

GOVP1200505999

분자생물학적 기법을 이용한 토종 및 양봉꿀의 판별법 개발

Development of Discrimination of Native and  
Foreign Bee Honey by Molecular Biological Methods

강 원 대 학 교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “분자생물학적 기법을 이용한 토종 및 양봉꿀의 판별법 개발”에 관한 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 10월 14일

주관연구기관명 : 강원대학교

총괄연구책임자 : 이 해 익

연 구 원 : 김 용 무

연 구 원 : 이 춘 영

# 요 약 문

## I. 제 목

분자생물학적 기법을 이용한 토종 및 양봉꿀의 판별법 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구 개발의 목적

- ▶ 사회적으로 신뢰도가 저하된 농축산물에 대한 새로운 품질평가 기술의 개발로 인한 신뢰도 회복을 목표로 함.
- ▶ 꿀 특이 단백질과 같은 분자량을 갖는 인공 단백질을 대장균에서 생산하여 신속하고 정확한 토종꿀 판별법으로 완성
- ▶ 항체를 이용한 꿀의 증량제 첨가 여부 등의 품질 평가법 보완

### 2. 연구 개발의 필요성

#### 1) 기술적 측면

- ▶ 꿀의 성분 분석에 이용되는 기존의 방법은 많은 시간과 비용이 요구될 뿐 아니라 토종꿀과 양봉꿀의 판별이 불가능함.
- ▶ 본 연구자 등에 의해 개발된 방법은 토종꿀과 양봉꿀을 효율적으로 판별이 가능하나 정확도를 높이기 위해 방법의 부분적 개량이 요구됨.
- ▶ 특이 단백질의 분석에 근거를 둔 방법이외에도 신속하고 대량처리를 위한 방안의 하나로서 항체를 이용한 면역분석법의 개발이 추가로 필요함.

## 2) 경제·산업적 측면

- ▶ 사회적으로 문제시 되고 있는 농산물에 대한 신뢰도를 회복시키기 위한 농축산물에 대한 새로운 품질평가 기술 개발이 요구됨.
- ▶ 각 지방에서 생산되는 벌꿀의 토산품 개발의 필요성에 따라 토종꿀의 품질인증을 할 수 있는 효율적 판별 기술의 개발이 요구됨.
- ▶ 토종꿀의 신뢰성을 회복하므로서 토종꿀의 수요를 확대하고 토종꿀 사육농의 소득증대에 기여함.

## 3) 사회·문화적 측면

- ▶ 우리 농산물에 대한 신뢰도를 증진시켜 신용사회를 구축함.
- ▶ 농가 소득증대로 사회적 소외감 해소.

## III. 연구개발 내용 및 범위

1차년 연구에서는 다음과 같은 연구를 추진하였다.

### 1) SDS-PAGE용 인공 마커 단백질 생산을 위한 유전자 조작 및 발현

- ① 꿀의 주요 단백질과 같은 분자량을 갖는 인공 단백질 제작 (모델정립)
  - 인공 단백질 DNA의 합성
  - Plasmid 제작
- ② 마커 단백질의 대장균 내 발현 및 분자량 확인 (모델 정립)

### 2) 꿀 단백질에 대한 항체의 제작

- ① 꿀 단백질에 대한 항체의 제작을 위한 토종꿀과 양봉꿀 주요단백질의 정제 (모델정립)
- ② Rat을 이용한 다클론 항체의 제작 (모델정립)
- ③ 항체의 정제 (모델정립)

#### ④ 정제된 항체의 토종꿀과 양봉꿀의 단백질간의 선택성 조사 (모델정립)

본 연구의 1차년에서는 SDS-PAGE용 인공 마커 단백질을 생산하기 위해 대장균을 이용하여 꿀의 주요 단백질과 같은 분자량을 같은 인공 단백질을 발현 및 확인, 꿀 단백질에 대한 특이적인 항체를 제작하기 위하여 꿀의 주요 단백질을 분리정제하고 이를 이용하여 항체를 제작, 선택성을 조사하였다. 1년차 연구를 바탕으로 2년차 연구에서는 기술의 실증을 목표로 다음과 같은 목표를 설정하고 연구를 추진하였다.

#### 1) SDS-PAGE용 인공 마커 단백질의 대장균 내 대량 생산 및 정제

- ① 마커 단백질의 대장균 내 대량 발현 (모델정립)
- ② 마커 단백질의 대량 생산 및 정제 (모델정립)
- ③ 인공 마커 단백질을 이용한 SDS-PAGE 판별법의 실증 (기술의 실증)

#### 2) 항체를 이용한 품질평가 기준 마련

- ① 다클론 항체의 ELISA의 이용성 검토 및 품질평가 기준 설정 (모델정립)
- ② 항체를 이용한 신속한 판별법의 개발 (기술의 실증)

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구의 1차, 2차 년도에 계획한 인공 마커 단백질을 이용한 SDS-PAGE 판별법의 실증 및 꿀 특이적인 항체를 이용한 신속한 판별법 개발은 성공적으로 이루어 졌다. 토종꿀의 고급화를 위해서는 엄격한 품질 인증과 제품의 규격화가 필요하므로 개발된 두 가지 판별기술을 식품공전에 반영하여 효율적인 판별이 이루어지도록 해야 할 것이다.

# Summary

## I. Subject

Development of discrimination of native and foreign bee honey by molecular biological methods

## II. Aim and necessity for research development

### 1. Aim for research development

- ① It is aim that recovery of trust in agricultural and stock farm products which lost the trust socially through developing new quality evaluation technology.
- ② Completion by quick and exact native honey determination producing artificial protein, which has same molecular weight with honey specific protein.
- ③ Complement for quality determination by antibody using test wether increase of quantity is added in honey.

### 2. Necessity if research development

#### 1) Technical sides

- ① Existing methods for honey ingredient analysis need lots of time and money and it is impossible that distinguish between native and foreign bee honey.
- ② Novel method development by our researcher makes possible to distinguish between native and foreign bee honey effectively, but partial reform is needed to improve accuracy.
- ③ Immunoassay method is necessary as a one of method for quick and mass treatment besides the method based on protein analysis.

## 2) Economic and industrial sides

- ① In order to recover the trust in agricultural product socially issued, development of new quality determining technology is needed.
- ② Effective determination technology is required to confirm the quality of honey follow the need for development local produce of honey.
- ③ Enlargement of demand for honey and contribution of profit increase by recovering the trust about honey.

## 3) Social and cultural side

- ① Credit society construction by improving trust about our agricultural products.
- ② Solution to a sense of alienation through income increase in farm.

## III. Research development contents and range

Following research was performed in first year research

### 1) DNA recombination and release to artificial marker protein production for SDS-PAGE

- ① Making artificial protein having same molecular weight with honey major proteins (setting up the model).
  - Synthesis of artificial protein DNA.
  - Plasmid preparation.
- ② Secretion of marker protein in *E. coli* and confirmation of molecular weight (setting up the model).

### 2) Making antibody for honey protein

- ① Purification of native and foreign bee honey for the production of antibody to the honey protein (setting up the model).
- ② Making multiclonal antibody using rat (setting up the model).

- ③ Antibody purification (setting up the model).
- ④ Conduct of selectivity honey proteins (setting up the model).

In the 1st year of research, we confirmed the release of artificial protein in the same molecular weight with major honey protein using *E. coli* to produce artificial marker protein for SDS-PAGE. And we isolated and purified honey major protein to make specific antibody for honey protein and analyzed the sensitivity after making antibody. In the second year research we set up following plan and push up on research.

- 1) For SDS-PAGE mass production of artificial marker protein in *E. coli* and purification
  - ① Mass release of marker protein in *E. coli* (setting up the model).
  - ② Mass production and purification of marker protein (setting up the model).
  - ③ Corroboration of SDS-PAGE diagnosis using artificial marker protein (proving technology).
  
- 2) Quality determination standard using antibody
  - ① Examination of ELISA availability of multiclonal antibody and establishment of quality examining standard (setting up the model).
  - ② Quick diagnosis development using antibody (proving technology).

#### IV. Research development results and proposal for research application

It is achieved successively that research of quick diagnosis development using honey specific antibody and actual proof of SDS-PAGE diagnosis using artificial marker protein planed in the 1st and 2nd year of this research. Because product standardization and strict quality proof are needed to improve the quality of honey, effective distinction should keep in food process through reflecting two tools that we developed.

# CONTENTS

Chapter 1. Overview of research development report . . . . .	12
Chapter 2. The present technic development situation at home and abroad . . . . .	13
Chapter 3. Research development performance contents and results . . .	16
Unit 1. Research development performance contents . . . . .	16
1. The final aim of research development project . . .	16
2. The annual aim of research development project . . .	16
3. Research development and design . . . . .	19
Unit 2. Results of the research development performance . . .	21
1. Access . . . . .	21
2. Materials and methods . . . . .	23
A. Discrimination of native bee honey by artificial marker protein . . . . .	23
a. Strain and materials . . . . .	23
b. Preparation of artificial marker protein using pGEX vector . . . . .	23
c. Preparation of artificial marker protein using pHCE vector. . . . .	26
d. Purification of recombinant marker protein . . .	26
B. Discrimination of native bee honey by immnological methods . . . . .	27
a. Materials . . . . .	27
b. Purification of major protein from honey . . .	27

c. Production of Antibody . . . . .	27
d. Western blot analysis . . . . .	29
e. Discrimination of commercial bee honey by Enzyme-Linked immunosorbent Assay (ELISA) . . . . .	29
3. Result and discussion . . . . .	31
A. Discrimination of native bee honey by artificial marker protein . . . . .	31
a. Preparation of artificial marker protein using pGEX vector . . . . .	31
b. Preparation of artificial marker protein using pHCE vector . . . . .	37
c. Availability and purification of recombinant marker protein . . . . .	41
d. Discrimination of commercial bee honey by purified marker protein . . . . .	46
B. Discrimination of native bee honey . . . . .	48
a. Purification of major protein from honey . . . . .	48
b. Production and purification of Antibody . . . . .	54
c. Western blot analysis . . . . .	58
d. Discrimination of commercial bee honey by ELISA . . . . .	58
e. Discrimination of artificially mixed honey protein by two methods . . . . .	62
C. Discrimination of commercial bee honey by two methods . . . . .	67
4. Conclusion . . . . .	71
Chapter 4. Accomplishment and contribution for related fields . . . . .	73
Chapter 5. Application plan of this research . . . . .	75
Chapter 6. Reference . . . . .	76

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의개요	12
제 2 장	국내외 기술개발현황	13
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	16
제 1 절	연구개발수행 내용	16
1.	최종 연구 개발 사업 목표	16
2.	년차별 연구 개발 사업 목표	16
3.	연구개발 방법 및 설계	19
제 2 절	연구개발 수행 결과	21
1.	접근 방법	21
2.	재료 및 방법	23
가.	인공 마커 단백질을 이용한 토종꿀의 관별법	23
1)	사용균주 및 재료	23
2)	pGEX vector를 이용한 인공 마커 단백질의 제작	23
3)	pHCE vector를 이용한 인공 마커 단백질의 제작	26
4)	재조합 마커 단백질의 정제	26
나.	토종꿀의 면역학적 관별법	27
1)	재료	27
2)	꿀의 주요단백질의 정제	27
3)	항체의 생산	27

4) Western blot analysis ·····	29
5) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)법을 통한 시판꿀의 판별 ·····	29
3. 결과 및 고찰 ·····	31
가. 인공 마커 단백질을 이용한 토종꿀의 판별 ···	31
1) pGEX vector를 이용한 인공 마커 단백질의 제작 ·····	31
2) pHCE vector를 이용한 인공 마커 단백질의 제작 ·····	37
3) 재조합 마커 단백질의 가용화 및 정제 ···	41
4) 정제된 마커 단백질을 이용한 시판꿀 판별	46
나. 토종꿀의 면역학적 판별법 ·····	48
1) 꿀의 주요 단백질의 정제 ·····	48
2) 항체 생산 및 정제 ·····	54
3) Western blot analysis ·····	58
4) ELISA법을 통한 시판꿀의 판별 ·····	58
5) 두 가지 판별법을 이용한 꿀의 혼합여부 판별	62
다. 두 판별법을 이용한 실증 ·····	67
4. 결론 ·····	71
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ·····	73
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ·····	75
제 6 장 참고문헌 ·····	76

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

꿀에는 토봉이나 양봉 유래의 서로 다른 분자량을 갖는 특이 단백질이 존재하며 이는 본 연구자 등에 의해 전기영동 (SDS-PAGE)방법을 이용한 토종꿀과 양봉꿀의 판별법으로 개발된바 있다. 그러나 분자량의 차이가 근소하여 적절한 마커 단백질과의 co-electrophoresis를 통하여 판별의 수월성과 정확도를 향상시킬 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 꿀 단백질과 같은 분자량을 갖는 인공 마커 단백질을 제작하기 위하여 glutathione-S transferase와 *Mycobacterium*의 heat shock protein 65 (HSP 65kDa) 유전자를 이용하여 토종꿀과 양봉꿀의 주요 단백질의 크기와 같은 56kDa, 59kDa의 합성 마커 단백질을 pGEX-2T vector와 pHCE vector를 이용하여 생산하였다. 인공 마커 단백질을 시판중인 토종꿀, 양봉꿀과 co-electrophoresis하여 진위판별에 응용하였다. 본 연구에서 개발된 인공 마커 단백질을 판별법에 적용함으로써 기존의 방법의 경우 품질이 입증된 토종꿀과 양봉꿀을 각각 비교하여야 하는 번거로움 없이 효율적으로 판별이 가능하였다.

꿀 특이 단백질의 분자량 차이에 근거한 판별법의 경우 많은 시간과 노력이 필요하므로 대량으로 신속하게 스크리닝을 할 수 있는 보조적인 방법의 개발이 필요하다. 따라서 분자량 차이에 근거한 방법을 보완하여 꿀 판별법을 완성하고자 꿀 특이 단백질의 항체를 제조하여 항체의 높은 항원 선택성에 기인한 방법을 개발하였다. 꿀 특이 단백질에 대한 항체를 제작하기 위하여 토종꿀과 양봉꿀의 주요 단백질을 분리, 정제하여 쥐에 면역시켰다. 쥐로부터 생성된 꿀 특이 단백질에 대한 항체는 토종꿀과 양봉꿀의 항원과 각각 매우 높은 선택성을 가지며 반응하였다. 따라서 꿀 특이 단백질에 대한 항체를 이용하여 시판중인 토종꿀과 양봉꿀을 판별한 결과 꿀 특이 단백질의 분자량 차이를 이용한 SDS-PAGE 판별과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 꿀 특이적인 항체는 토종꿀과 양봉꿀을 인위적으로 혼합한 경우에도 정량적으로 반응성이 증가하여 두 가지 꿀이 혼합된 여부를 판별가능 함을 알 수 있었다. 실제로 시판 토종꿀의 일부에서는 양봉 항체와도 반응하므로써 양봉꿀의 혼입가능성이 제시되었다.

본 연구에서 제시된 꿀 특이 단백질의 분자량 차이 및 항체의 선택적인 반응을 이용한 두 판별법을 상호보완적으로 이용할 경우 꿀의 진위판별뿐만 아니라 혼합 여부까지 신속하고 정확하게 검출할 수 있다고 판단된다.

## 제 2 장    국내외 기술개발 현황

벌꿀은 꿀벌들이 식물체의 꽃 꿀을 채집하여 벌집에 저장, 숙성시킨 당류로서, 채밀하는 벌의 종에 따라 한국 재래종으로부터 얻은 토종꿀과 서양종으로부터 얻은 양봉꿀로 나뉘고 있다. 양봉꿀은 꽃의 개화기를 이용하여 일정한 장소에서 채밀하거나, 밀원이 풍부한 지역으로 이동하면서 생산된 벌의 식량을 1년에 수차례 수확한 것으로서, 밀원이 되는 식물로는 아카시아, 밤나무, 메밀, 진달래 등이 있다. 토종꿀은 일정한 장소 없이 생산된 꿀을 1년에 한차례, 주로 가을철에 수확한 것으로 현재 우리나라에서는 벌꿀의 총 생산량 중 토종꿀의 생산량이 극히 미비한 실정이다. 그러나 토종꿀이 가진 신비스러움과 royal jelly 속에 함유되어 있는 각종 불포화지방산 및 기타 성분들에 의한 여러 가지 성분의 약리작용에 의한 의약학적 효력으로 인하여 그 수요는 급증하고 있다.

꿀의 진위여부를 가리는 방법이나 품질평가에 관한 연구는 매우 오래 전부터 많이 연구되어왔다. 여러 가지 방법 중에서 가장 일반적으로 적용되어 온 방법은 꿀의 화학조성을 이용하는 방법에 관한 연구이다. White(10)등은 꿀의 화학조성을 수분 17.50~18.20%, glucose 32.45~33.62%, fructose 38.29~38.69%, sucrose 0.07%~1.99%, 회분 0.067~0.145%, pH 3.84~4.22, 유리산 23.71~35.35 meq/kg, lactone 6.56~10.82 meq/kg, HMF 0.06~0.35 mg%, 그리고 diastatic activity를 15.1~45.8이라 보고하였으며, Hase(11)등은 일본의 시판 꿀 116점을 분석 조사한 결과 수분 16.0~24.5%, 가용성 전당 83.6~99.7%, 질소 7~73mg%, pH 3.21~6.11임을 보고하였다.

꿀의 대부분을 차지하는 유리당에 관하여 많은 연구가 보고 되었는데 Maeda(12)등은 3종의 벌꿀의 당류를 분석하였을 때 fructose가 전체의 50% 이상을 차지하였고, glucose가 20~40%, sucrose는 0~3.66%, 그리고 maltose는 0.63~4.35%를 차지하고 있다고 보고하였다. 또한 White(13)등은 꿀 중의 disaccharides를 정량 분석한 결과 isomaltose, maltulose, turanose, nigerose, maltose, sucrose를 확인할 수 있었으며 이중 isomaltose, maltulose, turanose, nigerose는 극히 미량이라고 보고하였다. White(10)등은 꿀 중의 유리당 함량은 fructose가 35.05~36.41%, glucose가 23.12~33.58%, maltose가 5.50~16.41%, sucrose가 1.04~16.8%이며 저장 중 fructose/glucose의 값이 증가한다고 보고하였다.

벌꿀은 동절기의 기후에 의한 점도나 보관중의 결정화현상이 있어 이것을 용해하여야 하는 과정과, 또한 소비자의 기호에 맞게 벌꿀을 혼합하는 것 등 때문에 가열, 용해, 혼합의 공정이 필요하다. 따라서 이에 대한 사전 예방 조치로 벌꿀에 대한 품질관리를 위하여 WHO/FAO 합동벌꿀규격이 제정되어 있으며 여기에 벌꿀의 이물질 혼입 및 과열을 방지하기 위한 시험 항목으로 diastase number 및 HMF시험법이 제정되어 있고, 우리나라는 현재 HMF를 채택하여 시험법으로 활용되고 있다.

HMF는 식품의 색과 풍미에 영향을 주는 인자로서 hexose와 fructose에 산이 작용하여 생기며 HMF가 중합하여 caramel이 생성되는 것으로 알려져 있다. 또한 HMF는 amino acid, peptide, 단백질 등이 당류, aldehyde 및 ketone등과 반응하여 생기는 Maillard반응의 중간물질이 되기도 하는데(14) 꿀에 있어 HMF의 양이 많으면 가열되었거나 선도가 떨어진 것으로 판정한다(15, 16). Winkler(17) 등은 분광 분석법에 의하여 HMF를 정량한 자연꿀에는 HMF의 함량이 0~4mg%, 인공 꿀에는 50~150mg%라 보고하였다.

Diastatic activity는 꿀의 선도를 측정하는 수단으로 이용가능하다고 판단하여 많은 연구자들이 이에 대해 보고하고 있다. White(16)등은 미국 꿀의 diastatic activity를 조사한 결과 15.0~41.8이라고 보고하였고, Hase(11)등은 일본의 시판꿀 116점과 원료용꿀 141점의 품질을 비교하고자 diastatic activity를 조사한 결과 원료용꿀과 시판꿀의 diastatic activity가 5이하에 속하는 것이 각각 2.7%와 22.3%, 5~8이 16.9%와 25.9%, 8~10이 12.5%와 22.3%, 10~15가 30.4%와 20.5%, 15~20이 18.8%와 6.3%, 20이상이 18.8%와 2.7%를 나타내 8이상의 activity를 보인 것이 원료용꿀은 80.4%인데 비해 시판꿀은 51.8%로서 시판 꿀의 선도가 떨어짐을 알 수 있다.

White(10)등의 보고에서 보는 바와 같이 꿀의 주성분인 당의 조성은 fructose와 glucose가 주종을 이루어 이들의 함량은 약 30~40% 정도인 반면 sucrose는 소량이 함유되어 있다. 따라서 가장 보편적인 감미료인 sucrose를 꿀에 혼합할 경우에는 용이하게 검출되어 대신 sucrose의 가수분해물을 꿀에 첨가하는 사례가 빈번하였다. 이와 같은 산 가수분해물을 검출하기 위한 여러 가지 방법이 연구되어왔으며 이중 HMF와 정색반응을 일으키는 원리를 이용한 방법인 resorcinol (Fieche) 측정법이나 aniline (Feder) 측정법에 의한 정색반응이 가장 집중적으로 연구되어 왔다(18, 19). 그러나 White(16)등은 저장 중에 온도가 높을수록 HMF 함량의 증가가 촉진된다고 보고하였고 한(20)등도 20℃에서 80일간 저장하면 그 양이 증가한다고 보고하였다.

또한 White(16)등은 23~28℃에서 17개월 저장하면 diastatic activity가 1/2로 감소한다고 보고하였으며, 한(20)등도 50℃에서 5일간 저장하면 1/2로 감소한다고 보고하였다. 따라서 diastase number 및 HMF 시험법은 꿀의 선도를 측정하는 방법으로는 적합하지만, 꿀의 진위여부를 가리는 방법으로는 다소 명확하지 못한 것으로 간주된다.

꿀의 향기성분 조성을 이용하여 꿀의 품질을 평가하려는 방법(21), 꿀에 존재하는 무기질의 함량을 측정하여 K/Na의 비율로 혼입여부를 판별하는 방법(22-25), 유기산의 조성으로 판별하는 방법(26), 효소의 역가를 측정하는 방법(7)등 여러 가지 연구보고가 있으나 이들 방법 각각의 당위성과 꿀의 다양성, 즉 밀원별, 벌의 분류학상의 종별, 계절적인 인자 및 지역적인 차이 등을 고려할 때 벌꿀의 진위판별에는 다소 문제가 있는 실정이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발 수행 내용

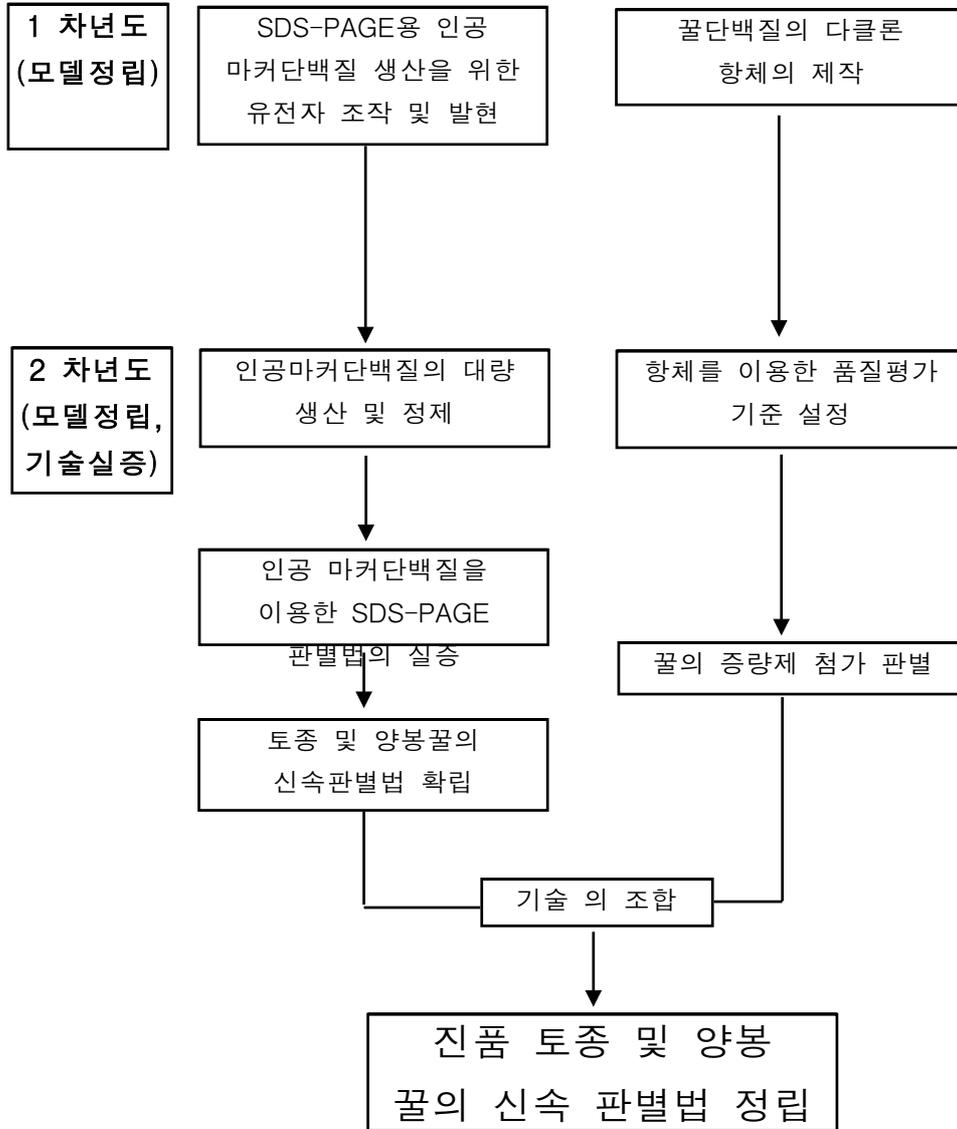
#### 1. 최종 연구 개발 사업 목표

- ▶ 사회적으로 신뢰도가 저하된 농축산물에 대한 새로운 품질평가 기술의 개발로 인한 신뢰도 회복을 목표로 함.
- ▶ 꿀 특이 단백질과 같은 분자량을 갖는 인공 단백질을 대장균에서 생산하여 신속하고 정확한 토종꿀 판별법으로 완성
- ▶ 항체를 이용한 꿀의 증량제 첨가 여부 등의 품질평가법 보완

#### 2. 년차별 연구 개발 사업 목표와 내용

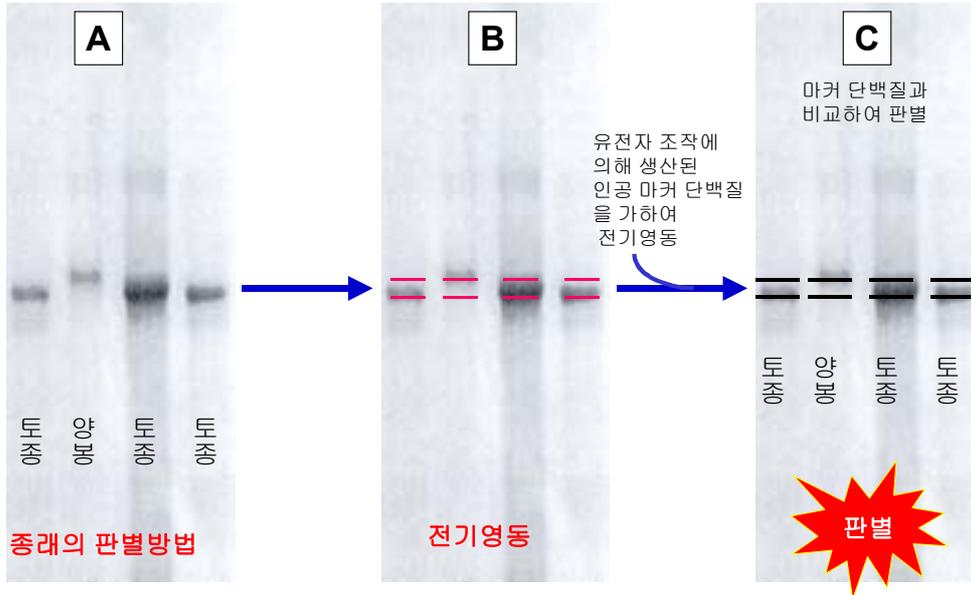
본 연구는 신속하고 정확한 꿀 판별을 위하여 인공 마커 단백질을 이용한 단백질 전기영동법의 보완 그리고 꿀 특이 항체를 이용한 품질 판정 방법 개발을 내용으로 하고 있다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 내용의 1차년도 및 2차년도 연구 범위를 설정하고 연구를 추진하였다.

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2002년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 SDS-PAGE용 인공 마커 단백질 생산을 위한 유전자 조작 및 발현</li> <li>0 꿀단백질에 대한 항체의 제작</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 꿀의 주요단백질과 같은 분자량을 갖는 인공 단백질 제작 (모델정립) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 인공 단백질 DNA의 합성</li> <li>- Plasmid 제작</li> </ul> </li> <li>0 마커단백질의 대장균내 발현 및 분자량 확인 (모델 정립)</li> <li>0 꿀단백질에 대한 항체의 제작을 위한 토종꿀과 양봉꿀 주요단백질의 정제 (모델정립)</li> <li>0 Rat을 이용한 다클론 항체의 제작(모델정립)</li> <li>0 항체의 정제 (모델정립)</li> <li>0 정제된 항체의 토종꿀과 양봉꿀의 단백질간의 선택성 조사 (모델정립)</li> </ul>
2차년도 (2003년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 SDS-PAGE용 인공마커단백질의 대장균내 대량 생산 및 정제</li> <li>0 항체를 이용한 품질평가 기준 마련</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 마커단백질의 대장균내 대량 발현 (모델정립)</li> <li>0 마커단백질의 대량생산 및 정제 (모델정립)</li> <li>0 인공 마커단백질을 이용한 SDS-PAGE 판별법의 실증 (기술의 실증)</li> <li>0 다클론 항체의 ELISA의 이용성 검토 및 품질평가 기준 설정 (모델정립)</li> <li>0 항체를 이용한 신속한 판별법의 개발 (기술의 실증)</li> </ul>



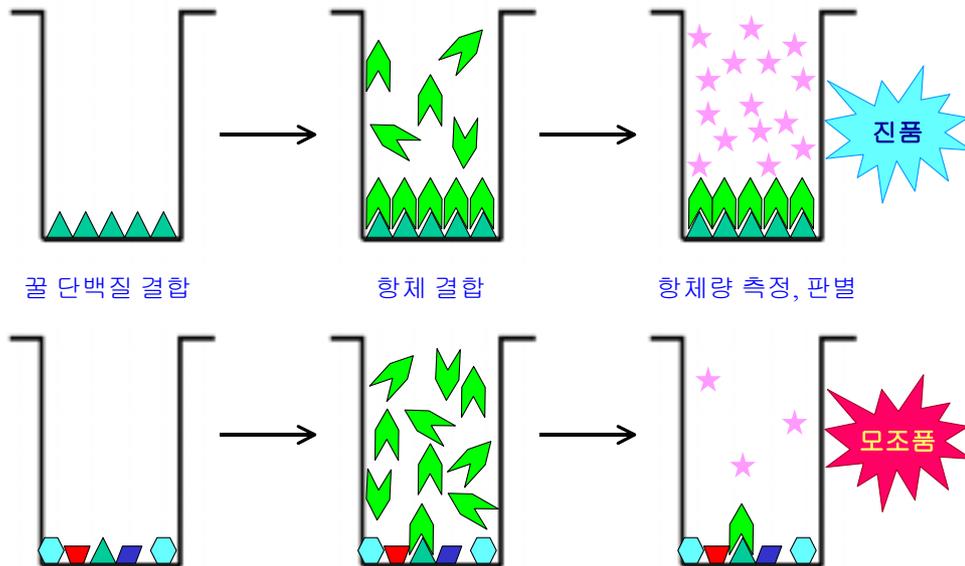
### 3. 연구개발 방법 및 설계

#### • 유전자 조작 마커 단백질에 의한 꿀의 판별



토종꿀 및 양봉꿀에는 각각 56kDa 및 59kDa의 분자량을 갖는 특이 단백질이 존재하므로 이를 근거로 하여 토종꿀과 양봉꿀의 판별법이 SDS-PAGE로 가능하게 되었다(그림 A). 이 방법에는 기준이 되는 마커 단백질을 필요로 하고 있다. 이 마커 단백질은 분자량이 같은 기존의 상품화되어져 있는 단백질 (효소 등) 또는 분자량 산출용 마커 단백질을 이용할 수도 있겠지만(그림 B) 이는 판별법으로 이용되고 있는 SDS-PAGE를 대중화시키려는 측면에서 경제적으로 불가능하다. 따라서 56kDa 및 59kDa 분자량을 갖는 인위적인 마커 단백질을 분자생물학적 기법을 이용하여 제작하여 시료에 첨가하여 전기영동을 하므로써 판별을 용이하게 한다. 즉 56kDa와 일치하는 꿀은 토종으로 (2개의 마커 중 아랫것과 일치) 59kDa와 일치하는 꿀은 양봉으로 (2개의 마커 중 위의 것과 일치) 판별한다(그림 C).

## • 효소면역법에 의한 꿀의 판별



또한 현재에는 꿀에 함유된 증량제의 검출 또는 설탕급여 꿀의 판별을 위해서 이용되고 있는 방법은 동위원소비율을 측정하는 것이다. 그러나 이 방법은 시간과 기기 설치비용 등 제한점이 있다. 꿀 속의 단백질은 벌의 타액에 유래한 것이므로 꿀 단백질을 항원으로하여 제작한 항체를 이용하여 꿀 속의 항원의 양을 ELISA 방법으로 정량하므로써 증량제의 첨가 여부를 판단할 수 있게 된다. 즉, 정상적인 꿀은 일정한 양의 항원을 가지고 있으므로 정상적인 발색을 하게 되나 (진품, 그림의 위) 이성화당과 같은 증량제가 첨가된 꿀은 항원의 양이 적어 ELISA상에서 낮은 발색도를 나타내게 되므로 증량제의 혼입 여부를 신속하게 판별할 수 있다 (가짜, 그림의 아래)

## 제 2 절 연구개발 수행 결과

### 1. 접근방법

본 연구자들은 강원도 일원에서 생산된 30종의 토종꿀과 국내외에서 생산된 양봉꿀 8종에 대하여 분석을 실시하여 토종꿀의 효과적인 판정방법을 개발하여 제시한 바 있다(27). 본 방법은 꿀벌 소화액 기원의 효소류의 차이에 의한 꿀 단백질의 분자량이 다름을 이용하여 토종꿀과 양봉꿀 각각의 특이적인 단백질을 SDS-PAGE로 분석하는 것을 기본적인 골격으로 하고 있다(Fig. 1). 그러나 SDS-PAGE를 이용해서 꿀을 판별할 경우 품질이 입증된 토종꿀, 양봉꿀의 단백질을 각각 마커 단백질로 이용해야 하는 번거로움이 뒤 따른다. 또는 마커 단백질로서 토종꿀과 양봉꿀로부터 특이 단백질을 정제하여 사용할 경우 정제과정이 번거로울 뿐만 아니라 꿀에는 g 당 2 mg 이내의 소량의 단백질이 존재하므로 대량의 마커 단백질을 얻기 위해서는 비싼 정제 비용이 추가로 요구된다. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제를 해결하기 위하여 토종꿀과 양봉꿀의 주요 단백질의 분자량과 같은 인공 마커 단백질을 제작하여 생산하고 이를 이용하여 토종꿀의 판별방법의 개선을 시도하였다.

또한 토종꿀과 양봉꿀에 서로 다른 분자량을 가지는 특이단백질이 존재함에 착안하여 각각의 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 생산하고자 하였다. 항체는 검출감도가 매우 높고 대량으로 처리가 가능한 장점을 가지고 있으므로 서로 다른 꿀 단백질에 특이적으로 반응하는 항체를 생산, 이를 이용하여 인공 마커 단백질을 이용한 판별법을 보완하되로서 특이성과 민감성이 높은 판별법을 개발하고자 하였다. 또한 인공 마커 단백질을 이용하여 토종꿀을 판별하는 판별법의 결과와 항체를 이용한 판별법의 결과를 비교, 분석하여 두 판별법의 상호보완성을 알아보았다.

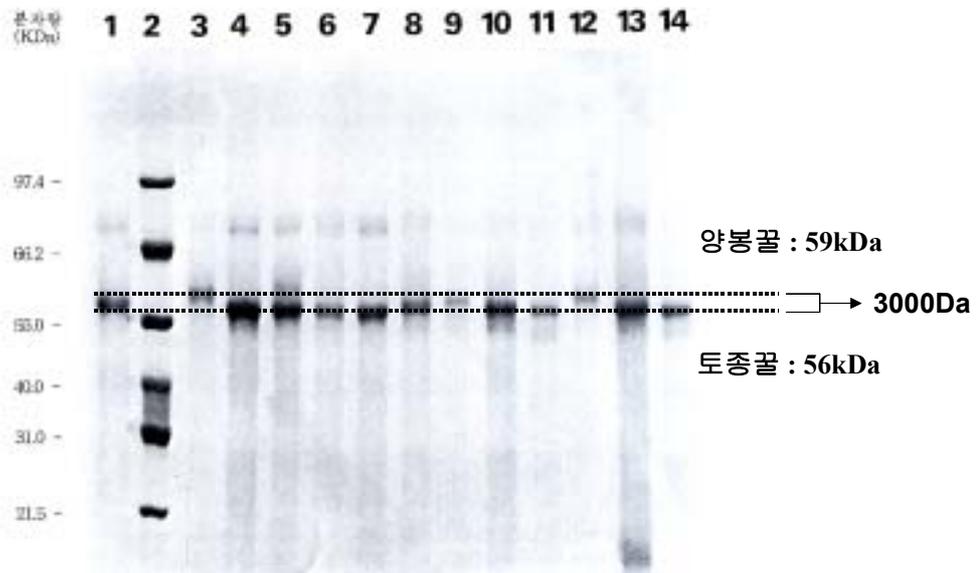


Figure 1. Analysis of honey protein by SDS-PAGE.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 인공 마커 단백질을 이용한 토중꿀 판별법

#### 1) 재료

*E. coli* XL-1 Blue균주는 Stratagene (La Jolla, CA. USA)에서, pGEX vector는 Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)에서, pHCE vector는 Takara Korea (서울, 한국)에서 구입하였다. *Nde* I, *Xba* I, *Eco*R I, Exo III, S1 nuclease, Klenow mix, dNTP, T4 DNA ligase는 BM (Mannheim, Germany)에서, Ampicillin은 Sigma Chemical (St. Louis, MO. USA)에서 구입하였으며 electrophorator와 Model-491 Prep Cell은 Bio-Rad (CA. USA) 제품을 이용하였다. 그 밖의 시약들은 특급품을 사용하였다.

#### 2) pGEX vector를 이용한 인공 마커 단백질의 제작

*Mycobacteria paratuberculosis* 기원 heat shock protein 65 (HSP 65)의 구조 유전자를 이용하여(Fig. 2) 각각 30kDa과 33kDa에 해당되는 DNA fragment를 증폭시키기 위해 PGF1, PGR1 primer와 PGF1, PGR2 primer를 제작하였다(Table. 1). Polymerase chain reaction (PCR)은 94°C에서 pre-cycle 2분 후 94°C에서 1분, 54°C에서 1분, 72°C에서 2분간 30cycle 수행하였다.

증폭시킨 DNA fragment를 26kDa의 GST fusion을 갖는 pGEX vector의 multiple cloning site (MCS)에 삽입시켜 56kDa과 59kDa의 재조합 마커 단백질을 발현시키기 위하여 pGEX vector와 증폭된 DNA fragment (HSP30, HSP33)를 *Eco*R I을 처리하여 linear DNA로 전환시켰다. 제한효소로 절단한 vector는 Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)로 처리하여, vector 자체의 self ligation을 방지해 주었다. CIAP 처리한 vector와 insert DNA (HSP30, HSP33)을 T4 DNA ligase를 이용하여 저온에서 (4°C, 16°C) ligation하였다. 15시간동안 ligation 한 후 electrophorater를 이용하여 competent cell (*E. coli* XL1-Blue)로 transformation시켰다. L-broth (contained 100µg Ampicillin/ml)로부터 random하게 선발된 transformants의

**Table 1. Bacterial strains, plasmids and primers used in this study**

Material	Relevant features	Source or reference
Bacteria		
<i>E.coli</i> XL-1 Blue	Used for general cloning SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lacF' [proAB <sup>+</sup> laCIq lacZ ΔM15 Tn10 (tetr)]	(28)
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Heat shock protein 65 (HSP65)	(29)
Plasmids		
pGEX-2T	Glutathione S-transferase fusion vector	(30-32)
pHCE IA (Nde I)	HCE promotor	(34)
Primers		
PGF1	5'-GGGGAATTCACTTCGCAATGGCCAAG AC-3' HSP65 start codon (EcoR I)	in this study
PGR1	5'-GGGGAATTCCAGGGTGGACAGGGCCT CG-3' HSP33 (EcoR I)	"
PGR2	5'-GGGGAATTCCGGCAGCAGGTCCTTGA C-3' HSP30 (EcoR I)	"
PHF1	5'-GGGCATATGTCCCCTATACTAGGTTA T-3' GST start codon (Nde I)	"
PHR1	5'-GGGTCTAGATCACAGGGTGGACAGGG CCT-3' HSP33 (Xba I)	"

1	ATCTTTGTGT	GGGGACGGTG	AGGCTCGGCT	CTGTCGTGCG	CCGACGGCAG	CAGCCTGGTC	
61	GTCCGTCGCG	GCCAAGCACG	CCGGCCAGGA	CGTGTGTCATCC	CCAATCCGGA	GGAATC <u>ACTT</u>	← PGF1
121	<u>CGCAATGGCC</u>	<u>AAGACAATTG</u>	CGTACGACGA	AGAGGCCCGT	CGCGGCCTCG	AGCGGGGGCT	
181	CAACGCCTC	GCCGACGCGG	TAAAGGTCAC	GTTGGGCCCC	AAGGGTCGCA	ACGTCGTCCT	
241	GGAGAAGAAG	TGGGGTGCCC	CCACGATCAC	CAACGATGGT	GTGTCCATCG	CCAAGGAGAT	
301	CGAGCTGGAC	TACCCGTACG	AGAAGATCGG	CGCCGAGCTG	GTCAAGGAAG	TCGCCAAGAA	
361	GACCGACGAC	GTCGCCGGTG	ACGGCACGAC	GACGGCCACG	GTGCTCGCCC	AGGCGTTGGT	
421	CCGCGAGGGC	TCGCGCAACG	TCGCGGCCGG	CGCCAACCCG	CTGGGTCTCA	ACGGCGGCAT	
481	CGAGAAGGCC	GTCGAGAAGG	TCACCGAGAC	CCTGCTCAAG	TCGGCCAAGG	AGGTCGAGAC	
541	CAAGGACCAG	ATCGCTGCCA	CCGCGGCCAT	CTCCGCGGGC	GACCAGTCGA	TCGGCGACCT	
601	GATCGCCGAG	GCGATGGACA	AGGTCGGCAA	CGAGGGCGTC	ATCACCGTCG	AGGAGTCCAA	
661	CACCTTCGGC	CTGCAGCTCG	AGCTCACCGA	GGGTATGCGG	TTCGACAAGG	GTTACATCTC	
721	GGGCTACTTC	GTCACGGACG	CCGAGCGTCA	GGAAGCGGTC	CTCGAGGACC	CGTTCATCCT	
781	GCTGGTCAGC	TCCAAGGTCT	CGACC <u>GTCAA</u>	<u>GGACCTGCTG</u>	<u>CCG</u> CTGCTGG	AGAAGGTCAT	← PGR2
841	CCAGGCCGGC	AAGCCGCTGC	TGATCATCGC	CGAGGACGTC	GAGGG <u>CGAGG</u>	<u>CCCTGTCCAC</u>	← PGR1
901	<u>CTG</u> TCGTC	AACAAGATCC	GCGGCACCTT	CAAGTCGGTG	GCCGTCAAGG	CGCCCGGCTT	
961	CGGCGACCGC	CGCAAGGCGA	TGCTTCAGGA	CATGGCCATC	CTCACCGGCG	GCCAGGTCAT	
1021	CAGCGAAGAG	GTCGGCTGT	CGCTGGAGAG	CGCCGACATC	TCGCTGCTCG	GTAAGGCCCG	

Figure 2. Nucleotide sequence of *Mycobacterium paratuberculosis* heat shock protein 65 gene.

plasmid DNA의 존재를 확인하고, IPTG induction 하여 SDS-PAGE를 통하여 단백질 발현 유무를 확인하였다. SDS-PAGE는 Laemmli(33)의 방법에 따라 수행하였고, molecular weight marker는 Bio-Rad (CA, USA)의 제품을 사용하였다.

### 3) pHCE vector를 이용한 인공 마커 단백질 제작

pGEX vector에 cloning 되어있는 fusion DNA (GST::HSP30, GST::HSP33)를 증폭시키기 위하여 GST 구조유전자의 start codon을 포함한 forward primer (PHF1)를 제작하였으며, reverse primer는 HSP30 (PHR2)과 HSP33 (PHR1) DNA서열의 마지막 부분에 맞게 제작하였다(Table. 1). PCR을 통해 증폭된 DNA를 제한효소 *Nde* I 과 *Xba* I 을 처리하였다. pHCE IA DNA는 XL1-blue에 transformation 하여 plasmid DNA를 추출하여, 제한효소 *Nde* I과 *Xba* I로 처리해준 후 CIAP처리를 하였다. T4 DNA ligase로 ligation 한 후 electrophorator로 형질전환 하였다. 형질전환체는 ampicillin을 함유한 L-broth에서 배양한 후, 재조합 인공 마커 단백질의 발현을 SDS-PAGE로 확인하였다.

### 4) 재조합 마커 단백질의 정제

토종꿀과 양봉꿀의 재조합 인공 마커 단백질 생산 균주를 각각 ampicillin을 함유한 L-broth에서 배양한 후 원심분리 (5,000×g, 10분, 4℃)하여 균체를 얻었다. 균체에 Cell lysis buffer I (50mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 100mM NaCl) 3ml 을 첨가한 후 100mM PMSF 4μl와 10mg/ml lysozyme 80μl을 첨가하고 37℃에서 30분간 방치하였다. Ice상에서 10분간 sonication한 후 원심분리 (10,000×g, 15분, 4℃)하여 상등액을 제거하고 침전에 inclusion-body solubilization buffer I (50mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0), 100mM NaCl, 8M urea, 0.1M PMSF)를 1ml 첨가하여 실온에서 1시간동안 방치하였다. 여기에 inclusion-body solubilization buffer II (50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 10.7), 1mM EDTA (pH 8.0), 50mM NaCl) 9ml 을 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 후 6N HCl을 이용하여 반응액의 pH를 8.0으로 보정한 뒤 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 용해된 합성 단백질은 Model 491 Prep Cell (BIO-RAD, CA, USA)을 이용하여 정제하였다.

## 나. 토종꿀의 면역학적 판별법

### 1) 재료

본 연구에서 사용한 꿀은 강원도 지역의 토종꿀 12 종과 시판 토종꿀 20 종, 시판 양봉꿀 6 종, 8종의 외국산 꿀로 4°C에서 보관하면서 필요에 따라 실온에서 채취하여 실험에 사용하였다. Goat anti-rat IgG-Horseradish Peroxidase (HRP) conjugate, Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant, 2,2'-azino-di-2-ethyl-benzthiazoline sulphonate (ABTS)는 Sigma Chemical (St. Louis, MO. USA)에서, enhanced chemiluminescence (ECL) reagent, nitrocellulose membrane, DEAE-Sepharose CL-6B는 Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)에서, Phenyl Toyopearl 650M은 TOYO SODA MFG (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. Luminometer는 Packard Instrument (Meriden, CT. USA)사 제품을 사용하였다. 항체생산을 위한 흰쥐 KP200 CD Rats은 바이오제노믹스 (가평, 한국)로부터 구입하였다. 그 밖의 시약들은 특급품을 구입하여 사용하였다.

### 2) 꿀의 주요 단백질의 정제

벌꿀을 증류수에 대해 투석한 후 원심분리하여 침전물을 제거한 다음 상정액을 동결건조 하여 단백질 정제용 시료로 이용하였다. 토종꿀은 DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography를 실시하였으며 양봉꿀은 Phenyl Toyopearl 650M column chromatography를 실시하여 주요 단백질을 정제하였다.

### 3) 항체의 생산

토종꿀과 양봉꿀로부터 정제된 각각의 단백질을 4°C에서 PBS (0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.002M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.14M NaCl, 0.003M KCl, pH 7.4)에 대해 12시간 투석하여 각각 3마리씩 두 그룹으로 나눈 7주령의 CrjBgi:CD(SD)IGS 흰쥐에 일회분의 면역원량을 300 $\mu$ g으로 하여 Freund's complete adjuvant와 1:1로 혼합하여 복강주사하였다. 추가면역은 2주 간격으로 Freund's incomplete adjuvant를 사용하여 2회 같

Table 2. Collection area of native bee honey and foreign bee honey

시료번호	채밀 지역	시료번호	채밀 지역
1	강원 평창 대화면 A	24	전북 남원 C
2	강원 평창 대화면 B	25	전북 남원 D
3	강원 평창 대화면 C	26	전북 남원 E
4	강원 횡성 월현리	27	전북 남원 F
5	강원 횡성 공근면 A	28	전북 남원 G
6	강원 횡성 공근면 B	29	전북 남원 H
7	강원 춘천	30	전북 남원 I
8	강원 강릉	31	충북 단양
9	강원 홍천 A	32	경남 마천
10	강원 홍천 B	33	(주) 한국명가
11	강원 홍천 C	34	(주) 동서식품
12	강원 홍천 D	35	(주) 꽃샘식품
13	강원 정선 A	36	신림농업협동조합
14	강원 정선 B	37	춘천농업협동조합
15	강원 속초 A	38	강원양봉농업협동조합
16	강원 속초 B	39	뉴질랜드
17	강원 평창	40	중국 산둥
18	강원 목계	41	중국 장백산 A
19	전남 구례 A	42	중국 장백산 B
20	전남 구례 B	43	중국 집안
21	전남 구례 C	44	중국 화령
22	전북 남원 A	45	일본
23	전북 남원 B	46	미국 버지니아

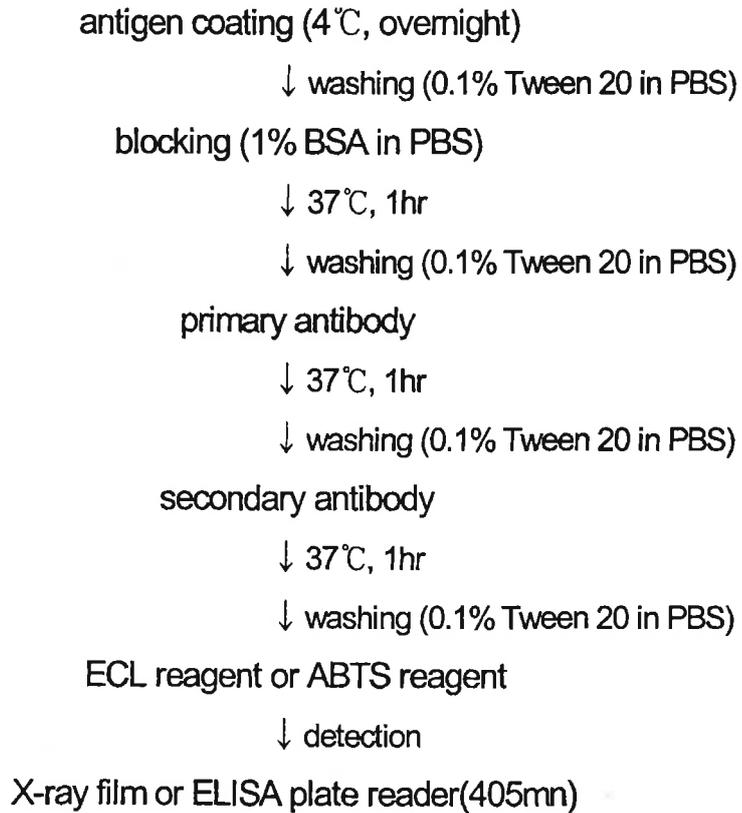
은 방법으로 주사하였다. 최종 면역 후 1주 후 심장으로부터 채혈하여 실온에서 1시간, 4°C에서 14시간 방치한 후 원심분리 (10,000×g, 10분, 4°C)하여 항혈청을 분리하였고 -70°C에서 보관하며 사용하였다.

#### 4) Western blot analysis

Towbin 등(35)의 방법에 따라 전기영동이 끝난 토종꿀 단백질과 양봉꿀 단백질을 nitrocellulose membrane에 65V에서 90분 동안 전사 시킨 후, 3% skim milk를 함유한 PBS로 상온에서 1시간 blocking하였다. 그 후 membrane을 0.1% Tween 20을 함유한 PBS로 세척한 후 토종꿀 단백질 항체와 양봉꿀 단백질 항체를 상온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 세척한 후 PBS에 1:50,000으로 희석한 anti-rat IgG antibody-HRP 용액을 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 세척한 후 ECL용액에 1분간 반응시킨 뒤 x-ray film에 현상하였다.

#### 5) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 법을 통한 시판꿀의 판별

10 $\mu$ g/ml가 되도록 coating buffer (0.05M sodium carbonate buffer, pH 9.6)에 녹인 꿀 단백질을 50 $\mu$ l씩 ELISA plate에 분주한 후 4°C에서 12시간동안 coating하였다. 이를 0.1% Tween 20을 함유한 PBS 200 $\mu$ l로 3회 세척하고 1% bovine serum albumin (BSA) 200 $\mu$ l로 37°C에서 1시간동안 blocking 시켰다. 반응이 끝난 후 다시 3회 세척하고 쥐로부터 분리한 항체 50 $\mu$ l를 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 다시 3회 세척한 후 PBS에 1:50,000으로 희석한 anti-rat IgG antibody-HRP 용액을 50 $\mu$ l 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 다시 3회 세척하고 HRP의 기질인 ABTS용액 (ABTS 0.22mg/ml, 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, phosphate citrate buffer) 50 $\mu$ l를 넣고 20분간 발색시켜 405nm에서 흡광도 값을 측정하거나 ECL용액을 가하여 발광도 값을 luminometer로 측정한 후 X-ray film에 현상하였다(Fig. 3).



**Figure 3. Process flow for antigen-antibody reaction.**

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 인공 마커 단백질을 이용한 토종꿀 판별법

##### 1) pGEX vector를 이용한 인공 마커 단백질의 제작

토종꿀의 주요 단백질의 크기인 56kDa과 양봉꿀의 주요 단백질의 크기인 59kDa의 재조합 단백질을 생산하기 위하여(Fig. 4) *Mycobacterium paratuberculosis* 기원 HSP65 유래의 단백질 중 30kDa과 33kDa에 해당되는 DNA fragment를 primer를 이용하여 증폭시켰다. 증폭된 DNA fragment는 26kDa 크기의 단백질을 발현하는 pGEX vector에 cloning하여(Fig. 5) *E. coli* XL-1 Blue에서 분자량 56kDa 및 59kDa의 재조합 단백질을 발현시켰다. 발현된 단백질을 SDS-PAGE로 확인한 결과, GST::HSP33의 단백질의 경우는 양봉꿀 단백질과 동일한 크기인 59kDa의 단백질이 발현되었음을 알 수 있었다. 그러나 GST::HSP30의 단백질의 경우는 그 크기가 당초에 계획된 56kDa이 아닌 59kDa으로 발현이 되었다(Fig. 6).

따라서 토종꿀 단백질과 같은 크기인 56kDa의 마커 단백질을 생산하기 위해 59kDa의 단백질을 발현하는 GST::HSP30 재조합 DNA에 ExoIII와 S1 nuclease를 처리하여 nested deletion 방법(36-38)으로(Fig. 7-A) GST::HSP30 gene의 size를 줄였다. GST::HSP30 gene을 *Bam*HI로 처리하여 5' protruding end의 linear DNA로 전환시켜 Exo III로 30초 간격으로 150초 동안 digest한 후 3' protruding end를 S1 nuclease로 digest 하였다(Fig. 7-B). Nested deletion 된 fragment DNA를 self ligation 하여 *E. coli* XL-1 Blue에 형질전환 시킨 후 발현된 단백질을 SDS-PAGE로 확인한 결과 토종꿀 단백질과 같은 크기의 단백질이 발현되었음을 알 수 있었다(Fig. 8).

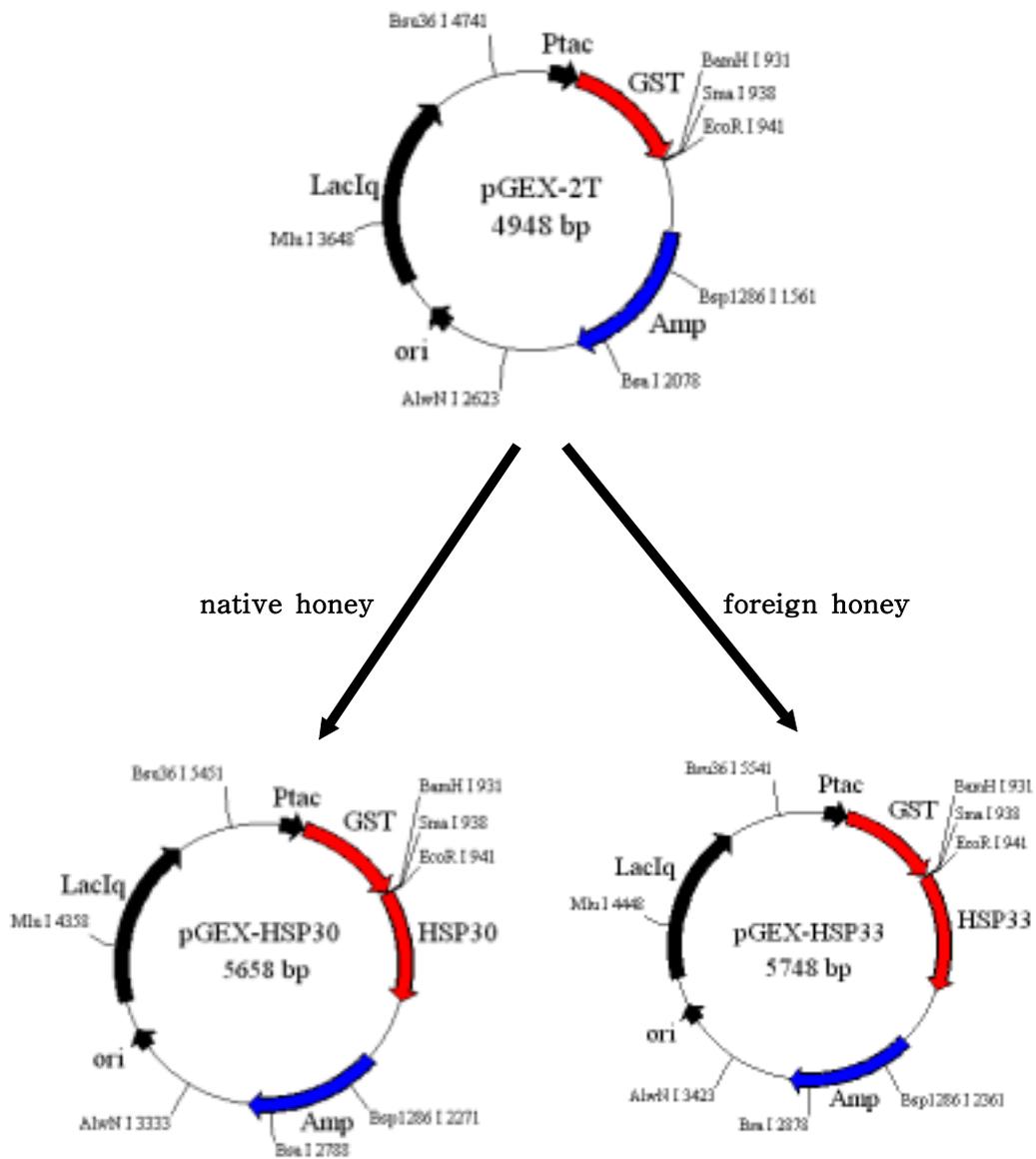


Figure 4. Construction of recombinant plasmid.

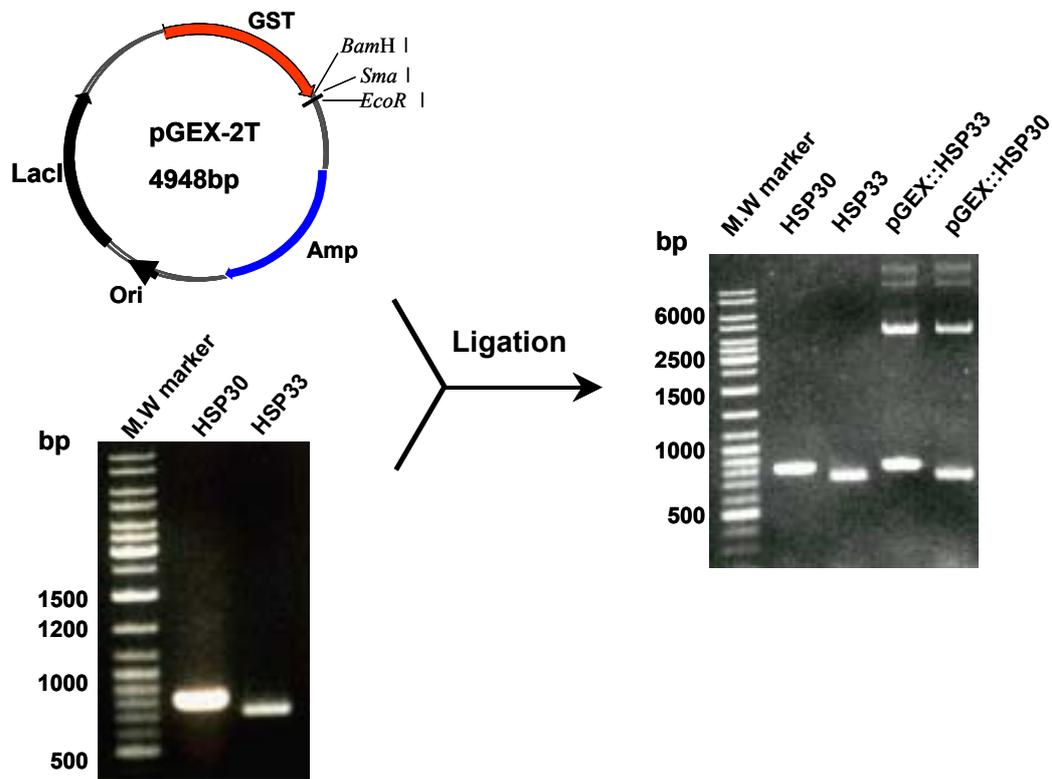


Figure 5. Ligation of PCR products into pGEX vector.

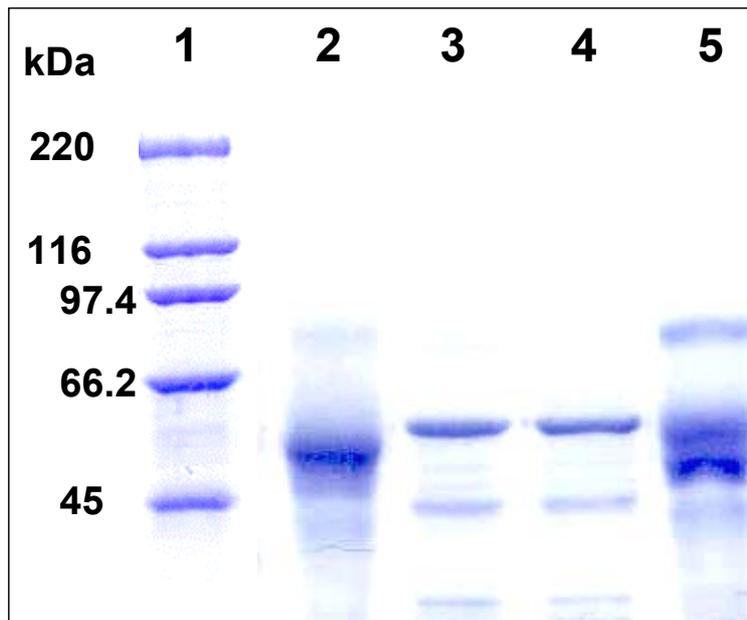


Figure 6. Expression of artificial marker proteins.

Lanes 1, molecular weight marker; 2, native bee honey protein; 3, *E. coli*/pGEX::HSP30 artificial marker protein; 4, *E. coli*/pGEX::HSP33 artificial marker protein and 5, foreign bee honey protein.

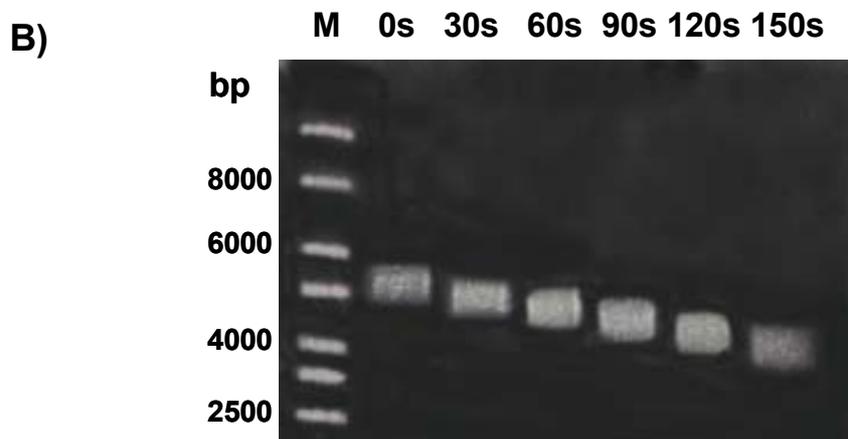
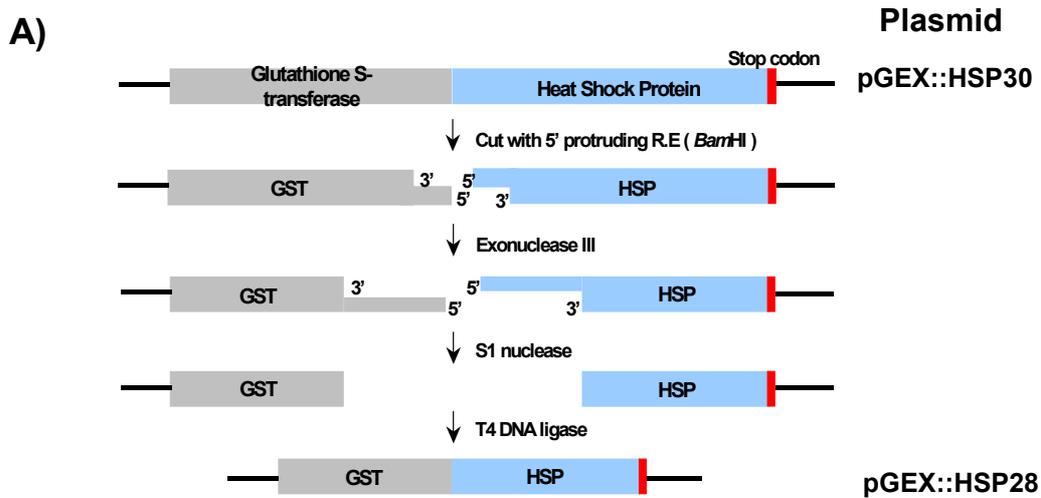


Figure 7. Cloning strategies for the production of marker protein.

Serial deletion of recombinant DNA used a kit(A) and agarose gel electrophoresis of serial deleted plasmid DNA(B). Plasmid DNA was digested with *Bam*HI. The molecular weight marker(M) used was 1 kb ladder. Aliquots were taken at 30 second intervals after the addition of the Exonuclease III, treated with S1 Nuclease.

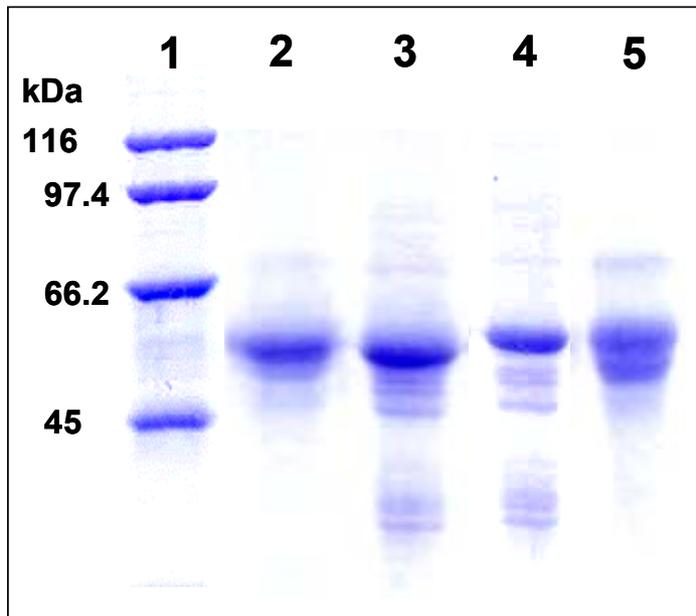


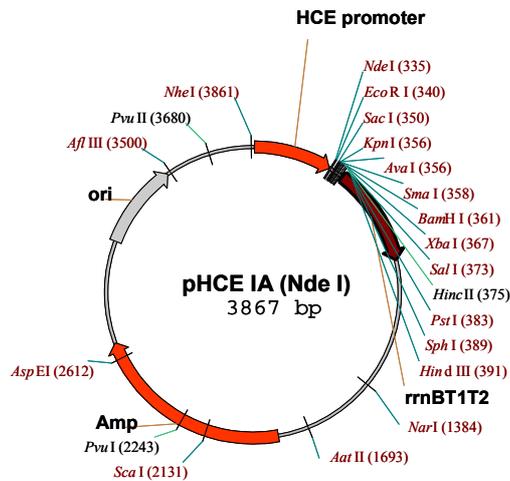
Figure 8. Expression of artificial marker proteins.

Lanes 1, molecular weight marker; 2, native bee honey protein; 3, *E. coli*/pGEX::HSP28 artificial marker protein treated with Nested deletion method from pGEX::HSP30; 4, *E. coli*/pGEX::HSP33 artificial marker protein and 5, foreign bee honey protein.

## 2) pHCE vector를 이용한 인공 마커 단백질의 발현

pGEX vector는 lac I gene이 있어서 lac promoter를 negative regulation 하는 expression vector이므로 고가의 IPTG를 첨가해야만 단백질을 발현한다. 따라서 대량 발현 시 IPTG induction 없이 마커 단백질을 얻기 위하여 *Bacillus* 기원의 강력한 promoter인 HCE promoter를 기반으로 ampicilline 저항성 유전자가 있는 expression vector인 pHCE IA vector를 이용하였다(Fig. 9). pGEX vector에 cloning 되어있는 fusion DNA (GST::HSP28, GST::HSP33)를 증폭시키기 위하여 PHF1 primer는 GST 구조유전자의 start codon을 포함하도록 제작하였으며, PHR1 primer는 HSP33 DNA서열의 마지막 부분에 맞게 제작하였다(Table. 1). 제작된 primer를 이용해 PCR을 수행하여 pGEX vector로부터 56kDa과 59kDa의 단백질을 발현하는 DNA fragment를 증폭하였다. 제한효소 처리 후 pHCE IA vector에 ligation 한 후 형질전환 하였다(Fig. 10). pHCE vector는 CPGY배지 (3.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30g casein peptone, 5g yeast metal extract, 50g glycerol, 1g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5g sodium glutamate, 1.0 ml 미량원소 총량 1 l, pH 6.8, 미량원소 조성비 10g/l FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2g/l CaCl<sub>2</sub>, 2.2g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5g/l MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.1g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.02g/l Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O)에서 합성 단백질이 고발현 된다. 그러나 IPTG를 첨가 하지 않는 장점 대신 여러 종류의 성분들을 첨가해야 하므로 경제적 효율성이 그다지 높다고 볼 수 없다. 따라서 pGEX vector와 pHCE vector가 삽입된 형질전환체를 ampicillin을 함유한 L-broth에 동일한 양을 접종하여 IPTG의 첨가 없이 배양한 후 단백질 발현정도를 비교하였다. 그 결과 pHCE vector의 단백질 발현정도는 IPTG induction을 시켜주는 pGEX vector의 단백질 발현정도와 비슷한 것으로 보아(Fig. 11) 대량 생산 시 pHCE vector를 이용한 발현은 CPGY배지 대신 L-broth를 사용하는 것이 매우 경제적이라고 생각되어진다. 따라서 인공적으로 대량발현을 통하여 생산된 마커 단백질을 토종꿀 진위판별에 사용하는 것이 g 당 2 mg 이내의 단백질만이 존재하는 고가의 꿀로부터 꿀 마커 단백질을 얻는 것 보다 경제적 효율성이 높다고 생각되어 진다.

(A) Map of pHCE IA (*Nde* I) expression vector



(B) Nucleotide sequence of multi-cloning sites of pHCE IA (*Nde* I) vector

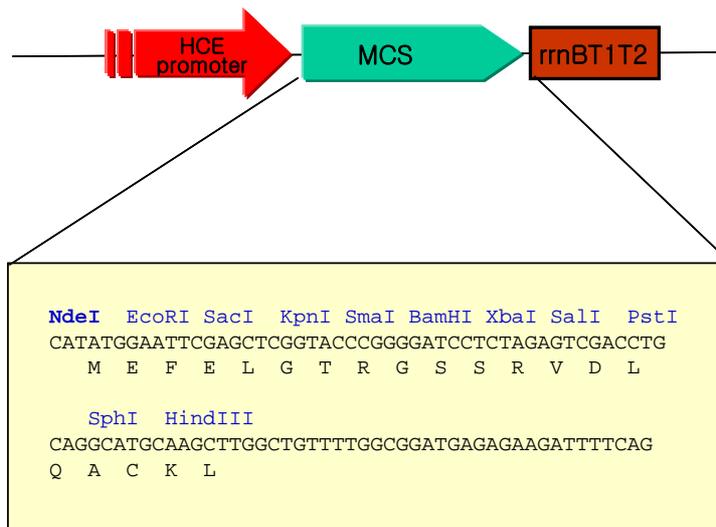


Figure 9. Constitutive expression of recombinant protein by strong HCE promoter based pHCE IA (*Nde* I) expression vector.

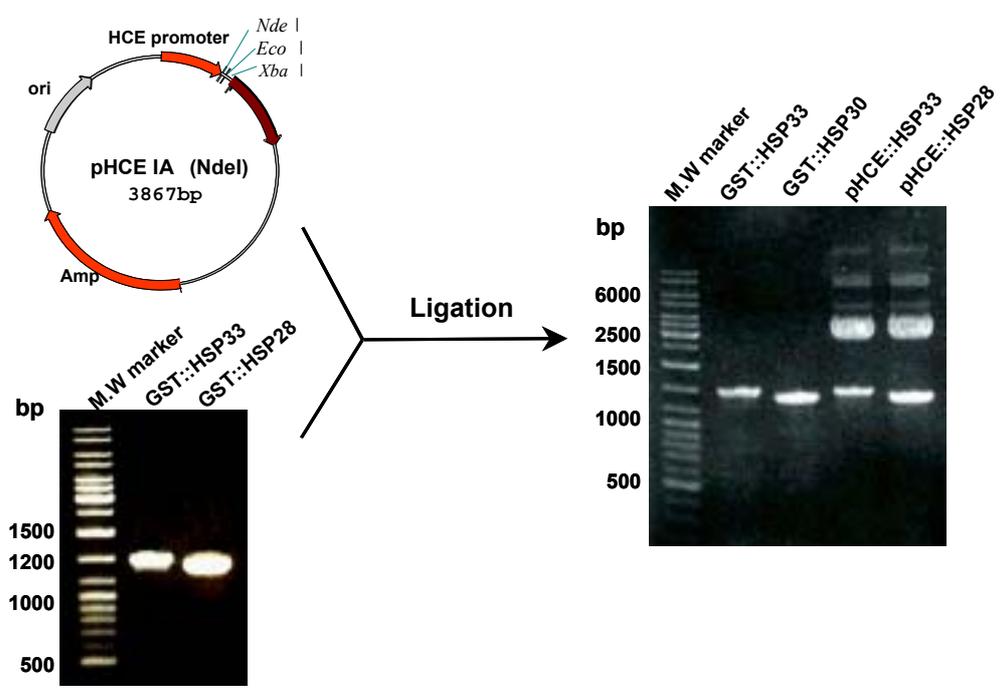


Figure 10. Ligation of PCR products into pHCE vector.

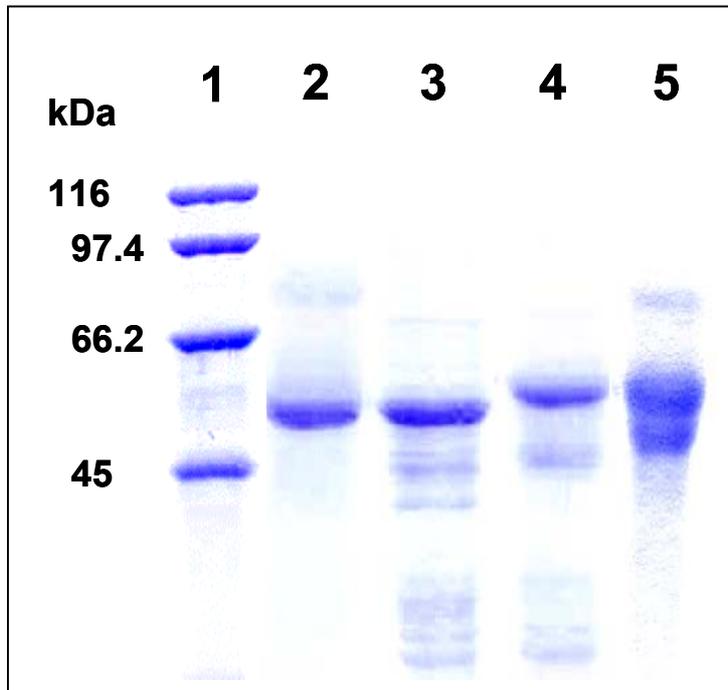


Figure 11. Expression of artificial marker proteins.

Lanes 1, molecular weight marker; 2, native bee honey protein; 3, *E. coli*/pHCE::HSP28 artificial marker protein; 4, *E. coli*/pHCE::HSP33 artificial marker protein and 5, foreign bee honey protein.

### 3) 재조합 마커 단백질의 가용화 및 정제

*E. coli* 내에서 인공적으로 합성된 마커 단백질은 GST와 HSP65 유래 단백질로 GST purification module을 이용한 affinity chromatography를 통해 쉽게 정제될 수 있도록 design된 것이다. 그러나 pGEX::HSP28과 pGEX::HSP33 균주의 경우는 *E. coli*내에서 마커 단백질이 과발현 되어 inclusion body를 형성하므로써 affinity chromatography를 사용하여 정제하지 못했다.

따라서 pHCE::HSP28과 pHCE::HSP33가 transformation 된 *E. coli* XL1-blue를 각각 ampicillin을 함유한 L-broth에서 배양한 후 원심분리 (5,000×g, 10min)하여 회수된 cell pellet과 상층액을 SDS-PAGE로 확인하였다. 그 결과 발현된 단백질은 세포 내에 존재함을 알 수 있었다(Fig. 12). 따라서 cell pellet을 회수하여 cell lysis buffer I을 처리하여 cell을 lysis시킨 후 inclusion-body solubilization buffer I, II를 처리하여 inclusion body를 가용화 시켰다(39, 40). 가용화된 토종꿀과 양봉꿀의 재조합 마커 단백질을 각각 10% resolving gel에 loading 하여 Prep-cell을 이용하여 50mA로 전개하였다(Table. 3). 용출되어 나온 단백질 분획(Fig. 13)을 SDS-PAGE로 확인하여(Fig. 13) 토종꿀과 양봉꿀의 주요 단백질과 크기가 같은 마커 단백질을 정제하였다 (Fig. 14).

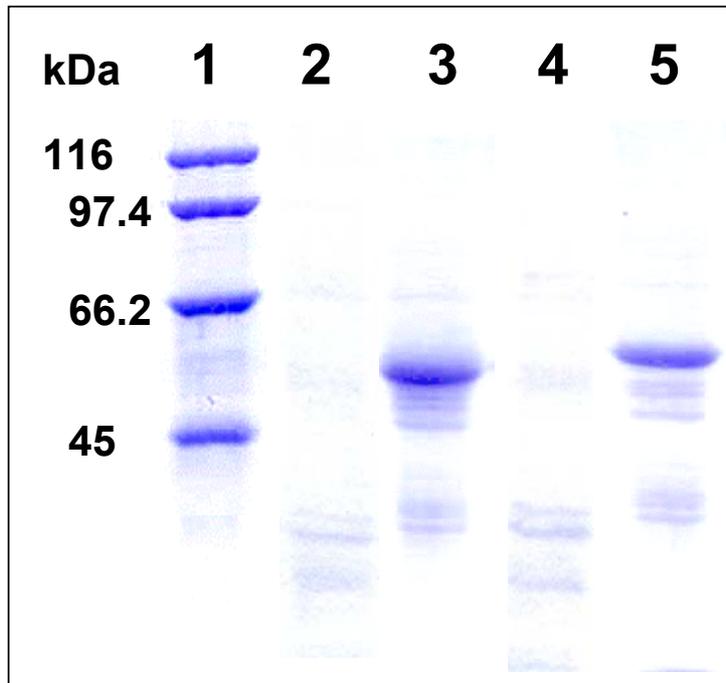


Figure 12. Confirmation of the expression of artificial marker proteins by SDS-PAGE.

Lanes 1, molecular weight marker; 2, soluble fraction of *E. coli*/pHCE::HSP28 cell extract 3, insoluble fraction of *E. coli*/pHCE::HSP28 cell extract 4, soluble fraction of *E. coli*/pHCE::HSP33 cell extract and 5, insoluble fraction of *E. coli*/pHCE::HSP33 cell extract.

**Table 3. Running condition of Prep-cell electrophoresis**

---

Resolving gel concentration	10% acrylamide solution
Resolving gel length	10.0 cm in the 37mm gel tube
Resolving gel buffer	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
Stacking gel concentration	4% acrylamide solution
Stacking gel length	1.5 cm
Stacking gel buffer	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
Elution buffer	0.025 M Tris-HCl, pH 8.0
Elution rate	0.6 mL/min
Fraction size	5 ml
Power	50mA-60mA

---

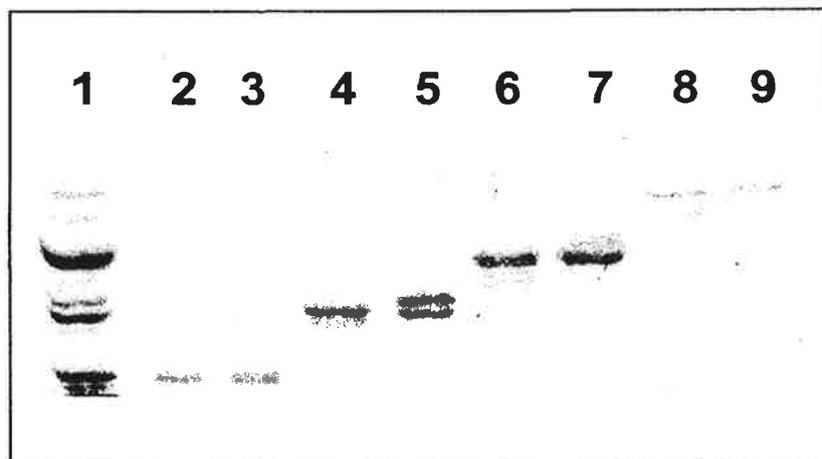


Figure 13. Purification of artificial marker protein with Prep-cell electrophoresis.

Lanes 1, crude extract; 2, fraction 35; 3, fraction 40; 4, fraction 55; 5, fraction 60; 6, fraction 70; 7, fraction 75; 8, fraction 85 and 9, fraction 90.

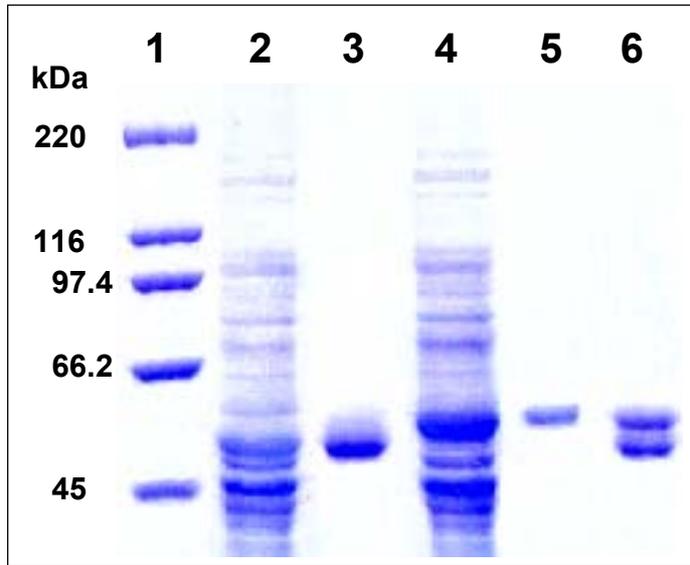


Figure 14. SDS-PAGE of artificial marker proteins.

Lanes 1, molecular weight marker; 2, total protein of *E. coli*/pHCE::HSP28 cell extract; 3, purified artificial marker protein for native bee honey protein; 4, total protein of *E. coli*/pHCE::HSP33 cell extract; 5, purified artificial marker protein for foreign bee honey protein and 6, mixture of purified artificial marker proteins for native and foreign bee honey.

#### 4) 정제된 마커 단백질을 이용한 시판꿀 판별

이상의 방법으로 제작된 인공 마커 단백질을 꿀의 판별에 이용하고자 농가에서 직접 채밀한 토종꿀, 시판 토종꿀 및 양봉꿀을 정제된 인공 마커 단백질과 co-electrophoresis하였다. 59kDa의 양봉 인공 마커 단백질을 이용하여 전기영동을 할 경우 양봉꿀의 경우는 주요 단백질의 크기가 양봉 인공 마커 단백질과 일치하므로 gel상에 하나의 band만 나타나지만 토종꿀의 경우는 인공 마커 단백질보다 작으므로 두개의 band가 나타남을 확인 할 수 있었다. 마찬가지로 56kDa의 토종 인공 마커 단백질을 이용할 경우 양봉꿀의 경우는 토종 인공 마커 단백질보다 크기가 크므로 gel상에 두개의 band가 나타나지만 토종꿀의 경우는 토종 인공 마커 단백질과 크기가 일치하므로 하나의 band가 나타남을 확인 할 수 있었다(Fig. 15). Fig. 15의 lane 3과 4는 시판중인 토종꿀로서 토종꿀 인공 마커 단백질과 co-electrophoresis한 경우 두개의 band가 나타났고 양봉꿀 인공 마커 단백질과 co-electrophoresis한 경우 하나의 band가 나타난 것으로 보아 양봉꿀로 판별되었다.

기존의 꿀의 특이적 단백질의 분자량의 차이에 의존했던 판별법은 하나의 미지의 꿀을 판별하기 위해서 품질이 입증된 토종꿀이나 양봉꿀을 꿀 마커로 사용하여 co-electrophoresis 해야 하므로 마커가 될 수 있는 꿀 확보가 다소 까다로울 것이라 생각된다. 뿐만 아니라 품질이 입증된 토종꿀이나 양봉꿀을 정제하여 꿀 마커로 사용할 경우 고가의 정제비용이 요구 되므로 이 또한 적합하지 못하다고 생각된다. 그러므로 다소 문제점이 있었던 기존의 판별법을 기본으로 하여 꿀 인공 마커 단백질을 이용함으로써 보다 간편하고 명확한 판별이 가능하다고 판단된다.

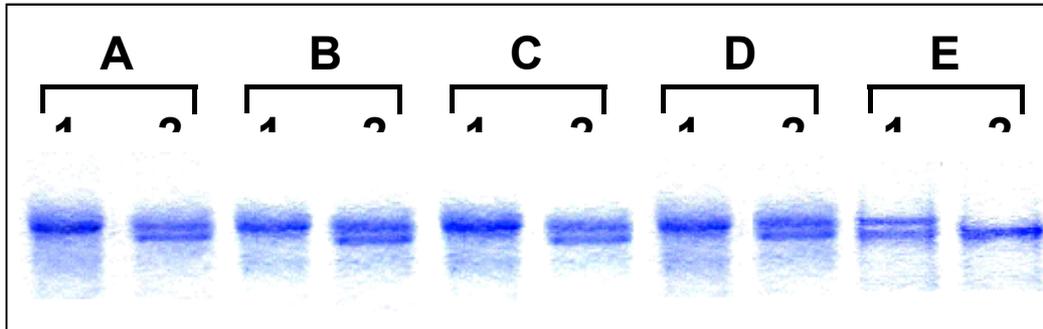


Figure 15. Discrimination of commercial bee honey by artificial marker protein.

Lanes 1 and 2, commercial foreign bee honey; 3, 4, 5, commercial native bee honey. Lanes A, co-electrophoresis with artificial marker protein for foreign bee honey and B, co-electrophoresis with artificial marker protein for native bee honey.

## 나. 토종꿀의 면역학적 판별법

### 1) 꿀의 주요 단백질의 정제

강원도 홍천의 농가에서 2002년에 직접 채밀한 토종꿀과 시판중인 양봉 아카시아꿀 (강원양봉협동조합)을 증류수에 대해 투석한 후 원심분리하여 (10,000×g, 10분) 침전물을 제거한 다음 상정액을 동결건조하여 단백질 정제용 시료로 사용하였다.

토종꿀의 경우 시료에 30% 포화농도가 되도록  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  분말을 가한 후 ice bath상에서 1시간동안 교반 한 뒤 원심분리 (10,000×g, 10분) 하여 얻은 침전물을 4°C에서 20mM Tris-HCl (pH 8.5)에 대하여 12시간 투석하였다. 투석이 끝난 후 20mM Tris-HCl (pH 8.5)로 평형화 시킨 DEAE-Sepharose CL-6B column (1.0×10cm)에 직접 도입한 후 20mM Tris-HCl (pH 8.5) 30ml로 세척하였다. 단백질 용출은 0M-0.5M NaCl linear gradient (in 20mM Tris-HCl (pH 8.5), total 200ml)로 하였다. 그 결과 비전도도 2.0~2.5mS/cm 부근에서 주요 단백질이 용출 되었고(Fig. 16-A) 그 분획만을 모아 20mM Tris-HCl (pH 8.5)에 대해 4°C에서 12시간동안 투석한 후 DEAE-Sepharose CL-6B column (1.0×10cm)을 이용하여 2차 column chromatography를 하였다(Fig. 16-B). 단백질 용출은 0M-0.5M NaCl linear gradient (in 20mM Tris-HCl (pH 8.5), total 200ml)로 하였으며 주요 단백질은 비전도도 2.3mS/cm 부근에서 용출되었다(Fig. 17).

양봉꿀의 경우 시료에 30% 포화농도가 되도록  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  분말을 가한 후 ice bath상에서 1시간동안 교반 한 뒤 원심분리 (10,000×g, 10분)하여 상정액을 30% 포화  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 함유된 20mM Tris-HCl (pH 8.5)로 평형화 시킨 Phenyl Toyopearl 650M column (1.0×10cm)에 직접 도입시켰다. 30% 포화  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  이 함유된 20mM Tris-HCl (pH 8.5) 30ml로 세척하고 단백질 용출은 30%-0%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  linear gradient (in 20mM Tris-HCl (pH 8.5), total 200ml)로 하였다. 그 결과 주요 단백질은 비전도도 10mS/cm 부근에서 용출되었다(Fig. 18, Fig. 19).

이상의 정제 과정에 의해 각각의 꿀로부터 분자량이 서로 다른 단백질을 균질한 상태로 정제할 수 있었다(Fig. 20).

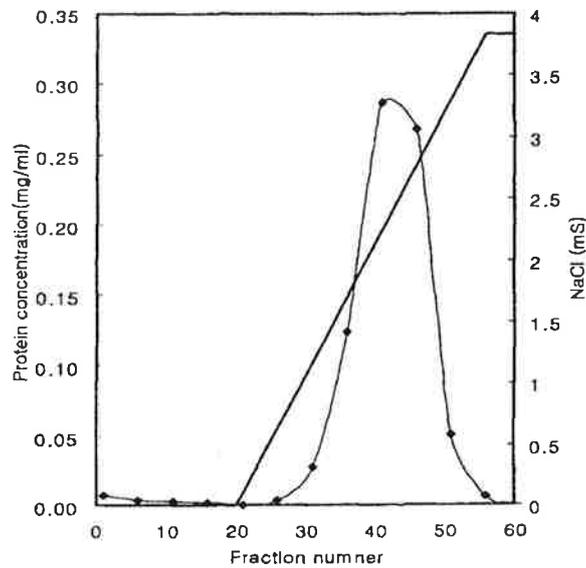
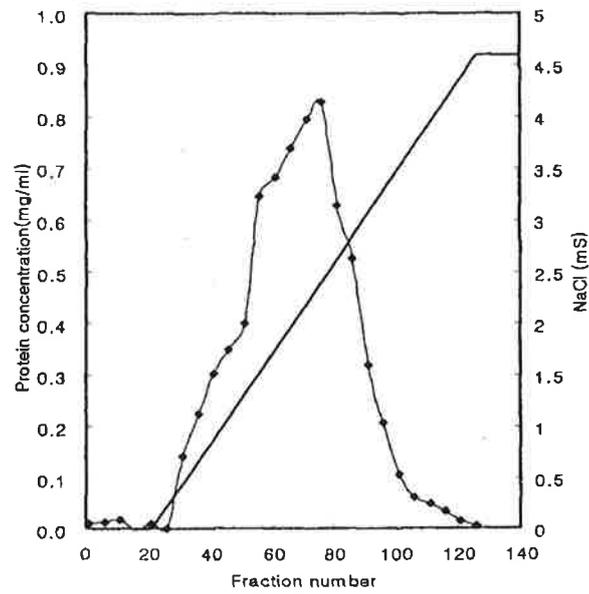


Figure 16. Separation of protein from native bee honey on DEAE-Sephrose chromatography.

Concentration of protein (◆), 0M-0.5M NaCl linear gradient (—).

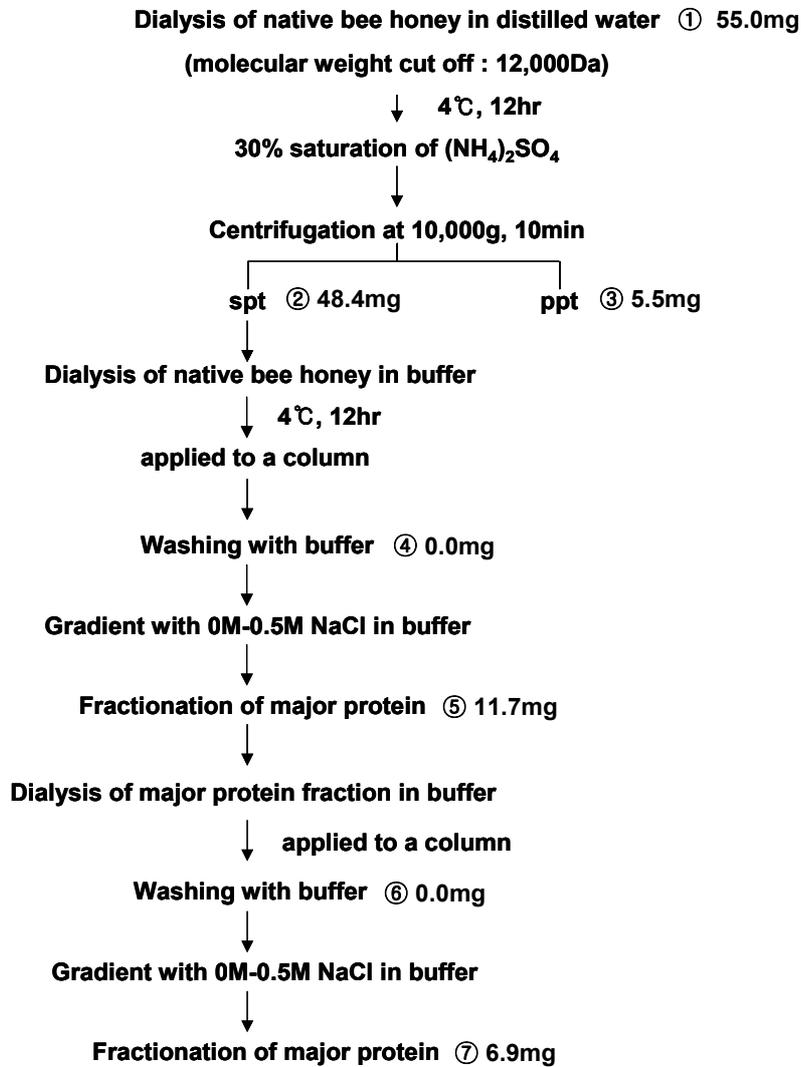


Figure 17. Process flow for protein purification from native bee honey.

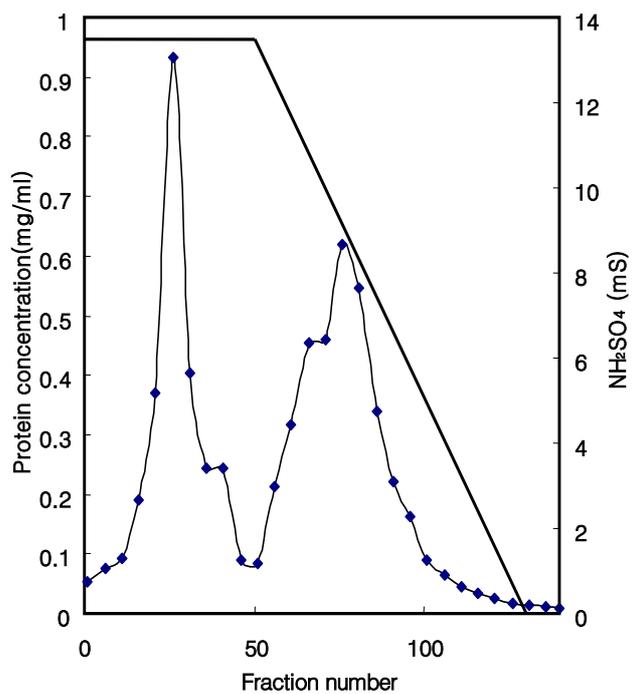


Figure 18. Separation of protein from foreign bee honey on Phenyl Toyopearl 650M chromatography.

Concentration of protein (◆); 30~0% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> linear gradient (—).

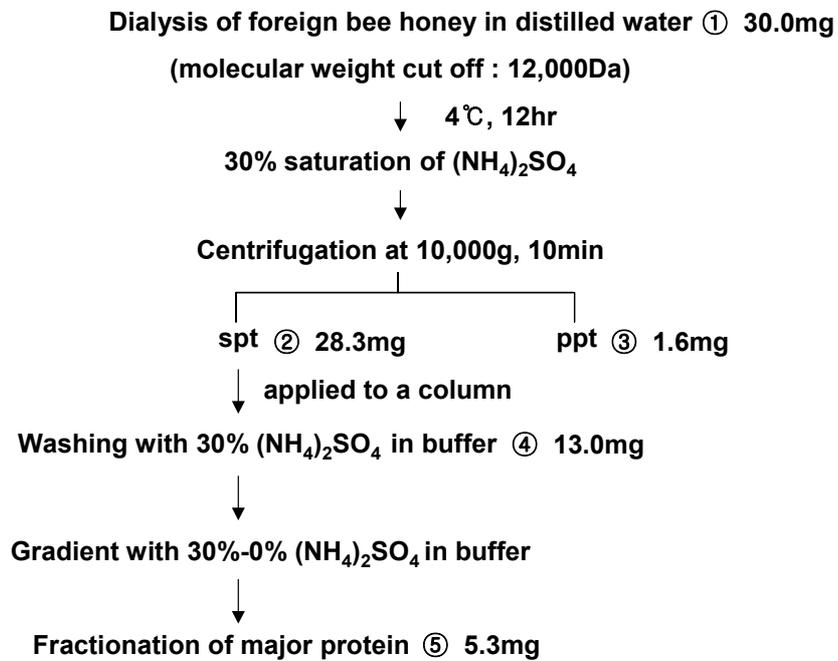


Figure 19. Process flow for protein purification from foreign bee honey.

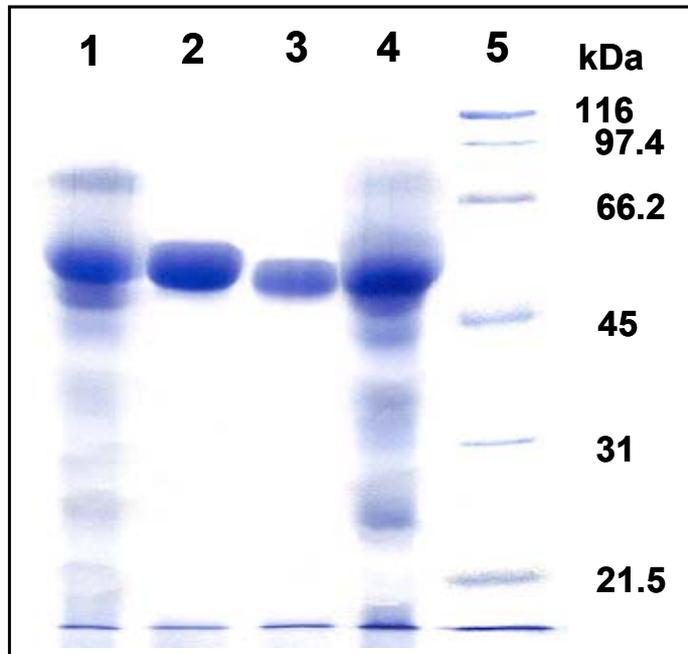


Figure 20. SDS-PAGE of crude and purified major proteins of native and foreign bee honey.

Lanes 1, crude foreign bee honey; 2, crude native bee honey; 3, purified major protein of foreign bee honey; 4, purified major protein of native bee honey and 5, molecular weight marker.

## 2) 항체 생산 및 정제

3마리씩 두 그룹으로 나눈 흰쥐에 정제된 두 단백질을 각각 5주간 면역한 후 심장에서부터 채혈하여 항혈청을 분리하였다. 꿀 단백질에 대한 항체특이성을 알아보기 위하여 정제된 꿀 단백질을 희석별로 coating한 plate에 각각의 혈청을 분주하여 항원-항체반응을 하였다. 그 결과 두 혈청 모두 꿀 단백질에는 특이적으로 반응하지만 각각의 항원에 대하여 선택적인 반응이 일어나지 않았다. 이는 생성된 항체가 polyclone이므로 두 단백질의 표면구조가 서로 비슷하여 자신의 항원에 대해 특이적으로 인식하지 못하는 것이라 생각할 수 있다. 따라서 토종꿀 항원은 양봉항체와, 양봉꿀 항원은 토종항체와 각각 희석별로 37°C에서 1시간, 4°C에서 12시간동안 cross-reaction 한 후 원심분리 (5000×g, 5분, 4°C)하여 그 상등액을 정제된 항체로 사용하였다(Fig. 21). 그 결과 500배 희석한 토종꿀 항체와 600 $\mu$ g의 양봉꿀 항원, 그리고 500배 희석한 양봉꿀 항체와 600 $\mu$ g의 토종꿀 항원을 각각 cross-reaction 한 경우가 선택성이 가장 높은 항체로 정제되었다(Fig. 22). 정제된 항체와 항원의 선택적 반응은 발색법 (ABTS)과 발광법 (ECL)으로 확인하였다. 발색법은 흡광도 (405nm) 측정 결과뿐만 아니라 Fig. 23-A에서 보는 바와 같이 육안으로도 정제된 항체가 각각의 항원에 대해 선택적으로 반응함을 알 수 있었다. 발광법도 Fig. 23-B에서 보는 바와 같이 정제된 항체가 각각의 항원에 대해 선택적으로 반응함을 알 수 있었다. 발색법이나 발광법으로 검출한 결과 두 방법이 같은 검출반응으로 나타나 두 가지 시약 중 어느 것을 사용하여도 면역반응을 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

즉, 본 연구에서 제작된 항체는 10배~50배 희석한 꿀의 항원을 발색법으로 검출하기에 충분하였으며 감출 감도를 극대화시키기 위한 별도의 노력을 하지 않아도 된다는 것을 말하여 주고 있다. 또한 발광법의 경우 신호 검출을 위한 별도의 특별한 시설이 필요하므로 실제적인 판별의 경우 보편적으로 사용되는 발색법이 더 효율적으로 접근할 수 있는 방법이라 생각된다. 본 판별법을 보다 과학적이고 합리적인 판별법으로 제시하기 위해서는 토종꿀과 양봉꿀의 특이 단백질의 아미노산 조성 또는 아미노기, 카복실기 말단의 서열등을 연구, 제시할 수 있겠지만 이러한 연구는 본 연구의 목표를 벗어남으로 더 이상 진행하지 않았다.

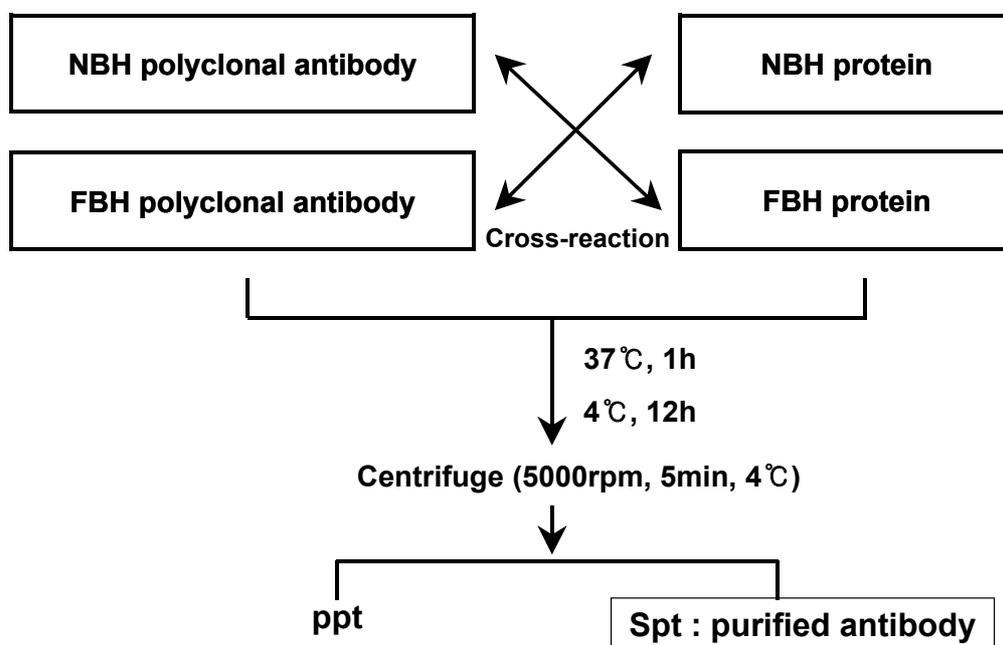


Figure 21. Purification of antibody.

NBH: native bee honey; FBH: foreign bee honey; Ab: antibody; Ag: antigen.

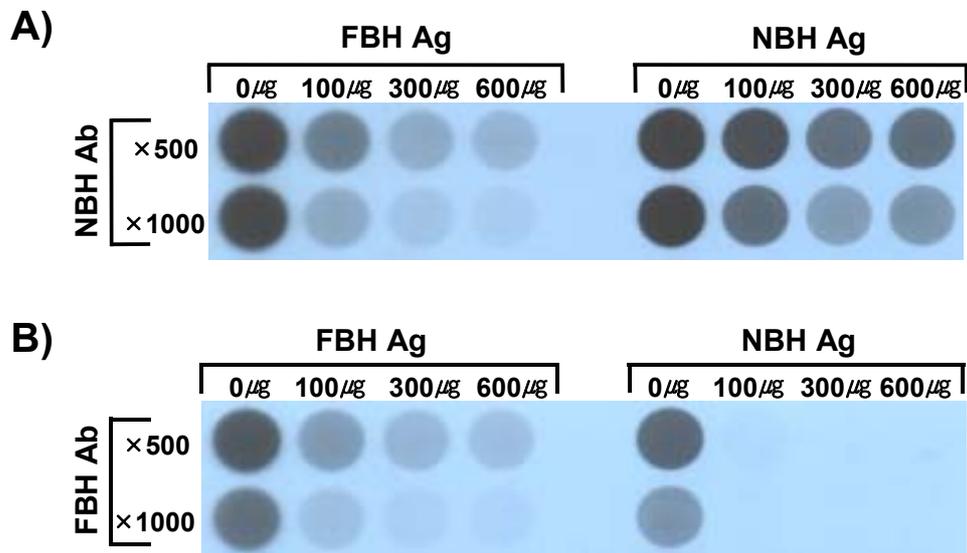


Figure 22. Optimal condition for purification of NBH Ab and FBH Ab.

A) Detection of NBH and FBH with purified NBH Ab at different concentration of honey protein and B) detection of NBH and FBH with purified FBH Ab at different concentration of honey protein.

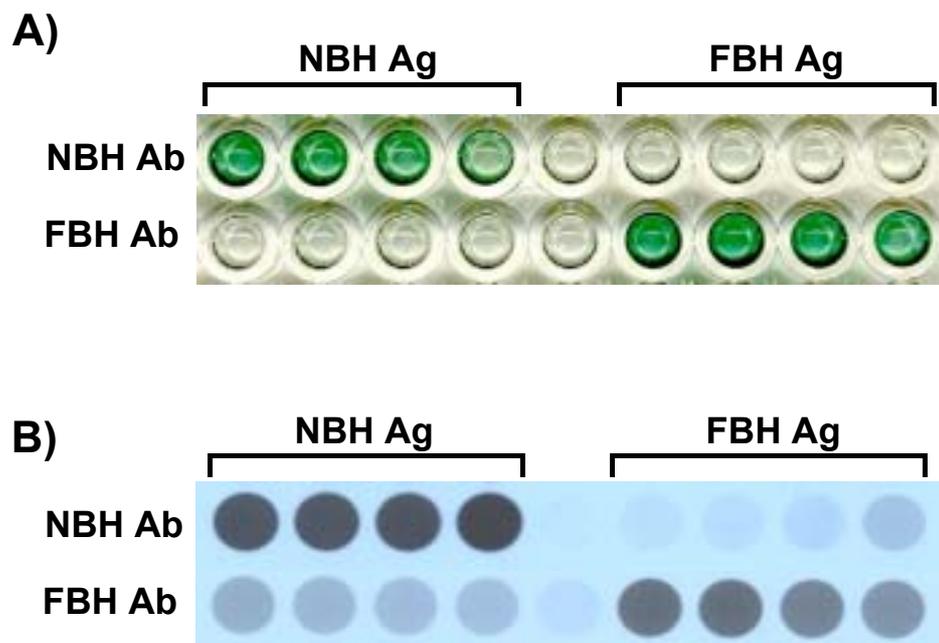


Figure 23. Antigen specificity of purified antibody.

A) colormetric method and B) luminometric method.

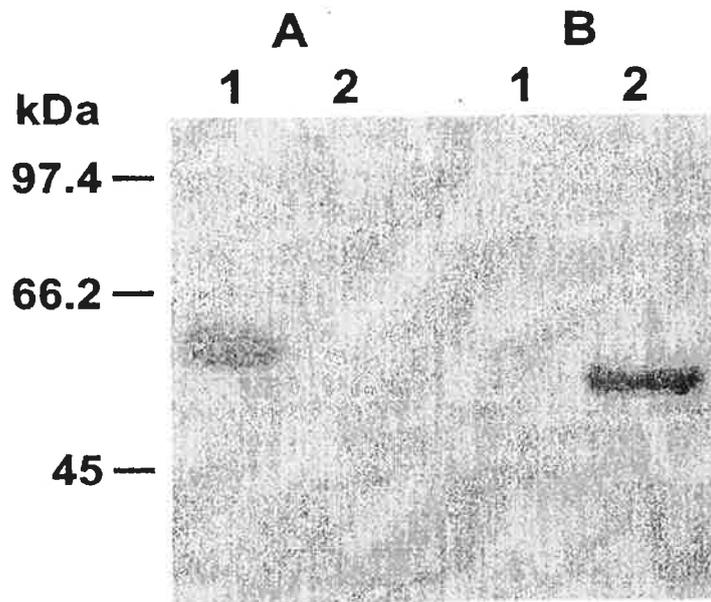
### 3) Western blot analysis

토종꿀 단백질과 양봉꿀 단백질을 SDS-PAGE와 western transfer시킨 후 정제된 항체로 western blot을 실시하였다. 그 결과 정제된 토종꿀 항체와 양봉꿀 항체가 각각의 항원에 대해 특이적으로 반응함을 알 수 있었다(Fig. 24). 따라서 특이적으로 정제된 항체를 이용하여 꿀 단백질과 반응시킴으로서 시판꿀의 진위여부를 판별할 수 있음을 알 수 있었다.

### 4) ELISA법을 통한 시판꿀의 판별

토종꿀 3종과 양봉꿀 2종을 원심분리 (10,000×g, 10분) 하여 화분을 제거하고 그 상등액을 증류수로 순차적으로 희석한 후 50 $\mu$ l씩 ELISA plate에 coating 시켰다. 1차 항체는 최적 조건에서 정제된 항체를 사용하였다. 발색법의 경우 Fig. 25-A에서 나타난 바와 같이 정제된 항체가 각각의 항원에 대하여 특이적으로 반응하므로 토종꿀과 양봉꿀의 진위여부를 육안으로 매우 쉽게 판별할 수 있었다. 발광법의 경우 x-ray film에 현상한 결과 발색법과 마찬가지로 정제된 항체가 각각의 항원에 대해 선택적으로 반응하여 토종꿀과 양봉꿀의 진위여부가 판별되었다(Fig. 25-B). 본 연구에서 생산된 항체를 이용하여 시판중인 꿀의 진위여부를 판별한 결과 발색법과 발광법 모두 농가에서 채밀한 토종꿀 D는 토종꿀로 시판중인 토종꿀 C와 E는 양봉꿀로 확인되었다. 토종꿀로 판매되고 있는 C와 E는 토종꿀에 양봉꿀을 혼합하여 판매하거나 혹은 토종벌 사육 시 양봉꿀을 먹임으로서 양봉꿀이 토종벌의 효소에 의해 토종꿀로 전환되기도 하지만 미처 전환되지 못한 양봉꿀이 검출된 것이라 생각할 수 있다.

본 실험에서 개발한 두 가지 판별법의 결과를 비교하여 연관성을 알아보았다. 그 결과 항체에 대한 반응에서 시판 중인 꿀 C와 E가 양봉꿀 양성으로 나타나 인공 마커 단백질을 이용한 분자량 판별에 의한 방법과 잘 일치함을 보여주고 있다(Fig. 26). 그러므로 두 판별법으로 진품 토종 및 양봉꿀의 진위판별에 병행하여 판별할 경우 보다 간편하고 신속, 정확한 판별법이 됨을 알 수 있다.



**Figure 24. Western bolt assay of polyclonal antibodies against protein of FBH and NBH.**

Protein of NBH(lane 1) and FBH(lane 2) were electrophoresed in a 7.5% polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose, and detected with the rat anti-protein of FBH polyclonal antibody(A), rat anti-protein of NBH polyclonal antibody(B).

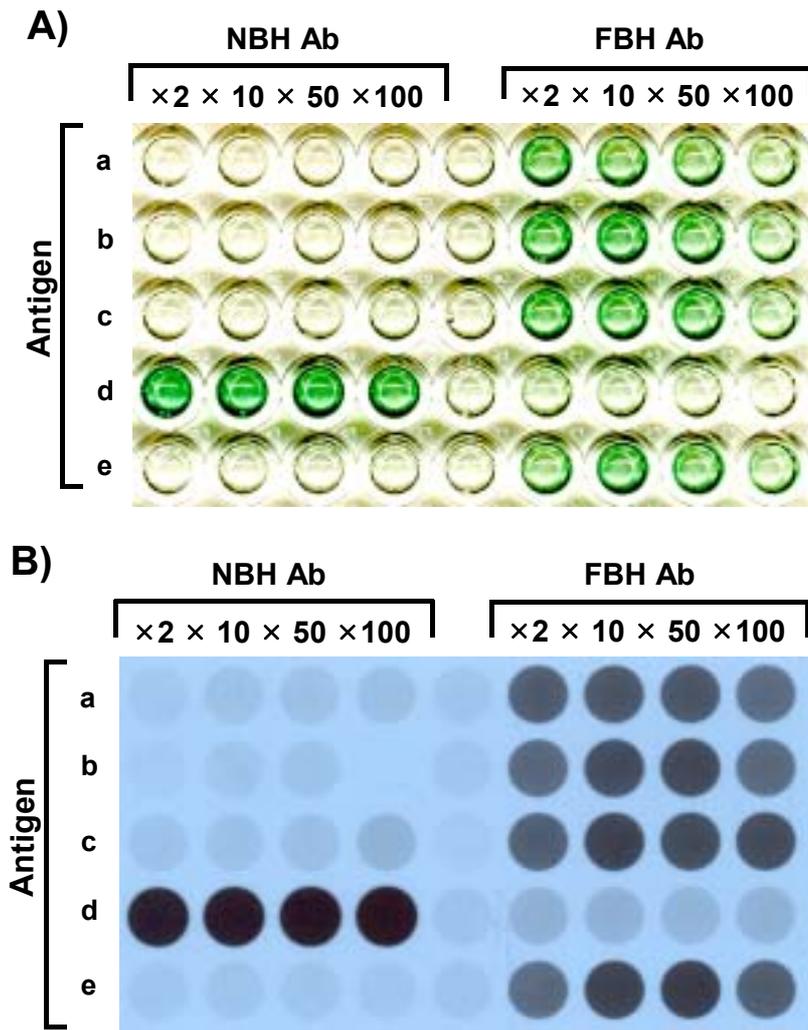


Figure 25. Immunological discrimination of commercial honey.

A) colormetric method and B) luminometric method;

Lanes a, b, commercial foreign bee honey; c, commercial native bee honey; d, native bee honey collected in Hongcheon and e, commercial naive honey.

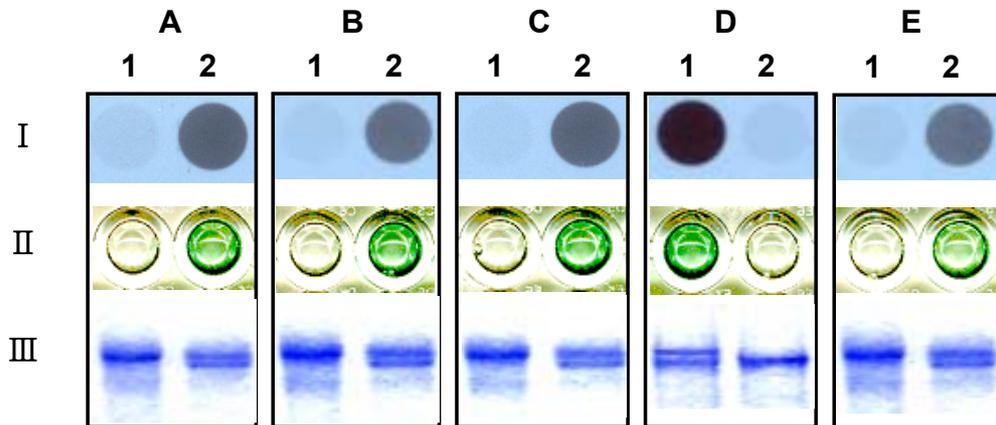


Figure 26. Discrimination of native bee honey by molecular biological methods.

I, Luminometric method; II, colormetric method; III, SDS-PAGE. A and B, commercial foreign bee honey; C, commercial native bee honey; D, native bee honey collected in hongcheon area and E, commercial naive bee honey.

Lanes I,II-1, detected with native bee honey antibody; I,II-2, detected with foreign bee honey antibody; III-1, co-electrophoresis with artificial marker protein for foreign bee honey and III-2 co-electrophoresis with artificial marker protein for native bee honey.

## 5) 두 가지 판별법을 이용한 꿀의 혼합여부 판별

다수의 토종꿀을 전기영동 한 결과 토종꿀 단백질만이 검출되어서 토종꿀로 판단되었던 꿀을 항체를 이용한 판별법으로 판별한 결과 토종꿀 단백질과 양봉꿀 단백질이 모두 검출되었다. 이러한 현상이 토종꿀에 양봉꿀이 혼합된 것인지, 벌중에 따라 면역학적 반응이 다른지 알아보려고 하였다.

토종꿀 단백질 500 $\mu$ g과 양봉꿀 단백질 500 $\mu$ g을 100:0, 80:20, 50:50, 20:80 그리고 0:100으로 인위적으로 혼합한 뒤 인공 마커 단백질과 co-electrophoresis 하였다. 그 결과 토종꿀과 양봉꿀의 50:50으로 혼합하였을 경우 두 가지 꿀 단백질의 band가 모두 나타났음을 확인 할 수 있었다(Fig. 27). 그러나 band가 겹쳐져서 두 단백질의 크기의 차이를 명확하게 구별하는 것에는 다소 어려움이 따랐다. 또한 80:20이나 20:80으로 혼합하였을 경우 두 꿀 단백질 중 과량의 꿀 단백질 band만이 선명하게 나타나므로 만약 소량의 토종꿀이나 양봉꿀의 혼합되었을 경우에는 명확한 진위 판별에는 많은 어려움이 따를 것이라 생각된다.

위에서 사용된 혼합된 꿀들을 항체를 이용한 판별법으로 혼합여부를 판별해보았다. 그 결과 토종꿀과 양봉꿀 단백질을 100:0으로 혼합한 경우에는 토종꿀 항체를 반응시킨 well에서만 발색이 일어났고 80:20으로 혼합한 경우에는 토종꿀 항체를 반응시킨 well 뿐만 아니라 양봉꿀 항체를 반응시킨 well 에서도 발색이 나타났다. 또한 50:50으로 혼합한 경우에는 두 항체의 반응에 의한 발색의 정도가 동일하였다. 80:20으로 혼합된 꿀의 경우 토종꿀 항체를 반응시킨 well이 양봉꿀 항체를 반응시킨 well보다 다소 강한 발색을 나타냈지만 100:0으로 혼합한 꿀의 결과와 비교하였을 경우 꿀의 혼합여부가 명확하게 판별되었다. 이러한 결과는 양봉꿀의 경우도 마찬가지임을 알 수 있었다(Fig. 28).

위의 실험은 토종꿀과 양봉꿀의 단백질량을 계산하여 일정한 비율로 혼합한 것이다. 그러나 실질적으로 판매자가 토종꿀에 양봉꿀을 혼합 할 경우 꿀 단백질 양을 일정하게 맞추어서 혼합하지는 않을 것이라 생각된다. 따라서 토종꿀과 양봉꿀을 꿀 무게만을 측정하여 혼합한 뒤 꿀의 혼합여부를 판별해 보았다. 그 결과 SDS-PAGE를 이용한 판별법의 경우 Fig. 27와 동일하였고 항체를 이용한 판별법 또한 위 실험의 결과와 유사한 결과가 나타났다(Fig. 29).

토종꿀을 SDS-PAGE를 이용한 판별법으로 판별할 경우 만약 양봉단백질이 검

출 되었고 항체를 이용한 판별법에서도 양봉항체에 반응한다면 이 꿀은 양봉꿀이라고 생각 할 수 있다. 그러나 SDS-PAGE를 이용한 판별법에서 토종단백질이 검출되었고 항체를 이용한 판별법에서는 양봉항체에 반응한다면 이것은 소량의 양봉꿀을 혼합한 꿀이거나 토종벌에게 양봉꿀을 급여하므로서 생산된 꿀이라고 생각 할 수 있다.

결과적으로 SDS-PAGE를 이용한 판별법의 경우는 소량의 꿀의 혼합여부까지 판별하기에는 다소 어려움이 따랐지만, 항체를 이용한 판별법의 경우 소량의 꿀의 혼합여부를 명확하게 판별 할 수 있었다. 따라서 두 판별법을 병행할 경우 기존에 보고되어진 판별법들보다 더 명확하고 신속한 판별법이 될 수 있으므로 그 실용성 또한 매우 높아질 것이라 기대된다.

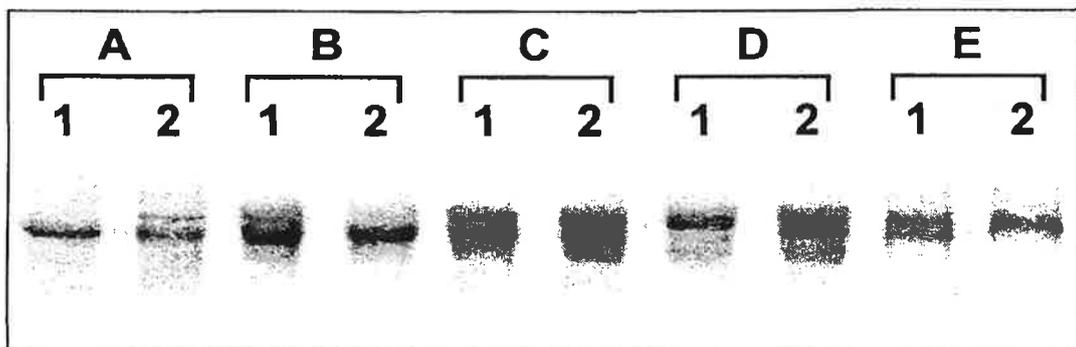


Figure 27. Discrimination of artificially mixed honey by SDS-PAGE.

Protein of NBH and FBH were mixed with 100 to 0(1), 80 to 20(2), 50 to 50(3), 20 to 80(4) and 0 to 100(5). Each protein were co-electrophoresis with artificial marker protein of NBH(A) and FBH(B).

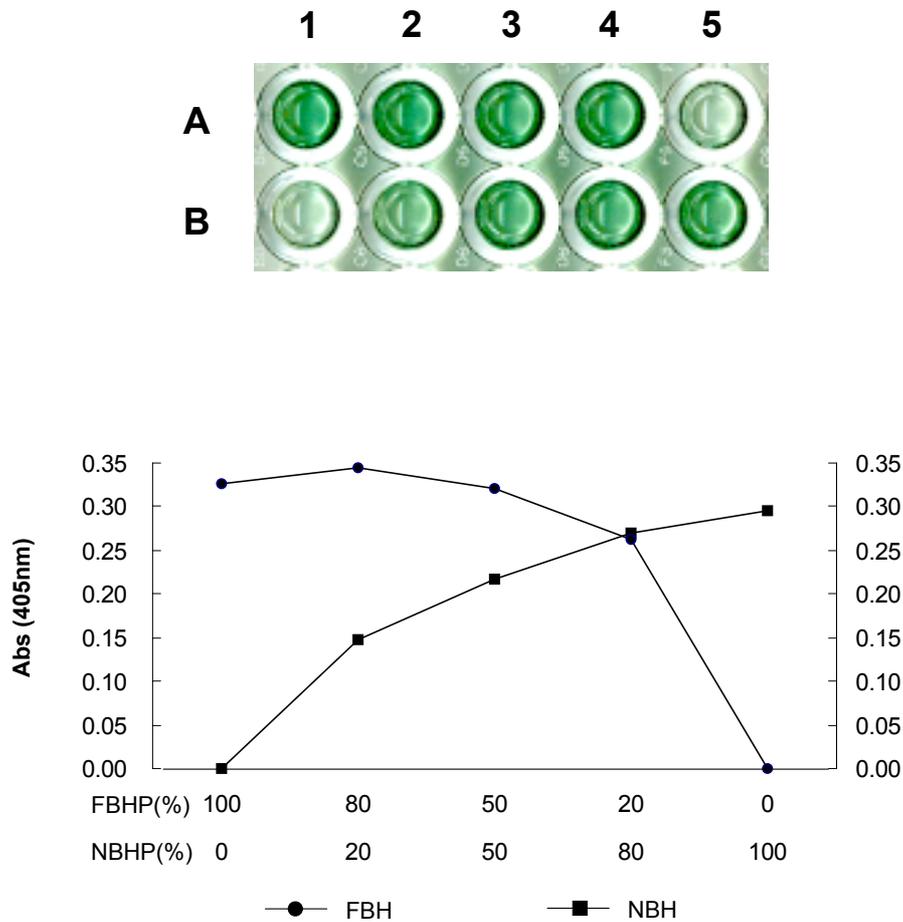


Figure 28. Absorbance of artificially mixed honey protein by colorimetric method.

NBH and FBH that have same amount of protein were mixed with 100 to 0 (1), 80 to 20 (2), 50 to 50 (3), 20 to 80(4) and 0 to 100(5). Each protein were detected with FBH Ab(A) and NBH Ab(B) and reactants were monitored by absorbance at 405nm. NBHP: protein of native bee honey; FBHP: protein of foreign bee honey.

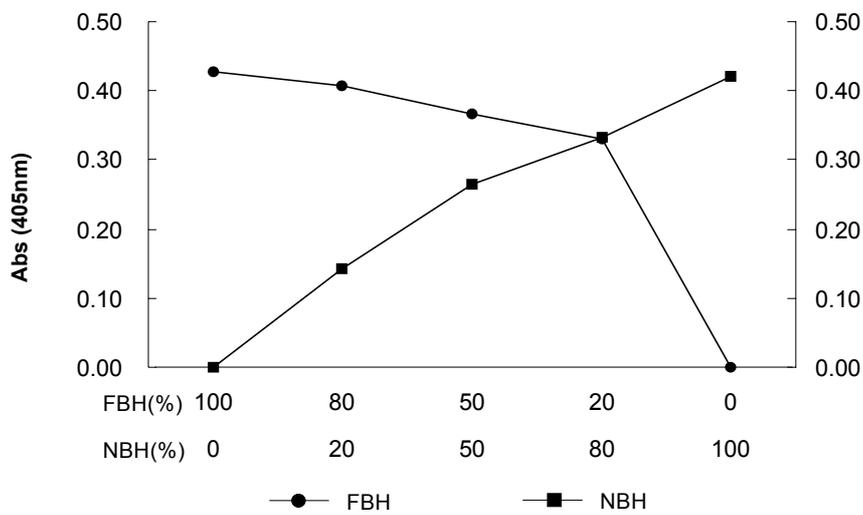
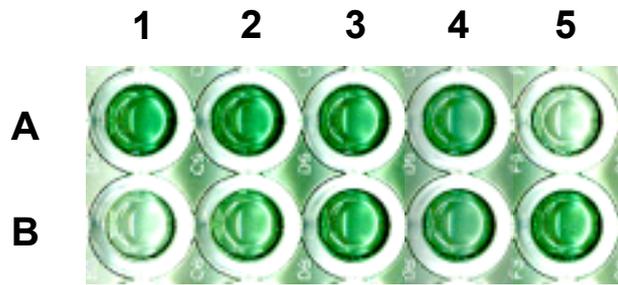


Figure 29. Absorbance of artificially mixed honey protein by colormetric method.

NBH and FBH that have same quantity were mixed with 100 to 0(1), 80 to 20(2), 50 to 50(3), 20 to 80(4) and 0 to 100(5). Each protein were detected with FBH Ab(A) and NBH Ab(B) and reactants were monitored by absorbance at 405nm.

#### 다. 두 가지 판별법을 이용한 실증

꿀벌과에 속하는 곤충의 종류는 무려 2,000여종 정도 되지만 한국에서 사육되는 양봉의 경우 벌의 품종이 *Apis mellifera Linne*으로 제한되어 있으므로 종 다양성에 의한 항원-항체 반응의 차이는 없을 것으로 판단이 된다. 그러나 토종봉의 경우 품종화가 되어 있지 않은 야생봉을 사용하므로 항원-항체 반응의 차이가 나타날 가능성이 있으므로 농가에서 직접 채밀한 토종꿀과 판매중인 토종꿀 32종, 그리고 국내 양봉꿀 6종과 수입꿀 8종에 대하여(Table. 2) 두 가지 판별법으로 판별하였다. 그 결과 농가에서 채밀한 토종꿀은 모두 gel 상에서 토종꿀 특이 단백질이 검출되었고 토종항체에 대해서만 특이성을 나타내었다(Fig. 30, 31). 이러한 결과로 미루어 볼 때 한국 내에서 사육하는 토종봉은 같은 면역학적 특성을 가지고 있다고 생각할 수 있다. SDS-PAGE를 이용한 판별법의 결과에 따르면 7종의 시판 토종꿀 (7, 8, 15, 20, 22, 23, 31번꿀)은 토종꿀 특이 단백질은 검출되지 않고 양봉꿀 특이 단백질만 검출되었다(Fig. 30). 또한 이 7종의 시판 토종꿀을 항체를 이용한 판별법으로 판별한 결과 1종 (7번꿀)은 토종항체에 전혀 반응하지 않는 것으로 보아 이 꿀은 양봉꿀이 토종꿀로 판매되고 있는 것이라 생각된다(Fig. 31). 또한 나머지 시판꿀로 판매중인 토종꿀 6종 (8, 15, 20, 22, 23, 31번꿀)은 양봉꿀에 토종꿀을 과량 혼합하였거나, 기타 첨가제를 혼합하여 제조한 가짜 토종꿀이라고 생각되어 진다. 그 외에 10종의 토종꿀 (19, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32번꿀)은 gel상에서는 토종꿀 단백질만이 검출되었으나(Fig. 30) 토종꿀 항체와 양봉꿀 항체에 모두 반응하는 것으로 보아 양봉꿀을 소량 혼합한 토종꿀이라고 생각되어 진다(Fig. 31). 6종의 국내 양봉꿀은 두 가지 판별법에서 모두 양봉꿀로 판별되었으며 8종의 외국산꿀도 모두 양봉꿀로 판별되었다(Table. 4).

따라서 본 연구에서 제시한 방법은 채밀에 관여한 주체가 토봉인가 양봉인가를 판단해 줄 수 있는 효과적인 방법임을 확인하였다. 또한 항체를 이용한 판별법의 경우 기존의 판별법 보다 단시간에 다량의 시료를 신속, 정확하게 판별할 수 있었다.

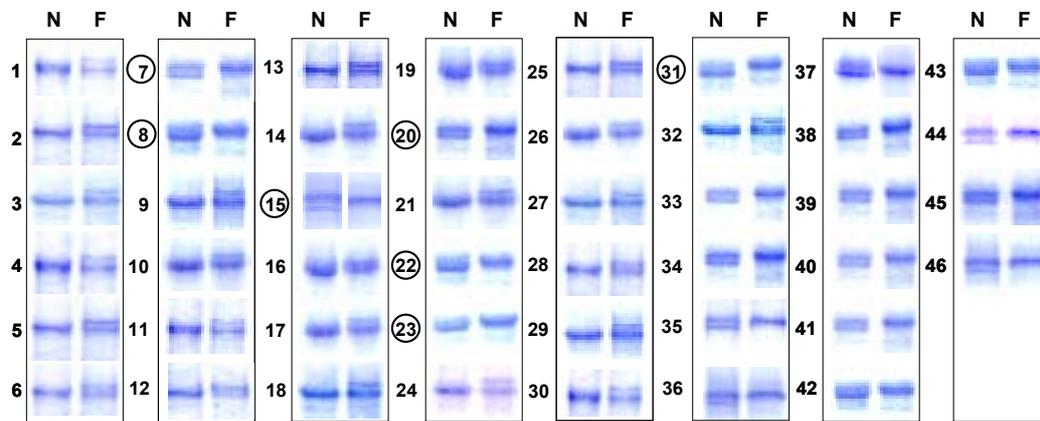


Figure 30. Discrimination of native bee honey and foreign bee honey by SDS-PAGE.

Thirty two commercial NBHs and 14 FBHs were discriminated by artificial marker protein. Lanes N, co-electrophoresis with artificial marker protein for NBH and F, co-electrophoresis with artificial marker protein for FBH. Fake and adulterated NBHs was displayed with circle.

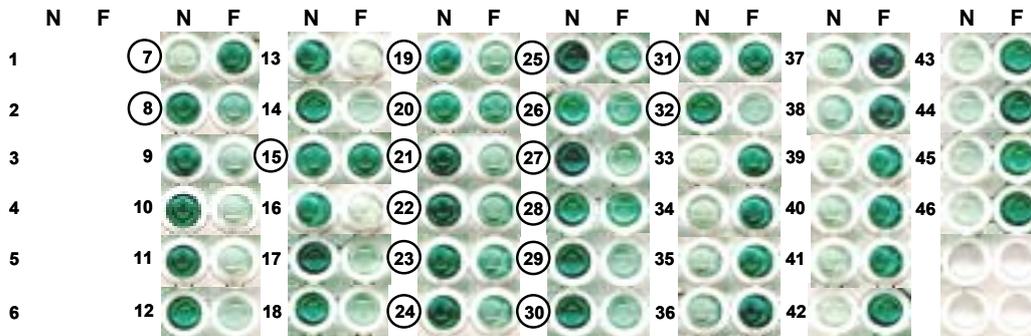


Figure 31. Discrimination of native bee honey and foreign bee honey by ELISA.

Thirty two commercial NBHs and 14 FBHs were discriminated by colormetric method. Lanes N, detected honey with NBH Ab and F, detected honey with FBH Ab. Fake and adulterated NBHs was displayed with circle.

Table 4. Discrimination results of collected bee honey by SDS-PAGE and ELISA.

시료 번호	판별 전	판별 후	시료 번호	판별 전	판별 후
1	토종	토종	24	토종	혼합꿀 (토>양)
2	토종	토종	25	토종	혼합꿀 (토>양)
3	토종	토종	26	토종	혼합꿀 (토>양)
4	토종	토종	27	토종	혼합꿀 (토>양)
5	토종	토종	28	토종	혼합꿀 (토>양)
6	토종	토종	29	토종	혼합꿀 (토>양)
7	토종	양봉	30	토종	혼합꿀 (토>양)
8	토종	혼합꿀 (토<양)	31	토종	혼합꿀 (토<양)
9	토종	토종	32	토종	혼합꿀 (토>양)
10	토종	양봉	33	양봉	양봉
11	토종	토종	34	양봉	양봉
12	토종	토종	35	양봉	양봉
13	토종	토종	36	양봉	양봉
14	토종	토종	37	양봉	양봉
15	토종	혼합꿀 (토<양)	38	양봉	양봉
16	토종	토종	39	양봉	양봉
17	토종	토종	40	양봉	양봉
18	토종	토종	41	양봉	양봉
19	토종	혼합꿀 (토>양)	42	양봉	양봉
20	토종	혼합꿀 (토<양)	43	양봉	양봉
21	토종	혼합꿀 (토>양)	44	양봉	양봉
22	토종	혼합꿀 (토<양)	45	양봉	양봉
23	토종	혼합꿀 (토<양)	46	양봉	양봉

#### 4. 결 론

본 연구에서 개발된 인공 마커 단백질을 판별법에 적용함으로써 기존의 SDS-PAGE를 이용해서 꿀을 판별할 경우 품질이 입증된 토종꿀과 양봉꿀을 하나하나 co-electrophoresis를 하여야 하는 번거로움이 없으므로 효율적인 판별이 가능하다고 할 수 있다. 또한 마커 단백질로서 정제한 토종꿀 특이 단백질을 사용할 경우 요구되어지는 비싼 정제 비용의 문제를 해소할 수 있다.

본 연구자등에 의하여 기존에 보고되어진 SDS-PAGE를 이용한 판별법은 꿀을 판별할 경우 품질이 입증된 토종꿀과 양봉꿀을 하나하나 co-electrophoresis를 하여야 하는 번거로움이 따른다. 또한 마커 단백질로서 정제한 토종꿀 특이 단백질을 사용할 경우 비싼 정제 비용이 요구되어 진다. 따라서 이러한 문제점을 보완하기 위하여 토종꿀과 양봉꿀 주요단백질의 크기와 같은 56kDa, 59kDa의 인공 마커 단백질을 제작하였다. 제작된 인공 마커 단백질을 꿀과 함께 co-electrophoresis한 결과 토종꿀과 양봉꿀의 진위판별이 기존의 판별법보다 훨씬 용이하였다.

토종꿀과 양봉꿀 주요 단백질의 크기가 다르다는 것은 단백질의 형태또한 다를 수 있다는 것을 의미함으로 이에 착안하여 토종꿀과 양봉꿀 주요 단백질에 특이적으로 반응하는 항체를 생산함으로써 보다 민감도가 높은 판별법을 개발하고자 하였다. 토종꿀과 양봉꿀의 주요 단백질을 분리, 정제하고 이를 쥐에 면역시켜 정제된 꿀 주요 단백질에 특이적으로 반응하는 항체를 생산하였다. 생산된 항체를 이용하여 실증 해 보았다. 그 결과는 SDS-PAGE를 이용한 판별법을 통하여 실증한 결과와 유의성 있게 나타났다. 그러나 SDS-PAGE를 이용한 판별법에서 토종꿀로 판별된 꿀이 항체를 이용한 판별법에서는 양봉항체에도 반응하는 경우가 나타났다. 이러한 결과를 해석하기 위하여 동일한 양의 토종꿀과 양봉꿀을 일정한 비율로 섞은 뒤 두 판별법으로 판별해 보았다. 그 결과 SDS-PAGE법에서는 소량의 양봉꿀과 다량의 토종꿀을 혼합했을 경우 양봉꿀 단백질은 검출되지 않고 토종꿀 단백질만이 검출되어 토종꿀로 판별되었다. 이와 마찬가지로 소량의 토종꿀과 다량의 양봉꿀을 혼합했을 경우 양봉꿀 단백질만이 검출되어 양봉꿀로 판별되었다. 동일한 조건으로 항체를 이용하여 판별을 해 보았다. 그 결과 소량의 양봉꿀이 혼합되어 있거나 소량의 토종꿀이 혼합되어 있는 경우 모두 그 혼합여부가 판별 되어 꿀 단백질의 크기만으로 판별하는 판별법 보다 민감함을 알 수 있었다.

이것은 항체를 이용한 판별법이 SDS-PAGE를 이용한 판별법보다 검출 가능한 단백질의 양이 극히 미량이기 때문에 토종꿀의 단백질 함량은  $1.5\pm 0.6$  mg/g인데 비해 양봉꿀의 단백질 함량은  $0.6\pm 0.3$  mg/g이므로 소량의 양봉꿀이 혼합되었을 경우에는 검출되지 못한 것이라 생각된다. 다. 토종꿀에서 소량의 양봉꿀이 검출되는 이유는 토종꿀에 양봉꿀을 섞어서 판매하거나 혹은 토종벌 사육 시 양봉꿀을 먹임으로서 양봉꿀이 토종벌의 효소에 의해 토종꿀로 전환되기도 하지만 미처 전환되지 못한 양봉꿀이 검출되기 때문이라고 생각되어진다.

결론적으로 SDS-PAGE를 이용한 판별법은 토종꿀과 양봉꿀의 진위판별이 가능하지만 만약 소량의 양봉꿀이 혼합되어 있을 경우 그 판별이 명확하지 못하다는 문제가 따른다. 따라서 이러한 문제는 SDS-PAGE를 이용한 판별법과 유의성이 있는 항체를 이용한 판별법을 상호보완적으로 이용함으로써 보다 혼합여부까지 파악할 수 있는 민감하고 신속한 판별이 가능할 것이라 생각된다.

본 연구에서 개발된 두 가지 판별법은 벌꿀 기원의 효소학적 차이에 의한 판별로서 설당혼합이나, 설당급여 여부 판별은 가능하지 않다. 따라서 보완적으로 PRISM II를 이용하면 설당급여 꿀을 판별할 수 있으므로 정밀성, 정확성 및 재현성과 신뢰도가 높은 꿀의 종합적 품질평가 기술로 완성될 것이라 판단된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구는 분자생물학적 방법을 이용하여 토종꿀의 판별법을 개발함으로써 현재까지 알려진 분석법의 문제점을 악용하여 출현되어지는 가짜 토종꿀을 명확하게 판별함으로써 토종꿀을 채밀하는 농가소득 증진에 이바지하고자 하였다.

본 연구자들은 강원도 일원에서 생산된 30종의 토종꿀과 국내외에서 생산된 양봉꿀 8종에 대하여 분석을 실시하여 토종꿀의 효과적인 판정방법을 개발하여 제시한 바 있다. 본 방법은 꿀벌 소화액 기원의 효소류의 차이에 의한 꿀 단백질의 분자량이 다름을 이용하여 토종꿀과 양봉꿀 각각의 특이적인 단백질을 SDS-PAGE로 분석하는 것을 기본적인 골격으로 하고 있다. 그러나 SDS-PAGE를 이용해서 꿀을 판별할 경우 품질이 입증된 꿀과 co-electrophoresis를 해야 하는 번거로움이 뒤 따른다. 또는 토종꿀과 양봉꿀로부터 특이 단백질을 정제하여 꿀 마커 단백질로 사용할 경우 정제과정이 번거로울 뿐만 아니라 꿀에는 g 당 2 mg 이내의 소량의 단백질이 존재하므로 대량의 마커 단백질을 얻기 위해서는 비싼 정제 비용이 추가로 요구된다. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제를 해결하기 위하여 토종꿀과 양봉꿀의 주요 단백질의 분자량과 같은 인공 마커 단백질을 제작하여 생산하고 이를 이용하여 토종꿀의 판별방법의 개선을 시도하였다. 발현, 정제된 토종꿀과 양봉꿀의 인공 마커 단백질을 이용하여 꿀의 진위판별을 시도한 결과 시료의 단백질 band와 인공 마커 단백질의 band가 명확하게 구별됨으로써 gel상에서 두 lane에 나타나는 3000Da 정도의 근소한 단백질 band 차이를 하나의 lane에서 명확하게 구별 할 수 있었다.

또한 두 꿀 단백질의 크기가 다르다는 것은 단백질의 형태 또한 다를 수 있다는 점에 착안하여 서로 다른 형태의 단백질을 인식하는 항체를 생산, 이용함으로써 꿀의 진위판별을 하고자 하였다. 꿀의 주요 단백질을 정제한 후 쥐를 이용하여 항체를 생산하였고 정제된 항체를 이용하여 ELISA법을 통해 꿀의 진위여부를 판별한 결과 꿀의 진위판별이 정확하게 이루어졌다. SDS-PAGE를 이용한 판별 시 소량의 양봉꿀이 혼합된 경우 단백질 검출이 다소 어렵다. 그러나 민감도가 높은 항체를 이용함으로써 혼합여부까지 판별이 가능하였다. 따라서 두 판별법을 상호보완적으로 이용한다면 꿀의 진위판별뿐만 아니라 혼합여부까지 판별을 할 수 있을 것이라 기대된다. 또한 항체를 이용한 판별법은 기존에 알려진 판별법보다 같은 시간 내에 다량의 시료를 판별할 수 있을 뿐만 아니라 이를 판별 kit로 제작하여 이용할 경우 일반 채

밀 농가의 농민 및 소비자들이 손쉽게 꿀을 판별 할 수 있으므로 실용성이 매우 높을 것이라 기대된다.

결과적으로 본 연구에서 개발된 두 판별법을 통하여 진품 토종 및 양봉꿀의 신속 판별법을 정립함으로써 토종꿀을 채밀하는 농가의 소득 증진뿐만 아니라 소비자들의 토종꿀 수요 확대에도 이바지 하므로써 꿀 시장 형성에 중요한 지표가 될 것이라 기대된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서 개발된 두 가지 판별법은 토종꿀과 양봉꿀의 분별이 신속, 정확하게 이루어지므로 토종꿀의 진위에 대한 의구심을 해소시킬 수 있다. 뿐만 아니라 개발된 판별기술은 식품공전에 반영하여 자체적인 품질 관리 기준으로 활용할 수 있을 것이다. 그리고 새로운 품질 관리 기준을 통하여 불신 식품종의 하나로 알려진 벌꿀로부터 소비자와 벌꿀 생산 농가를 보호할 수 있는 엄격한 품질 규격화를 유도하여야 할 것이다.

또한 항체를 이용한 판별법의 경우 기존에 알려진 판별법 보다 같은 시간 내에 다량의 시료를 판별할 수 있을 뿐만 혼합여부 또한 명확하게 판별할 수 있으므로 이를 kit로 제작하여 이용할 경우 일반 채밀 농가의 농민 및 소비자들이 손쉽게 꿀을 판별할 수 있으므로 그 실용성이 매우 높을 것이라 기대된다. 이러한 두 판별법을 통한 품질 규격화를 이용하여 각 지역 토종꿀의 브랜드화를 촉진시켜 소비자와 농민의 신뢰도 회복에 기여할 뿐만 아니라 더 나아가 사회적으로 문제가 되고 있는 농축산물에 대한 신뢰도의 회복을 가능하게 할 것이다.

## 제 6 장   참 고 문 헌

1. Kushnir, I. (1979) Sugars and sugar products : sensitive thin layer chromatographic detection of high fructose corn syrup and other adulterants in honey. *J. Assoc. Anal. Chem.* 62, 917-920.
2. White, J. W. Jr. (1980) Detection of honey adulteration by carbohydrate analysis. *J. Assoc. Chem.* 63, 11-18.
3. Yoon, J.H., Bae, S.Y., Kim, K. and Lee, D.S. (1997) Chemometric aspects and determination of sugar composition of honey by HPLC. *Analytical Science and Technology.* 10, 362-369.
4. Kim, E.S. and Rhee, C.O. (1995) Analysis and quantitation of di- and trisaccharides in native-bee honeys using capillary gas chromatography. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27, 605-611.
5. Kim, J.K. (1987) Variations and changes in chemical compositions, value of diastase numbers and amount of HMF in the Korean honey sources. *Korean J. Apiculture.* 2(2), 59-66.
6. Kim, E.S. and Rhee, C.O. (1996) Comparison of quality attributes of Koreannative-bee honey and foreign-bee honey by K/Na ratio. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25(4), 672-679.
7. Shallenberger, R.S., Guild, W.E. and Morse, R.A. (1975) Detecting honey blended with sugar syrups. *New York's food and Life Science.* 88(3), 8-10.
8. Kim, B.N., Kim, T.J. and Cheigh, H.S. (1994) Minerals, HMF and vitamins of honey harvested in Kangwon area. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23(4), 675-679.
9. Hawer, W.D., Ha, J.H. and Nam, Y.J. (1992) The quality assessment of honey by stable carbon isotope analysis. *Analytical Science and Technology.* 5. 229-234.
10. White, J. W. Jr., Riethof, M.L. and Kushnir, I. (1960) Composition of honey. VI. The effect of storage on carbohydrates acidity and diastase content. *J. Food Sci.* 26, 63-71.
11. Hase, S., Aid, Y., Kawamura, U. and Sat. M. (1978) *Shokuhin Sogo*

*Kenkyusho Kenkyu Hokoku.* 33, 89.

12. Maeda, S., Mukai, A., Kosuki, N. and Okada, Y. (1962) The flavor components of honey, *Japanese J. Food Sci. Technol.* 9, 270-283.
13. White, J. W. Jr. and Hoban, N. (1959) Composition of honey. IV. Identification of the disaccharides. *Arch. Biochem Biophys.* 80, 386-394.
14. 이서래, 신호선, (1977) 최신 식품화학, 신광출판사, p.130
15. Singh, B. Dean, G.R. and Cantor, S.M. (1948) The role of 5-(hydroxymethyl)-furfural in the discoloration of sugar solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 70, 517,
16. White, J. W. Jr., Kushmir, I. and Subers, M.H. (1964) Effect of storage and processing temperatures on honey quality. *Food Technol.* 18(4), 153-156
17. Winkler, O. (1955) Beitrag zum Nachweis und zur Bestimmung von Oxymethylfurfurol in Honig und Kunsthonig, *Z. Unters. Lebensmittel.* 102(3), 161-169.
18. Lampitt, L.H., Hughes, E.B. and Rooke, H.S. (1929) Furfural and diastase in heated honey *Anlyst.* 54, 381-395
19. Schade, J.W., Marsh, G.L. and Eckert, J.E. (1958) Diastase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their usefulness in detecting heat alteration. *Fd. Res.* 23, 446-463.
20. Han, J.G., Kim, K., Kim, K.Y. and Lee, S.K. (1985) Composition the changes of diastase activity and hydroxymethylfurfural content during storage of the various honey samples. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 17(3), 155-162.
21. Maga, J.A. (1983) Honey flavor. *Lebensm. Wiss u Technol.* 16, 65-68.
22. Shallenberger, R.S., Guild, W.E. and Morse, R.A. (1975) Detecting honey blended with sugar syrups. *New York's food and Life Science.* 88(3), 8-10
23. Kim, E.S. and Rhee. C.O. (1996) Comparison of quality attributes of korean native bee honey and foreign bee honey by K/Na ratio. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25(4), 672-679.
24. White, J.W.Jr. (1977) Sodium potassium ratio in honey and in high fructose corn syrup. *Bee World.* 58, 31-35.

25. Tong, S.S.C., Morse, R.A., Bache, C.A. and Lisk, D.J. (1975) Elemental analysis of honey as an indicator of pollution. *Arch. Environ. Health.* 30, 329-332.
26. Stinson, E.E, Subers, M.H., Petty, J. and Whiter, J.W. (1960) The composition of honey. V Separation and identification of the organic acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 89, 6-12.
27. Lee, D.C., Lee, S.Y., Cha, S.H., Choi, Y.S. and Rhee, H.I. (1998) Discrimination of native bee-honey and foreign bee-honey by SDS-PAGE. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30, 1-5.
28. Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
29. Zhang, Hisaeda, Sakai, Ishikawa, Hao, Nakano, Ito and Himeno. (1999) Macrophages expressing heat-shock protein 65 play an essential role in protection of mice infected with Plasmodium yoelii. *Immunology.* 97, 611-615.
30. Kaelin, W.G. Jr., Krek, W., Sellers, W.R., DeCaprio, J.A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C.S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P.J., Blonar, M.A., Livingston, D.M. and Flemington, E.K. (1992) Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma binding protein with E3F-like properties. *Cell.* 70, 351-364.
31. Mannervik, B. (1985) The isozymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol. Reiat. Areas Mol. Biol.* 57, 357-417.
32. Melcher, K. (2000) A modular set of prokaryotic and eukaryotic expression vectors. *Analytical Biochemistry.* 277, 109-120.
33. Laemmli, M.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
34. Poo, H.R., Song, J.J., Hong, S.P., Choi, Y.H., Yun, S.W., Kim, J.H., Lee, S.C., Lee, S.G. and Sung, M.H. (2002) Novel high-level constitutive expression system, pHCE vector, for a convenient and cost-effective soluble production of human tumor necrosis ractor- $\alpha$ . *Biotechnology letters.* 24, 1185-1189.
35. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of

- proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc Natn Acad Sci USA*. 76(9), 4350-4354.
36. Henikoff, S (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA Sequencing. *Gene*. 28, 351-359.
  37. Putney, S.D., Benkovic, S.J. and Schimmel, P.R. (1981) A DNA fragment with an  $\alpha$ -phosphorothioate nucleotide at one end is asymmetrically blocked from digestion by exonuclease III and can be replicated in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78, 7350.
  38. Barnes, W.M., Bevan, M. and Son, P.H. (1983) Kilo-sequencing : creation of an ordered nest of asymmetric deletions across a large target sequence carried on phage M13. *Meth. Enzymol*. 101, 98-122.
  39. Cho, T.H., Suh, C.W. and Lee, E.K. (2001) In vitro refolding of inclusion body proteins directly from *E. coli* cell homogenate in expanded bed adsorption chromatography. *Korean J. Biotechnol. Bioeng*. 16(2), 146-152.
  40. Wang, J., Chen, W., Lu, J. and Lu, S. (2003) Overexpression and purification of recombinant atrial natriuretic peptide using hybrid fusion protein REF-ANP in *Escherichia coli*. protein *Expression and Purification*. 28, 49-56.