

## 단백질 전기영동을 이용한 토종꿀의 판별

이득찬 · 이상영 · 차상훈 · 최용순 · 이해익  
강원대학교 식품생명공학부

### Discrimination of Native Bee-Honey and Foreign Bee-Honey by SDS-PAGE

Deug-Chan Lee, Sang-Young Lee, Sang-Hoon Cha, Yong-Soon Choi and Hae-Ik Rhee  
Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University

#### Abstract

To find out the difference between native bee-honey (NBH) and foreign bee-honey (FBH), quantification of honey protein and investigation of specific protein in NBH were carried out by SDS-PAGE. Contents of honey protein in NBH and FBH were measured by Bradford and Lowry method. The contents of protein determined by Bradford method were 0.1~3.3 mg/g in NBH and 0.2~1.6 mg/g in FBH, and by Lowry method were 12.9~45.7 mg/g in NBH and 15.8~27.1 mg/g in FBH. In order to investigate the distribution of bee-honey proteins, the SDS-PAGE was performed. The results showed that molecular weight of the major proteins in NBH and in FBH were 56 kDa and 59 kDa, respectively. Therefore, it was confirmed that the difference between NBH and FBH can be identified visually by SDS-PAGE analysis. The major proteins in NBH and FBH were purified through two step chromatography, and the obtained proteins were used as marker protein in SDS-PAGE to discriminate NBH and FBH.

Key words: honey, protein, SDS-PAGE

## 서 론

전보<sup>(1)</sup>에서는 토종꿀과 양봉꿀의 판별을 위한 기초적인 자료를 제시하고자 수분, 당조성, pH, HMF함량, 화분수 분포 등을 분석하였다. 그러나 꿀의 이화학적 조성의 분석만으로는 토종꿀과 양봉꿀의 판별에 한계가 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 전보에서 수집한 강원도 일원에서 생산된 30종의 토종꿀과 1종의 시판 토종꿀, 3종의 양봉꿀, 5종의 외국산 꿀을 이용하여 토종꿀만의 특이적인 성분을 탐색하고자 우선 토종꿀과 양봉꿀의 단백질함량을 조사하였으며 단백질 전기영동을 이용하여 토종꿀과 양봉꿀간의 단백질 사이의 차이점을 조사하였다. 그 결과로서 토종꿀과 양봉꿀간의 주요 단백질의 분자량이 다름을 밝혀냈다. 즉, 단백질 전기영동을 이용하여 토종꿀과 양봉꿀을 구별할 수 있는 방법을 개발하였기에 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에서 사용된 시료는 강원도 8개 지역의 토종꿀 30종과 양봉꿀 3종, 지리산에서 생산된 1종의 시판 토종꿀, 외국산꿀 5종으로서 도내에서 생산된 토종꿀과 양봉꿀의 채밀기간은 93년에서 95년 가을이었으며, 시료는 4°C 저온고에 보관하면서 필요에 따라 실온에서 채취하여 실험에 사용하였다<sup>(1)</sup>.

### 단백질 정량

단백질은 BSA를 표준물질로 하여 Bradford방법과 Lowry방법으로 각각 정량 하였다<sup>(2)</sup>.

### 꿀 단백질의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Laemmli SDS-PAGE 방법<sup>(3)</sup>을 이용하였으며 molecular weight marker는 Promega (USA)의 제품을 이용하였다. 전기영동이 끝난 후 gel 염색은 Coomassie Blue 염색법으로 하였다.

Corresponding author: Hae-ik Rhee, Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwon 200-701, Korea

꿀의 주요 단백질 정제

벌꿀을 증류수에 대해 투석한 후 원심분리하여 침전물을 제거한 다음 상정액을 동결건조 하여 단백질 정제용 시료로 이용하였다. 토종꿀은 DEAE-Toyopearl column chromatography와 butyl-Toyopearl column chromatography를 실시하였으며 양봉꿀은 DEAE-Toyopearl column chromatography를 실시하여 주요 단백질을 정제하였다.

결과 및 고찰

단백질 정량

벌꿀 속에는 미량의 단백질이 함유되어 있음은 많은 연구자들에 의해 확인이 되어 왔다<sup>(4-6)</sup>. 이들 단백질은 꿀벌 소화액 기원의 효소류 및 화분 기원의 효소류 그리고 꿀 속에 서식하는 미생물 기원의 것들로 추정된다. 벌꿀의 형성과정을 고려하면 여러 가지 다른 기원의 단백질 중에서 꿀벌 기원의 효소류가 가장 많이 차지할 것이다. 그러므로 벌꿀 중의 단백질 함량의 다소로써 꿀의 형성과정에 꿀벌이 직접적으로 관여하였는지 여부 및 증량제의 첨가여부를 판별할 수 있을

것으로 판단된다. 단백질 정량은 신속하고 간편하게 일반적으로 쓰는 방법인 Bradford방법과 Lowry방법<sup>(2)</sup>을 이용하여 측정하였다. Bradford방법과 Lowry방법 모두 화학물질이 단백질과 반응하여 나타나는 발색의 정도를 측정하는 방법이나 두 방법이 단백질과 반응하여 발색되는 기구가 다르므로 시료 중에 존재하는 단백질을 구성하는 아미노산의 함량 차이 또는 불순물이나 기타 다른 성분의 영향을 각각 다르게 받을 수 있다. Bradford방법과 Lowry방법으로 벌꿀 중의 단백질을 각각 정량한 결과는 Table 1과 같다. 실제로 Bradford방법을 이용한 경우 토종꿀에는 0.1~3.3 mg/g의 단백질이 함유되어 있었고 양봉꿀에는 0.2~1.6 mg/g의 단백질이 함유되어 있었다. 그러나 Lowry방법을 이용한 경우 토종꿀에는 12.9~45.7 mg/g의 단백질이, 양봉꿀에는 15.8~27.1 mg/g의 단백질이 함유되어 있는 것으로 나타나 두 방법간에 커다란 차이가 나타났다. 이 결과는 앞서 언급한 두 가지 정량방법의 특성에 기인한 것으로 Lowry법에 의한 정량시 발색을 촉진하는 물질이 벌꿀의 성분 중에 존재하는 것으로 다음의 실험을 통해서 판단할 수 있었다.

따라서 꿀 시료 중에 존재하는 발색 촉진 물질을 투

Table 1. Quantification of honey protein by Bradford and Lowry method (Unit: mg/g)

| Sample number      | Bradford  | Lowry      | Sample number        | Bradford  | Lowry      |
|--------------------|-----------|------------|----------------------|-----------|------------|
| A1                 | 1.3       | 26.1       | B5                   | 1.4       | 28.1       |
| A2                 | 2.1       | 30.3       | B6                   | 1.8       | 31.6       |
| A3                 | 1.5       | 31.5       | B7                   | 3.3       | 45.7       |
| A4                 | 0.8       | 25.0       | D3                   | 2.0       | 33.1       |
| B1                 | 1.3       | 26.5       | E4                   | 1.4       | 33.1       |
| B2                 | 0.6       | 20.3       | H2                   | 1.8       | 28.9       |
| B3                 | 1.2       | 27.0       | H3                   | 2.4       | 33.9       |
| B4                 | 1.8       | 30.1       | H4                   | 2.0       | 32.9       |
| C1                 | 1.6       | 28.5       |                      |           |            |
| D1                 | 1.3       | 25.9       | Mean ± S.D.          | 2.0 ± 0.6 | 33.4 ± 5.4 |
| D2                 | 1.1       | 28.8       |                      |           |            |
| I <sup>1)</sup> E1 | 0.8       | 24.3       | III <sup>3)</sup> K1 | 0.1       | 12.9       |
| E2                 | 1.5       | 30.3       |                      |           |            |
| E3                 | 1.3       | 26.0       | O1                   | 0.8       | 21.5       |
| F1                 | 0.9       | 25.9       | O2                   | 0.5       | 17.1       |
| G1                 | 1.5       | 27.5       | O3                   | 0.6       | 19.3       |
| H1                 | 1.3       | 24.3       | P1                   | 0.8       | 24.3       |
| I1                 | 2.5       | 37.5       | Q1                   | 1.6       | 27.1       |
| J1                 | 1.3       | 25.8       | R1                   | 0.2       | 16.6       |
| J2                 | 2.1       | 30.3       | R2                   | 0.3       | 15.8       |
| J3                 | 1.2       | 25.7       | R3                   | 0.6       | 18.4       |
| J4                 | 0.9       | 27.3       |                      |           |            |
| Mean ± S.D.        | 1.4 ± 0.5 | 27.5 ± 3.4 | Mean ± S.D.          | 0.7 ± 0.4 | 20.0 ± 4.0 |

<sup>1)</sup>Native bee-honey harvested in 1995

<sup>2)</sup>Native bee-honey harvested before 1994

<sup>3)</sup>Native bee-honey harvested at Jiri mountain in 1995

<sup>4)</sup>Foreign bee-honey

**Table 2. The effect of dialysis on quantification of honey (A1) protein**

| Method of quantification | Protein (mg/g)  |                |
|--------------------------|-----------------|----------------|
|                          | Before dialysis | After dialysis |
| Bradford                 | 1.3             | 1.0            |
| Lowry                    | 26.1            | 5.2            |

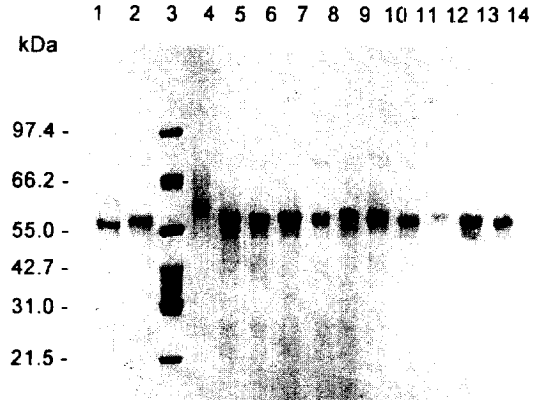
석으로 제거한 후 단백질량을 측정하였다. Table 2에서 나타난 바와 같이 Bradford방법은 투석 전·후의 단백질 함량에 별 다른 차이를 보이지 않았지만 Lowry방법으로 정량한 결과는 투석 후의 단백질량이 투석 전의 양보다 약 80% 정도 감소하였음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 Lowry방법에 의한 정량시에는 특정 물질에 의해 발색이 촉진되어 이 두 방법에 의한 단백질 정량 수치가 다르게 나타난 것으로 보인다.

전반적으로 보면 검출 방법에 관계없이 양봉꿀의 단백질 함량은 토종꿀의 단백질 함량보다 매우 낮음을 확인할 수 있었다. 그러나 토종꿀 중에서도 낮은 단백질 함량을 나타내고 있는 벌꿀과 양봉꿀 중에서도 상대적으로 높은 단백질 함량을 나타내고 있는 벌꿀도 있었다. 이는 예전에 가짜 꿀을 분별하는 방법으로 단백질 함량의 차이를 이용하려 했던 것을 뒷받침하고 있다고 볼 수 있다<sup>7)</sup>.

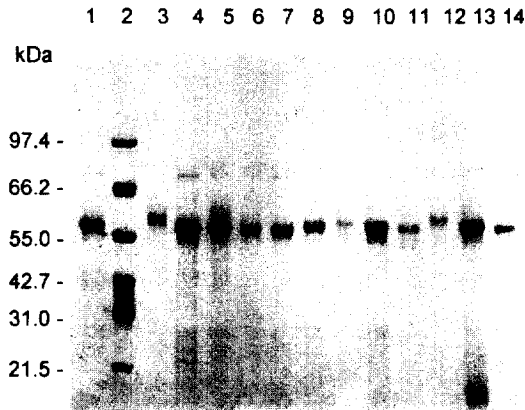
**단백질의 전기영동**

앞에서 살펴본 바와 같이 벌꿀 속에는 Bradford방법으로 정량 하였을 경우 0.1% 내외의 단백질이 존재하고 있으므로 벌꿀 속에 존재하는 단백질의 분자량 분포를 관찰하기 위하여 SDS-PAGE를 하였다. 수집된 벌꿀의 SDS-PAGE 결과는 Fig. 1, 2, 3과 같이 나타났

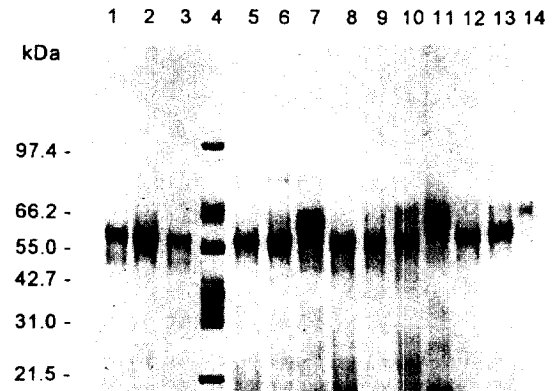
다. 즉 꿀 단백질의 전기영동 pattern은 비슷하게 나타났으나 토종꿀에는 토종꿀만의 주요 단백질이, 양봉꿀에는 양봉꿀만의 주요 단백질이 모두 존재하는 것으로 나타났다. 그리고 토종꿀의 주요 단백질과 양봉꿀의 주요 단백질은 분자량이 서로 다름을 확인할 수 있었다. 또한 주요 단백질의 분자량을 molecular weight marker를 이용하여 산출한 결과 토종꿀의 단백질은 56,000 Da이었으며, 양봉꿀은 59,000 Da으로 계산되었다. 꿀의 주된 단백질은 수집한 시료 모두에서 토종꿀 군 특이적, 양봉꿀 군 특이적으로 나타났으며 강원도의 어떠한 지역에서 채취한 토종꿀이라고 하더라도 분자량 56,000 Da의 단백질이 존재함을 확인할 수 있었다. 그리고 양봉꿀의 경우도 마찬가지로 분자량 59,000 Da의 주요 단백질이 모두 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 분자량 3,000 Da의 차이는 단백질의



**Fig. 2. Analysis of honey proteins by SDS-PAGE.** 1: B7, 2: C1, 3: Molecular weight marker, 4: P1, 5: D1, 6: D2, 7: D3, 8: E1, 9: Q1, 10: E2, 11: E3, 12: R2, 13: E4, 14: F1.



**Fig. 1. Analysis of honey proteins by SDS-PAGE.** 1: A1, 2: Molecular weight marker, 3: O1, 4: A2, 5: A3, 6: A4, 7: B1, 8: B2, 9: R1, 10: B3, 11: B4, 12: O2, 13: B5, 14: B6.



**Fig. 3. Analysis of honey proteins by SDS-PAGE.** 1: G1, 2: H1, 3: H2, 4: Molecular weight marker, 5: H3, 6: H4, 7: R3, 8: I1, 9: J1, 10: J2, 11: O3, 12: J4, 13: J3, 14: K1.

전기영동상에서 충분히 구분할 수 있을 만큼의 영동 거리를 나타내므로 전기영동방법은 토종꿀과 양봉꿀의 진위를 간편하게 판별할 수 있는 방법이라고 할 수 있다. 이러한 차이는 토종벌과 양봉벌의 생화학적 변이의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 그러므로 양봉벌이 생산한 꿀과 토종벌이 생산한 꿀에는 각각 서로 다른 분자량의 단백질이 존재하므로 꿀 속에 존재하는 단백질의 분자량을 측정함으로써 토종꿀인지 양봉꿀인지 간편하게 판별할 수 있었다.

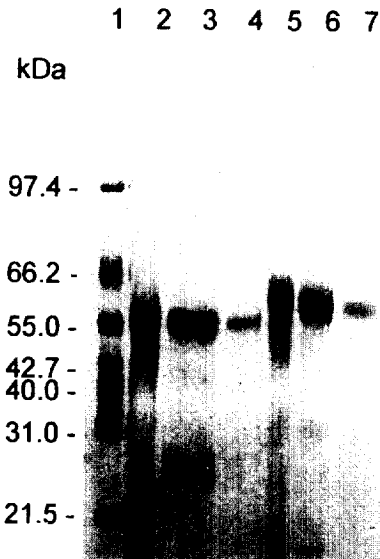
그리고 강원도산 토종꿀은 모두 분자량 56,000 Da의 단백질을 보여주고 있으나 시판되고 있는 지리산 토종꿀(K1)은 59,000 Da의 단백질을 보여주고 있어 양봉벌에 의해 채밀된 꿀이 토종꿀로 포장되어 판매되고 있는 것으로 판단된다. 특히 이 꿀(K1)은 단백질 함량과 전보에서 보고한 HMF함량과 화분수 분포 등을 고려할 때 강원도산 토종꿀과는 큰 차이를 보여주고 있으며 오히려 국내에서 생산된 양봉꿀과 유사한 분석결과를 보여주고 있다.

**벌꿀 주요 단백질의 정제**

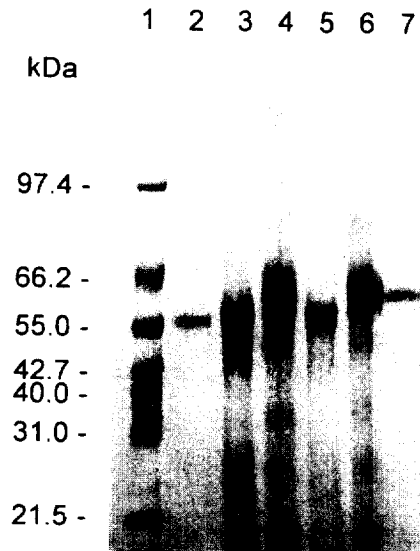
토종꿀과 양봉꿀을 각각 투석막(molecular weight cut-off 12,000 Da)을 사용하여 4°C에서 증류수에 대해서 12시간 동안 투석하였다. 원심분리(10,000×g, 10 min)한 후 얻은 상정액을 동결건조 하여 얻은 분말을

약간의 증류수에 희석한 후 단백질 정제를 위한 시료로 이용하였다. 우선 DEAE-Toyopearl column (2.5×10 cm)을 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)로 평형화시킨 후 시료를 직접 도입시켰다. 흡착이 끝난 후 비특이적으로 결합한 단백질을 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)로 세척하였다. 단백질의 용출은 NaCl linear gradient (0~0.5 M in 20 mM Tris-HCl, total 400 mL)로 하여 주요 단백질은 150 mL 부근에서 용출하였다. 정제의 결과는 Fig. 4에서 보듯이 토종꿀과 양봉꿀 모두 주요 단백질 외에 또 다른 단백질이 존재함을 볼 수 있다. 주요 단백질 외에 다른 단백질을 제거하기 위하여 양봉꿀은 얻어진 주요 단백질이 함유된 분획만을 모아 12시간 동안 증류수에 대해 투석한 후 DEAE-Toyopearl column을 그대로 이용하고 0.1 M에서 0.3 M NaCl (total 400 mL)의 linear gradient로 용출시켰다. 이렇게 하여 양봉꿀의 주요 단백질을 정제할 수 있었다.

그러나 토종꿀의 경우는 2차 DEAE-Toyopearl chromatography 획분을 모아 분말의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 30% 포화 농도가 되도록 교반하면서 서서히 가한 후 1시간 정도 방치한 후 원심분리(10,000×g, 10 min)하여 상정액을 30% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 포화용액으로 평형시킨 butyl-Toyopearl 650 M column (2.0×6.5 cm)에 도입하였다. 단백질의 용출은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> linear gradient (30-0% in 20 mM Tris-HCl, total 400 mL)로 하였다. 얻은 분획을 SDS-PAGE로 확인하여 Fig. 4에서 보는 바와 같이 정



**Fig. 4. SDS-PAGE of stepwise purified honey proteins by ion exchange chromatography.** 1: Molecular weight marker, 2: I1, 3: I1 (after DEAE-Toyopearl), 4: I1 (after Butyl-Toyopearl), 5: R1, 6: R1 (after DEAE-Toyopearl), 7: R1 (after DEAE-Toyopearl).



**Fig. 5. SDS-PAGE of purified and non-purified honey proteins.** 1: Molecular weight marker, 2: Purified I1 protein, 3: I1, 4: O1, 5: B1, 6: O2, 7: Purified R1 protein.

제된 단백질 분획만을 얻을 수 있었다.

이렇게 정제된 토종꿀과 양봉꿀의 주요 단백질은 토종꿀과 양봉꿀을 판별하기 위한 SDS-PAGE의 marker로서 이용할 수 있었다. 즉, 확인하고자 하는 시료와 정제된 두 개의 주요 단백질을 함께 전기영동하여 토종꿀인지 양봉꿀인지를 확인할 수 있는 marker로서 이용할 수 있었다. Fig. 5는 이를 단편적으로 보여주고 있다.

**최적 전기영동 분석조건**

화분은 지방질, 회분 이외에 단백질을 함유하고 있으므로 전기영동시 화분의 존재 여부가 영동에 어떤 영향을 미치는가를 검토하였다. 시료 1.0 g을 0.5 mL의 증류수로 희석하여 원심분리(10,000×g, 10 min)한 후 화분을 제거 한 것과 원심분리하지 않고 화분을 함유한 것을 단백질 분석용 시료로 하여 전기영동을 하였다. 그 결과 화분이 제거되지 않으면 단백질의 분리가 잘 이루어지지 않을 뿐 아니라 전기영동이 뚜렷하게 이루어지지 않음을 알 수 있었다. 이는 전기영동시 화분이 분리 gel의 pore를 막아 단백질의 원활한 영동을 방해할 뿐만 아니라 화분속에 함유되어 있는 단백질이 같이 영동되기 때문이다. 전기영동 후 분리 gel의 well을 살펴보면 화분이 걸려 있음을 관찰할 수 있었다. 따라서 깨끗한 전기영동상을 얻기 위하여는 꿀속에 혼재하는 화분을 원심분리로 제거하는 조작이 필수적임을 알 수 있다.

Polyacrylamide gel을 이용한 전기영동 분석에서 gel의 농도는 단백질의 영동거리에 크게 영향을 미친다. 즉, 실제 꿀의 분석에 있어 토종꿀과 양봉꿀의 주된 단백질을 가장 잘 분리하기 위하여는 적절한 gel농도에서 전기영동이 이루어져야 한다. 앞에서 분리한 토종꿀과 양봉꿀의 주된 단백질을 이용하여 acrylamide의 농도를 변화시켜 가며 두 단백질이 가장 잘 분리되는 조건을 규명하였다. 그 결과 10%의 gel로 전기영동을 하는 것이 판별이 용이하고 전기영동 후 사후 관리도 용이하다는 점에서 가장 현실성이 있는 방법으로 판단이 된다.

**요 약**

꿀의 식품학적 특성만으로는 토종과 양봉꿀의 판별이 불가능하므로 꿀 속에 존재하는 단백질의 특성으로 판별의 기준을 마련하고자 다음과 같은 연구결과를 얻었다.

꿀 속의 단백질을 Bradford방법을 이용하여 정량한

결과 토종꿀은 0.1~3.3 mg/g이었고 양봉꿀은 0.2~1.6 mg/g으로 토종꿀이 양봉꿀의 단백질함량보다 많음을 확인할 수 있었다. 그리고 단백질 전기영동방법을 이용하여 수집한 벌꿀의 단백질 pattern을 관찰해 본 결과 토종꿀과 양봉꿀의 주요 단백질의 분자량이 각각 56,000 Da과 59,000 Da으로 차이가 있음을 확인하였다. 수집한 모든 토종꿀과 양봉꿀에서 같은 결과를 나타내어 이들 단백질이 토종벌과 양봉벌의 생리적 차이에 의해서 나타나는 결과로 판단되었다. 또한 이 주요 단백질을 두 단계의 chromatography를 통해 정제하였으며, 정제된 주요 단백질은 토종꿀과 양봉꿀을 구별할 수 있는 SDS-PAGE의 marker로서 이용할 수 있었다. 그리고 꿀의 주요 단백질을 잘 분리하기 위해서는 10%의 gel 농도가 가장 적합하였으며 이 방법을 이용하여 토종꿀과 양봉꿀을 신속하고 효과적으로 구별할 수 있었다.

**감사의 글**

본 연구는 1996년 강원도 기술용역의 연구비 지원에 의하여 이루어진 내용의 일부로서 이에 감사드립니다.

**문 헌**

1. Lee, D.C., Lee, S.Y., Cha, S.H. Choi, Y.S. and Rhee, H. I.: Characteristics of native-bee honey harvested in Kangwon area (in Korea). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 1082-1088 (1997)
2. Lowry, O.H., Roserbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
3. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 (1970)
4. White, J.W. Jr. and Kushnir, I.: Composition of honey: protein. *J. Agri. Res.*, **6**, 163 (1967)
5. Han, J.G., Kim, K., Kim, D.Y. and Lee, S.K.: Composition, the changes of diastase activity and hydroxymethylfurfural content during storage of the various honey samples (in Korean). *Korean. J. Food Sci. Technol.*, **17**, 155-162 (1985)
6. Kim, B.N., Kim, T.J. and Cheigh, H.S.: Free amino acid, sugar and enzyme activity of honey harvested in Kangwon area (in Korea). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**, 680-685 (1994)
7. Lee, C.Y. and Kime, R.W.: The use of honey clarifying apple juice. *J. Agri. Res.*, **23**, 45 (1984)