

## 고엽산 생산능의 유산균 탐색 및 발효 조건 최적화

두경민<sup>1</sup> · 박세진<sup>1</sup> · 박명수<sup>2</sup> · 지근억<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 식품영양학과 식품미생물 연구실, <sup>2</sup>연성대학교 식품과학부 호텔조리과, <sup>3</sup>(주)비피도

### Screening of Lactic Acid Bacteria for Strong Folate Synthesis and Optimization of Fermentation

Kyung Min Du<sup>1</sup>, Se Jin Park<sup>1</sup>, Myung Soo Park<sup>2</sup>, and Geun Eog Ji<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Research Institute of Human Ecology, Seoul National University

<sup>2</sup>Department of Hotel Culinary Arts and Tourism, Yeonsung University

<sup>3</sup>Research Institute, Bifido Inc.

**Abstract** Folate is a water-soluble vitamin B that is required for the synthesis of amino acids and nucleic acids. It plays an important role in cell division and cell growth in several living organisms. The purpose of this study was to screen strong folate-synthesizing bacteria and to optimize their culture conditions for folate production. Folate production was quantified by microbiological assays by using folate-dependent strain *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237. Folate derivatives were identified by LC-MS/MS. Of the 65 strains of bifidobacteria and lactobacilli tested, *L. plantarum* Fol 708 demonstrated the greatest ability to produce folate. Its optimal pH for folate production was 5.5 in a pH-controlled, lab-scale fermenter. Coculturing *L. plantarum* Fol 708 with *L. brevis* GABA 100 in a milk medium enhanced the level of folate produced in comparison to culturing *L. plantarum* Fol 708 alone.

**Keywords:** folate, microbiological assay, fermented-food, lactobacilli, co-culture

## 서 론

엽산은 수용성 비타민 B군에 속하며, 아미노산 합성과 핵산 합성 및 세포 분열과 성장에 중요한 cofactor로 작용한다. 엽산은 pteridine, para-aminobenzoic-acid, glutamate로 구성되어 있으며, 식품에 존재하는 엽산은 대부분 glutamate가 3-11개 결합된 polyglutamate 형태이고, 보충제 형태는 glutamate가 1개 결합된 monoglutamate 형태를 이루고 있다(1). 임신 중 엽산 섭취가 부족해지면 태아 발생 과정에서 신경관 형성이 제대로 이루어지지 않게 되고, 이러한 증상을 예방하기 위해 가임기 여성에 엽산 보충제 섭취가 권장되고 있다(2). 최근 연구 결과에 따르면 엽산을 일일 권장량 수준으로 꾸준히 섭취할 경우, 심혈관계 질환 및 각종 암, 빈혈, 성장 지연 등을 예방할 수 있다는 연구 결과가 보고되고 있다(3). 한국인 엽산 일일 권장량은 성인의 경우 200-400 µg 이며, 임산부의 경우 600 µg이다. 엽산의 주요 급원은 녹색채소와 일부 유산균 발효 식품이다(4). 엽산의 형태는 folate (천연 형태)와, folic acid (합성 형태), 그 외 pteroyl-L-glutamate으로 되어 있으며(4), 보충제인 folic acid는 체내 흡수된 후 간에서 tetrahydrofolate, 또는 다른 형태의 folate로 전환된 후에 생리 활성을 나타내어 체내에

서 이용된다(5). 일부 연구에서 과도한 folic acid 섭취로 인해 혈액 내의 vitamin B<sub>12</sub>의 부족을 진단하기 어렵게 한다는 점이 보고되고 있으며(4), 이러한 문제점에 대한 해결 방안으로 미생물을 이용하여 생성된 엽산을 공급하는 방안이 제시된 바 있다(1).

본 연구에서는 프로바이오틱스로서의 장점을 갖는 유산균들을 대상으로 하여 엽산 생성 균주에 주목하였다. 총 65균주의 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*를 이용하여 plate screening을 통해 엽산 생성 능력을 가지는 균주를 선발하였다. 생성된 엽산의 정성 분석을 위해 LC-MS/MS (liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry)를 이용하였으며, 엽산 생성 능력이 가장 우수한 균주를 이용하여 엽산 생성을 증가시킬 수 있는 조건들을 조사하였는데, 본 연구의 결과는 엽산을 고농도로 함유한 발효 식품 개발의 기초 자료로 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 성장 조건

엽산 생성 능력의 확인을 위해 서울대학교 식품영양학과 식품미생물 연구실에서 보관중인 총 65종의 *Lactobacillus* 및 *Bifidobacterium*을 사용하였으며, microbiological assay에는 *L. rhamnosus* KCTC 3237 (ATCC 7469)가 사용되었다. 모든 균주는 MRS (deMan, Rogosa and Sharpe, BD, Franklin Lake, NJ, USA)에서 배양한 후 25% glycerol (Samchun, Pyoungtaek, Korea)이 포함된 stock 상태로 -80°C에서 보관하였다. L-cysteine hydrochloride (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)가 0.05% 수준으로 첨가된 MRS broth를 121°C에서 15분간 멸균한 뒤, 균주를 혐기조건에서 37°C, 18시간, 1회 계대배양 후 사용하였다.

\*Corresponding author: Geun Eog Ji, Department of Food and Nutrition, Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
Tel: 82-2-880-8749  
Fax: 82-2-884-0305  
E-mail: geji@snu.ac.kr  
Received December 24, 2013; revised February 27, 2014;  
accepted March 4, 2014

**엽산 생성 균주 확인**

유산균의 엽산 생성 능력을 확인하기 위해, L-ascorbic acid (50 mg/100 mL, Sigma, Buchs, Switzerland)가 첨가된 folic acid casei medium (FACM, BD-Falcon Bioscience, Lexington, TN, USA)을 이용하였다. 이 때 L-ascorbic acid가 첨가된 FACM agar 배지는 121°C에서 5분간 멸균하여, 미리 8 mL의 MRS 배지에 18시간 배양된 엽산생성 후보균주를 13,500×g에서 2분 30초간 원심분리하여 균체를 얻어 이를 1 mL의 멸균생리식염수(0.9%, w/v, NaCl)에 현탁한 후 10 µL 접종하였다. 접종한 FACM agar 배지는 혐기조건에서 37°C, 48시간 배양 후, 26종의 *Lactobacillus*와 39종의 *Bifidobacterium* 중, 집락 형성이 확인된 경우 엽산생성능력이 있는 균주로 1차 선별하였다.

**Microbiological assay를 이용한 엽산 생성 균주의 정량 분석**

FACM 배지(FACM broth 9.4 g, L-ascorbic acid 50 mg)에서 선별된 11균주를 혐기조건에서 37°C, 18시간, 2회 계대배양 후 사용하였다. 이 때 L-ascorbic acid가 첨가된 FACM배지는 121°C에서 5분간 멸균하여 이용하였다. 배양 후 수확한 세포를 13,500×g에서 2분 30초간 원심분리한 후, 상등액과 세포를 분리하였다. 원심분리를 통해 침전시킨 세포는 1 mL의 멸균된 엽산 완충용액(0.08 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Amresco, Solon, OH, USA), 0.02 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Amresco), 0.1% L-ascorbic acid, 최종 pH 6.1±0.05)에 녹인 후, 4°C에서 초음파 세포 파쇄기로 2분 30초(1초 켜고, 1초 끄)간 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포와 원심분리를 통해 분리한 배양상등액을 각각 85°C에서 30분간 열처리하였다. 이 후 세포 파쇄액을 13,500×g에서 2분 30초간 원심분리 하여 상등액을 수거하고, 다시 엽산 완충용액에 녹여 세포를 풀어준 후, 13,500×g에서 2분 30초간 원심분리 하여 상등액을 다시 수거하였다. 세포 파쇄를 통해 얻은 상등액과 배양 상등액을 각각 0.2 µm 필터(Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA)로 제공한 후, 엽산의 glutamic acid를 제거해 주는 효소인 gamma-glutamyl hydrolase (Pro-spec, Ness-ziona, Israel)를 첨가하여 37°C, 200 rpm (JEIO TECH, Seoul, Korea)에서 18시간 동안 처리하였다(6).

Microbiological assay에 이용되는 엽산 의존성 균주인 *L. rhamnosus* KCTC 3237는 0.2 µm 필터로 멸균된 folic acid (농도 0.2 ng/mL)가 첨가한 FACM 배지에서 2회 계대배양 후 이용하였다. Microbiological assay 전 멸균생리식염수(0.9% NaCl, w/v)로 *L. rhamnosus* KCTC 3237를 3회 세척하였다.

Microbiological assay는 멸균된 96-well microtiter plate (well 부피 300 µL, Corning, NY, USA)에서 3회 반복 실험하였다. 각 well은 100 µL의 FACM 배지와, 100 µL의 folic acid 표준물질 또는 시료물질, 10 µL의 *L. rhamnosus* KCTC 3237으로 구성되었다(6). 시료 또는 표준물질에 *L. rhamnosus* KCTC 3237을 접종한 후, 혐기 조건에서 37°C, 18시간 배양 후, 600 nm의 파장에서 microplate reader (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(7).

***L. plantarum* Fol 708에서 생성된 엽산의 정성 분석**

선별 균주인 *L. plantarum* Fol 708에서 생성된 엽산을 정성 분석하기 위해 LC-MS/MS (AB sciex instrument 3200 Q TRAP, MA, USA)를 이용하여 3회 반복측정 하였다. 정성 분석에 이용한 표준물질은 체내 엽산 대사체 중 가장 많이 발견되는 형태인 (6S)-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid (Schircks laboratories, Jona, Switzerland)와 (6S)-5CH<sub>3</sub>-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid (Schircks laboratories)이며, C<sub>18</sub>-column으로(2.0×100 mm, 3 µm, Phenomenex,

Macclesfield, UK) 이동상의 속도는 1.0 mL/min로 하며, 컬럼 온도는 25°C로 설정하여 측정하였고, 시료 10 µL을 주입하였다(8). 엽산 표준물질은 100% 메탄올(0.1% L-ascorbic acid, 0.1% citric acid)에 녹였으며, acetonitrile과 증류수(0.1% ammonium acetate)를 각각 1:10의 비율로 섞어준 용액으로 희석하였다(8). 미지시료는 희석용액(75 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 52 mM ascorbic acid, 0.1% 2-mercaptoethanol, pH 6.0)으로 희석하여 분석하였다(8). 이동상은 메탄올/증류수(5/95, v/v (A))용액과 메탄올에 5 mM의 diethylhexylamine 이 첨가된 용액(pH 8.1 (B))이 이용되었고, 조건으로는 0-5분(22%A, 78%B), 5-20분(20%A, 80%B) 20-25분(100%B)를 사용하였다(8).

***L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100의 우유배지 내 공동 배양을 통한 엽산 생성**

멸균된 MRS (0.05% L-cysteine hydrochloride) 배지에서 미리 1차 배양된 *L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100을 멸균생리식염수(0.9% NaCl, w/v) 1 mL에 각각 현탁한 후, 1% glutamic acid (Junsei Chemical, Tokyo, Japan)를 첨가한 10 mL의 우유배지에 접종하였다. 우유배지는 95°C에서 30분간 멸균하여 이용하였다. 균주의 접종은 *L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100의 단독 배양과, 공동 배양의 경우 *L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100의 접종 비율을 각각 1:1, 10:1, 1:10 (v/v)으로 하였다. 시료는 12시간마다 채취하고, 시료 채취 후 pH 변화를 측정하였다. 엽산 함량은 microbiological assay를 이용하여 분석하였다.

**pH 조절 발효 조건에서 *L. plantarum* Fol 708으로부터 생성된 엽산 정량 분석**

MRS (0.05% L-cysteine hydrochloride) 배지에 미리 1차 배양된 *L. plantarum* Fol 708을 멸균된 800 mL의 MRS 배지에 1% (v/v) 접종하였다. 배양은 동시 배양기(Multi-fermentation system, CNS. Co, Seoul Korea)를 이용하여 혐기 조건, 37°C에서 70시간까지 배양하였고, 배양 초기부터 pH 조건을 각각 4.5, 5.5, 6.5로 고정하였다. 시료 채취는 각각 0, 12, 24, 48, 70시간에 이루어졌고, 배양 배지와 균주에 존재하는 엽산을 각각 microbiological assay를 이용하여 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**엽산 합성 균주의 탐색**

엽산 생성 능력이 있는 유산균의 선별을 위해, 초기 plate screening에서 65균주를 이용하였다. 그 결과 총 11종의 *Lactobacillus* sp.에서 엽산 생성이 가능함을 확인하였다(Table 1).

**선별 균주의 엽산 정량 분석**

선별된 11균주의 *Lactobacillus*를 FACM배지에서 배양한 후, 생성된 엽산을 microbiological assay를 통하여 정량하였다. 분석 결과 11균주 중, 엽산 생성능력이 높은 총 3균주를 선택하였다. 선택된 3균주는 *L. plantarum* Fol 708, *L. reuteri* ATCC 53608, *L. brevis* 651이며, 총 엽산 생성은 각각 약 25, 3 및 2 µg/100 mL이었다(Table 2). 선택 균주의 엽산 생성을 살펴보면, 가장 높은 생성을 보인 *L. plantarum* Fol 708의 경우 동일한 배지 및 배양 조건에서 기존 *L. plantarum*의 생성능력으로 알려진 4.5 µg/100 mL 보다 약 5배 높은 생성능을 보여주었다(1). 이러한 엽산 생성능력은 동일한 배양 조건에서 상업 균주로 이용되고 있는 *Strepto-*

**Table 1. Bacterial strains used in this study**

Strain	Growth degree
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ART 57	w
<i>B. longum</i> ART 32	w
<i>B. bifidum</i> ART 104	w
<i>B. infantis</i> ART 1	w
<i>B. longum</i> KCTC 15707	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 1	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 9	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 23	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 32	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 40	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 42	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 43	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 47	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 48	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 56	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 69	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 71	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 79	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 81	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 5	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 22	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 24	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 35	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 41	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 51	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 53	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 59	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 66	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 6	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 7	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 10	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 30	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 36	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 37	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 38	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 39	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 46	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 49	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 54	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 61	w
<i>Bifidobacterium</i> sp. RD 72	w
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ART 5	w
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i> ART 7	w
<i>Weissella confusa</i> ART 8	w
<i>L. plantarum</i> ART 2	w
<i>L. acidophilus</i> ART 3	w
<i>L. casei</i> 704	w
<i>L. casei</i> KCTC 3110	w
<i>L. cremoris</i> ART 9	w
<i>L. helveticus</i> LHB-2	w
<i>L. brevis</i> ART 100	w
<i>L. brevis</i> 221	w
<i>L. brevis</i> 805	w
<i>L. brevis</i> 806	w

**Table 1. Continued**

Strain	Growth degree
<i>L. brevis</i> 239	+
<i>L. brevis</i> 353	+
<i>L. brevis</i> 651	++
<i>L. brevis</i> IFO 12005	+
<i>L. bulgaricus</i> 3188	+
<i>L. casei</i> KFRI 196	++ or +
<i>L. casei</i> 911	+
<i>L. delbrueckii</i> KCTC 1047	+
<i>L. reuteri</i> ATCC 53608	++++
<i>L. rhamnosus</i> GG	++
<i>L. plantarum</i> Fol 708	+++

Grows very well: +++++, Grows well: +++, Grows: ++, Grows rarely: +, Grows very poorly: w

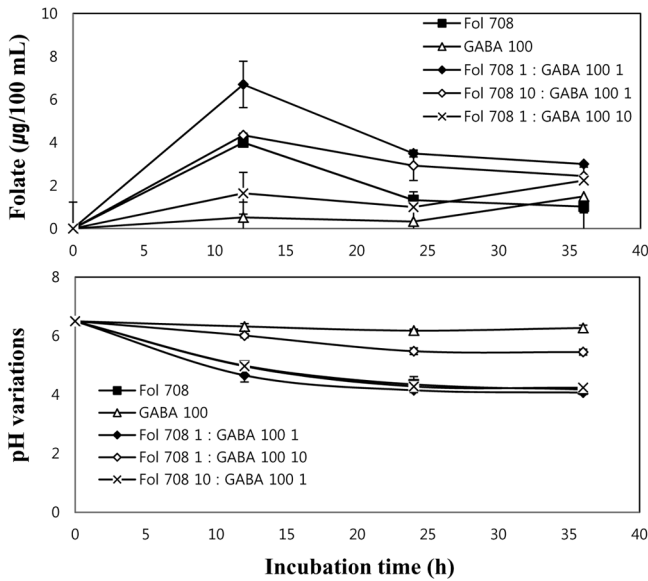
**Table 2. Microbiological assay of intra- and extra-cellular folate synthesized from the selected strains in folic acid casei medium**

Strains	<i>L. plantarum</i> Fol 708	<i>L. reuteri</i> ATCC53608	<i>L. brevis</i> 651
Intra-folate (µg/100 mL)	20	2	1
Extra-folate (µg/100 mL)	5	1	1
Intra-folate/dry cell mass (µg/g)	340	29	6

*coccus thermophilus* (20 µg/100 mL)와 유사한 수준이다(1,2). 선발된 균주의 엽산 생성을 균체 내부와 배양 상등액으로 나누어 비교해 본 결과, 균체 내부에서 생성된 엽산의 농도가 배양 상등액에서 생성된 농도보다 높게 나타났다(Table 2). 특히 *L. plantarum* Fol 708의 경우, 균체 내부의 엽산 농도가 배양 상등액보다 약 4 배 더 높게 나타났다. 엽산 생성 균주의 엽산 생성량과 건조 중량의 상관관계는 Table 2에서와 같이 균주 간 연관성이 나타나지 않았다. 시료 전처리 과정 중,  $\gamma$ -glutamyl hydrolase를 처리하지 않고 분석한 엽산 생성 결과를 처리한 결과와 비교해 보면, 효소를 처리한 쪽에서 엽산의 농도가 높게 나타난 것을 확인 할 수 있었고(data not shown), 이러한 차이는 엽산이 polyglutamate 형태로 생성된다는 것을 의미하며(2), Hyun과 Tamura(9)의 연구에서도 유사한 경향을 확인할 수 있었다. 또한 microbiological assay에 이용되는 엽산 의존성 균주인 *L. rhamnosus* KCTC 3237는 엽산 분석 중 mono-glutamate 또는 di-glutamate 형태의 엽산을 주로 이용하기 때문에(9), 시료 전처리 과정에서 18시간 동안 효소와 반응시켜 엽산을 mono-glutamate 형태로 전환시킨 후 분석하였다. 이러한 엽산 시료의 전처리 방법은 기존 연구들에서 사용된 방법인 tri-enzyme법(9)과는 처리한 효소의 종류 및 반응 시간에서 차이를 보이며, 이러한 시료의 전처리 과정은 엽산의 열 안정성을 고려하여 손실률을 줄이기 위함이었다(6,9).

#### *L. plantarum* Fol 708의 엽산 정성 분석

선발 균주인 *L. plantarum* Fol 708이 생성하는 엽산의 정성 분석을 위해 표준물질로 엽산의 주요 대사 형태인 tetrahydrofolic acid와 5-CH<sub>3</sub>-tetrahydrofolic acid를 분석한 후, 시료에서 합성된 엽산의 존재를 확인하였다(10). 표준물질과 시료는 LC-MS/MS 상에서 모두 positive ion mode로 분석하였고, 분석 결과 표준물질인 tetrahydrofolic acid는 precursor ion값이 446.1 m/z이고, prod-



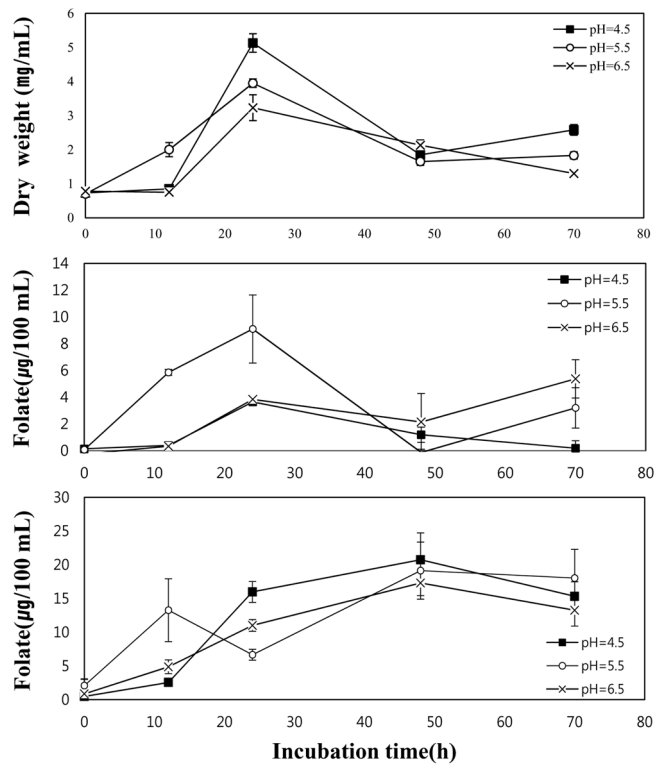
**Fig. 1.** Concentration of folate in cultures of *L. plantarum* Fol708 and *L. brevis* GABA 100 (a), and time-dependent pH change of culture media in different culture conditions using milk media containing 1% glutamic acid (b).

uct ion값이 299.1 m/z으로 확인되었다(8). 본 실험에 사용된 5-CH<sub>3</sub>-tetrahydrofolic acid는 precursor ion 값이 460 m/z이고, product ion값이 313.2 m/z으로 확인되었다(8). 시료에서 표준물질로 정한 tetrahydrofolic acid와 5-CH<sub>3</sub>-tetrahydrofolic acid의 product ion값과 precursor ion값이 모두 확인되었다(data not shown). 이러한 결과를 통해 생성된 엽산의 형태 중 tetrahydrofolic acid와 5-CH<sub>3</sub>-tetrahydrofolic acid의 화학적 motif를 확인할 수 있었다.

***L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100의 우유배지 내 공동 배양을 통해 생성된 엽산 정량 분석**

엽산 생성이 확인된 균주 중, 가장 높은 생산성을 보인 *L. plantarum* Fol 708의 배양 중 급격한 pH 감소로 인한 균체량 감소를 억제하고, 이를 통한 엽산 생성 증가를 목적으로 *L. brevis* GABA 100과 공동 배양하였다. Glutamic acid가 1% 첨가된 우유 배지에서 *L. plantarum* Fol 708와 *L. brevis* GABA 100를 각각 단독 배양하고, 공동 배양의 경우 *L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100에서 접종 비율이 각각 1:1, 10:1, 1:10(v/v)이었다. 배양 과정에서 시료를 수집할 때 pH변화도 같이 측정하였다. 측정 결과 단독 배양의 경우, *L. plantarum* Fol 708은 약 4 µg/100 mL의 엽산 생성을 보여주었고, *L. brevis* GABA 100의 경우에는 엽산을 거의 생성하지 않았다(Fig. 1). pH 변화는 *L. plantarum* Fol 708에 경우 6.5에서 4.2로 감소하였으나, *L. brevis* GABA 100의 경우에는 6.5에서 6.2로 *L. plantarum* Fol 708보다 감소폭이 작은 것으로 측정되었다.

공동 배양의 경우, 1:1 접종 비율에서 가장 높은 약 8 µg/100 mL의 엽산 생성을 보여주었고, 10:1과 1:10의 비율에서는 *L. plantarum* Fol 708 단독 배양과 같거나 더 낮은 생성을 보여주었다(Fig. 1a). pH 변화에서도 1:1 접종 비율의 경우, 6.5에서 4.1으로 감소하였으나, 나머지 접종 비율에서는 pH 변화폭이 1:1보다 작은 것으로 측정 되었다(Fig. 1b). 최대 엽산 생성 시간은 모든 조건에서 12시간으로, 그 이후에는 생성된 엽산의 양이 감소하는 것으로 측정되었다. 이러한 결과는 저지방 우유배지에서 *S.*



**Fig. 2.** Time course profiles of dry weight of the cells grown in different pH controlled media (a) concentrations of intracellular folate (b) and extracellular folate (c).

*thermophilus*의 엽산 합성능력을 연구한 Lin과 Young(5)의 경우와 같이 균주의 성장기에 엽산 생성은 균체의 증가에 따라 증가하지만, 이후에는 엽산 생성균주가 합성된 엽산을 소비하여 농도가 감소한다는 연구결과와 유사함을 확인할 수 있었다.

**pH 조절 발효 조건에서 *L. plantarum* Fol 708의 엽산 생성 정량 분석**

엽산 생성이 가장 높은 *L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100의 공동 배양을 통해 확인된 엽산 생성 조건 중, pH의 영향을 확인하기 위해 *L. plantarum* Fol 708의 배양 기간 중 pH를 각각 4.5, 5.5, 6.5으로 유지한 상태에서, 생성된 엽산의 정량 분석과 균주의 건조중량을 측정하였다. 분석 결과 최대 엽산 합성은 균체 내부의 경우 pH 5.5에서 약 8 µg/100 mL으로 측정되었고, 배양 상등액의 경우 pH 5.5에서 약 20 µg/mL으로 측정되었다. 합성 균주의 건조 중량은 pH 4.5에서 24시간에 약 5.13 mg/mL으로 가장 높게 측정되었다(Fig. 2a). 최대 엽산 생성 시간은 균체 내부의 경우 24시간(Fig. 2b), 배양 상등액의 경우 48시간(Fig. 2c)으로 측정되었고, 건조 중량의 경우 24시간에서 가장 높게 측정되었으며, 최대 측정 시간 이후, 균체 및 배양 상등액의 엽산 농도와 건조 중량 모두 감소하는 경향을 보였다. 고정된 pH의 MRS 배지에서 배양한 *L. plantarum* Fol 708의 최대 엽산 생성 시간은 FACM배지에서 배양한 후 엽산을 정량 분석한 과정에서 나타난 시간인 18시간보다 증가하였다. 엽산의 생성을 보기 위해 FACM배지에서 배양한 양은 8 mL이었고, pH를 고정된 상태에서 배양한 양은 800 mL이었다. 최대 엽산 생성 시간의 차이와 함께, 생성된 엽산의 농도에서도 균체 보다는 배양 상등액에서 더 높은 농도가 측정되었다. 이러한 배양용량의 증가로 인

해 배양 중 여러 성장단계가 나타나며, 시간에 따라 증가하는 세포 파괴로 용출된 엽산이 증가하여, 배양 상등액의 엽산 농도가 증가한 것으로 판단된다. pH별 엽산 생성의 경향을 살펴 보면, 균체 내의 농도는 5.5에서 가장 높게 나타났고, 배양 상등액의 농도는 4.5와 5.5에서 거의 유사한 수준으로 높게 나타났으며, 총 엽산 생성은 pH 4.5와 5.5에서 24-28  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 의 유사한 수준으로 관측되었고, 6.5에서는 이보다 낮은 14-18  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 으로 관측되었다. 하지만 최대 엽산 생성 시간이 지난 후, 모든 조건에서 엽산의 농도가 감소하는 경향을 보였다. 이러한 경향성은 공동 배양의 엽산 생성 결과 및 저지방 우유배지에서 *S. thermophilus*의 엽산 생성능력을 연구한 Lin과 Young(5)의 경우에서와 같이, 엽산을 생성하는 균주일지라도 최대 생성시간 이후에는 합성된 엽산을 소비하여 농도가 감소한다는 연구결과와 유사함을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 엽산 생성 능력이 우수한 유산균 *L. plantarum* Fol 708, *L. reuteri* ATCC 53608, *L. brevis* 651을 선발하였고, 엽산 생성능력이 가장 높은 *L. plantarum* Fol 708을 이용하여 최적 엽산 생성 조건을 찾기 위해, *L. brevis* GABA 100과 공동 배양을 하고, *L. plantarum* Fol 708의 배양 조건 중 pH를 배양 초기부터 고정하여 엽산 생성 농도 변화를 측정하였다. 이러한 조건에서 *L. plantarum* Fol 708의 총 엽산 생성은, FACM 배지에서 배양할 경우, 상업 균주로 이용되는 *S. thermophilus*의 20  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$  (1)과 유사한 약 25  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 의 생성을 보여주었고, 우유 배지에서 공동 배양한 결과에서도, 우유 배지에서 배양한 *S. thermophilus*의 엽산 생산성인 1.5-14  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$  (1)과 유사한 수준인 약 8  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 의 생성을 보여주었다. 성장 초기부터 고정된 pH의 MRS배지에서 배양한 후 측정된 총 엽산 생성도 24-28  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$  수준으로 FACM배지에서 배양할 때 보여준 생성과 유사한 수준으로 측정되었다. 이러한 결과를 통해 *L. plantarum* Fol 708을 이용한 엽산 생성과, 배양조건의 조절을 통한 엽산 생성 증가가 가능하다는 것을 확인하였다. 본 연구에서 선발된 높은 엽산 생성을 보여준 *L. plantarum* Fol 708은 유제품을 이용한 엽산 제품뿐 아니라 한국의 전통 음식인 김치 등을 포함한 다양한 발효 식품의 개발 및 응용에 활용할 수 있을 것이다.

## 요 약

본 연구에서는 총 65균주의 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*로부터 엽산 생성능력이 있는 11균주의 *Lactobacillus*를 1차 선정하였다. 그 중 microbiological assay를 통해 엽산 생성능력이 가장 우수한 것으로 선발된 *L. plantarum* Fol 708을 이용하여, 우유배지에서 *L. brevis* GABA 100과의 공동배양 및 배양 pH를 일정하게 유지한 후, 각각의 pH조건에서 균체 내부 및 배양 상등액의 엽산 생성과 균체량을 측정하였다. 공동 배양은 1% glutamic acid가 첨가된 우유배지에 균주를 각각 1% (v/v) 접종하여 발효시켰으며, *L. plantarum* Fol 708과 *L. brevis* GABA 100의 접종비율이 1:1에서 가장 높은 엽산 생성(약 8  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ )을 보여주었다. 배양 pH를 일정하게 유지한 후 균체량과 엽산 생성을 측정한 경우, 균체량은 pH 4.5에서 가장 높게 측정되었고, 총 엽산 생성은 pH 5.5에서 가장 높게 측정되었다. 본 연구에서 선발한 *L. plantarum* Fol 708을 이용하면 엽산 함량이 높은 다양한 발효 식품의 개발에 도움이 될 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청의 차세대바이오그린 21 사업(과제번호: 009543)과 농림축산식품부의 고부가가치식품기술개발사업(과제번호: 113018-3)에 의해 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

## References

1. LeBlanc JG, Giori GS, Smid EJ, Hugenholtz J, Sesma F. Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms. *Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol.* 1: 329-339 (2007)
2. Sybesma W, Starrenburg M, Tijsseling L, Hoefnagel MN, Hugenholtz J. Effects of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4542-4548 (2003)
3. D'Aimmo MR, Mattarelli P, Biavati B, Carlsson NG, Andlid T. The potential of bifidobacteria as a source of natural folate. *J. Appl. Microbiol.* 112: 975-984 (2012)
4. Nor NM, Mohamad R, Foo HL, Rahim RA. Improvement of folate biosynthesis by lactic acid bacteria using response surface methodology. *Food Technol. Biotechnol.* 48: 243-250 (2010)
5. Lin MY, Young CM. Folate levels in cultures of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 10: 409-413 (2000)
6. Arcot J, Shrestha AK, Gusanov U. Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. *Food Control* 13: 245-252 (2002)
7. Horne DW, Patterson D. *Lactobacillus casei* microbiological assay of folic acid derivatives in 96-well microtiter plates. *Clin. Chem.* 34: 2357-2359 (1988)
8. Garratt LC, Ortori CA, Tucker GA, Sablitzky F, Bennett MJ, Barrett DA. Comprehensive metabolic profiling of mono- and polyglutamated folates and their precursors in plant and animal tissue using liquid chromatography/negative ion electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 2390-2398 (2005)
9. Hyun TH, Tamura T. Trienzyme extraction in combination with microbiological assay in food folate analysis: an updated review. *Exp. Biol. Med.* 230: 444-454 (2005)
10. Vishnumohan S, Arcot J, Pickford R. Naturally-occurring folates in foods: Method development and analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Food Chem.* 125: 736-742 (2011)
11. Rossi M, Amaretti A, Raimondi S. Folate production by probiotics bacteria. *Nutrients* 3: 118-134 (2011)
12. Laino JE, Leblance JG, Savoy de Giori G. Production of natural folates by lactic acid bacteria starter cultures isolated from artisanal Argentinean yogurts. *Can. J. Microbiol.* 58: 581-588 (2012)
13. Vora A, Riga A, Dollimore D, Alexander KS. Thermal stability of folic acid. *Thermochim. Acta.* 392: 209-220 (2002)
14. Gujska E, Michalak J, Klepacka J. Folate stability in two types of rye breads during processing and frozen storage. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64: 129-134 (2009)
15. Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D, Rossi M. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotics property. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 179-185 (2007)
16. DeVries JW, Rader JI, Keagy PE, Hudson CA, Anqyal G, Arcot J, Castelli M, Doreau N, Hudson C, Lawrence P, Martin J, Peace R, Rosner L, Strandler HS, Szpylka J, van den Berq H, Wo C, Wurz C. Microbiological assay-tri-enzyme procedure for total folate in cereals and cereal foods: collaborative study. *J. AOAC Int.* 88: 5-15 (2005)
17. Gutzeit D, Monch S, Jerz G, Winterhalter P, Rychlik M. Folate content in sea buckthorn berries and related products (*Hippophae*

- rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*): LC-MS/MS determination of folate vitamer stability influenced by processing and storage assessed by stable isotope dilution assay. Anal. Bioanal. Chem. 391: 211-219 (2008)
18. Chen L, Eitenmiller RR. Single laboratory method performance evaluation for the analysis of total food folate by trienzyme extraction and microplate assay. J. Food Sci. 72: 243-247 (2007)
  19. Goli DM, Vanderslice JT. Investigation of the conjugase treatment procedure in the microbiological assay of folate. Food Chem. 43: 57-64 (1991)
  20. Ringling C, Rychlik M. Analysis of seven folates in food by LC-MS/MS to improve accuracy of total folate data. Eur. Food Res. Technol. 236: 17-28 (2013)