

< Original Article >

봉독 분석을 위한 전처리 방법 개발 및 이를 이용한 젖소 원유 중의 봉독 잔류물질 조사

한상미* · 홍인표 · 우순옥 · 김세건 · 장혜리

농촌진흥청 국립농업과학원

Analysis of bee venom residues in milks of dairy cattle using UHPLC with newly developed pre-processing method

Sang-Mi Han*, In-Pyo Hong, Soon-Ok Woo, Se-Gun Kim, Hye-Ri Jang

Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science,
Rural Development Administration, Wanju 565-851, Korea

(Received 3 March 2015; revised 9 March 2015; accepted 12 March 2015)

Abstract

Bee venom has been used as to prevent and treat bovine mastitis as natural antimicrobial compounds in some dairy cattle farms in Korea. It is needed to determine the residual of bee venom in milks of dairy cattle treated with bee venom. Since bee venom is not approved as a raw material for animal drugs, the preprocessing method to detect bee venom residual in milk and the tolerance limit for its residue has not been established yet in Korea. Therefore, the purpose of this study was to develop pre-processing method not affecting major component of bee venom for detection of its residue in milks using ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC). In addition, bee venom residue was also analyzed in milk samples of dairy cattle treated for mastitis with bee venom using UHPLC with the developed pre-processing method in this study. As a result, melittin, histamin and phospholipase A2, the major components of bee venom, were all detected by UHPLC with the pre-processing method developed in this study. The results of this study suggest that the pre-processing method developed in this study can be useful to detect bee venom residue in dairy cattle milk. We also found that no bee venom residues were detected in milk samples collected from dairy cattle treated with bee venom after 1 and 3 days, respectively.

Key words : Honeybee venom, Residues, Milks, Dairy cow, Pre-processing method

서 론

가축의 생산성 증진을 위한 사양 관리 중 사료 첨가용 항생제는 자돈 및 육계, 산란계의 성장 촉진, 사료 효율 개선 및 질병 예방 등에 뛰어난 효과를 나타내는 것으로 알려져 농가에서 오랫동안 사용되어 왔다(Hays와 Muir, 1979). 특히 젖소에서 항생제를 사용하게 되는 가장 흔한 원인은 유방염이며 세균학적 진

단을 거쳐 적절한 항생제를 투여한다(Smith 등, 2001). 그러나 항생제의 오남용으로 인한 축산물 중의 잔류 항생제는 소비자들로의 전이 가능성과 더불어, 분뇨를 통한 내성 강화 병원균의 발생 가능성을 증가시킴으로써 증대한 사회적 문제가 되었다(Burgat, 1991; Jung, 2006). 그로 인해 가축의 생산성에 막대한 영향을 미치던 항생제의 사용이 2011년 7월 이후 전면 금지됨에 따라 이를 대체할 수 있는 천연항생제의 개발에 대한 축산농가의 관심이 증가되고 있다. 또한 소득 증대와 식품 안전성에 대한 소비자의 의식 강화로

*Corresponding author: Sang-Mi Han, Tel. +82-63-238-2896,
Fax. +82-63-238-3832, E-mail. sangmih@korea.kr

우리나라는 1989년부터 국내산 축산물의 잔류조사 5개년 사업을 추진하여 전국적인 잔류검사 체계를 확립하는 기틀을 마련하였고, 1991년부터 국가잔류검사프로그램을 도입 시·도 축산물위생검사기관에서 검사를 시작하였다. 이후 육류 중 유해성잔류물질 검사요령을 제정 고시하여 시행하고 있다(식품의약품안전평가원, 2014). 또한 축산물을 비롯한 식품 전반의 잔류 허용 기준 설정을 지속적으로 확대하고 있으며, 2010년부터는 국내 또는 Codex의 잔류허용기준이 없는 항생제 및 합성항균제가 검출될 경우, 일률기준 0.03 ppm을 적용하도록 하는 잔류물질 기준을 강화하는 추세이다(식품의약품안전평가원, 2014).

순수 천연물질이면서 강력한 항균, 항염증 및 면역증강 등의 효과를 갖는 봉독은 부작용과 잔류에 대한 위험성이 적어 봉침요법으로 오래 전부터 관절염, 통풍 등의 질환에 사용되어 오고 있다(김, 1992; Curcio-Vonlanthen, 1997). 봉독은 다양한 성분이 복합적으로 구성되어 있는데 이중 펩타이드가 항염증과 항균작용, 강력한 진통작용, 면역증강 등의 역할을 한다고 알려졌다(Habermann과 Reiz, 1965; Piek, 1986). 2005년 이후 봉독 채집장치와 봉독 정제법의 개발로 고순도의 정제봉독이 생산됨에 따라 동물 및 인체적용 의약품 개발 연구가 활발히 이루어지고 있다. 봉독을 자돈 및 양계에 처리했을 때 체중 및 생존율 증가와 같은 생산성 향상과 질병 감소에 효과를 나타낸다고 보고되었다(Han 등, 2009a&2009b; Han 등, 2010a). 또한, 봉독을 분만 전 교소혈(交巢穴)에 투여한 경우 분만 소요시간 단축과 후산 정체를 감소 등 분만효율이 개선되었으며, 발정 재귀일수와 분만간격의 단축과 봉독을 투여한 어미소로부터 출생한 신생 송아지의 체중 증가와 질병이 감소하는 것으로 보고되었다(Han 등, 2010b). 뿐만 아니라 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 등 유방염 원인균에 의해 유발된 젖소 유방염의 경우 봉독 투여로 체세포수가 크게 감소하는 것으로 확인되었고, 유방염에 걸린 젖소로부터 채취한 원유에서 분리한 균에 대한 항균력 우수한 것으로 보고된바 있다(Han 등, 2007). 일반적으로 천연물질의 장점은 체내에 잔류하지 않는다는 점이나, 우유를 어린이나 유아들도 섭취하기 때문에 봉독을 처리한 젖소의 원유에서 봉독의 잔류 여부를 조사할 필요가 있다. 그러나, 국내에서 봉독은 아직 동물용의약품 원료로 승인되지 않았기 때문에 우유 내 봉독의 잔류여부를 조사하기 위한 전처리 방법이나 잔류허용기준은 아직까지 설정되어 있지 않다.

따라서 본 연구의 목적은 현재 일부 젖소농가에서 유방염 예방 및 치료를 위한 천연항생제로 사용되고 있는 봉독의 우유 내 잔류 여부를 분석하기 위하여 봉독 성분에 영향을 주지 않는 전 처리방법을 개발하는데 있다. 더불어, 개발된 이 전처리 방법을 이용하여 봉독을 처리한 젖소로부터 채취한 우유 내 봉독의 잔류여부를 조사함으로써 향후 동물약품원료 등록의 기초 자료로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

봉독 처리

봉독은 서양종 꿀벌에 봉독 채집장치(청진테크, 한국)를 이용하여 채취 분리한 다음 간이정제방법으로(한 등, 2007) 정제한 정제봉독을 구입하여 사용하였다(대한정제봉독, 한국). 본 시험은 봉독을 유방염 예방 및 치료에 사용하고 있는 경남 창령군 소재 목장을 시험목장으로 선택하였다. 정제봉독 투여량 및 투여방법은 농가에서 사용하는 종래방법으로 교소혈에 정제봉독을 생리식염수로 1,000배로 희석한 후 봉독 0.02 mg/kg의 농도로 젖소에 주사하였다(Han 등, 2007).

원유 채취 및 전 처리

시험에 사용한 젖소 20두에 봉독을 주사한 지 1일과 3일 후 2차례에 걸쳐 각 젖소로부터 우유를 채취하였다. 채취한 우유는 곧바로 냉동한 후 동결건조하였다. 봉독 성분의 기기분석을 위하여 동결건조한 우유는 기존의 우유 속 항균물질 분석을 위한 전 처리 방법을 사용하여 처리한 우유를 대조군으로 하였고, 본 연구에서 개발한 방법을 사용하여 전 처리한 우유를 시험군으로 하였다. 기존의 전 처리 방법을 간략히 설명하면 우유 시료 50 mL를 5분간 원심분리 후 지방층 아래 부분에 있는 탈지층(skim portion)을 취하여 분석시료로 하였다(식품의약품안전처, 2014). 본 연구에서는 봉독의 주요성분이 펩타이드 및 단백질 성분임을 고려하여 이들 성분에 영향을 주지 않도록 고안하여 원유를 동결건조한 후 이를 멸균증류수로 40 mg/mL 비율로 희석하고 1시간 동안 초음파 세척기를 사용하여 추출하였다. 초음파 추출한 우유는 13,000 rpm으로 5분간 4°C에서 원심분리한 후 상청액을 취하였다. 상청액은 0.45 µl 멤브레인 필터를 사용

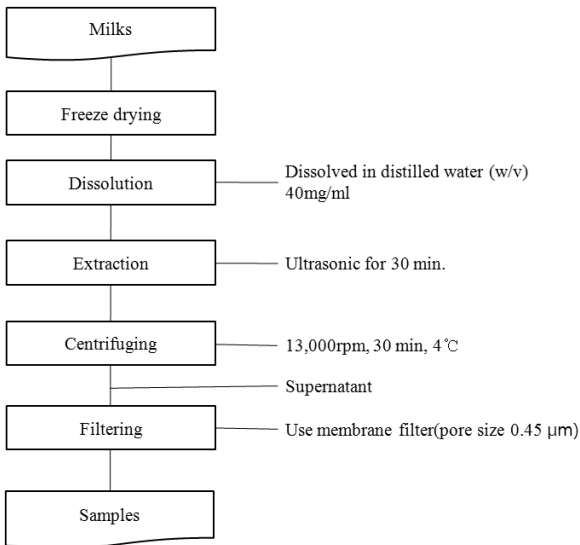


Fig. 1. scheme of raw milks processing.

하여 여과하여 분석에 사용하였다(Fig. 1).

UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography) 분석

Agilent (Santa clara, CA, USA)사의 UHPLC-DAD 1290 infinity 모델에 Advanced materials technology (Wilmington, DE, USA)사의 Halo peptide ES-C18 (2.7 μm, 4.6×100 mm) 컬럼을 장착하여 흐름속도 2.0 mL/min, 컬럼온도 50°C, 주입량 2 μL, 검출파장 220 nm로 설정하였다. 봉독 성분 중 멜리틴, 히스타민, 포스포리파아제 분석을 위하여 이동상은 (A) 20 mM TFA/ACN (trifluoroacetic acid/acetonitrile)과 (B) 20 mM TFA/H₂O를 이용하여 (A) 0%, 0~6분, 유속 0.3 mL/min (A) 0~10%, 6~9분; 10~31%, 9~13분; 31~33%, 13~16 min; 33~40%, 16~17 min; 40~41%, 17~25 min 은 유속 1.8 mL/min의 조건으로 분석하였다. 멜리틴 분석 조건은 이동상으로 (A) 20 mM TFA/ACN과 (B) 20 mM TFA/H₂O를 이용하여 (A) 40%, 0~4.5 min, (A) 40~45%, 4.5~9분의 조건으로 분석하였다. 모든 시약은 HPLC 용 특급시약을 사용하였고, 멜리틴, 히스타민, 포스포리파아제 표준품은 시그마산을 사용하였다.

전 처리 검증

우유를 전 처리하는 과정 중 봉독 성분의 파괴 또

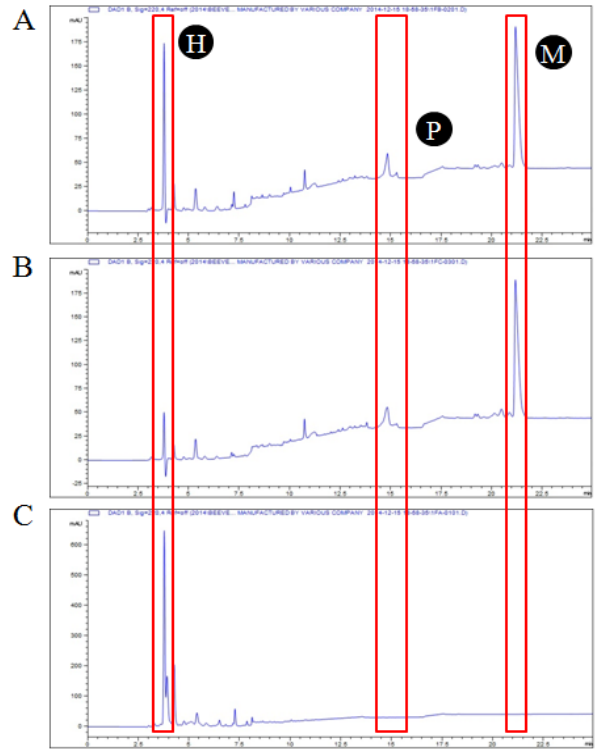


Fig. 2. UHPLC chromatograms of bee venom. A: Bee venom (5 mg/mL), B: cow milk containing bee venom (5 mg/mL) analyzed using the pre-processing method developed in this study, C: cow milk containing bee venom (5 mg/mL) analyzed using general pre-processing method for detection of antimicrobial residue in cow milk. H, histamine; P, Phospholipase A2; M, melittin.

는 손실 여부를 조사하기 위하여, 봉독 처치를 하지 않은 젖소에서 채취한 우유에 정제봉독을 혼합하였다. 정제봉독은 UHPLC를 사용하여 분석 가능한 최소농도인 2 μg/mL 비율로 우유에 첨가하였다. 첨가 후 동일한 전 처리과정을 거쳐 UHPLC 분석을 시행하였다.

결 과

우유 전 처리과정 검증

젖소 유방염 예방 및 치료에 사용되는 봉침 또는 봉독주사 후 우유 내 봉독잔류 여부를 분석하기 위하여 Fig. 1과 같은 절차로 우유를 전 처리하였다. 전 처리 과정 중 봉독 성분의 손실 여부를 검증하기 위하여 우유에 정제봉독을 첨가하여 동일한 과정을 수행한 후 성분을 분석하였다. Fig. 2A에서 보는 바와

같이 정제봉독 5 mg/mL을 UHPLC로 분석할 경우 봉독의 주요성분인 멜리틴과 히스타민, 포스포리파아제가 충분히 분리 검출되었다. 또한 본 연구에서 개발한 방법으로 수행한 전 처리과정 중에 봉독을 첨가한 시험군에서도 정제봉독과 동일한 멜리틴, 히스타민, 포스포리파아제 피크를 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 그러나 봉독을 첨가하여 기존의 방법으로 전 처리과정을 수행(대조군)하여 UHPLC로 분석했을 경우엔 Fig. 2C와 같이 히스타민 피크는 확인되었으나 봉독의 주요성분인 멜리틴은 물론 단백질 성분인 포스포리파아제 성분은 확인되지 않았다.

우유 중의 봉독 잔류물질 조사

국내 젖소 농가에서 일반적으로 사용하는 봉독 주사용량인 0.02 mg/kg의 정제봉독을 유방염에 걸린 젖소의 교소혈에 주사하고 1일과 3일 후에 각각 동 젖소들로부터 우유를 채취하였다. 채취한 우유에 대한 전 처리과정을 거친 후 UHPLC를 사용하여 분석한 결과, 멜리틴은 물론 히스타민, 포스포리파아제에 대한 검출을 의미하는 피크(peak)가 전혀 확인되지 않았다(Data not shown). 봉독 성분이 잔류하지 않는 것으로 확인된 이러한 결과를 재 확인하기 위하여 봉독 성분 중의 40% 이상을 차지하는 멜리틴의 최소 검출

한계량을 구한 후 동일한 분석조건으로 봉독 처리 젖소의 우유를 분석하였다. 그 결과, Fig. 3A에서 보는 바와 같이 UHPLC를 사용하여 멜리틴이 검출될 수 있는 봉독의 양은 5 μ g/mL 이상이었다. 그러나 봉독을 처리한 젖소로부터 각 1일과 3일째에 채취한 모든 우유에서 멜리틴이 전혀 검출되지 않았다(Fig. 3).

고 찰

젖소의 유방염은 유량과 유질의 저하, 유방염으로 인한 폐기 우유의 증가와 도태 및 폐사 등을 가져와 낙농가에겐 경제적 손실을 줄 뿐만 아니라 의욕상실 등을 초래하기 때문에 생산성 향상을 도모하기 위해서는 젖소 유방염 예방 및 치료가 매우 중요하다(남, 2010; 류, 2010). 젖소 유방염의 원인은 다양하며 그 중 병원성 세균 감염에 기인된 비유기 유방염의 치료와 건유기 유방염 예방을 위해서 매우 다양한 항생제가 사용되고 있다(Kime 등, 1997; 남, 2010). 그러나 항생제 투여로 인한 약제 내성균의 출현과 항생제의 우유 내 잔류 또는 유방 전체에 흡수되어 퍼질 수 있다는 문제가 심각하게 대두되고 있는 실정이다(Kwon, 2011). 이러한 문제 때문에 휴약 기간을 설정하여 젖소에 항생제를 사용했을 경우 최소한 72시간 이내에 채취된 우유는 폐기해야만 한다. 따라서 해외는 물론 국내에서도 항생제내성 문제와 식품안전성 문제가 대두되면서 유방염 등 질병 방제를 위하여 항생제를 탈피하여 생리학적 및 면역학적 요법에 의한 숙주의 질병에 대한 저항성을 높이는 천연물질의 개발이 활발히 연구되고 있다(Hur 등, 2006).

봉독은 오래 전부터 인체 및 가축의 질병 치료에 사용되어 왔다. 젖소에서도 봉독이 유방염 유발 원인균인 *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* 등에 강한 항균력을 갖고 있으며, 유방염에 감염된 젖소의 우유 내 체세포수를 크게 감소시키는 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다(Han 등, 2007). 현재까지 밝혀진 봉독을 구성하는 물질은 건조봉독의 40% 이상을 차지하는 멜리틴을 비롯한 펩티드 11종, 효소 5종, 생리학적 활성 아민 3종 그리고 비펩티드 성분이 4종으로 알려져 있다(Pick, 1986). 봉독의 주요 효능인 항염증 및 항균효과를 나타내는 지표물질로 알려진 멜리틴은 분자량 2,840로 액체크로마토그래피를 사용하여 검출 가능하다고 알려져 있다(Pick, 1986). 천연물질은 내성이나 축산물에 대한 잔류문제

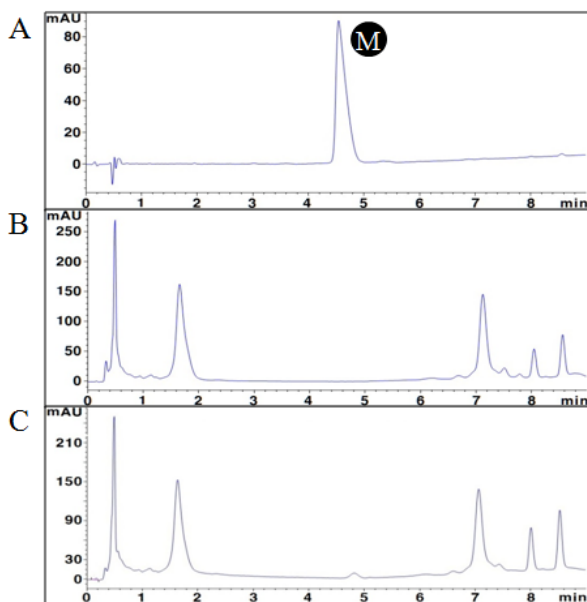


Fig. 3. UHPLC chromatograms of bee venom. A: Bee venom (5 μ g/mL), B: milk from dairy cow with no bee venom treatment, C: milk from dairy cow after 1 day of bee venom treatment. M, melittin

가 없어 항생제나 기존의 면역증가제 대체제로 사용되고 있다. 따라서 동물용의약품 또는 사료 첨가제로서 천연물질에 대한 축산물 잔류에 대한 기준은 설정되어 있지 않다. 국내 젖소 농가에서도 천연물질로 알려진 봉독을 유방염 예방 및 치료에 사용하고 있으나, 우유 중의 봉독 잔류 여부에 대해서는 보고된 바 없다. 또한 우유 중에 잔류하는 봉독 성분을 검출하기 위한 전 처리 방법은 아직까지 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 우유 중에 존재하는 봉독 성분의 변화를 초래하지 않는 전 처리 방법을 개발하였다. 우유와 봉독은 모두 단백질과 펩타이드를 주 성분으로 하는 물질로 기존의 항균물질 분석을 위한 우유 전처리 방법으로는 멜리틴과 포스포리파아제 성분이 충분히 추출되지 않았다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 우유를 동결건조한 다음 증류수로 희석, 초음파를 이용하여 봉독 성분이 추출 될 수 있도록 한 후 원심분리하여 상청액을 취하여 0.45 µm로 필터링하여 얻어진 물질을 이용해서 봉독의 주요 성분인 멜리틴과 포스포리아제의 분석이 가능하였다. 특히 멜리틴은 봉독 성분의 40% 이상을 차지하고 있어 봉독의 잔류 여부를 확인하기에 가장 효율적인 성분이다. 멜리틴이 검출되지 않는다면 10% 이하 또는 1% 이하의 미량 성분 또한 존재하지 않는 것으로 추정할 수 있다. 따라서 멜리틴 성분이 검출되지 않은 우유는 봉독 성분이 검출되지 않는 것으로 판정할 수 있다.

또한, 본 연구를 통해 젖소에 봉독을 투여한 후 3 일째는 물론 투여 후 1 일째에도 우유에서 봉독 성분은 검출되지 않았으며, 이는 젖소를 봉독으로 처치해도 1 일 후에는 우유 내에 봉독이 잔류하지 않음을 의미하는 것으로 보인다. 본 연구결과를 종합해 볼 때, 천연물질인 봉독은 유방염 유발 병원균에 대한 강한 항균력과 항염증 효과를 갖고 있어 항생제 내성문제와 식품 안전성 문제를 해결하면서 항생제를 대체할 수 있는 유방염 예방 및 치료용 소재로 개발하기에 적합한 물질인 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ01132503)에 의하여 수행되었습니다.

REFERENCES

김문호. 1992. 봉독요법과 봉침요법. 한국교육기획. 서울: 67-141.

남향미. 2010. 젖소 유방염에 대한 항생제 사용 지침. 대한수의사회지. 7월호: 638-644.

류일선. 2010. 젖소의 유방염발생감소를 위한 예방 및 관리대책. 3월호: 230-243.

식품의약품안전평가원. 2014. 축수산물 유해물질 분석법 편람.

한상미, 이광길, 여주홍, 우순옥, 권해용. 2007. 봉독 간이정제법. 특허 제 10-0758814호.

Burgat V. 1991. Residues of drugs veterinary use in food. Rev Pract 41: 985-990.

Choi SH, Cho SK, Cul XS, Kang SS, Kwan YB. 1999. The Therapeutic Effect of Piglets with Bacterial Diarrhea by Natural Honeybee (*Apis mellifera*) Venom. Korean J Vet Clin Med 16(1): 150-154.

Curcio-Vonlanthen V, Schneider CH, Frutig K, Blaser K, Kalbacher H. 1997. Molecular parameters in melittin immunogenicity. J Pept Sci 3(4): 267-276.

Jung SC. 2006. Establishment of control system of antibiotics for livestock. National Veterinary Research and Quarantine Service and Korea Food & Drug Administration. 8-12.

Habermann E, Reiz KG. 1965. On the biochemistry of bee venom peptides, melittin and apamin. Biochem Z 343(2): 192-203.

Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kweon HY, Kim BS, Kim JY, Baek HJ, Kim ST. 2007. Antibacterial activity of the honey bee venom against bacterial mastitis pathogens infecting dairy cows. Int J Indust Entomol 14(2): 137-142.

Han SM, Lee KG, Yeo JH, Hwang SJ, Chenoweth PJ, Pak SC. 2009a. Effects of bee venom treatment on growth performance of young pigs. Am J Chin Med 37(2): 833-842.

Han SM, Lee KG, Yeo JH, Hwang SJ, Chenoweth PJ, Pak SC. 2009b. Somatic cell count in milk of bee venom treated dairy cows with mastitis. J ApiProduct ApiMed Sci 1(4): 104-109.

Han SM, Lee KG, Yeo JH, Oh BY, Kim BS, Lee W, Baek HJ, Kim ST, Hwang SJ, Pak SC. 2010a. Effects of honeybee venom supplementation in drinking water on growth performance of broiler chickens. Poult Sci 89: 2396-2400.

Han SM, Lee KG, Yeo JH, Oh BY, Kim ST. 2010b. Effects of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom on the reproductive efficiency of dams and the growth performance, disease occurrence of Hanwoo calves. Korean J Vet Serv 33(3): 287-292.

Hays VW, Muir WM. 1979. Efficiency and safety of feed additive use of antibacterial drugs in animal production. Can J Anim Sci 59: 447-456.

Hur TY, Kang SJ, Suh GH. 2006. Antibacterial effect of *Caesalpinia sappan* extract against mastitis pathogens from dairy cows. J Vet Clin 26(3): 286-290.

Kim SJ, Park JH, Kim KH, Lee WR, An HJ, Min BK, Han SM, Kim KS, Park KK. 2012. Apamin inhibits THP-1-de-

- rived macrophage apoptosis via mitochondria-related apoptotic pathway. *Exp Mol Pathol* 93: 129-134.
- Kim ST, Kim S, Kim SY, Son JK. 1997. Comparison of fatty acid composition of *Staphylococcus* sp isolated from bovine mastitis milk. *Korean J Vet Serv* 20: 37-46.
- Kwon JW. 2011. Harmonization of MRL setting for compounds used both as pesticides and as veterinary drugs with regulatory aspects-Cypermethrin in food of animal origin. *Korean J Environ Agric* 30: 89-97.
- Lin JH, Rogers PAM. 1980. Acupuncture effects on the body's defense systems. *Vet Bull* 50: 633-640.
- Lin YC. 1987. Observation of therapeutic effects of acupuncture treatment in 170 cases of infantile diarrhea. *J Tradit Chin Med* 7(3): 203-204.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene; evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol Biol* 5(3): 153-165.
- Smith GW, Constable PD, Morin DN. 2001. Ability of hematologic and serum biochemical variables to differentiate Gram-negative and Gram-positive mastitis in dairy cows. *J. Vet. Intern. Med.* 15: 394-400.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Piek T. 1986. *Venoms of the Hymenoptera*. Academic press, London. United Kingdom.
- Vick JA, Shipman WH. 1972. Effects of whole bee venom and its fractions (apamin and melittin) on plasma cortisol levels in the dog. *Toxicon* 10(4): 377-380.
- Wu M, Hancock RE. 1999. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J Biol Chem.* 274(1): 29-35.