 높음)로 채밀하는 것이 완숙벌꿀(수분함량 낮음)로 채밀하는 것에 비하여 보다 높은 생산량을 보이기 때문에, 생산효율의 면에서만 보면, 미완숙벌꿀을 많이 생산하여 농축(건조)시키는 것이 보다 경제성이 높다 할 것이다. 한편, 벌꿀을 농축(건조)시키는 것은 HMF(mg/kg)의 수치를 높이는 것으로 나타났으며, 이는 상당히 널리 퍼져 있었던 벌꿀의 농축에 제한을 가하는 방법으로 사용되었다. 그러나, 농축의 기술도 발전하여, HMF(mg/kg)의 수치를 높이지 않고 벌꿀을 농축시킬 수 있는 방법 또한 알려지고 있다.

토종꿀의 경우, 등급화에서 이 수분함량을 어떻게 결정하여야 할 것인가? 본 과제의 벌꿀 기본분석의 결과는, 접수된 48개 토종꿀 시료에 대한 수분함량 측정에서 17.4%에서 22.4%까지로 나타났으며, 48개 시료 중 17개 시료는 수분함량이 20%이하로 측정되었다. 한편, 접수된 시료 중 2개는 HMF (mg/kg)의 측정에서 20-30 mg/kg으로 나타났으며, 또한 1개는 30 mg/kg 이상으로 측정되었다. 이 3개 시료의 수분함량은 모두 20% 이하이었으나, 시료로 제공된 벌꿀은 가열 농축하지 않았는가 추정된다. 또한, 토종꿀의 성분 분석에 의한 등급화에서 주요 척도는 과당/포도당% (F/G%)이 될 것이다. 본 과제의 벌꿀 기본분석의 결과는, 접수된 48개 토종꿀 시료에 대한 당비(F/G)는 대부분이 1.4에서 1.6이하로 나타났다. 48개 토종꿀 시료의 과당/포도당% (F/G%)는, 양봉농협의 등급판정기준(표 46) 중 잡화항목(1.3 이상)을 적용하면, 모두 1+(프리미엄)급을 받을 수 있는 수준이다. 그리고, 토종꿀의 성분 분석에 의한 등급화에서 사용될 수 있는 주요 척도는 향미 그리고 색도가 될 것이나, 이 척도 들은, 토종꿀의 다양함으로 인하여, 보다 객관적인 방법이 적용되어야 할 것이며, 이러한 다양성은 등급화의 척도 설정을 보다 어렵게 하는 요소가 될 것이다. 서양벌꿀에서도 논란이 되고 있는 탄소동위원소비(‰)는, 토종꿀 시료에 대한 벌꿀 기본분석의 결과에서, 모든 시료가 -24.0 (‰) 이하로 측정되었다. 이는 양봉농협의 등급판정기준을 적용하면, 모두 1+(프리미엄)급을 받을 수 있는 수준이나, 일부 시료 제공자가 설탕사양을 한 것으로 신고한 점 만 고려하여도, 탄소동위원소비 (‰)의 측정으로 사탕무우설탕의 사양여부를 판정하기는 어렵다고 판단된다.

(2) 지표 후보물질 분석에 의한 토종꿀의 등급기준 설정

본 과제는 토종꿀의 지표 후보물질을 발굴하고자 노력을 경주하였다. 먼저, HPLC분석을 통하여, 지표 후보물질이 될 수 있는 물질을 찾으려 하였으며, 또한 사양꿀 여부를 검사하고자 하는 목적으로도 잔류 유전자(residual DNA) 분석법을 확립시키고 그 방법을 명료히 제시하였다.

별도로, 토종꿀에 잔류된 화분을 분리하고, 화분에서 화분유전자를 추출하고, 이들의 정성적, 정량적 분석을 시행함으로써, 토종꿀에 함유된 각 밀원식물 화분의 함량 및 함량비를 척도로 사용을 추구하였다.

그러나, 토종꿀 지표후보물질의 발굴이라는 목표에서 선행된 서양종 꿀벌에 의한 아카시아꿀의 지표후보물질의 발굴에서의 문제점, 즉,

- 1) 후보물질이 국내 전역에서 생산되는 토종꿀 중 절대 다수의 토종꿀(상품)에 함유되어 있는지 여부? (현재의 보편성의 문제)
- 2) 이 후보물질의 함량에 의하여 토종꿀의 품질을 평가할 수 있는지? (꿀품질 평가의 기준으로 신뢰성의 문제)
- 3) 꿀에 포함된 극미량의 후보물질이 해당 꿀을 그대로 섭취했을 경우, 해당 생리작용을 나타낼 수 있는지? (높은 함량의 보증 문제) 등을 검토하게 하였으며, 아울러,
- 4) 토종꿀의 다양성을 훼손하고, 획일성을 추구하는 것이 옳은 것인가? (국내 토종꿀을 단일 물질에 의해 평가하여 단일 상품으로?) 등의 근본적 의문이 계속 제기되고 있다할 것이다.

본과제의 연구가 종료된 현 시점에서, 가장 가능성이 높은 지표물질은 잔류유전자(residual DNA)라 생각되며, 이 잔류유전자 분석법의 확립을 통하여 사탕무 식물체의 고유유전자 정량, 사탕수수 고유유전자 정량이 정확히 수행된다면, 우수한 토종꿀은 천연꿀임을 분명히 주장하게 될 수 있을 것이다.

현시점에서 벌꿀의 최고 품질은, 역설적일 수 있으나, 천연 벌꿀(Natural honey)이라 할 것이다. 설탕으로 사양된 토종꿀은 아무리 기능적으로 유효한 약물이 들어있다 하더라도, 그 약물은 이미 화학적 합성의 길이 알려져 있기에, 약재로써 토종꿀은, 토종꿀 내 약제의 함량으로, 소비자를 납득시키기에는 한계가 있다.

벌꿀에는 어떤 첨가물도 가미할 수 없고, 첨가물(예: 유자)이 첨가된다면 식품의 분류에서 이미 꿀이 아닌 차로 분류되며, 일정한 약제(예: 카페인)가 첨가된 것도 역시 꿀이 아닌 차가 될 것이다.

명백히 토종꿀은 천연꿀이라는 과학적 입증이 있다면, 소비자의 신뢰를 받을 수 있을 것이며, 이 과학적 입증이 바로 국내에 재배되지 않는 사탕수수 및 사탕무 식물체의 고유 유전자가 토종꿀에서 발견되지 않는다는 입증일 것이다.

라) 국산 토종꿀 산업의 발전을 위한 제언

(1) 토종꿀의 등급 인증제 확립을 위한 제언

본 과제는 토종꿀의 등급 인증제 확립을 위하여 다음의 사항들을 제안하고자 한다. 기본적으로 한국양봉농협에서 시행하고 있는 등급기준 중 잡화꿀에 대한 기준을 크게 활용하고자 하면서, 새로이 천연벌꿀의 입증항목을 신설하여, 유전자검사를 통한 설탕생산식물(사탕무 및 사탕수수)의 고유 유전자가 미검출 또는 최소량이하 검출로 제한을 가하고자 하는 것이다.

- 세부적 사항으로는:

- 1) 수분함량(%): 표 46에서 제시한 바와 같이, 등급판정 항목을 1+(프리미엄), 1(스페셜), 2(표준)의 3단계로 나누어 시행하되, 수분함량(%)는 각 20%이하, 20%-25%, 25% 초과로 각 등급을 나눈다.
- 2) HMF (mg/kg): HMF의 경우, 각 등급을 3 mg/kg 이하, 3 mg/kg 초과 - 30 mg/kg, 30 mg/kg 초과로 등급을 나눈다.
- 3) 당비(F/G): 과당/포도당비(F/G)는 1.3이상, 1.1 - 1.3 미만, 1.1 미만으로 등급을 나눈다.
- 4) 향미 또는 색도: 이 항목들은 보다 많은 시료들에 의해 세부 평가지침이 제정되어야 하기에 인증제 확립을 이룬 후 논의하고자 한다.
- 5) 탄소동위원소비(%) : 탄소동위원소비는(%)는 아카시아꽃에서 사양꽃을 판별하려는 목적으로 많이 사용되었으나, 근래 사탕무설탕에 의한 사양꽃이 천연꽃과 같은 탄소동위원소비(-24 %)이하로 나타남에 따라, 사양꽃의 판별력이 크게 무력화되었다. 따라서, 이 항목을 제외시킨다.
- 6) 유전자 검사법: 본 과제에 의해 개발된 사탕무, 사탕수수 고유 유전자에 대한 유전자 검사법을 보다 개발하여 토종꿀 시료 모두에게 적용시킨다. 토종꿀에 사탕무, 사탕수수 고유 유전자가 불검출되어야 함을 원칙으로 하되, 우선, 인증제 확립을 위하여 일정기간(예: 3년)의 적용 유예기간을 두어 일정수의 분자 이상이 함유된 토종꿀은 2등급으로 그보다 적은 수의 분자가 함유된 꿀은 1등급으로, 검출되지 아니한 토종꿀은 1+급으로 하는 방식을 제안한다.

(2) 본 과제에서 제시하는 토종꿀의 등급 인증제(제안)

표 131. 본 과제에서 제시하는 토종꿀의 등급 인증제(안)

등급판정 항목	1+ (Premium)	1 (special)	2 (standard)	3 (minus)	4 (등급외)
사탕수수 및 사탕무우 고유 유전자 함유	검출되지 아니함	검출되었으나 극 미량	검출되었으나 미량	미량을 넘어섬	벌꿀증산을 목적으로 설탕 사용됨
수분함량	20% 이하	20%-24%	20%-25%	25%이상	-
과당/포도당비	-	-	-	-	-
HMF (mg/kg)	3이하	3-10	10-30	30초과	
향미					
색도					
탄소동위원소비	적용치 아니함	적용치 아니함	적용치 아니함	적용치 아니함	적용치 아니함
항생제 및 농약	옥시테트라사이클린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 시미아졸, 네오마이신, 아미트라즈 등의 불검출 또는 특정농도이하				

3) 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시

가) 소비자 선호에 기반한 토종꿀 상품화 방향성 제시

(1) 토종꿀 브랜드 아이덴티티 기반 상품화 프로세스 수립

(가) 연구방법

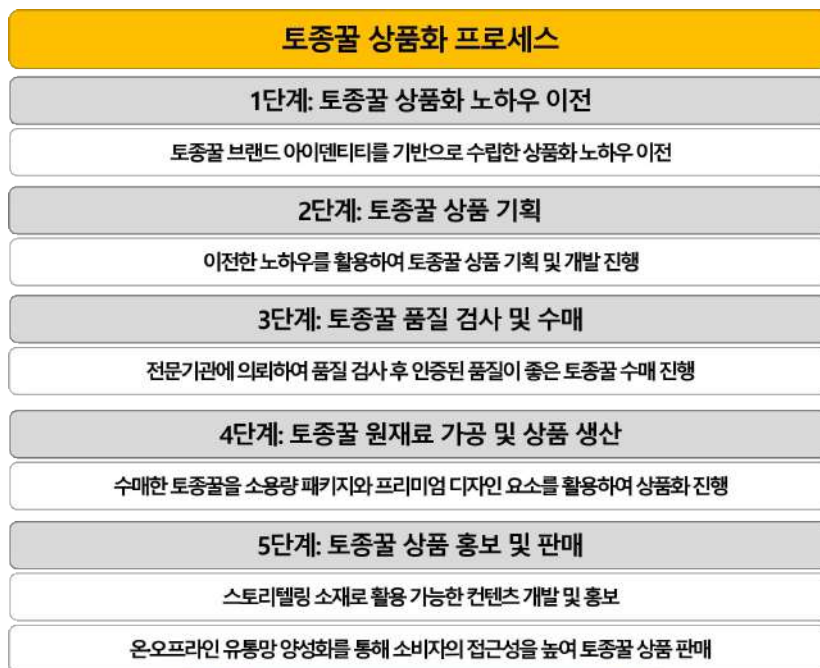
① 토종꿀 상품화 및 스토리텔링 개발 노하우 이전

- 2차연도에 수립된 토종꿀의 브랜드 아이덴티티와 홍보마케팅 전략 방향성을 기반으로 구체적인 상품화 전략 및 노하우를 도출함
- 토종꿀 상품화에 관심이 있는 기업을 대상으로 토종꿀에 대한 차별화된 상품 개발 전략과 스토리텔링 구축 노하우를 이전하여 소비자에게 토종꿀의 가치를 전달하고 토종꿀의 새로운 시장을 형성하고자 함

② 토종꿀 상품화 및 체계적인 유통을 위한 기업과의 협업

- 온라인 유통망을 구축하기 위해 농식품 온라인 유통 전문 기업과의 협업을 통해 토종꿀을 상품화하고 홍보 및 판매함
- 오프라인 유통망을 확대하기 위해 백화점 내 프리미엄 농식품 전문 매장과 협업하여 토종꿀 가공품 상품화 및 판매를 진행함

(나) 연구결과



실질적인 매출 달성

그림 269 토종꿀 상품화 프로세스

- ① 토종꿀 브랜드 아이덴티티에 기반한 체계적인 상품화 프로세스 도출
 - 전문적인 토종꿀 상품화를 위하여 기업과의 협업을 통해 스토리텔링 소재로써 활용 가능한 콘텐츠(지역별 밀원식물, 생산자 정보, 관능적 특성 등) 구성 노하우를 기반으로 상품 컨셉을 기획함
 - 전문기관을 통한 토종꿀 품질 검사 이후 인증된 토종꿀을 수매하였으며, 해당 토종꿀에 대해 당해연도에 출원한 상표를 활용한 토종꿀 인증마크를 제공함
 - 이후 원재료 가공 및 생산 과정을 거쳐 실질적인 토종꿀 상품화 및 판매를 진행함으로써 토종꿀 브랜드 아이덴티티에 기반한 상품화 프로세스를 구축하였음

- ② 양봉인구와 소비자들의 만족도를 끌어올릴 브랜드꿀 상품화 가이드라인 제안
 - 토종꿀은 생산 환경, 생산 방식, 주요 밀원식물의 분포에 따라 관능적 차이가 존재하므로 다른 주산지 및 다른 시기에 채입한 토종꿀을 혼입하게 될 경우 토종꿀 본연의 개성을 잃을 수 있으므로 토종꿀을 혼입하지 않아야 함
 - 프랑스어로 “풍토”를 뜻하는 고유 단어 테루아(terroir)는 음식이 만들어지는 자연 환경 또는 자연 환경으로 인해 음식이 갖게 된 독특한 향미를 뜻함. 다시 말해, 음식의 원료가 자라는 데 영향을 주는 지리, 기후, 재배법 등의 상호 작용을 한데 아우르는 말로 이러한 개념을 토종꿀에도 적용하여 토종꿀의 지역성 자체를 브랜드화 하여 상품화해야 함
 - 토종꿀의 테루아를 소비자에게 잘 소구시키기 위한 상품화의 방법 중 하나로는 테루아가 다른 꿀을 하나의 패키지에 여러 개의 세트 상품으로 구성하여 소비자들이 지역별 토종꿀 간의 관능적 차이를 비교하면서 경험해 볼 수 있도록 하는 것임
 - 또한, 토종꿀의 생산 환경, 즉 벌통의 위치에 따라서 그 맛이 근본적으로 다르다는 점을 강조하는 상품화 전략을 취할 필요가 있음
 - 토종꿀이 가질 수 있는 테루아와 이로부터 발생하는 프리미엄한 가치를 보다 잘 전달하기 위해서는 기존의 대용량 패키징보다는 소용량 패키징으로 제품화하는 것을 고려해야 함
 - 토종꿀 생산자들은 기존에 지인들을 통해 알음알음 토종꿀을 판매하는 방식에서 벗어나, 유통업체와의 협업을 통해 온·오프라인 유통망을 확대하는 방식을 추구해야 함

- ③ 실질적인 토종꿀 상품화를 통해 토종꿀 시장의 성장 가능성 확인
 - 토종꿀은 토종벌이 서식하고 있는 지역의 밀원식물로부터 수확한 꿀로서, 벌통을 이동하지 않는 고정양봉을 통해 꿀을 수확하며 1년에 한 번 채집을 진행함
 - 따라서, 벌통이 위치한 지역의 환경적 요인에 따라 관능적 차이가 존재하므로, 토종꿀의 생산 환경, 생산 방식, 주요 밀원식물, 관능적 특성 등에 대한 정보를 조사한 후 이에 기반하여 상품화를 진행하였음
 - 기업과의 협업을 통해 다양한 토종꿀 상품을 출시했으며, 실질적인 매출을 달성하여 토종꿀에 대한 소비자 수요와 토종꿀 시장의 성장 가능성을 확인하였음

(2) 소비자 선호에 기반한 토종꿀 상품화 전략 수립 및 상품 개발 (위탁과제)

(가) 연구방법

- ① 토종꿀 특성 조사를 통한 차별화된 제품 컨셉 개발
 - 토종꿀의 본질적 특성인 지역별 밀원식물 및 생육환경 등의 영향으로 인해 나타나는 차이점을 활용하여 소비자들이 취향에 맞게 선택할 수 있는 제품 컨셉을 개발함
 - 또한, 토종꿀이 지니고 있는 프리미엄 이미지를 강조하기 위해 세련된 디자인 요소(패키지, 라벨, 포장지 등)를 활용함

② 토종꿀 농가 선정 및 인터뷰를 통한 스토리텔링 구축

- 2차연도에 확보한 토종꿀 농가 리스트 중 토종꿀 생산량, 판매 의사 등의 기준을 고려하여 상품화가 가능하다고 판단되는 농가들을 선정함
- 선정된 토종꿀 농가를 직접 방문하여 생산자 인터뷰를 통해 토종꿀의 본질적 특성(품종, 생육환경, 생육방식, 후처리방식)에 관련된 정보들을 수집함
- 수집된 정보를 활용하여 스토리텔링 콘텐츠를 개발하였으며, 이를 토종꿀 상품 홍보 및 소비자들과의 커뮤니케이션 도구로 사용하였음

(나) 연구결과

① 각 지역의 특성을 담고 있는 토종꿀 세트 상품 개발

[1st 에디션 프롬 자연 토종꿀 2020 - 연천과 제천 밀원으로부터]

- 인위적인 사양, 열처리를 하지 않고 자연 상태로 수확한 토종꿀을 상품화함
 - 프롬 자연 토종꿀 2020 1차 에디션은 연천과 제천지역의 토종꿀을 사용하여 각 150g 용량의 세트 상품을 출시함
 - 밀원식물이 서식하는 환경적 차이에서 비롯되는 관능적 차이를 강조하였음
 - 지역별 토종꿀 생산 환경, 생산 방식, 주요 밀원식물, 관능적 특성들을 조사하여 스토리텔링 형태로 구체적인 정보를 제공함
 - 전문기관을 통해 토종꿀 기본성분분석을 진행하여 원료로 사용된 토종꿀의 품질을 판단한 후 (사)한국한봉협회의 협업을 통해 품질 인증서를 제작하여 상품에 대한 신뢰도를 확보함
 - 상품 출시 이전에 체험단을 모집하여 연천, 제천 토종꿀을 미리 경험할 수 있도록 했으며, 이러한 경험을 프롬마켓 홈페이지(<https://from.kr/market/best>) 및 개인 SNS에 공유하게끔 함으로써 온라인 바이럴을 통해 토종꿀 상품을 홍보함
-



그림 270. 프롬 자연 토종꿀 2020
- 연천과 제천 밀원으로부터



그림 271. 프롬 토종꿀 체험단 리뷰

[2nd 에디션 프롬 자연 토종꿀 2021 - 연천과 제천 밀원으로부터]

- 인위적인 사양, 열처리를 하지 않고 자연 상태로 수확한 토종꿀을 상품화함
- 2nd 에디션으로는 연천과 강원 지역의 토종꿀을 선정하여 4종 세트(150g*4병), 단품 500g 5종으로 구성하여 상품화를 진행함
- 같은 지역 내에서 수확한 토종꿀이더라도, 주위 환경에 따라 관능적으로 미세하게 차이가 나타나는 점(마이크로 페루아)을 활용함
- 연천의 경우, 벌통의 위치가 다른 3 종류의 토종꿀을 수매했으며, 각각의 마이크로 페루아(작은 분지, 임진강 절벽 위, 절벽 아래)에 대한 정보를 수집함
- 강원도의 경우, 벌통의 위치가 다른 2종류의 토종꿀과 동일한 생산자가 충청도에서 생산한 토종꿀을 수매했으며, 마이크로 페루아에 대한 정보를 수집함
- 제품 출시 전 프롬마켓 홈페이지와 SNS를 통해 마이크로 페루아로 인해 발생하는 밀원식물, 관능적 차이에 대한 정보를 전달함
- 소비자들의 토종꿀 취향을 파악할 수 있는 온라인 테스트를 기획하여 소비자들의 토종꿀 관여도를 끌어올림



그림 272. 오인국 생산자(연천) 토종꿀



그림 273. 이명수 생산자(평창) 토종꿀



그림 274. 이정만 생산자(연천) 토종꿀



그림 275. 이명수 생산자(단양) 토종꿀

② 소용량 패키지 및 디자인 요소를 활용한 토종꿀 상품화

- 기존의 토종꿀 패키지는 전통적인 단지 형태의 대용량 용기에 담아 판매되고 있어 토종꿀 프리미엄 이미지를 전달하기 어려움
- 다양한 지역의 토종꿀 상품(약 3~4개)을 세련된 소용량 용기에 담아 하나의 세트 상품으로 구성하여 판매를 진행하였음
- 또한 세련된 디자인적 요소(캐리커처, 라벨, 패키지, 병 모양 등)를 활용하여 토종꿀의 프리미엄 이미지를 강조함으로써 토종꿀 가격 지불의사를 높임



그림 276. 세련된 소용량 패키지를 활용한 토종꿀 상품

(다) 온라인 유통망 확대

- 기존의 토종꿀은 소매점이나 온라인 상으로 구매할 수 있는 방식이 아닌, 소비자가 알음알음 토종꿀 농가를 방문해서 토종꿀을 구매하는 형태로 접근성이 낮은 한계가 존재함
- 젊은 소비층의 식료품 유통 경로가 오프라인에서 온라인으로 이동하고 있음에 따라 온라인 판로를 개척하여 토종꿀에 대한 접근성을 높임
- 온라인 플랫폼에서 소비자들 간 연결이 가능하기에, 소비자들의 토종꿀 경험을 서로 공유하게 함으로써 토종꿀에 대한 관여도를 끌어 올림



그림 277. 농식품 온라인 유통망 플랫폼 '프롬' - 토종꿀 판매

(3) 지역성을 강조한 프리미엄 토종꿀 가공품 개발

(가) 연구방법

① 프리미엄 토종꿀 가공품 개발을 위한 조사

- 토종꿀의 부가 가치를 증대하기 위해 토종꿀의 가공품 현황을 조사한 후 토종꿀의 프리미엄 이미지에 적합한 가공품 형태를 선정함
- 토종꿀의 프리미엄 이미지를 강조하기에 적합한 백화점 전통식품 브랜드 명인명촌과 협업하여 토종꿀 상품화 프로세스를 진행함

(나) 연구결과

① 프리미엄 토종꿀 진옥고 상품화

- 경기도 연천과 전라도 무주 지역의 토종꿀을 활용하여 프리미엄 토종꿀 진옥고 상품을 개발함
- 진옥고란 꿀을 사용해 만든 한약의 일종으로, 전통방식 그대로 토종꿀과 한방재료를 혼합하여 제조하여 소비자들의 지불의사가 높은 상품임
- 상품의 특성에 맞게 현대백화점 내 오프라인 매장 및 온라인 사이트(현대식품관 to Home)를 통해 유통할 것이며, 토종꿀에 대한 스토리텔링, 가이드북 등을 활용하여 홍보할 예정임



그림 278. 명인명촌 토종꿀 진옥고

나) 토종꿀 산업 활성화를 위한 브랜드 운영 전략 제시

(1) 식재료의 본질에 기반한 브랜드 운영 전략 도출

(가) 연구방법

① 식재료의 본질 4요소에 대한 정의

- 품종: 생물학적, 유전적으로 구분되는 식재료의 특성
- 생육환경: 어떤 환경에서 성장하느냐에 따라 달라지는 식재료의 특성
- 생육방식: 작물을 두고 인간과 생육환경의 상호작용으로 달라지는 식재료의 특성
- 후처리방식: 식재료의 보존성과 기호성/상미성을 끌어 올리는 인간의 노력

② 토종꿀의 본질 4요소에 대한 조사

- 의성, 제천, 가평, 연천, 괴산, 임계, 울릉도, 인제를 방문하여 토종꿀 생산자와의 인터뷰, 생산지 방문을 통해 생산지의 자연환경, 밀원식물, 채밀 방식을 비롯하여 토종꿀의 본질 4요소와 관련 있는 정보를 수집함
- 선행연구, 지자체 홈페이지를 통해 자료를 수집한 후 생산지 기후 및 자연환경, 밀원식물 조사를 수행하여 지역별 토종꿀의 본질 4요소에 대한 정보를 구체화함

(나) 연구결과

① 서양꿀과는 차별화된 토종꿀의 본질적 특성 도출

- 토종꿀은 토종벌(*Apis Cerana*)이 우리나라 우리 땅에서 한 해 동안 나고 자란 밀원들로부터 따온 꿀을 1년에 한 번 채밀한 꿀임
- 토종벌(*Apis Cerana*)은 서양벌(*Apis Mellifera*)에 비해 몸체의 크기가 작고 1회 수밀량도 적은 편이며, 선호하는 밀원도 자생하는 지역에 분포하는 밀원들로 서양벌이 선호하는 밀원과 다름

	토종벌 (<i>Apis Cerana</i>)	서양벌 (<i>Apis Mellifera</i>)	<i>Apis cerana</i> <i>Apis mellifera</i>
분포 지역	북부, 한국, 일본 등 동아시아	유럽에서 출발해 전 세계에 분포	
크기	몸크기: 119mm 허길아: 53mm	몸크기: 127mm 허길아: 65mm	
1회 수밀량	16mg	37mg	
선호 밀원	산딸기, 짙레꽃, 철쭉, 아기똥풀, 국수나무	아카시아, 클로버, 보리수, 엉겅퀴	

그림 279. 토종벌과 서양벌의 차이

- 밀원을 따라 계속 이동하며 꿀을 채집하고 수확하는 이동양봉 방식으로 생육되는 서양벌과 달리 토종벌은 봄부터 10월 말까지 고정양봉을 통해 생육됨
- 이로 인해, 토종꿀은 해당 지역의 피고 지는 들꽃의 향이 응축되어 있고 그 지역의 떼루아를 간직하고 있다고 할 수 있음
- 원심 분리로 꿀을 추출하는 서양꿀과 달리, 토종꿀은 1년에 벌집을 한 번에 압착 추출하므로 그 지역의 회분, 로열젤리, 프로폴리스까지 모두 추출이 가능함



그림 280. 토종벌통, 토종꿀의 압착 추출 과정, 토종꿀



그림 281. 서양벌통, 서양벌의 이동양봉

② 토종꿀의 차별화된 특성에 대한 구체적인 정보 제공

- 토종꿀 생산과 관련된 구체적인 정보를 제공함으로써 토종꿀에 대한 소비자의 신뢰도를 제고해야 함(예: 벌통의 종류, 수확 시기/횟수, 채밀 방법, 품질 향상을 위한 생산자만의 고유 기술)
- 생산자의 이름과 거주지, 벌통의 위치, 벌통이 위치한 곳의 지형과 기후조건과 같이 생산자와 생산 환경에 대한 구체적인 정보를 제공해야 함
- 벌통의 재료 및 구조, 토종꿀의 수확 시기 및 횟수, 채밀 방법, 채밀 온도, 채밀 시 사용하는 도구와 같이 생산 방식에 대한 구체적인 정보를 제공해야 함
- 토종꿀의 차별화된 특성에 대한 구체적인 정보를 제공함으로써, 소비자들로 하여금 생산지별 환경적 특성의 차이에 따른 관능적 차이를 경험하도록 할 수 있음

생산자	<ul style="list-style-type: none"> ◆성함 : 최상현 ◆주소 : 경기도 연천군 군남면 군남로 944 	
생산 환경	<ul style="list-style-type: none"> ◆토종꿀 생산지(벌통) 위치: 경기도 연천군 중면 도연리 ◆연천군은 경기도 최북단에 위치하며 연평균 기온은 10.4℃임 ◆비무장지대(DMZ)에 벌통이 놓여 있어 인적 없는 청정지역에서 토종꿀이 생산되고 있음 ◆생산지 주변은 산지가 발달해 있고 벌통이 놓인 장소는 해발 250m의 상대적으로 높은 고도의 골짜기에 위치해 있어 밤에는 바람이 내리 불고 낮에는 바람이 위로 부는 지형임 	
생산자	<ul style="list-style-type: none"> ◆성함 : 오인국 ◆주소 : 경기도 연천군 군남면 연군로 404 	
생산 환경	<ul style="list-style-type: none"> ◆토종꿀 생산지(벌통) 위치: 경기도 연천군 중면 강내리 ◆임진강 상류 주상절리에 5 ~ 10m 간격으로 약 14개 정도의 벌통이 놓여 있음 ◆벌통의 위치가 강과 가까워서 강의 영향을 많이 받아 강근처에 서식하는 식생을 밀원으로 하며, 벌통이 해발고도 100m 즈음에 설치되어 있어서 고도가 높은 곳에서 자라는 식생 또한 밀원으로 삼고 있음 	

그림 282. 토종꿀 생산자 및 생산 환경에 대한 정보 제공 사례 개발 예시

생산 방식

- ◆ 통나무로 만든 벌통을 비롯해 나무로 된 사각 벌통, 스티로폼벌통을 사용하며 채밀기를 직접 개발하여 사용하고 있음
- ◆ 1년에 한 번 11월 초 중순에 꿀을 뜨며, 벌들이 겨울 동안 식량으로 삼을 꿀을 일정량 남겨 놓음
- ◆ 스테인리스로 된 채밀기를 사용하여 열을 가하지 않고 30~35도의 실온을 유지하며 꿀을 내리는 방식을 활용함



생산 방식

- ◆ 소나무, 오동나무, 버드나무를 이용해 통나무 벌통을 만들고 번식용 틀과 채밀기를 직접 개발하여 사용하고 있음
- ◆ 벌통은 땅에서 어느 정도 띄워서 설치하고 벌통의 아랫부분이 깨끗하게 유지될 수 있도록 20일에 한 번씩 아랫부분을 청소함. 개미가 들어오지 못하도록 개미가 싫어하는 향이 나는 약을 둠
- ◆ 1년에 한 번, 11월 중하순에 꿀을 뜨며, 벌들이 겨울 동안 식량으로 삼을 꿀을 일정량 남겨 놓음
- ◆ 스테인리스로 된 채밀기를 사용하여 열을 가하지 않고 꿀을 내리는 방식을 활용하며 채밀된 꿀은 25℃ 온도로 실내보관함



그림 283. 토종꿀 생산 방식에 대한 정보 제공 사례 개발 예시

③ 농가별 월별 토종꿀 밀원식물 분포표 제시

- 토종꿀 생산지별 자생하는 주요 밀원식물에 따라 관능적 차이가 나타나므로 각 토종꿀에 대한 월별 밀원식물 분포표를 제작하여 소비자에 전달해야 함
- 1세부(서울대학교 이승환 교수)에서 제작한 월별 종합 밀원식물 조합도를 활용하여 토종벌들이 밀원식물로 삼는 식물들을 전반적으로 확인한 후 각 토종꿀 농가 생산자 인터뷰를 통해 월별 주요 밀원식물에 대해 조사함
- 조사한 내용을 기반으로 소비자가 이해하기 쉬운 형태의 월별 주요 밀원식물 분포표를 제작하였으며, 각 밀원식물의 분포정도에 따라 핵심밀원을 표시하여 전달함

밀원 식물

- ◆ 벌통이 위치한 골짜기를 둘러싼 복숭아 나무, 아카시아 나무, 들국화 등을 밀원으로 함
- ◆ 주 밀원식물: 생강나무(3월), 복숭아나무(4월), 산딸기나무(5월), 싸리(7월), 산국(9-10월)

밀원식물	밀원 분포정도								
	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	
갯버들									
생강나무	핵심밀원								
산수유									
개복숭아나무		핵심밀원							
벗나무									
울벚나무									
산벚나무									
앵두나무									
애기홍불									
개살구									
돌배나무									
심수리나무									
조팝나무									
분꽃나무									
귀중나무									
산사나무									
팔배나무									
산딸기나무			핵심밀원						
아카시아나무									
족제비싸리									
신갈나무									
신나무									
마가목									
산마늘									
중충나무									
검양울나무									
물푸레나무									
다래									
배초향									
국수나무									
쨍레꽃									
개망초									
밤나무									
사위질빵									
영경취									
머루									
물봉선									
찰피나무									
광대싸리									
가시오갈피나무									
담쟁이덩굴									
헛개나무									
두릅나무									
읍나무									
싸리					핵심밀원				
향유									
참싸리									
삼주									
환심덩굴									
오갈피나무									
들깨꽃									
메밀꽃									
붉나무									
산국									핵심밀원
연백국화									

그림 284. 월별 주요 밀원식물표 개발 사례

(2) 소비자 신뢰도 제고를 위한 토종꿀 품질인증방법 제시

(가) 연구방법

① 토종꿀 품질인증 프로세스의 필요성 제시

- 현 시행 벌꿀 품질등급제를 기반으로 당원(사탕무, 사탕수수, 콘시럽) 고유 유전자 검출기준을 추가한 토종꿀에 적합한 품질인증 프로세스 구축의 필요성을 확인함
- 실제로, 생산자들은 토종꿀의 품질인증을 득할 수 있는 실질적인 방안을 잘 모르기 때문에 체계적인 프로세스를 구축하여 이를 실천할 수 있는 방안과 이에 수반되는 절차 및 비용에 관련된 정보를 전달해야 함

(나) 연구결과

① 토종꿀 품질인증 프로세스 구축

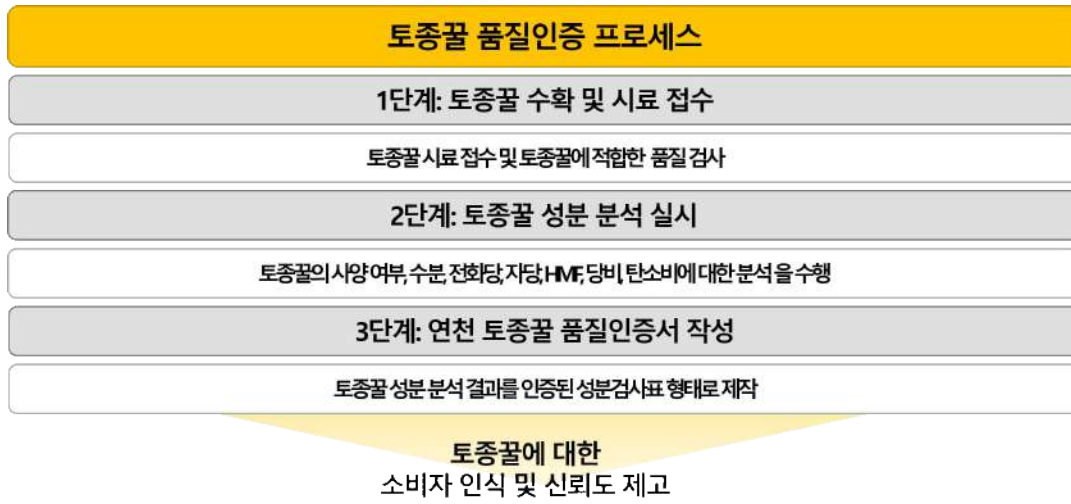


그림 285. 토종꿀 품질인증 프로세스

- 본 연구과제는 토종꿀에 적합한 품질 프로세스를 구축하고, 실제 토종꿀 생산자들이 실천할 수 있는 품질인증 방법에 관한 노하우를 도출함
- 이러한 노하우를 토종꿀 생산자들에게 전달하여 실질적으로 농가 단위에서 토종꿀 성분 분석을 통해 품질 인증을 받을 수 있는 방법을 전달함
- 또한, 토종꿀 성분분석 결과를 품질인증서의 형태로 반영하여 해당 내용을 전달함으로써 소비자의 신뢰도를 제고함

② 토종꿀 품질인증 기준안 제시

- 현 시행 벌꿀 품질등급제는 사양꿀과 토종꿀을 구분하지 않고 동일한 품질기준을 적용하고 있어 토종꿀에 적용하기에는 한계가 있음
- 또한, 현 시행 벌꿀 품질등급제로는 사양 여부를 판정할 수 없다는 한계가 있으므로 보다 민감하고 정확한 방법인 당원(사탕무, 사탕수수, 콘시럽) 고유 유전자 검사를 통해 사양 여부에 대한 자체적인 품질 관리가 필요함
- 따라서, 연구개발기관(1세부, 2세부, 1협동) 간의 협업을 통해 토종꿀에 적합한 새로운 품질관리체계를 구축하고 정책 제안을 통해 이러한 품질관리체계를 농가에서 적용할 수 있도록 함

③ 토종꿀 품질인증 정보 커뮤니케이션 전략 도출

- 토종꿀 성분검사 결과는 각 검사 항목에 대한 설명과 함께 소비자가 이해하기 쉬운 단어로 결과를 표현하여 토종꿀 품질에 대한 정보를 효과적으로 전달해야 함
- 또한, 품질검사 결과는 인증된 성분검사표 형태로 제작하여 토종꿀을 구매하는 소비자에게 품질에 대한 객관적인 정보를 제공해 토종꿀에 대한 소비자 인식 및 신뢰도 제고 효과를 기대할 수 있음

〈토종꿀 성분검사표〉

구분	항목	설명	검사결과
1	사양 여부	당원식물체(사당무 및 사당수수) 유전자를 검출하여 사양 여부 파악	사양하지 않음
2	수분	토종꿀 수분함량 측정(보통 토종꿀의 수분은 20% 정도임)	좋음
3	전화당	과당과 포도당을 포함하는 전화당과 자당의 함량은 벌꿀 품질 규격의 척도	좋음
4	자당		좋음
5	HMF	HMF(Hydroxymethyl Furfural)는 가열을 얼마나 했는지 알려주는 지표	좋음
6	당비	과당/포도당(Fructose/Glucose) 비	좋음
7	탄소비	벌꿀의 구성 성분인 탄소를 이용하여 벌꿀의 순도 측정	좋음

그림 286. 토종꿀 성분검사표

(3) 소비자에게 적절한 정보를 제공할 수 있는 토종꿀 홍보 기술자료 제시

(가) 연구결과

- ① 토종꿀의 본질적 특성 조사항목 및 방법 제시
 - 토종꿀의 본질적 특성에 관련된 정보를 수집하기 위해 조사항목으로 식재료의 본질에 관련하여 생산자, 벌통 위치, 생산 방식, 관능적 특징을 조사해야 함
 - 해당 정보들은 신뢰할 수 있는 인증 기관 및 생산자와의 인터뷰를 통해 수집해야 하며, 농가별 토종꿀 생산과 관련된 구체적인 정보를 제공해야 함
 - 이러한 정보들을 효율적으로 수집할 수 있도록 조사항목 및 가이드라인을 농가에 전달함 (별첨 자료, 그림S49)

- ② 벌통의 위치에 따른 밀원식물 조사방법 및 노하우 전달
 - 1세부(서울대학교 이승환 교수)에서 제작한 월별 종합 밀원식물 조합도를 기준으로 각 생산자별 벌통의 위치에 따라 주변의 주요 밀원식물을 도출하였음
 - 토종벌은 벌통이 위치한 지역에서 365일 머무르면서 해당 지역에서 서식하는 밀원식물로부터 꿀을 얻고, 같은 지역 내에서도 토종꿀 생산지별 자생하는 주요 밀원식물에 따라 관능적 차이가 나타나므로 이를 구분한 월별 밀원식물 분포표를 제작하여 소비자에게 전달해야 함
 - 따라서, 양봉업자들이 소비자에게 생산지별 주요 밀원식물에 대한 정보를 잘 전달할 수 있도록 월별 밀원식물 분포표를 제공하여 밀원식물의 차이로 인한 차별화된 관능적 특성을 소비자들이 경험할 있도록 함(별첨 자료, 그림S50)

- ③ 소비자 신뢰도 제고를 위한 품질보증 가이드라인 및 양식 제시
 - 토종꿀 품질 보증을 위해서는 최종적으로 토종꿀 품질 인증서를 작성하여 소비자들에게 제공해야 하며, 토종꿀 성분 분석 결과를 인증된 성분 검사표 형태로 제작해야 함
 - 토종꿀 성분 분석을 위해서 먼저 토종꿀을 수확하고 시료를 접수하여 토종꿀에 적합한 품질 검사를 진행해야 하며, 이후 토종꿀의 사양 여부, 수분, 전화당, 자당, HMF, 당비, 탄소비에 대한 분석결과를 소비자에게 제시해야 함
 - 따라서, 토종꿀 성분검사 결과를 소비자가 이해하기 쉬운 방식으로 제시할 수 있도록 관련 기술자료를 토종꿀 농가 및 유통업체에 전달함(별첨자료, 그림S51)

나. 정량적 연구개발성과

<연구성과 목표 대비 실적>

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		논 문 평 균 IF			학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	35	10		10		15							5	6	5	8	6			
최종목표	6	1		1		3					1	4		5	5	6	1	7		
1 차 연 도	목 표													2		3				
	실 적											3		3		3		1		
2 차 연 도	목 표	2										2		2	1	1		3		
	실 적	1									2	115	10		2		5			
3 차 연 도	목 표	2	1		1	2					1	2		1	3	1	1	3		
	실 적	2			2	4					1	3		4	3	2	2	3		
소 계	목 표	4	1		1	2					1	4		5	4	5	1	6		
	실 적	3	1 ^a		2	4					3	6		17	3	7	2	9		

^a특허등록: 상표 출원 2건 완료 후 해당 상표에 대한 등록 절차 진행 중으로, 검토의견에 따라 등록여부가 결정될 예정임

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	기문응애(Acarapis woodi) 특이 유전자 검출을 위한 초고속 nested PCR법 개발	Journal of Apiculture	Moonjung kim	34(1)	-	한국 양봉학회	비SCIE	19.04.30	1225-0252	100%
2	Multi-point PCR법을 이용한 Black Queen Cell Virus (BQCV) 검출법 개발	Journal of Apiculture	김소민	34(1)	-	한국 양봉학회	비SCIE	19.04.30	1225-0252	100%
3	봉변에서 특이 유전자 검출법에 의한 봉군 내 꿀벌가시응애류 (Tropilaelaps)의 정량적 검출	Journal of Apiculture	Byounghee Kim	34(1)	-	한국 양봉학회	비SCIE	19.04.30	1225-0252	100%
4	Rapid detection of Israeli acute paralysis virus using multi-point ultra-rapid real-time PCR (UR-qPCR)	Journal of apicultural research	Truong A Tai	58(5)	-	Taylor & Francis	SCI	19.08.27	0021-8839	100%
5	Rapid detection of deformed wing virus in honeybee using ultra-rapid qPCR and a DNA-chip	Journal of veterinary science	김정민	21(1)	-	Korean Society of Veterinary Science	SCI	20.01.01	1229-845x	100%
6	A Study on Determinants of the Willingness to pay for Native Honey	Agribusiness and Information Management	이서윤	-	토종꿀에 대한 지불의사 결정요인 연구	EPIS 농림수산식품교육문화정보원/한국농식품정보과학회	비SCIE	21.01.25	ISSN 2234-3075(print) ISSN 2288-7806(online)	100%
7	Susceptibility of Apis mellifera Larvae of Different Ages to Infection from Melissococcus plutonius, an European Foulbrood Disease-causing Pathogen	Journal of Apiculture	A-Tai Hong	36(2)	-	한국 양봉학회	비SCIE	21.06.01	1225-0252	100%
8	Molecular Detection of Honey Bee Pathogenic Microbes: Recent Advances and Future Perspective	Journal of Apiculture	Nguyen Thi Kim Cuc	36(2)	-	한국 양봉학회	비SCIE	21.06.01	1225-0252	100%
9	Rapidly quantitative detection of Nosema ceranae in honeybees using ultra-rapid real-time quantitative PCR	Journal of Veterinary Science	A-Tai Hong	22(3)	-	Korean Society of Veterinary Science	SCI	21.03.01	1229-845X	100%

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	특허	토종꿀에서 어피니티 컬럼을 이용한 잔류 유전자 분리방법	경기대 학 교산학협 력단	20.08.19	10-20 20-01 04038	-	-	-	-	100%	
	상표	한봉화밀	서울대 학 교산학협 력단, (사) 한국한봉 협회	21.03.15	40-20 21-00 52540	-	-	-	-	100%	
2	상표	천밀야화	서울대 학 교산학협 력단, (사) 한국한봉 협회	21.06.07	40-20 21-01 16509	-	-	-	-	100%	

○ 지식재산권 활용 유형

* 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
				√						

[경제적 성과]

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	노하우	스토리텔링 개발을 위한 토종꿀 특성 발굴 노하우	(주)다리와사람들	20.10.14	5,000,000	-
2	노하우	스토리텔링 개발을 위한 토종꿀 특성 발굴 노하우	(주)커넥서스컴퍼니	20.11.20	5,000,000	-

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	기술이전	신제품 개발	국내	프롬 자연 토종꿀 2020 세트상품	연천과 제천 지역의 토종꿀을 세트상품으로 판매	(주)커넥서스컴퍼니	15,000	-	2021	2020.11.20. - 2023.11.20
2	기술이전	신제품 개발	국내	프롬 자연 토종꿀 2021 세트상품	연천과 강원 지역의 토종꿀을 세트상품으로 판매	(주)커넥서스컴퍼니	8,000	-	2021	2020.11.20. - 2023.11.20
3	기술이전	신제품 개발	국내	프롬 자연 토종꿀 2021 단품	연천과 강원 지역의 토종꿀을 단품으로 판매	(주)커넥서스컴퍼니	7,000	-	2021	2020.11.20. - 2023.11.20
4	기술이전	신제품 개발	국내	명인명촌 토종꿀 진육고	무주, 연천 지역의 토종꿀을 진육고로 상품화	(주)다리와사람들	21년 8월 출시제품으로 매출 발생 전		2021	2020.10.14. - 2023.10.14

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
프롬 자연 토종꿀 2020 세트상품	2021	15,000	-	15,000	결산보고서 기준
프롬 자연 토종꿀 2021 세트상품	2021	8,000	-	8,000	결산보고서 기준
프롬 자연 토종꿀 2021 단품	2021	7,000	-	7,000	결산보고서 기준
명인명촌 토종꿀 진육고	2021	21년 8월 출시제품으로 매출 발생 전			-
합계		30,000	-	30,000	결산보고서 기준

[사회적 성과]

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용
1	제안	소비자 신뢰도 제고를 위한 토종꿀 품질인증방법 제안	연천군청 농업기술센터 기술보급과	-	-
2	제안	토종꿀 특성에 기반한 상품기획 및 마케팅 전략 제안	연천군청 농업기술센터 기술보급과	-	-

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	중앙전문지	매일경제	[더 테이블] 1년에 딱 한번의 달콤함, 토종꿀	20.10.05
2	인터넷/PC통신	네이버 FARM판 공식 블로그 '더농부'	믿고 먹는 토종꿀을 만들기 위해...생산자·연구자·마케터가 뭉쳤다	21.04.23

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

□ 교육지도

교육일	장소	대상	주제
21.01.25	홍천농업기술센터	홍천군소재 농업인	화분매개에 사용되는 벌목 곤충과 각 화분매개충의 종류, 특징
21.04.20	서울대 평창캠퍼스 근린시설 260동 201호	평창지역 농업인, 생산자, 귀농자, 소비자	“어떻게 먹어야 할 것인가? 지속가능한 미래를 위해”
21.05.17	온라인 비대면 교육(Zoom)	농촌진흥청 연구사	토종꿀 상품화와 마케팅

2) 목표 달성 수준

□ 주관 제 1세부 (서울대학교 이승환) : 재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
정성적 목표		
○재래꿀벌의 특성분석	○재래꿀벌과 양봉꿀벌의 생활사 차이분석	○ 100%
	○재래꿀벌과 양봉꿀벌의 수밀력과 채밀활동 비교	○ 100%
○재래꿀벌이 선호하는 밀원 선발	○3 지역간 밀원식생 현황 및 재래꿀벌 및 양봉꿀벌의 선호 밀원 파악	○ 100%
정량적 목표		
○학술성과	○‘중부지역 주요 밀원식물의 꿀벌의 선호성 및 계절 연계성’ 한국양봉학회지 2021. 10월 게재 완료	○ 80%
○학술발표	○ 총 5건의 학술대회 발표 완료	○ 100% (초과달성)
○교육지도	○ 흥천농업기술센터에서 화분매개에 사용되는 벌목 곤충과 각 화분매개충의 종류, 특징에 대해 강의	○ 100%
○인력양성	○ 박사 3명 인력양성 완료	○ 100% (초과달성)
○홍보전시	○ 농민신문에 밀원자원 및 양봉직불제에 관하여 2건 기고	○ 100% (초과달성)

□ 제 1협동 (경기대학교 윤병수) : 토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
정성적 목표		
지역별 생산된 토종꿀의 성분 및 특성 분석	○ 지역별 생산된 토종꿀의 성분 및 특성 분석을 완료하였음.	○ 100%
지역별 토종꿀 품질관리 기술 개발	○ 지역별 토종꿀 품질관리 기술 개발을 완료하였음.	○ 100%
토종꿀의 품질을 체계적으로 관리하기 위한 필수 요소와 개개의 관리 방법 및 향후 인증 시 필요한 요건과 세부 방법 제시	○ 토종꿀의 품질을 체계적으로 관리하기 위한 필수 요소와 개개의 관리 방법 및 향후 인증 시 필요한 요건과 세부 방법 제시하였음.	○ 100%
정량적 목표		
○특허출원 (1건 미달)	○ 특허 출원의 목표를 모두 달성하였음. 단 국내 특허 1건은 학술논문으로 출판을 대기하였다가 출원할 예정임.	○ 100%
○학술성과	○ 학술성과의 목표를 초과 달성하였음.	○ 100% (초과달성)
○학술발표	○ 학술발표의 목표를 초과 달성하였음.	○ 100% (초과달성)
○인력양성	○ 인력양성의 목표를 초과 달성하였음.	○ 100% (초과달성)

□ 제 2세부 (서울대학교 문정훈) : 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시

추진목표	달성내용	달성도(%)
정성적 목표		
○ 소비자 선호에 기반한 토종꿀 상품화 방향성 제시	○ 토종꿀 브랜드 아이덴티티 기반 상품화 프로세스 수립 ○ 소비자 선호에 기반한 토종꿀 상품화 전략 수립 및 상품 개발 ○ 토종꿀 브랜드 아이덴티티(지역성)를 강조한 프리미엄 토종꿀 가공품 개발	○ 100% ○ 100% ○ 100%
○ 토종꿀 산업 활성화를 위한 브랜드 운영 전략 제시	○ 식재료의 본질에 기반한 브랜드 운영 전략 도출 ○ 소비자 신뢰도 제고를 위한 토종꿀 품질인증방법 제시	○ 100% ○ 100%
정량적 목표		
○ 특허출원	○ (사)한국한봉협회와 협업 하에 ‘한봉화밀’, ‘천밀야화’ 토종꿀 상표 출원	○ 100%
○ 특허등록	○ ‘한봉화밀’, ‘천밀야화’ 상표 출원 완료 후 등록 심의 진행 중	○ 80%
○ 기술실시(이전)	○ 토종꿀을 상품화 가능성 확대를 위해 기업을 대상으로 토종꿀 스토리텔링 소재로서 활용 가능한 컨텐츠 구성 노하우 이전	○ 100% (초과달성)
○ 사업화(제품화)	○ 기술계약을 실시한 기업과 협업하여 토종꿀 원물 및 가공품 상품화	○ 100% (초과달성)
○ 학술성과	○ ‘토종꿀에 대한 지불의사 결정요인에 대한 연구’ 논문 게재	○ 100%
○ 교육지도	○ 평창지역 농업인, 생산자, 귀농자, 소비자 대상 토종꿀의 중요성 교육지도 ○ 농촌진흥청 연구사 대상 토종꿀 상품화 및 마케팅 교육지도	○ 100% (초과달성)
○ 정책활용	○ 경기도 연천군청 농업기술센터에서 활용할 수 있는 토종꿀 관련 정책을 2건 제안했으며, 긍정적인 답변을 받음	○ 100% (초과달성)
○ 홍보전시	○ 토종꿀과 지역별 토종꿀에 대한 홍보 (매일경제 기고, 네이버 더농부 게시)	○ 100% (초과달성)

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

□ 주관 제 1세부 (서울대학교 이승환) : 재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석

- 성과지표 모두 달성하여 해당 없음

□ 제 1협동 (경기대학교 윤병수) : 토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정

- 본 과제에서 출원되지 않은 특허출원 1건은 한국양봉학회지 9월호에 출판 예정인 “ 벌꿀에서 잔류 DNA의 분리를 위한 과정의 최적화. 김선미 등(2021). J. Apiculture 36(3) : 139-150.”의 출판을 기다려 특허출원을 하고자 하였기 때문임

□ 제 2세부 (서울대학교 문정훈) : 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시

- (사)한국한봉협회와 협업하여 ‘한봉화밀’, ‘천밀야화’ 상표를 공동으로 출원 완료했으며, 현재 특허청 심사관에서 등록을 위한 심의 절차 진행 중임
- 특허청 심사관은 출원 순서에 따라 등록여부를 결정하게 되며, 결과가 나오는 데까지 대략 5~8개월이 소요됨
- ‘한봉화밀’의 경우, 2021년 3월 15일자로 출원이 완료되었으나, 등록 심의 결과에 대한 답변을 받지 못하여 연구과제 종료 후 추가 진행사항에 따라 달성할 수 있을 것으로 사료됨

2) 자체 보완활동

□ 주관 제 1세부 (서울대학교 이승환) : 재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석

- 성과지표 모두 달성하여 해당 없음

□ 제 1협동 (경기대학교 윤병수) : 토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정

- 지난 2021년 9월 30일 상기의 학회지의 논문이 출판되었기에 바로 “논문 발표 후 특허 출원(6개월 이내)” 을 진행하고자 함

□ 제 2세부 (서울대학교 문정훈) : 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시

- 특허 등록 실적은 추후 심의가 완료되면 심의 결과에 따라 달성할 수 있을 것으로 사료됨
- 출원 및 등록이 완료된 상표를 활용하여 홍보 방향성을 수립하여 신규 제품화 가능성을 확대할 수 있을 것으로 예상됨

3) 연구개발 과정의 성실성

□ **주관 제 1세부 (서울대학교 이승환) : 재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석**

- 1년차에 발육실험을 통해 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 성장단계별 생활사 차이 조사를 실시하고, 부족한 데이터는 2-3년차에 보완하였음
 - 1년차에 시기별 재래꿀벌과 양봉꿀벌 봉군의 채밀력 차이 조사 및 활동특성 차이를 통해 재래꿀벌이 양봉꿀벌에 비하여 아까시나무 선호도가 낮음을 확인하여 밀원 자원 확립의 중요성을 확인함
 - 주요 토종꿀 생산지에 식재된 밀원식물 및 개화기조사를 2-3년차에 실시, 한봉업자를 대상으로 한 설문조사와 취합하여 연계도 작성을 완료함
-

□ **제 1협동 (경기대학교 윤병수) : 토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정**

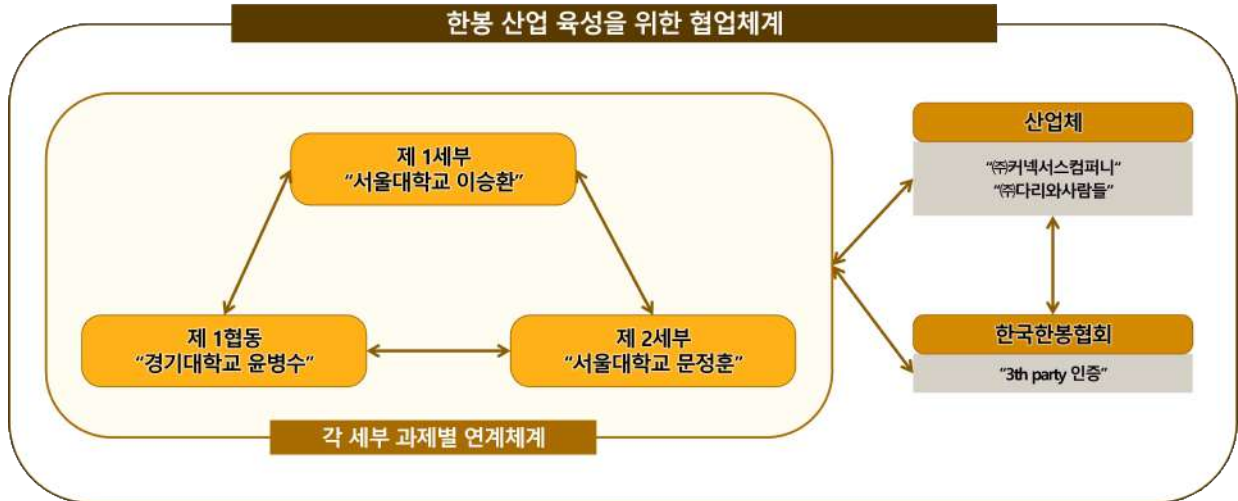
- 본 과제는 3개년의 연구를 통하여, 토종꿀에서 잔류 유전자 분리법을 성공적으로 개발하여, 이 잔류 유전자로부터 사탕수수 고유 유전자 및 사탕무우 고유 유전자 검출을 위한 유전자 증폭 검사법을 개발하게 되었음
 - 이 유전자 검사법은 해당 토종꿀이 사양꿀이 아님을 입증할 수 있는 것이며, 또한 해당 토종꿀은 천연벌꿀임을 입증할 수 있는 과학적 근거를 제공하는 것임
 - 한봉협회에서 제공받은 토종꿀 시료는 물론, 본 과제에서 자체 수집한 토종꿀의 시료들에서 사탕수수 고유 유전자 또는 사탕무우 고유 유전자가 검출되는 시료들을 다수 발견하였으며, 예상외로 사탕무우 설탕이 토종꿀 산업에도 많이 사용되고 있는 상황을 발견하게 되었음
 - 본 과제의 결과(유전자 검사법)는 향후 토종꿀의 품질검사에서 주요 검사법으로 사용될 것임
-

□ **제 2세부 (서울대학교 문정훈) : 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시**

- 1-2년차에 (주)오버맨과 위탁과제를 통해 개발한 브랜드 아이덴티티를 기반으로 토종꿀의 지역성을 담고있는 ‘한봉화밀’ 과 천개의 들꽃을 의미하는 ‘천밀야화’ 상표를 디자인함
 - 각 상표의 핵심 브랜드 아이덴티티를 구축하고 이를 효과적으로 표현할 수 있는 다양한 상표 로고를 디자인하였으며, (사)한국한봉협회와의 논의를 통해 출원할 로고 디자인을 선정함
 - 결과적으로, 3년차에 서울대학교와 (사)한국한봉협회 간의 긴밀한 협업을 통해 해당 상표를 공동 출원하였으며, 현재 등록을 위한 심의 절차 진행 중임
-

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도

□ 각 세부 과제별 연구결과 연계를 통한 한봉 산업 육성 추진



- 제 1세부의 재래꿀벌의 생육 분석 결과를 활용하여 소비자에게 서양벌과 차별화된 재래꿀벌의 본질적 특성을 제시함으로써 토종꿀에 대한 소비자의 선호도를 향상시킴
- 제 1세부의 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석 결과를 통해 토종꿀은 주산지에 따라 주요로 하는 밀원식물에 차이가 있다는 것을 이해하고 지역성을 브랜드 아이덴티티로 수립함
- 제 1세부의 주산지별 밀원식물 조사표를 적극 활용하여 토종꿀 생산자별 별통의 위치에 따라 주요 밀원식물을 조사한 후 산업체와 협업하여 각 지역별 브랜드 토종꿀을 제품화 함
- 제 1협동에서 수립한 토종꿀 품질관리 및 인증 기준을 기반으로 연천군에 적합한 품질인증 프로세스를 도출하여 연천군 농업기술센터에 정책적으로 제안함
- 제 1세부, 1협동 2세부가 협업하여 토종꿀 생산자와 토종꿀의 제품화에 관심이 있는 산업체를 연결하고 제 1세부에서는 주요 밀원식물을 도출, 제 1협동에서는 수매한 꿀에 대한 품질 검사 실시, 제 2세부에서는 그 결과를 소비자가 이해하기 쉬운 정보의 형태로 전달함
- 제 1협동의 품질검사 결과를 바탕으로 토종꿀 생산자 및 산업체가 활용할 수 있는 품질인증 프로세스 및 가이드라인을 제시함

[산업체]

- ㈜커넥서스컴퍼니: 다양한 지역별 토종꿀의 지역성을 브랜드화 하여 세트로 상품화 함
- ㈜다리와 사람들: 토종꿀을 전통적인 진육고 형태의 프리미엄 가공품으로 상품화 함

[한국한봉협회]

- 각 세부 과제별 연계체계와 산업체가 협업하여 상품화 한 토종꿀이 자연적인 토종꿀을 사용했다는 것을 3th party 인증기관으로서 인증하여 소비자의 신뢰도를 향상시킴

□ **주관 제 1세부 (서울대학교 이승환) : 재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석**

- 재래꿀벌 및 양봉꿀벌을 동시 동소 사양하여 발육실험, 채밀력 및 채밀활동 차이조사를 통해 양봉가들의 시기별 봉군 관리에 도움이 될 수 있는 데이터를 확립함
 - 2년에 걸친 지역별 밀원 개화기 및 분포도, 밀원별 꿀벌 선호도를 조사하여 총합 89종에 대한 데이터를 통해 양봉가들에게 실질적으로 필요한 자료를 공유함
 - 주요 한봉단지의 밀원식물 종류 및 식재현황을 한눈에 파악할 수 있는 정밀 밀원도의 제작 모델을 제시하였으며, 이를 바탕으로 전국적인 밀원식물 파악 및 정밀 식생도 제작의 필요성을 도출함
 - 이상을 바탕으로 양봉직불제, 밀원림직불제 등 밀원자원 확보를 위한 국가 제도를 제안함
-

□ **제 1협동 (경기대학교 윤병수) : 토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정**

- 본 과제의 주요 결과는 토종꿀에서 사양꿀의 증거인 사탕수수 고유 유전자 또는 사탕무 고유 유전자를 검출해 낼 수 있는 유전자 검사법이라 할 것임
 - 이 검사법은 천연벌꿀임을 강조하여야 하는 토종꿀 산업에서 사양꿀이 아님을 입증할 수 있는 중요 도구가 되어할 것임
 - 거듭, 토종꿀의 품질검사에서 본 검사법은 주요 검사 항목이 되어야 할 것임
-

□ **제 2세부 (서울대학교 문정훈) : 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시**

- 1-2차연도에 수립한 주산지 특성을 반영한 토종꿀 브랜드 아이덴티티를 바탕으로 상품화 프로세스 및 전략을 수립하여 소비자의 선호를 끌어올릴 수 있는 상품화 방향성을 제시함
 - 기업을 대상으로 토종꿀 상품화 및 스토리텔링 개발 노하우를 이전하여 다양한 토종꿀 상품을 개발하였으며, 이후 실질적인 판매를 통해 지역별 토종꿀 상품의 성공 가능성을 확인함으로써 새로운 토종꿀 시장 형성의 기반을 마련함
 - 또한, 1-2차연도에 수립한 토종꿀 브랜드 아이덴티티를 실현하기 위해 서양꿀과는 차별화되는 토종꿀의 본질적 특성을 도출하고 이를 바탕으로 토종꿀 브랜드 운영 전략을 제시함
 - 더하여, 토종꿀에 대한 체계적인 품질인증 프로세스를 구축하여 토종꿀 산업의 핵심 이해관계자들(생산자, 제조업체, 유통업체 등)에게 구체적인 토종꿀 품질인증방법 및 품질에 대한 정보를 소비자에게 효과적으로 전달할 수 있는 커뮤니케이션 전략을 공유함
 - 결과적으로, 당해연도의 연구과정을 통해 토종꿀의 신규 상품화 가능성을 확대했으며, 산업화를 실현할 수 있는 기반을 형성하였음
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

□ 주관 제 1세부 (서울대학교 이승환) : 재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석

- 토종꿀벌과 재래꿀벌의 생활사, 채밀력, 채밀활동 차이 분석 자료를 제공하여 토종꿀벌 관리에 대한 기초자료로써 활용할 수 있음
- 지역별 밀원수종 종류와 개화기 조사를 통해 각 지역별로 아까시나무 개화 전과 개화 후 이용가치가 높은 밀원식물을 목록화하여 제공해 낭충봉아부패병으로 인해 급격히 줄어든 재래꿀벌의 봉군 수 증진에 기여할 수 있음

□ 제 1협동 (경기대학교 윤병수) : 토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정

- 본 과제에서 개발한 “사탕수수 고유 유전자 또는 사탕무우 고유 유전자 검출용 유전자 검사법”은 향후 제정되어야 하는 토종꿀의 품질검사를 위한 표준 검사법에 주요 검사 항목으로 채용되어야 할 것임
- 이 검사법은 유관 기관인 농촌진흥청, 식품 또는 축산물 품질관리원의 주관으로, 산업계의 검사실(예: 한국양봉협회 또는 한국양봉농협의 벌꿀 품질 검사실) 및 토종꿀을 포함하는 양봉업계의 의견을 받아, 벌꿀(토종꿀 포함)의 표준 품질검사법을 제정할 때, 주요 검사법으로 활용될 수 있도록 하여야 할 것임

□ 제 2세부 (서울대학교 문정훈) : 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시

- 토종벌과 서양벌의 비교연구를 통한 제시한 토종꿀의 차별화 요인과 이를 기반으로 수립한 토종꿀 브랜드 아이덴티티를 활용하여 성공적인 신규 토종꿀 상품화를 실현할 수 있음
- 국내외 꿀 산업의 상황에 맞는 토종꿀 브랜딩화를 통해 현실적이고 구체적인 토종꿀의 홍보/마케팅 전략 및 브랜드 운영 전략을 제시함으로써 지속가능한 토종꿀 생산 및 지역별 토종꿀 산업 활성화가 가능함

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
국내논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
특허출원	국내	3
	국외	
	계	
특허등록	국내	1
	국외	
	계	
인력양성	학사	
	석사	
	박사	
	계	
사업화	제품화	
	기술이전	
	공정개발	
제품개발	시제품개발	
	교육지도 홍보전시	2

7. 별첨 자료

자체평가의견서

1. 과제 현황

		과제번호		318093-3	
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	농림축산식품 연구			과제구분	단위
사업명	생명자원 부가가치제고				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	한봉 산업 육성을 위한 토종꿀의 특성 및 기능 분석연구			과제유형	(기초)
연구개발기관	농림식품기술기획평가원			연구책임자	이승환
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018.11.20. ~ 2019. 08. 19.	222,000		222,000
	2차년도	2019.08.20.~2020. 08. 19.	296,000		296,000
	3차년도	2020. 08. 20.~2021. 08. 19.	296,000		296,000
	계		814,000		814,000
참여기업					
상대국	상대국연구개발기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021.10.01

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
서울대학교 산학협력단	교수	이승환

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수

- 국내에서 3지역을 선정하여 대상지별 밀원식물의 목록 및 계절별 연계도, 그리고 밀원식물 별 방화곤충의 종류를 목록화 하는 연구는 국내에 미진하였기 때문에 창의적인 연구 주제로 3년간 다양한 데이터를 확보할 수 있었음.
- 더불어 소비자 측면에서 중요시 되는 꿀의 진위 여부 판별에 대한 연구 또한 이번 연구 과제를 통하여 수행되어 실용적인 연구결과를 도출하고 소비자 트렌드와 토종꿀의 고유가치에 대한 스토리를 반영하여 토종꿀의 브랜드화 모델을 제시하여, 과제 착수시 계획했던 내용 이상의 우수한 결과를 도출한 것으로 사료됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

- 밀원식물별 방화곤충 전체를 대상으로 꿀벌의 선호성을 평가하여 양봉장 주변의 전체 밀원식물을 대상으로 종합적으로 평가한 경우는 이번이 처음 시도됨, 또한 양봉장 주변의 전체 밀원식물상을 한눈으로 파악할 수 있는 밀원식물 정밀 식생도 제작 또한 처음 시도된 것으로 향후 전국적인 조사사업으로 확대될 것으로 예상함
- 3년간의 연구개발과정을 거쳐 실제로 토종꿀을 브랜드화 한 것은 높은 파급효과를 가질 것으로 사료됨. 토종꿀은 양봉꿀에 비하여 신뢰할 수 있는 유통이 구축되지 않은 것이 단점이었으나, 이번 연구사례를 통해 토종꿀 상품화 방향성을 제시함으로써 보다 다양한 소비자층을 확보할 수 있을 것으로 판단됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

- 밀원식물 부족으로 인한 국내 양봉산업의 어려움을 극복할 수 있는 기반 연구결과로, 양봉직불제 및 밀원림 직불제 시행을 제안하여, 이를 위한 근거자료로 활용될 것으로 사료됨
- 최근 한봉 연구회 활동이 활발한 연천군 농업기술센터에 연천군 지역에 적용 가능할 것으로 보이는 소비자 신뢰도 제고를 위한 토종꿀 품질인증방법과 토종꿀 특성에 기반한 상품기획 및 마케팅 전략에 대하여 제안하여 이에 대한 정책 반영 답변을 공문으로 전달 받았음. 이는 연구개발결과의 높은 활용 가능성을 보여준 예시로 사료됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수

- 3년간의 각 세부별로 연구를 수행하며 주관에서는 국내 수도권 및 중부권의 밀원식물을 강원도 52종, 경기도 38종에 대한 식생을 확인하였고 이에 대한 계절별 개화시기를 파악할 수 있었음
- 1 협동의 경우 비록 사전에 계획되어 있던 토종꿀의 기능성 평가에서는 유의미한 결과값을 도출해 낼 수는 없었으나, 연구수행 중 사탕무와 사탕수수의 이용을 검출할 수 있는 실험방법을 구축하여 이로 인해 토종꿀 산업에 치명적인 영향을 미칠 수 있는 사항을 예방하는데에 큰 도움이 될 것으로 사료됨
- 2세부는 토종꿀 브랜드화를 통하여 제품화 4건, 기술실시, 교육지도, 정책활용, 홍보전시에서 초과달성을 보여 연구 정량적 성과에 크게 이바지 하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수

- 기존에 계획되어 있었던 연구결과의 논문게재, 학술발표 모두 초과달성하였으며, 특히 2차년부터 본과제의 최종 목표인 토종꿀의 브랜드화를 한봉농가, 소비자 및 유통시장(백화점)의 총 수요자 트렌드를 반영하여 브랜드화를 실현시키는 사례를 성공적으로 제시함

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석	30	30	재래꿀벌의 발달과정 및 밀원식물의 선호성 및 구성분석 조사를 차질없이 수행하였고 도출된 결과는 추후 재래꿀벌 농가에 실용적인 도움이 될 것으로 사료됨
토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정	40	35	재래꿀벌의 사양 현장 및 지역별 표준화가 불가능한 한봉산업의 현실로, 토종꿀만의 고유 기능성 물질 분석은 도출할 수 없었으나, 사탕무와 사탕수수 유전자 검출방안을 활용하여 추후 토종꿀 등급제 기준 확립에 큰 도움이 될 수 있을 것으로 사료됨
소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시	30	30	신뢰할 수 있는 토종꿀 유통체제를 마련, 판매함으로써 소비자 인식 향상에 크게 기여한 것으로 사료됨
합계	100점	95점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

연구수행을 통해 밀원식물 목록과 연계도를 구축할 수 있었으며, 이를 통하여 “중부지역 주요 밀원식물 에 대한 꿀벌의 방화활동 및 시기별 밀원식물 조성”의 제목으로 논문을 투고하여 학술적인 가치뿐만 아 니라 실용적인 측면에서도 큰 성과를 내어 중부권 한봉농가에 실증적인 도움이 될 수 있는 결과를 도출 할 수 있었음. 더불어 토종꿀의 진위판별 및 꿀 조성 밀원식물 현황을 파악할 수 있는 실험법을 확인하여 차후 등급제에 활용할 수 있을 것으로 기대되며, 토종꿀의 브랜드화 구축 및 매출액 초과달성을 통해 토 종꿀 산업의 부가가치를 높이는 데에 일조하였음

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

토종꿀의 기능성 평가는 HPLC등을 활용하여 시도하였으나 유의미한 결과값을 도출해낼 수 없었기 때문 에 양봉꿀벌이 생산하는 꿀과 비교하여 특출난 기능성을 가지는 것 으로 판단하기 어려움. 더불어 등급 제 에 등급별 기준을 마련하는 것은 한봉협회와 농가 등의 협의를 통해 이루어져야 하기 때문에 이번 보 고서에서 상세한 기준을 설정하지 않았으며 이는 추후 등급제 마련시 재논의가 필요할 것으로 판단됨

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

앞서 위에 언급한 것과 같이 연구수행결과로 토종꿀의 등급 기준을 명확히 하기 위해서는 추후 등급제 구축시 협회와 농가와 의 논의가 필요할 것으로 사료됨

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	생명자원 부가가치제고	
연구과제명	한봉 산업 육성을 위한 토종꿀의 특성 및 기능 분석연구			
주관연구개발기관	서울대학교		주관연구책임자	이승환
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	814,000,000			814,000,000
연구개발기간	2018.11.20.~2021.08.19. (2년 9개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input checked="" type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
<p>① 재래꿀벌의 생육, 밀원식물 선호성 및 토종꿀 주산지 밀원식물 구성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 재래꿀벌과 양봉꿀벌의 생육, 채밀 등과 관련된 3가지 관점(생활사, 채밀력, 채밀활동)에서의 차이점 제시 - 재래꿀벌 선호 밀원식물의 계절연계성 모델 제시(제1연구대상지(인제군 한계리): 52종, 제2연구대상지(가평군 목동리): 38종)
<p>② 토종꿀 성분 및 기능성 분석과 품질관리 및 인증 기준 설정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 토종꿀과 사양꿀에서의 사탕무 및 사탕수수 고유 유전자 분리법 개발 - 고유 유전자에 의한 사양꿀 판별 유전자 검사법 개발 - 주밀원의 화분 유전자에 의한 토종꿀 지역별 특성 규명 - 시판중인 토종꿀에 유전자 검사법의 적용 - 국산 토종꿀의 등급별 기준 설정
<p>③ 소비자 인식 향상을 위한 토종꿀 브랜드 전략 제시</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 빅데이터 분석을 통한 꿀 소비 트렌드 분석 - 설문조사를 통한 국내 꿀 소비자들의 인식 및 소비 특성 도출 - 토종꿀 브랜드 아이덴티티 모델을 활용한 가치·편익 제안 - 지역 특산물과 함께 지역적인 특성을 살린 프리미엄 토종꿀 가공품 홍보 전략 수립 - 각 지역의 토종꿀을 담은 제품에 대한 홍보 방향성 제시 - 토종꿀 주요 산지 3개 지역을(경북 의성, 충북 충주, 전북 무주) 선정하여 특성발굴 조사 실시 - 스토리텔링 개발 후 활용 방안 제시 - 토종꿀 브랜드 아이덴티티 기반 상품화 프로세스 수립 - 소비자 선호에 기반한 토종꿀 상품화 전략 수립 및 상품 개발 - 토종꿀 브랜드 아이덴티티(지역성)를 강조한 프리미엄 토종꿀 가공품 개발 - 식재료의 본질에 기반한 브랜드 운영 전략 도출

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육지 도	인력양 성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활영등)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	평 균 관 I F 급	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치	35	10			10		15							5	6	5	8	6		
최종 목표	6	1			1		3					1	4	5	5	6	1	7		
당해 년도	목표	2	1		1		2					1	2	1	3	1	1	3		
	실적	2			2		4	3				1	3	4	3	2	2	3		
달성률 (%)	100 %	0%			100 %		100 %	100 %				100 %	100 %	100 %	75%	100 %	100 %	100 %		

* 달성률은 3차년도 종합 기준으로 계산하였음

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	토종꿀에서 어피니티 컬럼을 이용한 잔류 유전자 분리방법
②	한봉화밀
③	천밀야화
④	스토리텔링 개발을 위한 토종꿀 특성 발굴 노하우
⑤	토종꿀 특성에 기반한 상품기획 및 마케팅 전략 제안
⑥	소비자 신뢰도 제고를 위한 토종꿀 품질인증방법 제안

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업제이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		v				v				
②의 기술		v					v			
③의 기술		v					v			
④의 기술		v					v			
⑤의 기술		v							v	
⑥의 기술		v							v	

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획 6

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	기존 꿀에서 유전자 분리와는 달리 어피니티 컬럼을 사용하여, 기존 방법보다 유전자를 분리하는데에 빠르고 조작이 간편해 다량의 시료를 짧은 기간안에 유전자 분리가 가능한 장점을 가지며, 이는 벌꿀 품질평가에 유전자 검출법의 적용에 유리함
②의 기술	서울대학교 푸드비즈니스랩과 (사)한국한봉협회가 협업하여 출원하였으며 구축된 토종꿀 아이덴티티 및 상표를 바탕으로 홍보 방향성을 설정하여 신규 제품화 가능성을 확대할 수 있을 것으로 기대됨
③의 기술	토종꿀이 지역에서 자생하는 여러 들꽃들을 밀원으로 한다는 특성을 기반으로 “천밀야화” 상표를 디자인하여 상품에 활용할 수 있을 것으로 기대됨
④의 기술	본 노하우는 토종꿀의 특성화발굴조사(기초조사, 자원핵심조사, 전승가치조사, 활용가치조사)를 통해 토종꿀 제품의 스토리텔링 소재로서 활용이 가능한 콘텐츠를 구성함 스토리텔링 마케팅 활용을 위한 토종꿀 콘텐츠 세부 내용을 전달하며, 유전자 검출 여부를 바탕으로 토종꿀 채취 적합 지역을 선정하여 제공하고 밀원에 대한 정보를 제공하여 제품의 마케팅 방향에 가이드라인 제공이 가능할 것으로 기대됨
⑤의 기술	토종꿀의 특성을 기반으로 상품을 기획하고 홍보 및 마케팅 전략을 수립하여 구체적인 정보를 제공함으로써 토종꿀에 대한 소비자 인식 및 신뢰도를 제고하고 토종꿀의 높은 가격에 대한 설득 가능성을 높일 수 있음
⑥의 기술	토종꿀에 적합한 품질관리체계를 기반으로 연천 토종꿀의 품질에 대한 객관적인 정보를 제공함으로써 토종꿀에 대한 소비자의 잘못된 인식에 바로잡고 신뢰도를 높여 프리미엄 가격 지불의사를 끌어올릴 수 있음

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액) (만원)	
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T 평 가 단 위 등급	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문				학술발표	정책 활용		홍보 전시
													SCI	비SCI						
단위	건	건	건		건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	35	10			10		15							5	6	5	8	6		
최종목표	6	1			1		3					1	4	5	5	6	1	7		
연구기간내 달성실적	3				2		4	3				3	6	17	3	7	2	9		
연구종료후 성과창출 계획	3	1												2				1		

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명	스토리텔링 개발을 위한 토종꿀 특성 발굴 노하우 (대상기관: 주식회사커넥서스컴퍼니)		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	5,000 천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2020. 11. 20~ 2020. 12.11	실용화예상시기	2020. 10. 04~ 2023. 10. 13
기술이전시 선행조건			

핵심기술명	스토리텔링 개발을 위한 토종꿀 특성 발굴 노하우 (대상기관: (주) 다리이사람들)		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	5,000 천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	2020. 10. 15~ 2020.11. 5	실용화예상시기	2020. 10. 04~ 2023. 10. 13
기술이전시 선행조건			

1. 토종꿀 생산자 및 생산환경

[토종꿀 생산자 및 생산환경]

신뢰할 수 있는 기관에서 연천 토종꿀의 품질을 확인했다는 것을 기재
예) 푸드비즈니스 랩에서는 본 꿀이 현장 실증과 품질 관련 실험을 통해 인위적인 사양, 열처리를 하지 않은 자연 상태의 우리 토종꿀임을 확인하였습니다.

1. 생산자

- 성함:
- 주소:

생산자
사진

2. 생산 환경

- 토종꿀 생산지(벌통) 위치:
- 연천군 기후:
- 지리적 특징:

벌통 위치
지형도

3. 생산 방식

- 벌통의 특징:
- 수확 시기 및 방법:
- 채밀 과정:

벌통 사진

4. 관능적 특징

- 예) 맛, 질감, 향, 풍미, 색 등

(인증기관 로고)

(신뢰도 높은 인증기관명)에서는
본 꿀이 토종꿀임을 조사, 확인하였습니다.

2. 그림S50 밀원식물 조사표

○ 월별 주요 밀원식물	밀원 분포정도									
	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	보통	높음
회양목										
개버들										
생강나무										
산수유										
개복숭아나무										
벗나무										
울벗나무										
산벗나무										
매실나무										
앵두나무										
애기똥풀										
개살구										
돌배나무										
상수리나무										
조팝나무										
분꽃나무										
산사나무										
귀룽나무										
팔배나무										
산딸기나무										
아카시아나무										
죽제비싸리										
신갈나무										
신나무										
마가목										
산마늘										
층층나무										
야광나무										
고추나무										
검양옥나무										
검푸레나무										
다래										
배초향										
국수나무										
찔레꽃										
개망초										
밤나무										
사위질빵										
영강취										
머루										
물봉선										
찰피나무										
광대싸리										
가시오갈피나무										
담쟁이덩굴										
헛개나무										
두릅나무										
음나무										
싸리										
향유										
참싸리										
삼주										
환삼덩굴										
오갈피나무										
들깨꽃										
메밀꽃										
북나무										
산국										
연백국화										

3.그림S51. 토종꿀 성분검사항목 및 검사결과 제시 양식

구분	항목	설명	검사결과
1	사양 여부	당원식물체(사탕무 및 사탕수수) 유전자를 검출하여 사양 여부 파악	사양하지 않음
2	수분	토종꿀 수분함량 측정(보통 토종꿀의 수분은 20% 정도임)	좋음
3	전화당	과당과 포도당을 포함하는 전화당과 자당의 함량은 벌꿀 품질 규격의 척도	좋음
4	자당		좋음
5	HMF	HMF(Hydroxymethyl Furfural)는 가열을 얼마나 했는지 알려주는 지표	좋음
6	당비	과당/포도당(Fructose/Glucose) 비	좋음
7	탄소비	벌꿀의 구성 성분인 탄소를 이용하여 벌꿀의 순도 측정	좋음

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업 생명자원 부가가치제 고연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.