

# 양봉꿀벌이 생산한 감로꿀의 항산화 활성

김세건 · 김효영 · 최홍민 · 이혜진 · 한상미\*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

## Antioxidant Activity of Honeydew Honey Produced by *Apis mellifera* L.

Se-Gun Kim, Hyo-Young Kim, Hong-Min Choi, Hye-Jin Lee and Sang-Mi Han\*

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Wanju 55365, Korea

**ABSTRACT:** To evaluate biological activity of honeydew honey produced by *Apis mellifera* L. in Korea, we measured antioxidant activity by using DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), ABTS [2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)], FRAP (Ferric reducing antioxidant power), and total polyphenol content assays. Korean honeydew honey respectively scavenged 26% and 86% of DPPH and ABTS radicals at the highest concentration of 10 mg/mL. In the result of FRAP assay, Korean honeydew honey showed activity (126  $\mu$ M of FRAP value) to reduce  $Fe^{3+}$  to  $Fe^{2+}$ . Total polyphenol content was 73.41 mg GAE/kg. Korean honeydew honey exhibited excellent antioxidant activity due to having high radicals scavenging ability and reducing power of ferric ion as well as the presence of phenolic compounds. These findings suggest that Korean honeydew honey has great potential as a functional food material.

**Key words:** Honeydew honey, antioxidant activity, *Apis mellifera* L.

**초 록:** 국내 생산 감로꿀의 기능성 식품 소재로 활용하기 위하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)와 ABTS [2,2-azobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] 라디칼 소거능, FRAP (Ferric reducing antioxidant power) 활성, 총 폴리페놀 함량 분석을 통하여 항산화 활성을 평가하였다. 국내 생산 감로꿀은 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성을 보였으며 최고농도 10 mg/mL에서 DPPH에 비하여 ABTS 라디칼 소거능이 3배 이상 높게 측정되었다. FRAP 분석에서는 ferric ion ( $Fe^{3+}$ )를 126  $\mu$ M의 ferrous ( $Fe^{2+}$ )로 환원시켰다. 또한, 국내 생산 감로꿀에 함유된 폴리페놀성 화합물의 총량은 73.41 mg GAE/kg로 확인되었다. 이상의 연구결과에 비추어 볼 때, 국내 생산 감로꿀의 우수한 라디칼 소거능과 환원력을 가지며 천연 항산화제로 알려진 페놀성 화합물을 존재로 인하여 항산화 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 본 연구결과는 국내 생산 감로꿀의 기능성 식품 소재로 활용할 수 있는 기초자료로 제공하는 바이다.

**검색어:** 감로꿀, 항산화활성, 양봉꿀벌

2021년 기준 국내 양봉산물(벌꿀, 프로폴리스, 벌화분, 로열 젤리, 봉독 등)의 총 생산액은 7,208억 원으로 추정되며 벌꿀 생산액은 6,257억 원(86.8%)으로 국내 양봉농가의 주요 소득원으로 알려져 있다(National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, 2021). 벌꿀은 포도당, 과당과 같은 당류가 60% 이상 함유되어 있으며 당류 이외에도 인체 생리적 기능에 관여하는 아미노산, 비타민, 무기질이 존재하여 사탕수수 또는 사탕무 유래 정제 설탕과는 다르게 인체에

유익한 식품으로 알려져 있다(Solayman et al., 2016; Escuredo and Seijo, 2019). 벌꿀은 영양성분 이외에도 식물의 화밀에서 유래된 페놀성 화합물, 알칼로이드 계열 물질과 같은 2차 대사 산물을 포함하고 있는데, 이와 같은 화합물은 항산화, 항균, 항염과 같은 생리활성을 가지고 있다(Prasain et al., 2004; Kim et al., 2021). 벌꿀은 주로 밀원식물의 화밀 유래이며 아카시아꿀, 밤나무꿀, 유채꿀, 헛개나무꿀, 뱃나무꿀, 메밀꿀 등과 같이 다양하게 존재하는데, 각각의 벌꿀마다 향, 맛, 색상이 다르게 나타나고 생리활성 역시 차이를 보인다(Kim et al., 2010).

감로꿀은 식물의 화밀 유래 벌꿀과 달리 진딧물과 같은 곤충의 분비물 또는 식물의 진액을 꿀벌이 수집하여 생산한 벌꿀이

\*Corresponding author: sangmih@korea.kr

Received October 7 2022; Revised November 21 2022

Accepted November 25 2022

다. 감로꿀의 특징으로는 밤나무꿀과 유사하게 암갈색을 띠며 향이 거의 없고 부드러운 맛이 난다. 감로꿀은 스페인, 그리스, 루마니아, 세르비아와 같은 유럽에서 늦여름에 주로 생산되고 있으며 페놀성 화합물, 단백질, 아미노산 함량이 높아 화밀 유래 벌꿀보다 생리활성이 높은 것으로 알려져 있다(Iglesias et al., 2006; Haroun et al., 2012; Seraglio et al., 2019). 하지만, 국내에서 생산되는 감로꿀은 영양성분 분석(Kim et al., 2019), 포도당/과당 비율을 이용한 꽃꿀과의 판별 연구(Choi and Nam, 2020)가 일부 연구자들에 의하여 보고되었지만 생리활성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 국내에서 생산되는 감로꿀의 항산화 활성을 측정하여 기능성 식품 소재로 활용할 수 있는 과학적 근거를 마련하고자 연구를 수행하게 되었다.

## 재료 및 방법

### 공시 시료

감로꿀은 2020년 충청남도 아산시에서 양봉꿀벌(*Apis mellifera*)을 사육하는 양봉농가에서 8월에 생산한 것을 구입하였으며 25±5°C의 암실에서 보관하였다.

### 시약

본 연구에 사용한 모든 시약은 특급 시약을 구입하여 사용하였고, 총 폴리페놀 측정 시 대조 표준물질로 gallic acid (Sigma-Aldrich G7384-250G, St Louis, MO, USA)를 사용하였다. 시약은 Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich 47641-100ML), DPPH (Sigma-Aldrich D9132-5G), ABTS (Sigma-Aldrich A1888-1G)를 분석에 사용하였다.

### DPPH 라디칼 소거능

DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 라디칼 소거 활성은 Bang and Ahn (2019)의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료 20 µL에 0.2 mM DPPH 180 µL를 첨가하여 vortex mixer로 혼합하고 30분 동안 실온에 방치한 후 spectrometer (spectramax M2 microplate reader, Molecular Devices, San Jose, CA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 다음의 계산식을 이용하여 산출하였다.

$$\begin{aligned} & DPPH\text{radical scavenging activity}(\%) \\ &= \left( \frac{\text{Control } O.D. - \text{Sample } O.D.}{\text{Control } O.D.} \right) * 100 \end{aligned}$$

### ABTS 라디칼 소거능

ABTS[2,2-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)] 라디칼 소거능은 Kim (2016)의 방법에 따라 실험하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 1:1 비율로 혼합한 후 냉암소에서 ABTS 라디칼이 생성되는 24시간 동안 방치하였다. 제조한 ABTS 용액을 실험 직전에 분광광도계를 이용하여 732 nm 파장에서 흡광도 0.700이 되도록 에탄올로 희석하여 사용하였다. 시료에 제조한 ABTS 용액을 첨가하여 냉암소에서 정확히 10분간 반응시킨 후 735 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조구는 시료 대신 동일한 양의 메탄올을 사용하였다.

$$\begin{aligned} & ABTS\text{radical scavenging activity}(\%) \\ &= \left( 1 - \frac{\text{Sample } O.D.}{\text{Control } O.D.} \right) * 100 \end{aligned}$$

### FRAP 활성 측정

FRAP (Ferric reducing antioxidant power) 분석은 FRAP™ colorimetric detection kit (Arbor Assays, MI, USA)를 사용하였으며 제조사에서 제공한 실험방법 따라 실시하였다. 분광광도계를 이용하여 560 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고 FRAP 활성도는 Fe (II) 표준곡선에 대한 선형 방정식을 기반으로 평가하였다.

### 총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Kim and Kim (2016)의 방법을 응용하여 측정하였다. 시료 100 µL에 Folin-Ciocalteu reagent 50 µL를 첨가하고 증류수 750 µL를 넣어 잘 섞어 준 다음 5분간 실온에서 반응시킨 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL를 가하여 1시간 동안 발색시킨 다음 분광광도계를 이용하여 725 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 이용하여 표준검량곡선을 작성하였고, 이로부터 시료의 총 폴리페놀 함량을 산출하여 mg GAE/g으로 나타냈다.

### 통계처리

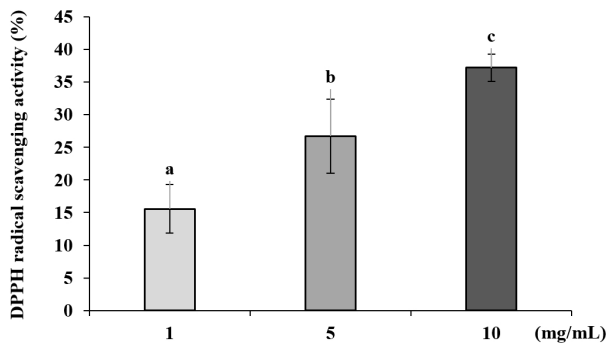
본 실험결과의 통계 분석은 SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 SPSS user manual (Pallant, 2011)를 사용하여 분산분석(ANOVA)를 실시하였으며, 시료 간의 유의성은

Duncan's multiple range test로 차이를 검정하였다 ( $p < 0.05$ ).

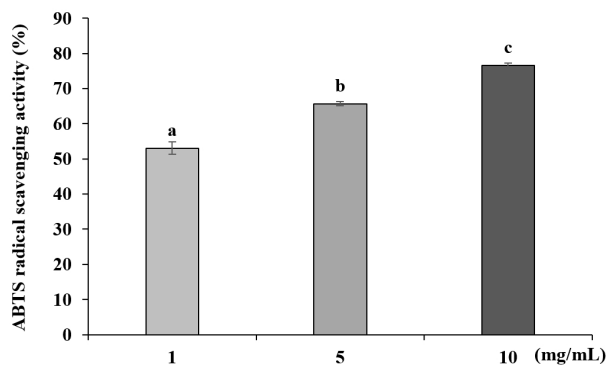
## 결과 및 고찰

### DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성

국내 생산 감로꿀의 항산화 활성을 측정하기 위하여 비색법으로 널리 사용되는 DPPH 자유라디칼과 ABTS 양이온 라디칼을 이용하여 소거능으로 평가하였으며, 그 결과를 Fig. 1과 Fig. 2에 나타냈다. 감로꿀을 메탄올로 희석하여 농도별로 첨가하였을 때, 최고농도(10 mg/mL)에서 DPPH와 ABTS 라디칼을 각각 26%, 86% 소거하였으며 ABTS 라디칼에서 3배 이상 높은 활성을 나타냈다. DPPH와 ABTS는 분석시료의 항산화력을 측정하는 유사한 방법이지만 분석시료에 존재하는 소수성 또는 친수성 항산화 물질에 따라 라디칼에 결합하여 소거능력의 차이를 나타내는데(Lee et al., 2014), 감로꿀에 포함된 화학적 성분이 DPPH보다는 ABTS에 더 높게 반응하는 전자공여체로



**Fig. 1.** DPPH radical scavenging activity of honeydew honey. Data was expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.



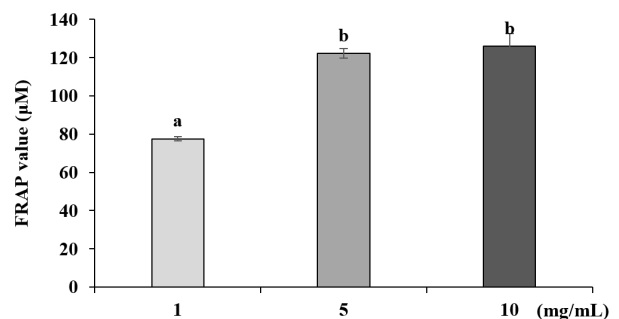
**Fig. 2.** ABTS radical scavenging activity of honeydew honey. Data was expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

작용하여 활성차이를 나타낸 것으로 판단된다. 한편, Lee et al. (2022)은 항산화제로 사용되는 비타민 C (ascorbic acid)를 본 실험에서 사용한 동일한 라디칼 소거능을 측정하였을 때, 20  $\mu\text{g/mL}$ 에서 DPPH와 ABTS를 각각 45%, 56% 소거한다고 보고하였다.

Seraglio et al. (2019)은 스페인, 그리스, 세르비아 등 유럽에서 생산되는 감로꿀은 참나무속(*Quercus*), 소나무속(*Pinus*), 전나무속(*Abies*) 식물로부터 유래된 것이 대부분이며 DPPH 라디칼 소거능은 52.9~95.6%로 보고하였다. 국내 생산 감로꿀은 유럽산 감로꿀에 비하여 다소 낮은 DPPH 라디칼 소거능을 나타냈는데, 시료를 희석하는 용매 종류와 DPPH 라디칼 용액의 농도 등 실험 방법의 차이 및 감로꿀이 수집된 지역의 위치, 밀원 식물의 종류, 기후조건, 토양 조성에 따라 활성 차이를 보인 것으로 판단된다.

### FRAP 활성

FRAP는 ferric tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) 복합체가 항산화제에 의하여 ferrous tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ)로 환원되는 정도를 측정하는 항산화 활성 측정방법이다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 감로꿀을 농도 별로 처리하였을 때, 최고농도(10 mg/mL)에서 FRAP value ( $\text{Fe}^{2+}$ )는 126  $\mu\text{M}$ 이었으며 감로꿀에 함유된 항산화 성분이 수소 원자를 공유하여 라디칼의 연쇄반응을 감소시킨 결과라 판단된다. Lee et al. (2022)은 항산화제로 널리 알려진 비타민 C 1 mg/mL의 농도에서 FRAP value ( $\text{Fe}^{2+}$ )가 700  $\mu\text{M}$ 로 보고하였다. 감로꿀의 FRAP 활성은 처리 농도에 따라 ABTS 소거능과 유사한 결과를 보였으며 Pichichero et al. (2009)은 이탈리아에서 생산된 *Thymus vulgare* 유래 감로꿀의 FRAP value가 695  $\mu\text{M}$ 로 꿀벌 유래 벌꿀보다 높은 함량을 나타낸다고 보고하였다.



**Fig. 3.** FRAP activity of honeydew honey. Data was expressed as mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

## 총 폴리페놀 함량

페놀성 화합물은 페닐기(phenyl)에 수산기(hydroxyl)가 결합한 방향족 화합물의 총칭으로 플라보노이드(flavonoid), 페놀산(phenolic acid), 탄닌(tannin) 등을 포함한 식물 유래 2차 대사산물로 알려져 있다. 페놀성 화합물은 항산화, 항균, 항암 등 다양한 생리활성을 가지고 있다. 특히, 항산화 활성이 우수하여 체내 활성산소종(reactive oxygen species)의 과도한 증가를 막고 세포를 구성하는 DNA의 산화를 방지하여 암, 심혈관 및 퇴행성 질환을 예방하는 것으로 알려져 천연 항산화제로 인식되고 있다(Kim and Shu, 2005; Kang and Lee, 2021). 국내 생산 감로꿀에 포함된 총 폴리페놀 함량은 73.41 mg GAE/kg로 측정되었다(Table 1). 감로꿀의 성분 연구는 주로 유럽에서 활발하게 진행되고 있는데 Recklies et al. (2021)은 유럽산 감로꿀에는 acacetin, apigenin, chrysin, galagin, benzoic acid, caffeic acid, ferulic acid, gallic acid 등 30 종 이상의 페놀성 화합물이 존재하며 밀원식물에 따라 구성성분 및 함량 차이를 나타낸다고 보고하였다. 또한, 노린재목 진딧물아목(Hemiptera: Sternorrhyncha) 식물 수액 흡즙 곤충 유래 감로꿀의 경우 꽃꿀 유래 벌꿀에는 거의 없는 삼당류 물질 melezitose가 높게 존재한다고 보고하였다(Haroun et al., 2012; Seraglio et al., 2019; Recklies et al., 2021). 최근 들어 국내 일부 지역에서도 감로꿀이 생산되고 있다(Kim et al., 2019; Choi and Nam, 2020). 국내 생산 감로꿀의 기능성 소재로 활용하기 위한 식물 기원, 구성성분 및 꽃꿀 유래 벌꿀과의 차이 구명 대한 추가 연구가 필요하다.

국내 생산 감로꿀의 기능성 식품 소재로 활용하기 위하여 DPPH와 ABTS 라디칼 소거능, FRAP 활성, 총 폴리페놀 함량 분석을 통하여 항산화 활성을 평가하였다. 국내 생산 감로꿀은 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성을 보였으며 최고농도 10 mg/mL에서 DPPH에 비하여 ABTS 라디칼 소거능이 3배 이상 높게 측정되었다. FRAP 분석에서는 ferric ion ( $Fe^{3+}$ )를 126  $\mu$ M의 ferrous ( $Fe^{2+}$ )로 환원시켰다. 또한, 국내 생산 감로꿀에 함유된 폴리페놀성 화합물의 총량은 73.41 mg GAE/kg로 확인되었다. 이상의 연구결과에 비추어 볼때, 국내 생산 감로꿀의

**Table 1.** Total polyphenol content of honeydew honey

Sample	Total polyphenol content (mg GAE/kg) <sup>1)</sup>
Honeydew honey	73.41±0.04

Data was expressed as mean ± standard deviation.

<sup>1)</sup>Gallic acid equivalent mg GAE/kg of raw honey

우수한 라디칼 소거능과 환원력을 가지며 천연 항산화제로 알려진 페놀성 화합물을 존재로 인하여 항산화 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 본 연구결과는 국내 생산 감로꿀의 기능성 식품 소재로 활용할 수 있는 기초자료로 제공하는 바이다.

## 사사

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ01574601)에 의하여 수행되었으므로 감사를 드립니다.

## Statement for Authorship Position & Contribution

- Kim, S.-G.: National Institute of Agricultural Science, Researcher; Designed the research, conducted the experiments, and wrote the manuscript
- Kim, H.-Y.: National Institute of Agricultural Science, Researcher; Conducted the experiments
- Choi, H.-M.: National Institute of Agricultural Science, Researcher; Conducted the experiments
- Lee, H.-J.: National Institute of Agricultural Science, Researcher; Conducted the experiments
- Han, S.-M.: National Institute of Agricultural Science, Researcher; Designed the research and wrote the manuscript

All authors read and approved the manuscript.

## Literature cited

- Bang, H.J., Ahn, M.R., 2019. Antioxidant and antiangiogenic activities of bee pollen collected in various regions of Korea. *J. Apic.* 34, 87-89.
- Choi, S.H., Nam, M.S., 2020. Classification of honeydew and blossom honeys by principal component analysis of physicochemical parameters. *Korean J. Agric. Sci.* 47, 67-81.
- Escuredo, O., Seijo, M.C., 2019. Honey: chemical composition, stability and authenticity. *Foods* 8, 577.
- Haroun, M.I., Poyrazoglu, E.S., Konar, N., Arti, N., 2012. Phenolic acids a flavonoids profiles of some Turkish honeydew and floral honeys. *J. Food Technol.* 10, 39-45.
- Iglesias, M.T., Martín-Álvarez, P.J., Polo, M.C., de Lorenzo, C. Pueyo, E., 2006. Protein analysis of honeys by fast protein liquid chromatography: application to differentiate floral and honeydew

- honeys. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8322-8327.
- Kang, H., Lee, S.G., 2021. Antioxidant capacity of ethanol extracts and fractions from *Rubus coreanus* Miq. *J. Plant Biotechnol.* 48, 264-270.
- Kim, C.J., Suh, H.J., 2005. Antioxidant activities of rhubarb extracts containing phenolic compounds. *J. Korean. Soc. Food Cult.* 20, 77-85.
- Kim, C.S., Kim, H.K., 2016. Antioxidative activity of Makgeolli supplemented with pollen. *J. Foodserv. Managem.* 19, 339-354.
- Kim, H.K., Lee, M.Y., Hong, I.P., Choi, Y.S., Kim, N.S., Lee, M.L., Lee, S.C., 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral honey correlation with phenolic and flavonoid contents. *J. Apic.* 25, 275-282.
- Kim, S.G., Kim, H.Y., Choi, H.M., Lee, H.J., Moon, H.J., Han, S.M., 2021. A rapid method for determination of kynurenic acid in Korean chestnut (*Castanea crenata*) Honey by UPLC. *J. Apic.* 36, 183-188.
- Kim, S.G., Woo, S.O., Bang, K.W., Kim, H.Y., Choi, H.M., Moon, H.J., Han, S.M., 2019. Amino acids and vitamins analyses of Korean honeydew honey produced in summer. *J. Apic.* 34, 261-264.
- Kim, S.J., 2016. Changes in approximate composition, antioxidant activity and melatonin content of rapeseed during germination. *Korean J. Food Preserv.* 23, 839-847.
- Lee, B.G., Kim, J.H., Ham, S.G., Lee, C.E., 2014. Study on biological activities of extracts for cosmeceutical development from *Lagerstroemia indica* L. branch. *Korean J. Plant Res.* 27, 29-34.
- Lee, H.J., Han, S.M., Woo, S.O., Kim, H.Y., Choi, H.M., Kim, S.G., 2022. Antioxidant activity of *Prunus serrulata* var. spontanea pollen collected by *Apis mellifera*. *J. Apic.* 37, 45-50.
- National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration. 2021. Research on the status of beekeeping industry in Korea. Wanju, p. 39.
- Pallant, J., 2011. SPSS survival manual-a step by step guide to data analysis using SPSS. 4th ed. Allen and Unwin. Australia.
- Pichichero, E., Canuti, L., Canini, A., 2009. Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *J. Sci. Food Agric.* 89, 609-616.
- Prasain, J.K., Wang, C.C., Barnes, S., 2004. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radic. Biol. Medi.* 37, 1324-1350.
- Recklies, K., Peukert, C., Kölling-Speer, I., Speer, K., 2021. Differentiation of honeydew honeys from blossom honeys and according to their botanical origin by electrical conductivity and phenolic and sugar Spectra. *J. Agric. Food Chem.* 69, 1329-1347.
- Seraglio, S.K.T., Silva, B., Bergamo, G., Brugnerotto, P., Gonzaga, L.V., Fett, R., Costa, A.C.O., 2019. An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. *Food Res. Int.* 119, 44-66.
- Solayman, M., Islam, M., Paul, S., Ali, Y., Khalil, M., Alam, N., Gan, S.H., 2016. Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: a comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 219-233.